



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

**UNIDAD IRAPUATO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA**

“¿La domesticación afecta los rasgos de la defensa indirecta?
Estudios comparativos de la secreción del néctar extrafloral
en diferentes variedades de frijol común.”

Tesis que presenta

IBQ. Ana Gabriela López Pérez

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
En la especialidad de
Biología de Plantas.

Directores de la tesis: Dr. Martin Heil y Dr. Milan Janda.

Irapuato, Gto.

Diciembre 2017

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ecología de Plantas del Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV-Irapuato, fue dirigido por el Dr. Martin Heil y el Dr. Milan Janda, asesorado por el Dr. Alfredo Herrera Estrella y el Dr. Victor Olalde Portugal y financiado por CONACYT (Beca 339248).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico otorgado con la beca número 339248.

A los Doctores de CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato por la formación académica recibida.

Al Dr. Martin Heil por permitirme ser parte de su equipo de laboratorio, por su apoyo y consejos durante todo el proyecto, sobre todo en la redacción de la tesis, muchas gracias.

Al Dr. Milan Janda, al Dr. Alfredo Herrera Estrella y al Dr. Victor Olalde Portugal por el apoyo, sus observaciones y sugerencias durante todo el proyecto.

A la Ing. Agr. Rosa María Adame Álvarez por su valiosa ayuda en la fase experimental.

Al personal de invernaderos, de mantenimiento y administrativo por facilitarme la estancia en el CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Al laboratorio de Química de Productos Naturales, en especial al Dr. Molina por su apoyo durante la fase experimental y por el tiempo y equipo brindado en el desarrollo del proyecto. También al MC. Enrique Ramírez Chávez por el apoyo en los experimentos realizados, los consejos y aportaciones a lo largo del desarrollo del proyecto.

A las compañeras y los compañeros del laboratorio de Ecología de Plantas: Ariana, Elizabeth, Ithaí, Omar, Francisco, Xicotencatl, Iris, Alex y en especial a Chayo, que durante el proyecto con sus comentarios fueron enriqueciendo más el proyecto.

A todos mis compañeros de generación y amigos, que a lo largo de este proyecto hicieron el camino más agradable y llevadero, gracias por sus comentarios y todos los buenos momentos (Marianita, Paco, Pablo Moo, Christian, Ernesto, Julián y Ana Laura).

A Pablo Peláez, por todo el apoyo y sugerencias en la escritura y parte experimental, muchas gracias por las aportaciones y la paciencia.

A todas las personas que con su amistad y compañía contribuyeron a que esta estancia fuera más agradable.

DEDICATORIA

Con profundo cariño a mi familia, especialmente a mis padres, que a pesar de las circunstancias me han enseñado a no abandonar mis sueños. Los amo, esto es por ustedes.

A mis hermanos, que con una palabra me alientan a seguir adelante y demuestran el gran cariño que hay entre nosotros.

Gracias

ABREVIATURAS

NEF	Nectar extrafloral
NF	Nectar floral
AJ	Ácido Jasmónico
AS	Ácido Salicílico
CG-EM	Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
Glu	Glucosa
Fru	Fructosa
Sac	Sacarosa
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
Mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
Rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

Las plantas secretan nectar extrafloral (NEF) como mecanismo de defensa indirecta contra herbívoros el cual atrae insectos “benéficos”: los enemigos naturales de los herbívoros. Esta secreción es inducida después de daño, ya sea mecánico o por herbívoros, y se puede inducir de manera artificial por la aplicación exógena de ácido jasmónico (AJ). La secreción del NEF involucra la actividad de una enzima clave: la invertasa de pared celular, encargada de hidrolizar la sacarosa en fructosa y glucosa. Se ha encontrado en múltiples estudios que la domesticación afecta de manera negativa diferentes rasgos de defensa. El presente estudio se enfocó en investigar el efecto de la domesticación en la secreción de NEF en el frijol común, *Phaseolus vulgaris*. Para ello, se cuantificó la secreción de NEF de distintas variedades (domesticadas y silvestres). Se seleccionaron cuatro variedades (dos silvestres y dos domesticadas) y sobre ellas se realizaron tratamientos de aspersión en hojas con AJ bajo condiciones de invernadero. Se cuantificó la cantidad de NEF secretado durante 24 h, la actividad de la invertasa y la cantidad de azúcares presentes en el NEF (glucosa, fructosa y sacarosa). Se encontró un aumento en la secreción de NEF en las variedades domesticadas. La secreción de NEF en las variedades silvestres se mostró muy variable y se observó un aumento en la secreción en plantas tratadas con AJ durante la noche. Para la actividad de la invertasa no se pudo detectar una respuesta significativa a la aplicación exógena de AJ, aunque la invertasa en general se mantuvo más activa durante el día. Se observó una relación positiva en cuanto a la actividad de la enzima con la cantidad de NEF secretado en variedades domesticadas y silvestres, así como la cantidad de azúcares presentes en el NEF (glucosa, fructosa y sacarosa). Con los datos obtenidos se tiene un primer acercamiento a la secreción de NEF en variedades domesticadas y silvestres, así como en la composición química que tiene cada variedad a distintas horas del día. También se tiene el comportamiento de la invertasa durante 24 h en plantas tratadas con AJ, un elemento central en la secreción del NEF aún poco estudiado. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren el incremento de un rasgo defensivo indirecto (la secreción de NEF) y parece ser el primer reporte donde la domesticación tiene un efecto positivo en un rasgo defensivo indirecto de una planta domesticada.

ABSTRACT

Many plants secrete extrafloral nectar (EFN) as an indirect defense mechanism against herbivores that acts via the attraction of 'beneficial' insects. The secretion of EFN in most plants is induced after mechanical damage or herbivory, and can be elicited experimentally via the application of jasmonic acid (AJ). A central enzyme that controls nectar flow is cell wall invertase, hydrolyzing sucrose into fructose and glucose. Domestication has been reported to negatively affect different defense traits. However, little is known about the effects of domestication on indirect defenses, such as EFN. The present study investigated whether domestication had an effect on the EFN secretion by common bean (*Phaseolus vulgaris*). The EFN secretion of various common bean varieties (domesticated and wild) was quantified and four varieties (two wild and two domesticated) were selected and exposed to spray treatments with AJ under greenhouse conditions to quantify the temporal response in the secretion of EFN over the following 24 h, the activity of the invertase, and the amount of sugars present in the EFN (glucose, fructose and sucrose). An increase in the secretion of EFN in the domesticated varieties was found. The secretion of EFN during 24 hours in the wild varieties was very variable and an increase in the secretion was observed in plants treated with AJ during the night. The activity of the invertase did not show a detectable response to the exogenous application of AJ and in general, remained more active during the day, showing a relationship of the activity of the enzyme with the amount of EFN secreted as well as the amount of sugars present in the NEF (glucose, fructose and sucrose). With the data obtained we have a main approach to the secretion of EFN in domesticated and wild varieties and its relation to the invertase, a central element in the secretion of NEF that has received little attention so far. The results of the present study suggest an increase of a defensive trait (EFN secretion) and appear to be the first report on a positive effect of domestication on a defensive trait.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Defensas en plantas.....	1
1.2 Nectar extrafloral como mecanismo de defensa indirecta.....	2
1.3 Nectarios: glándulas especializadas en la secreción del néctar.....	2
1.4 Composición química del NEF y función.....	4
1.5 Mecanismo de secreción del NEF.....	7
1.6 La invertasa tiene un rol importante en la secreción del NEF	9
1.7 Inducción del NEF	10
1.8 Papel del AJ en la inducción del NEF	10
1.9 Phaseolus vulgaris como modelo de estudio	11
1.10 Antecedentes	13
2. HIPÓTESIS.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Localización del área de trabajo.....	18
4.2 Material biológico y condiciones de crecimiento	18
4.3 Cuantificación de NEF total a las 24 h	20
4.4 Cuantificación de la secreción temporal de NEF.....	21
4.5 Determinación de la actividad de invertasa.....	22
4.6 Análisis de azúcares	23
5. RESULTADOS	25
5.1 Cuantificación de NEF en variedades silvestres y domesticadas.	25
5.2 Curvas de secreción de las variedades seleccionadas.....	28
5.2.1. Variedades domesticadas	28
5.2.2 Variedades silvestres.....	31

5.3	La actividad de invertasa en las variedades silvestres y cultivadas.	34
5.3.1	Variedades domesticadas	34
5.3.2	Variedades silvestres.....	37
5.4	Cuantificación de azúcares de las variedades seleccionadas.....	40
5.4.1	Variedades domesticadas	40
5.4.2	Variedades silvestres.....	44
6.	DISCUSIÓN.....	49
6.1.	Factores involucrados en la secreción del nectar	52
6.1.1.	NEF no es siempre inducible por daño o la aplicación exógena de AJ 52	
6.1.2.	COV's.....	54
6.1.3.	Infestación o infecciones	54
6.1.4.	Dependencia del consumo	55
6.1.5.	Reabsorción.....	56
6.1.6.	Dependencia de condiciones de luz	57
7.	CONCLUSIONES	60
8.	PERSPECTIVAS	61
9.	REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de los nectarios extraflorales en la planta.	3
Figura 2. Composición química del NEF y organismos implicados.....	6
Figura 3. Mecanismo propuesto de secreción del NEF.....	8
Figura 4. Secreción de NEF de distintas variedades de frijol.....	14
Figura 5. Curva de la actividad de invertasa en frijol (variedad FJM).....	23
Figura 6. Secreción de NEF de frijol común en temporada Otoño - Invierno. ...	26
Figura 7. Secreción de NEF en temporada Primavera-Verano.....	27
Figura 8. Secreción temporal de NEF en la variedad criolla NSL.. ..	29
Figura 9. Secreción temporal de NEF en la variedad domesticada FJM	30
Figura 10. Plantas tratadas con AJ secretan mayor cantidad de NEF durante la noche en la variedad silvestre Pv11.....	32
Figura 11. Secreción temporal de NEF en la variedad silvestre Pv27.. ..	33
Figura 12. Cuantificación de la actividad de invertasa en la variedad criolla NSL.	35
Figura 13. La actividad de la enzima invertasa aumenta en plantas inducidas con AJ durante el día en la variedad domesticada FJM.....	36
Figura 14. La actividad de invertasa se ve aumentada en plantas control durante el día en la variedad silvestre Pv11.....	38
Figura 15. Cuantificación de la actividad de invertasa en la variedad silvestre Pv27.....	39
Figura 16. La mayor cantidad de azúcares en la variedad criolla NSL se encontró 24 h después de aplicar los tratamientos.	41
Figura 17. Plantas no tratadas secretan mayor cantidad de azúcares en la variedad domesticada FJM.	43
Figura 18. Cantidad de azúcares en el NEF de la variedad silvestre Pv11.....	45
Figura 19. La secreción de NEF en plantas inducidas se da en mayores cantidades durante la noche en la variedad silvestre Pv27.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Material vegetal utilizado.	19
Tabla 2. Influencia de la variedad y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF de distintas variedades de frijol común. Temporada Otoño – Invierno.....	26
Tabla 3. Influencia de la variedad y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF de distintas variedades de frijol común. Temporada Primavera – Verano.....	28
Tabla 4. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad criolla NSL.....	29
Tabla 5. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad domesticada FJM.	31
Tabla 6. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad criolla silvestre Pv11.....	32
Tabla 7. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad silvestre Pv27.....	34
Tabla 8. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad criolla NSL.....	35
Tabla 9. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad domesticada FJM.	37
Tabla 10. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad silvestre Pv11.	38
Tabla 11. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad silvestre Pv27.	40
Tabla 12. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad criolla NSL.	42

Tabla 13. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad domesticada FJM.	44
Tabla 14. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad silvestre Pv27.	46
Tabla 15. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad silvestre Pv11.	48
Tabla 16. Especies en las cuales se ha observado una inducción de NEF por la aplicación AJ.	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Defensas en plantas

Como organismos sésiles, las plantas se encuentran expuestas a una gran diversidad de organismos, los cuales pueden generar daño o causar algún efecto benéfico. Para contrarrestar el daño, las plantas han desarrollado una extensa variedad de defensas, las cuales se pueden clasificar de manera general en defensas constitutivas e inducibles y cada una a su vez en directas e indirectas (Gatehouse, 2002; Kessler & Baldwin, 2002; Mithöfer & Boland, 2012).

Las defensas constitutivas se encuentran siempre presentes. Algunas actúan de manera directa contra el agresor, y entre ellas se encuentran: tricomas, espinas, altos niveles de lignificación o algunos metabolitos especializados de ciertos tejidos que pueden ser tóxicos (Duke et al., 2000). Las defensas indirectas actúan mediante la atracción de organismos de otro nivel trófico (Heil, 2008). Como ejemplo de las defensas constitutivas que actúan de manera indirecta se encuentran los domacios. Los domacios son pequeñas estructuras que se encuentran en la cara inferior de las hojas de diversas plantas. Se ha descrito que brindan hospedaje a hormigas o ácaros con los cuales forman una relación simbiótica, generando así beneficios a la planta huésped (Walter, 1996)

Las defensas inducibles son aquellas cuya expresión es inducida por ciertos agresores, donde la planta es capaz de reconocer distintos herbívoros por medio de señales intracelulares cuando ésta es dañada (Leitner et al., 2005; Maffei et al., 2007a; 2007b). Por ejemplo, muchos compuestos orgánicos volátiles (COV's) actúan como defensa inducible indirecta, ya que son liberados después de aplicar daño mecánico o biológico. Dependiendo del tipo de daño y el tipo de herbívoro, es el tipo de compuestos que se liberan (Turlings et al., 1990; Rose et al., 1996; Kessler & Baldwin, 2001; van Poecke & Dicke, 2004; Leitner et al., 2005; Mithöfer et al., 2005; Hilker & Meiners, 2006). Otro ejemplo de este tipo de defensa es la secreción de néctar extrafloral (NEF). Mientras el néctar floral (NF) es secretado dentro de las inflorescencias y está relacionado con polinización, el néctar extrafloral es secretado

(en su mayoría) fuera de las inflorescencias y sirve como defensa indirecta para la planta, intensificando interacciones tritróficas con carnívoros depredadores de los herbívoros de la planta (Elias, 1983; Heil, 2008, 2011). En particular, el NEF sirve como mediador de interacciones entre plantas y sus defensores (Heil et al., 2004; Kost & Heil, 2005). Este NEF sirve como alimento, atrayendo hormigas, u otros depredadores generalistas o también de parasitoides que defienden a la planta como intercambio del recurso por defensa (con excepción de los parasitoides o robadores de néctar; Nicolson et al., 2007; Heil, 2011; Mithöfer & Boland, 2012; Heil, 2015).

1.2 Nectar extrafloral como mecanismo de defensa indirecta

Muchos estudios han reportado la secreción NEF como mecanismo de defensa indirecto. Por ejemplo, se ha observado una correlación positiva entre el aumento de la secreción de NEF y el aumento en la defensa contra herbívoros (aumento en la cantidad de hormigas foráneas en plantas dañadas o inducidas) en diferentes especies de plantas como frijol lima (*Phaseolus lunatus*; Kost & Heil, 2005; Hernandez-Cumplido et al., 2016), *Macaranga tanarius* (Heil et al., 2001), plantas de Acacia (Marcia González-Teuber et al., 2012), *Solanum dulcamara* (Lortzing, Calf, Böhlke, Schwachtje, Kopka, Geuß, Kosanke, Kopka, et al., 2016), *Senna mexicana* (I. M. Jones & Koptur, 2015a), entre otras.

1.3 Nectarios: glándulas especializadas en la secreción del néctar

Las primeras referencias que se tienen sobre el término “nectario” datan de 1735, cuando Linneo observó tejidos especializados que secretaban néctar y acuñó el término (Linnaeus, 1735). La primer diferencia funcional y topográfica entre nectarios florales y extraflorales se propuso en 1848 por el Dr. Caspary. A partir de las distinciones de néctar floral y extrafloral, los primeros trabajos sobre néctar extrafloral comienzan a realizarse (Belt, 1874; Fidgor, 1891). En los siguientes años (1900s) se comienza a enfocar la investigación en la estructura y taxonomía de los nectarios (Fahn, 1988; Daguillón y Coupin, 1903). Se inician, además, investigaciones sobre la composición del néctar relacionada con las interacciones

planta-animal, en algunos estudios se comienza a discutir si las hormigas confieren defensa a la planta (Delpino, 1886; Nieuwenhuis von Uexküll-Güldenband, 1906).

Los nectarios extraflorales son glándulas donde se secreta el NEF. Varían en tamaño y tipo, pero generalmente tienen forma de “bebedero”, plato o parecidos a una cúpula, aunque existen casos en los que no se puede observar un tejido secretorio especializado (Elias, 1983; Pate et al., 1985; Fahn, 1988). En este caso, los nectarios pueden solamente ser identificados como áreas donde el néctar aparece en la superficie de la planta (Frey-Wyssling and Hausermann, 1960; Lortzing et al., 2016; Mathur et al., 2013). Los nectarios extraflorales suelen tener diversas formas. En general, los nectarios extraflorales están conectados al floema y al xilema o solo al floema (Koptur, 1992 y referencias ahí citadas).

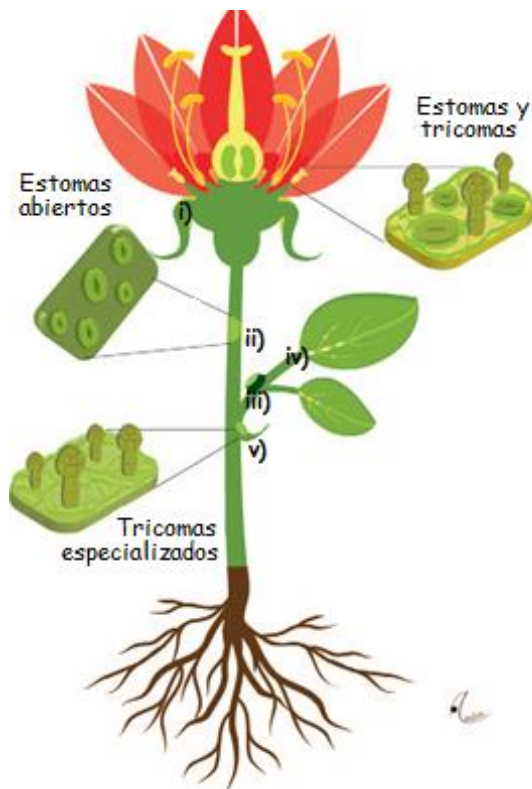


Figura 1. Localización de los nectarios extraflorales en la planta. Los nectarios extraflorales pueden estar localizados en el interior o en la superficie de los sépalos (i), en los brotes (ii), en los tallos de las hojas (iii), en la base de las hojas (iv) o en los estípulos (v). La secreción se lleva a cabo por estomas que se encuentran siempre abiertos, tricomas especializados o la combinación de ambos. Tomado y modificado de Heil (2011) *Trends Plant Science*.

Los nectarios están conformados por estomas siempre abiertos, tricomas especializados o la combinación de ambos (Fahn, 1988; Wist & Davis, 2005). Se

encuentran localizados alrededor de toda la planta, dependiendo de la especie, con excepción de las raíces (

Figura 1). Además, se encuentran generalmente fuera de las inflorescencias, aunque algunas veces se secreta NEF en las inflorescencias (Heil, 2011, 2015).

1.4 Composición química del NEF y función

El NEF es una solución líquida que contiene en su mayoría azúcares, como son glucosa, fructosa y sacarosa, en menor cantidad contiene aminoácidos libres, COV's, lípidos, proteínas y algunos otros metabolitos secundarios. Entre los organismos que puede atraer el NEF se pueden encontrar: hormigas (en el caso de plantas mimerozófitas, que producen néctar para atraer hormigas) u otros y depredadores de los herbívoros de las plantas, e insectos parásitos (Figura 1; Koptur, 1992; Wäckers & Bonifay, 2004; Heil, 2008b).

El término atrayente que se le da a ciertos compuestos presentes en el néctar, ha sido utilizado por algunos biólogos para describir la función que tiene el néctar inicialmente en polinizadores de flores, pero desde que el néctar es descubierto después de que los insectos son atraídos por algunas otras características (visuales, olores, o movimientos), el término recompensa se considera es el más apropiado (Koptur, 1992).

Muchos nectarios extraflorales son coloridos, proporcionando una señal visual a los insectos para localizar el néctar (Algunas especies como *Vicia*, *Pteridium*, *Costus*, *Cassia*, *Lysiloma*). En algunos otros, la presencia de "gotas brillantes" proveen un estímulo visual (Koptur, 1992). Además, los COV's liberados pueden servir como una señal que guía a predadores y parasitoides foráneos a alimentarse de herbívoros (Turlings et al., 1990; Paré & Tumlinson, 1997). La composición de la mezcla de volátiles liberada por la inducción de herbívoros, depende no solamente de la especie de la planta o cultivar, sino también de la especie y el estado larval del herbívoro (Arimura et. al., 2005).

Actualmente, ya se conoce la función que tienen algunos de los componentes principales del NEF (Nicolson et al., 2007; González-Teuber et al., 2009). Los

primeros trabajos sobre la composición del néctar son de 1927, que tratan sobre el contenido proteico del néctar (Buxbaum, 1927). Posteriormente se comienzan a analizar los mecanismos de secreción y el contenido de carbohidratos presentes en el néctar (Shuel, 1952). A la par, comienzan las investigaciones sobre la actividad de la enzima invertasa en néctar (Frey-Wyssling et al., 1954; Zimmermann, 1954), así como el contenido e importancia de los aminoácidos en el néctar (Baker et al., 1978b; Baker and Baker, 1973; Koptur, 1979; Pate et al., 1985; Ruffner and Clark, 1986; Smith et al., 1990)

De manera general, los componentes químicos del NEF tienen dos funciones principales. Una función es atraer insectos benéficos, por ejemplo, hormigas que defienden a la planta a cambio de alimento (NEF). Se sabe que en el NEF se encuentran compuestos orgánicos volátiles (COV's) que son emitidos para atraer a diferentes tipos de consumidores (Nicolson et al., 2007; Martin Heil, 2011, 2015).

Los principales solutos encontrados en muchos de los néctares son proporciones variables de sacarosa, glucosa y fructosa (Frey-Wyssling, 1955). Aunque las concentraciones de azúcares son más altas que las de aminoácidos en el NEF, los aminoácidos se han detectado en todos los néctares analizados hasta la fecha y se sabe que son una fuente clave de nitrógeno para organismos mutualistas (Baker and Baker, 1973; Baker et al., 1978a; Pate et al., 1985; Ruffner & Clark, 1986; Smith et al., 1990; Blüthgen & Fiedler, 2004; Nicolson et al., 2007; Heil, 2011, 2015). Además, se ha propuesto que proveen sabor al néctar (Gardener & Gillman, 2002).

El néctar necesita ser químicamente atractivo en su composición y concentración para satisfacer las necesidades nutricionales del tipo de insectos que atrae, así, su composición estará definida de acuerdo con el tipo de insectos que atrae y a la especie de la planta.

La segunda función que tienen los componentes químicos del néctar es proteger contra robadores de néctar o microorganismos que infectan el néctar (González-Teuber & Heil, 2009a, 2009b). Las nectarinas (nombre que se designó a las proteínas del néctar) o la gelsemina, son compuestos considerados como repelentes de ciertos organismos (Carter & Thornburg, 2004; Carter et al., 2007;

González-Teuber et al., 2009; 2010; Kram et al., 2008). Por ejemplo, en el néctar floral de tabaco (*Nicotiana spp.*) se han encontrado nectarinas que están involucradas en el ciclo redox, produciendo altos niveles de peróxido de hidrógeno que aseguran que el néctar permanece libre de microorganismos (Carter & Thornburg, 2004). En otro estudio realizado, se observó que en el NEF de plantas de acacias mimercofíticas se encontraron más de 50 proteínas, de las cuales algunas resultaron ser enzimas PR, incluyendo quitinasas, β -1,3-glucanasas y peroxidasas, que actúan directamente contra patógenos. Además realizando ensayos in vitro no se observó el crecimiento de hongos en placas petri con muestras de NEF fresco y agar extracto de malta (González-Teuber et al., 2009; Orona-Tamayo et al., 2013).

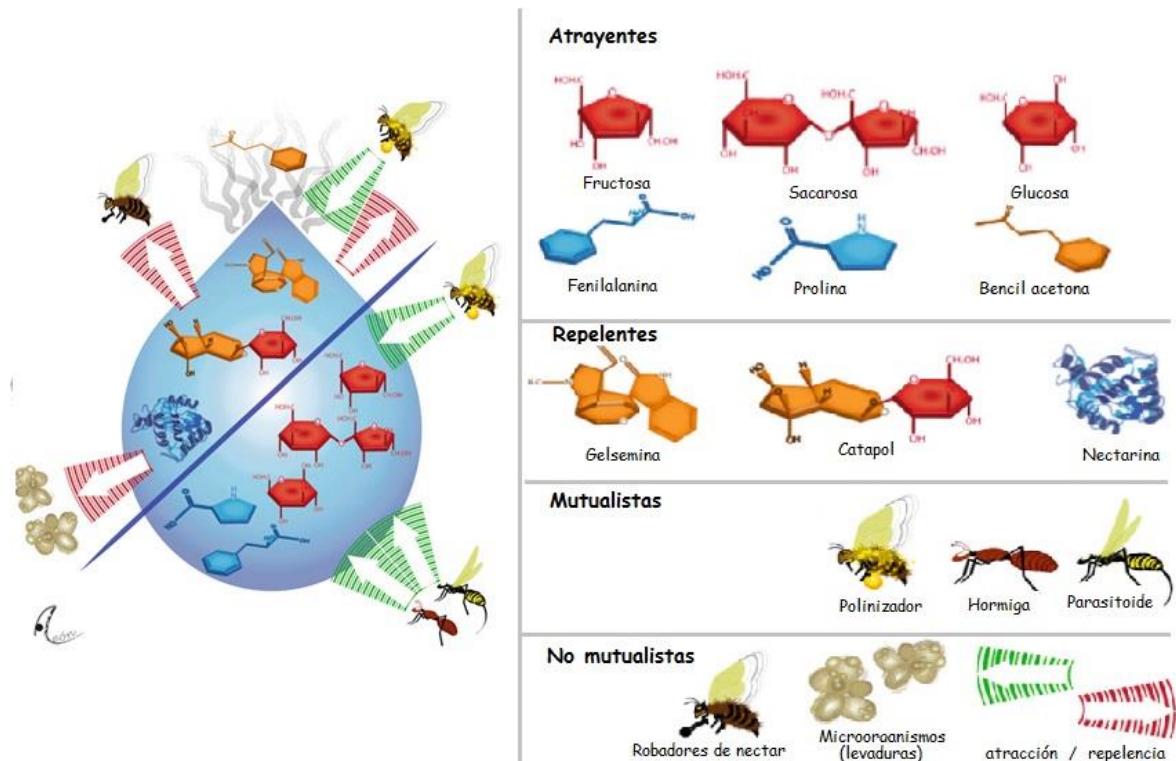


Figura 2. Composición química del NEF y organismos implicados. El néctar de manera general se cree que cumple dos funciones: para atraer insectos (como los polinizadores en el caso del néctar floral, parasitoides o defensores contra herbívoros de la planta) y para proteger contra organismos que infectan el néctar o robadores de néctar. Tomado y modificado de Escalante-Pérez y Heil (2012) *Signalling and Communication in Plants*.

Diversos estudios en diferentes especies demuestran que el néctar se produce durante ritmos diurnos y sólo en algunas pocas especies se han reportado que lo secretan de manera nocturna (Heil et al., 2000; Radhika et al., 2010; González-Teuber et al., 2012; Millán-Cañongo et al., 2014; Jones & Koptur, 2015). Se cree que esta secreción está adaptada a la actividad de los consumidores (Corbet & Delfosse, 1984; Heil et al., 2000; Kuo & Pate, 1985; Tilman, 1978), y el mecanismo de secreción depende de la especie, de la fisiología de la planta, del tipo de nectario, etc.

1.5 Mecanismo de secreción del NEF

A pesar de que se han logrado avances significativos en el estudio de los componentes químicos del NEF, aún se tienen teorías que no han sido comprobadas del todo, de cómo se lleva a cabo la síntesis de sus componentes y la secreción. Se sabe que el tejido del nectario está conectado con la vasculatura del floema y se cree que la mayoría de los componentes del néctar provienen del flujo del floema, aunque no se ha comprobado cómo se lleva a cabo este transporte. Se ha propuesto que este transporte podría llevarse a cabo por vía simplástica o apoplástica. Se ha observado una diferencia en la concentración y tipos de compuestos encontrados en el tejido del nectario y floema, lo que ha ayudado a elucidar que muchos de los compuestos presentes en el NEF se sintetizan en tejido del nectario (Fahn, 1988; Gaffal et al., 2007; Kram & Carter, 2009; Vassilyev, 2010).

En algunos estudios se ha observado que el néctar es reabsorbido cuando no se consume (Pederson et al., 1958; Nicolson, 1995; Nepi y Stpiczyńska, 2008; Escalante-Pérez et al., 2012; Cardoso-Gustavson y Davis, 2015). El primer trabajo se reportó en néctar floral, marcando sacarosa con C¹⁴ en nectarios de alfalfa (Pederson et al., 1958). Aunque se ha demostrado este proceso en el NF de varias especies, aún son pocos los trabajos en los que se ha observado este proceso en néctar extrafloral (Escalante-Pérez et al., 2012; Cardoso-Gustavson y Davis, 2015).

Se ha propuesto un mecanismo de secreción de NEF, donde la formación y secreción del NEF requieren de tres pasos esenciales:

1. Carga de carbohidratos y almacenamiento. La mayoría de los carbohidratos se transportan como sacarosa desde el floema hacia el tejido del nectario. En el nectario se almacenan algunos carbohidratos en vacuolas (Ruhlmann et al., 2010)
2. Procesado del néctar y síntesis de otros componentes (como lípidos y proteínas). En el tejido del nectario se lleva a cabo la síntesis (en aparato de Golgi y mitocondria) y almacenamiento (en vacuolas y amiloplastos) del almidón, de algunos lípidos, así como de las nectarinas (proteínas). Se sintetizan además algunos otros carbohidratos y se comienzan a formar el pre-néctar (Kuo & Pate, 1985; Stpiczynska et al., 2005; Wist & Davis, 2005).
3. Secreción. El pre-néctar es secretado cuando se induce por diversos mecanismos (Figura 3).

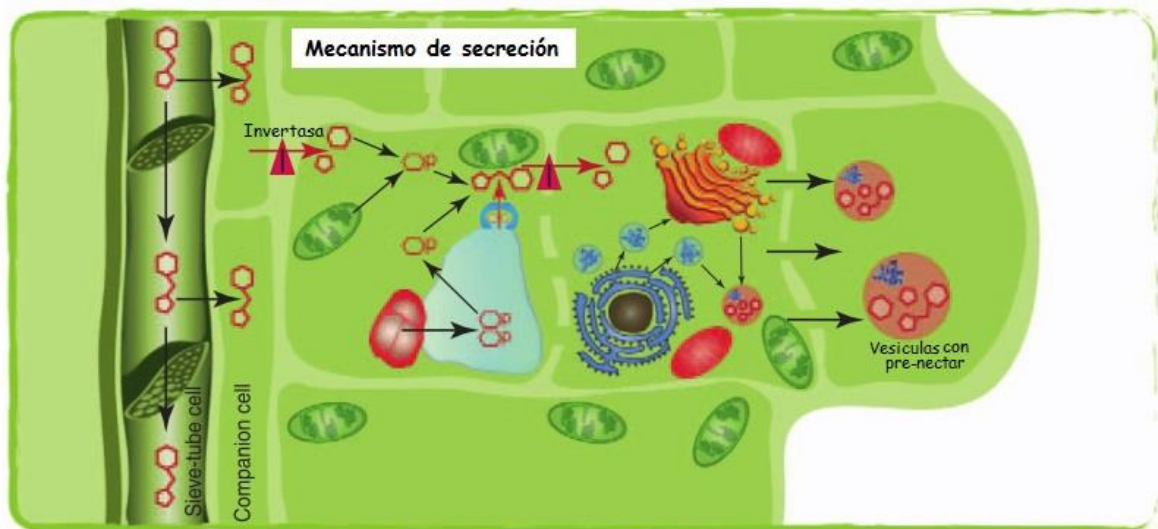


Figura 3. Mecanismo propuesto de secreción del NEF. En el proceso de secreción del néctar extrafloral la mayoría de los carbohidratos provienen del floema y pasan al tejido del nectario con ayuda de las invertasas de pared celular. En el tejido del nectario se sintetizan algunos otros componentes como lípidos y proteínas (y algunos otros carbohidratos) y se forman vesículas de pre-néctar. La secreción final se da por la inducción de factores externos (daño, aplicación de hormonas como el AJ, etc.). Tomado y modificado de Heil (2011) *Trends Plant Science*.

En algunos de los pasos anteriores se requiere la participación de una enzima clave: la invertasa. Esta enzima se encarga de hidrolizar sacarosa en glucosa y

fructosa. Esta acción tiene dos efectos: (1) Crear una fuerza impulsora constante para exportar sacarosa y (2) crea un potencial de agua negativo (una molécula de disacárido se hidroliza en dos monosacáridos) causando que el agua se mueva hacia los azúcares, formando así gotas de néctar (Ruhlmann et al., 2010). Por tanto, está involucrada en la carga de sacarosa del floema hacia el tejido del nectario, la hidrólisis de la sacarosa en el nectario para mantener glucosa y fructosa en el pre-néctar que se forma, y también es importante para que se lleve a cabo la secreción del néctar (Kram & Carter, 2009; Ruhlmann et al., 2010)

1.6 La invertasa tiene un rol importante en la secreción del NEF

Las invertasas son enzimas (EC.3.2.1.26) que hidrolizan de manera irreversible la sacarosa en glucosa y fructosa. Hasta ahora, se han identificado 3 tipos de invertasas: invertasas alcalinas / neutrales (A/NInv) y dos tipos de invertasas ácidas; la invertasa de pared celular (por sus siglas en inglés CWIN: Cell Wall Invertase) y la invertasa vacuolar (invertasa vacuolar IV). Las invertasas alcalinas / neutrales se encuentran localizadas ya sea en el citosol, mitocondria o en los plastidios. La invertasa de pared celular se encuentra unida a la pared celular y la invertasa vacuolar se encuentra en el espacio vacuolar (Tauzin & Giardina, 2014).

La actividad de invertasa en el néctar y en nectarios fue observada por primera vez en el año de 1950 (Zimmermann, 1953). Un año más tarde, Frey-Wyssling y colaboradores reportaron la actividad de esta enzima en nectarios florales (Frey-Wyssling et al., 1954).

Se ha demostrado en diversos estudios que la actividad de invertasa de pared celular tiene un rol importante en la carga de sacarosa del floema al nectario en el proceso de secreción: por ejemplo, en nectarios florales de *Arabidopsis* se observó una expresión alta de AtCWINV4, un gen que codifica la invertasa de pared celular 4 (CWIN4). En plantas donde se suprimió este gen, no se observó secreción del néctar y se encontró que las mutantes almacenaron almidón en el receptáculo (Ruhlmann et al., 2010). Así mismo, en nectarios extraflorales de *Acacia cornígera* se observó la expresión activa de CWIN4 en las hojas antes de la secreción de NEF, y se observó también esta actividad en el tejido del nectario durante el proceso de

secreción (Orona-Tamayo et al., 2013). En plantas de *Ricinus communis* la enzima invertasa se mostró más activa antes del pico máximo de secreción de NEF y se observó un decremento en su actividad cuando disminuyó la secreción de NEF (Millán-Cañongo et al., 2014).

1.7 Inducción del NEF

La secreción de NEF puede ser afectada por factores externos como es daño por herbivoría, daño mecánico, o por la aplicación exógena de ácido jasmónico. Esto se ha observado en más de diez especies de plantas de seis diferentes familias (Heil et al., 2001; Heil, 2004; Radhika et al., 2008; Millán-Cañongo et al., 2014; Jones & Koptur, 2015; Hernandez-Cumplido et al., 2016; Lortzing et al., 2016).

En diversos estudios se ha reportado que al inducir plantas para que produzcan más NEF, se incrementa el número de hormigas que se encuentran en las plantas inducidas, por lo cual, las hormigas atraídas ofrecen protección contra herbívoros (Heil et al., 2001; Hernandez-Cumplido et al., 2016; Jones & Koptur, 2015; Kost & Heil, 2005; Kost & Heil, 2006).

1.8 Papel del AJ en la inducción del NEF

El AJ se ha identificado como una de las hormonas que afectan la secreción tanto de NF como de NEF (Heil et al, 2001; 2004; Radhika et al., 2010; Hernandez-Cumplido et al., 2016). Aplicando de manera exógena ácido jasmónico (AJ) a concentración 1Mm, se incrementó la secreción de NEF en plantas de *Macaranga tanarius* y *Phaseolus lunatus* en condiciones naturales y esto favoreció la protección de las plantas, observando menos daño causado por herbívoros (Heil et al., 2001; Heil, 2004). En el 2014 Millán Cañongo y colaboradores encontraron que induciendo plantas de *Ricinus communis* con AJ se incrementaba la secreción de NEF. En el mismo estudio, se mostró que la enzima invertasa se inducía con la aplicación exógena de AJ y se hizo una correlación a nivel mecanismo entre la aplicación de AJ, la respuesta de la enzima invertasa y la tasa de secreción de NEF. Se sabe por lo tanto, que el AJ tiene un papel importante en la inducción de NEF en diferentes especies, incluyendo la familia de las Fabaceas.

1.9 *Phaseolus vulgaris* como modelo de estudio

La domesticación en plantas es el proceso que resulta de la combinación de la evolución natural y la selección de ciertas características por el hombre. Mediante este proceso se derivan los cultivos domesticados a partir de sus progenitores silvestres que permiten desarrollar cultivos mejor adaptados a diferentes agroecosistemas, fáciles de cosechar y consumir (Zohary, 1999; Gepts, 2010). Algunas características de la domesticación incluyen la pérdida de dispersión de la semilla, hábito de crecimiento determinado, el aumento de tamaño (especialmente de la parte cosechada de la planta), la pérdida de dormancia de las semillas y la pérdida de protección ya sea química o mecánica contra herbívoros (Pickersgill, 2007). Por ejemplo: algunos tuberculos o papas silvestres contienen glucoalcaloides en cantidades que podrían ser tóxicas para los humanos, por el contrario, las papas domesticadas no los tienen (Johns, 1989). Algunas otras especies, protegidas mecánicamente por espinas, se han vuelto sin espinas a través de la selección humana. Un ejemplo son algunas variedades domesticadas del melocotón de palma (*Bactris gasipaes*) que han perdido las espinas de sus troncos, y las variedades silvestres aún las tienen (Balick, 1984). En frijol común el cambio en estas características en variedades domesticadas es muy notorio: las semillas no se liberan durante la maduración de la vaina (pérdida de dispersión), las plantas tienen hábito de crecimiento compacto (algunas de tipo arbustivo en comparación con las silvestres que crecen de manera indeterminada o en forma de liana), son insensibles al fotoperiodo, tienen vainas y semillas más grandes, etc. comparado con su progenitor silvestre (Singh, 2001; Kelly, 2004).

El frijol se clasifica dentro del género *Phaseolus* y la familia Fabaceae (Leguminosas). Es una planta herbácea, de ciclo anual que incluye cinco especies domesticadas: *P. vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima), *P. acutifolius* (frijol tépari), *P. coccineus ssp. coccineus* (frijol ayocote) y *P. dumosus*, también conocido

como *P. polyanthus* o *P. coccineus ssp. darwinianus* (frijol de año) (Freytag & Debouck, 2002).

México es considerado uno de los centros de origen del frijol y es uno de los principales países productores (Gepts & Debouck, 1991; Chacón et al., 2005; FIRA, 2016). Se considera que en el país existen cerca de 50 especies de frijol, los cuales se distribuyen en siete grupos principales: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. En el país hay más de 150 variedades mejoradas (Vargas et al, 2006). En 2004, el INIFAP realizó la descripción varietal de 142 variedades mejoradas de frijol y cada año se siguen sumando nuevas variedades.

Por su amplia adaptación y por el número de variedades mejoradas disponibles, el cultivo de esta leguminosa se realiza prácticamente en todas las regiones, condiciones climáticas y tipos de suelos en el país (FIRA, 2016). El clima y la disponibilidad de agua son los factores más importantes que determinan la productividad del cultivo, ya que las principales regiones productoras registran bajos niveles de precipitación pluvial y además con una distribución errática. En siete principales entidades productoras de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se concentró el 76.6 por ciento de la cosecha nacional en 2015: Zacatecas (29.9 %), Durango (11.5 %), Sinaloa (8.7 %), Chihuahua (9.9 %), Chiapas (6.2 %), San Luis Potosí (4.6 %) y Guanajuato (5.7 %; FIRA, 2016).

Existen diversas plagas que atacan al frijol y que reducen considerablemente su rendimiento por el daño que provocan, ya sea a la planta o a las vainas donde se encuentra la semilla (Cid Ríos et al., 2014). Entre las principales plagas encontramos: diabrotica, mosquita blanca, mosca de la semilla, pulgones, chicharritas, conchuela, minador de hoja, trips, etc. (Escoto Gudiel, 2004) . Las estrategias que se utilizan para el manejo de plagas actualmente incluyen: muestreos manuales esporádicos para monitorear las poblaciones de plagas, el uso de trampas pegajosas de colores llamativos o el uso de plaguicidas, lo cual implica la inversión de mucho tiempo en los muestreos o la aplicación de químicos que resultan ser dañinos para el organismo de quienes los aplican e incluso de los

consumidores (CESAVEG, 2007). Por ello, se recomienda el uso de técnicas naturales o de biocontrol que no presenten este tipo de desventajas.

1.10 Antecedentes

Comparando los cultivos de plantas domesticadas con sus ancestros silvestres, se puede observar de manera general, que poseen rasgos físicos aumentados (Fraenkel, 1959; Schwanitz, 1966; Smartt & Simmonds, 1995), morfologías más simples (Evans, 1993; Rosenthal & Welter, 1995; Chen & Bernal, 2011; Doust, 2007), contenido nutricional alterado y una reducción en las defensas (Lindig-Cisneros et al., 1997; Jones, 1998; Gols et al., 2008; Sujana et al., 2012). En cuanto a reducción de las defensas se ha observado por ejemplo que diversas líneas silvestres de frijol presentaron una mayor variedad de metabolitos secundarios comparando con las líneas cultivadas (Lindig-Cisneros et al., 1997; Lindig-Cisneros et al., 2002)

La selección artificial de cultivos para incrementar rendimiento y calidad ha mostrado una influencia negativa en la resistencia contra patógenos e insectos (Chen et al., 2015). Esto ha sido demostrado para diversos cultivos como zanahoria (Leiss et al., 2013), frijol (Córdova-Campos et al., 2012), maíz (Rosenthal & Welter, 1995), entre otros. Esto podría tener consecuencias en la protección de los cultivos a microorganismos y pestes, incluyendo insectos, que representan el 18 y el 16% de las pérdidas mundiales de cultivos, respectivamente (Oerke, 2006). Muchos cultivos se han seleccionado por su baja producción de toxinas y su mejor palatabilidad. Algunos ejemplos incluyen concentraciones reducidas de alcaloides en papa (Timothy Johns & Alonso, 1990), los altramuces o lupines (Enneking & Wink, 2000), glucosinolatos en cultivos de Brassicas (Mithen et al., 1987) y cucurbitacinas en pepino y calabaza (Nee, 1990; Paris, 1989). Esto también se puede observar en maíz, que perdió algunas de sus defensas directas durante la selección, y este fenómeno es más evidente en variedades modernas que en variedades criollas (Rosenthal & Dirzo, 1997; Dávila-Flores et al., 2013). Diferentes rasgos de defensa parecen ser variablemente afectados por la domesticación

(Bellota et al., 2013). Las variedades criollas son poblaciones dinámicas de líneas cultivadas que tienen un origen histórico, una identidad distinta y que carecen de mejoramiento de cultivo formal. Son genéticamente diversas, localmente adaptadas y asociadas con sistemas de agricultura tradicionales (Camacho Villa et al., 2005). Diferentes criollas son adaptadas a necesidades y ambientes locales específicos, produciendo óptimos rendimientos bajo condiciones ambientales específicas, tales como sequía o presión por pestes.

En 2011 Córdoba Campos evaluó la secreción de NEF en distintas variedades de frijol común (Córdoba Campos, 2011). Utilizando diferentes variedades de frijol con distinto grado de domesticación, esto es, variedades silvestres, criollas y mejoradas, observó que de manera general las variedades mejoradas secretaban mayores cantidades de NEF comparando con las variedades silvestres (Figura 4). Éste fenómeno resulta muy interesante, ya que por lo general, se ha documentado que como resultado de la domesticación, las plantas cultivadas producen bajas cantidades de metabolitos secundarios comparando con sus tipos silvestres (Lindig-Cisneros et al., 1997, 2002; Chen et al., 2015).

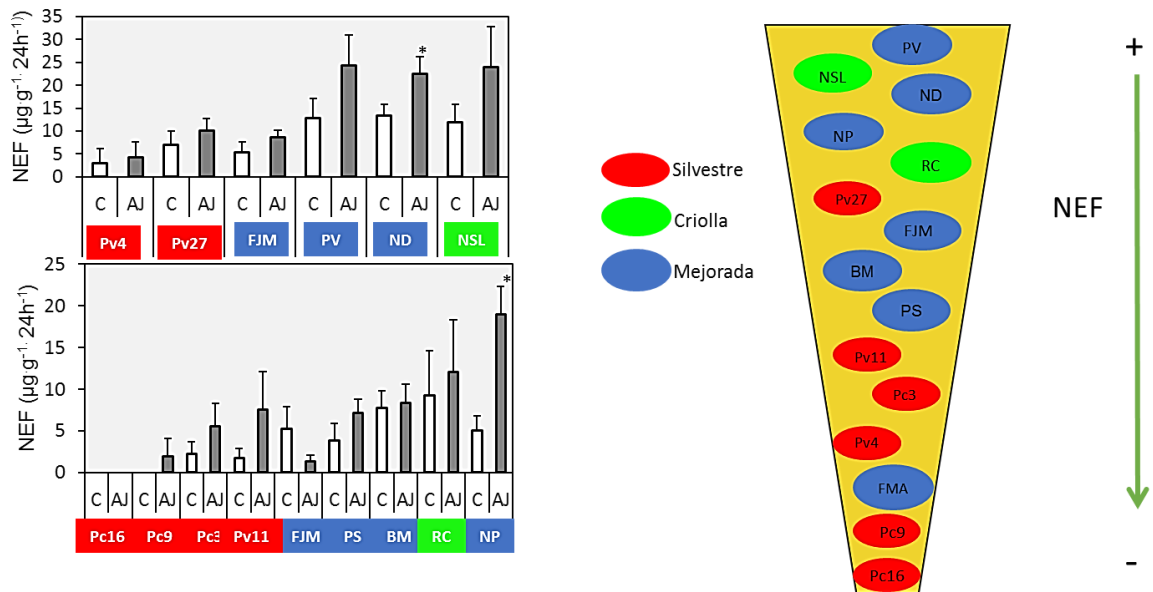


Figura 4. Secreción de NEF de distintas variedades de frijol. Al evaluar la secreción de NEF en distintas variedades de frijol, Se observó de manera general que las variedades domesticadas secretaban mayor cantidad de NEF en comparación con las variedades silvestres. Pc3 = Phaseolus coccineus 3; Pc9 = Phaseolus coccineus 9; Pc16 = Phaseolus coccineus 16; Pv27 = P. vulgaris 27;

Pv11 = *P. vulgaris* 11; Pv4 = *P. vulgaris* 4; BM = Bayo Madero; PV = Pinto Villa; RC = Rosa de Castilla; FJM = Flor de Junio Marcela; FMA = Flor de Mayo Anita; NP = Negro papaloapan; ND = Negro Durango; PS = Pinto Saltillo; NSL = Negro San Luis; C = Control; AJ = Ácido Jasmónico. Tomado y modificado de (Córdoba Campos, 2011).

2. HIPÓTESIS

Las variedades domesticadas secretan mayores cantidades de nectar extrafloral (NEF) y este nectar presenta mayor calidad (mayor cantidad de azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa) en comparación con las variedades silvestres. Este incremento está asociado con un incremento en la actividad de la invertasa de pared celular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si el proceso de domesticación afectó la secreción de NEF en variedades de *Phaseolus vulgaris*.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar la secreción de NEF en respuesta a la aplicación exógena de ácido jasmónico en dos variedades criollas, cinco variedades mejoradas y cuatro variedades silvestres de *Phaseolus vulgaris*.
- Cuantificar la secreción durante 24 h de NEF en dos variedades silvestres y dos variedades domesticadas de *Phaseolus vulgaris*.
- Cuantificar la actividad de invertasa de pared celular en nectarios extraflorales de dos variedades silvestres y dos variedades domesticadas de *Phaseolus vulgaris*.
- Analizar la composición química del NEF (azúcares) de dos variedades silvestres y dos variedades domesticadas de *Phaseolus vulgaris*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del área de trabajo

El presente proyecto fue realizado en invernaderos y en el laboratorio de Ecología de Plantas ubicados en las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN) Unidad Irapuato. con dirección en el Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato - León 36821 Irapuato, Guanajuato, México. Las coordenadas de ubicación del lugar son 101° 19' 44.999'' de longitud oeste y 20° 43' 13.502'' de latitud norte

4.2 Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizaron variedades domesticadas y silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) para determinar diferencias en cantidad y calidad (concentración de azúcares) en la secreción de NEF dependiendo del grado de domesticación. Se utilizaron siete variedades domesticadas, que incluyen cinco mejoradas y dos criollas (Tabla 1). Las variedades mejoradas utilizadas fueron: Pinto Saltillo (PS), Pinto Villa (PV), Flor de Junio Marcela (FJM), Negro Papaloapan (NP) y Negro Durango (ND). Las variedades criollas que se utilizaron fueron: Rosa de Castilla (RC) y Negro San Luis (NSL). En cuanto a las variedades silvestres se utilizaron cuatro, que incluyen: *Phaseolus vulgaris* 11 (Pv11), *Phaseolus vulgaris* 4 (Pv4), *Phaseolus vulgaris* 27 (Pv27) y Chihuahua (CH).

Las variedades utilizadas en este proyecto (con excepción de la variedad silvestre Chihuahua) fueron donadas por el Dr. Jorge Alberto Acosta Gallegos, investigador del Programa de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campo experimental Celaya. La variedad silvestre Chihuahua fue donada por el Dr. Alfredo Herrera Estrella, investigador del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

Tabla 1. Material vegetal utilizado.

VARIEDAD	HÁBITO DE CRECIMIENTO	RAZA	ESTATUS BIOLÓGICO	REFERENCIA
Pinto Saltillo	Indeterminado postrado, tipo III	Durango	Mejorado	(Gonzalez Torres et. al, 2008)
Pinto Villa	Indeterminado postrado, tipo III	Durango	Mejorado	(Acosta-Díaz et. al, 2004)
Flor de Junio Marcela	Indeterminado postrado, tipo III	Jalisco	Mejorado	(Gonzalez Torres et. al, 2008)
Negro Papaloapan	Indeterminado arbustivo, tipo II	Mesoamericana	Mejorado	(López-Salinas et. al., 2007)
Negro Durango	Indeterminado postrado, tipo III	Durango	Mejorado	(Acosta-Díaz et. al, 2009)
Rosa de Castilla	Indeterminado, trepador, tipo IV	Jalisco	Criollo	
Negro San Luis	Indeterminado postrado, tipo III	Jalisco	Criollo	(Acosta Díaz et. al, 2008)
<i>Phaseolus vulgaris</i> 11	Indeterminado, trepador, tipo IV		Silvestre	
<i>Phaseolus vulgaris</i> 4	Indeterminado, trepador, tipo IV		Silvestre	
<i>Phaseolus vulgaris</i> 27	Indeterminado, trepador, tipo IV		Silvestre	
<i>Chihuahua</i>	Arbustivo indeterminado	Chihuahua	Silvestre	

Las semillas de las variedades antes mencionadas se desinfectaron previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante cinco minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada y fueron germinadas en charolas de plástico, utilizando sanitas de papel humedecidas con agua destilada. A todas las semillas se les removió una parte de la testa para acelerar el proceso de germinación. Al cabo de una semana, las plántulas se pasaron a macetas de 1.5 L con sustrato estándar: una parte de vermiculita, dos partes de hojas molidas (“Tierra de Hoja”, Viveros de Silao, Gto., México), una parte de “perlita mineral expandida” (Perlita de la Laguna, Ciudad de México, México), tres partes de “Sunshine mixture 3” (Sun Gro horticulture, Canadá) y una porción de tierra lama (“Tierra de limo”). Se regaron cada que fuese necesario para mantenerlas húmedas y se fertilizaron una vez por semana, después de 15 días de haberse pasado a macetas, con Ferviafol 20-30-10 NPK ® (Agroquímicos Rivas S.A. de C.V., Celaya, GTO, México). Se mantuvieron

bajo condiciones invernadero con temperaturas medias de 29 °C durante el día y 20 °C aproximadamente durante la noche, bajo condiciones de luz natural.

4.3 Cuantificación de NEF total a las 24 h

Para comparar la secreción de NEF como mecanismo de defensa indirecta entre distintas variedades de frijol común, se cuantificó la cantidad de NEF secretado por las variedades antes mencionadas 24 h posteriores a la aplicación del AJ (plantas control fueron tratadas con agua).

Se seleccionaron plantas de cuatro semanas de edad o con cinco o seis hojas verdaderas para la medición de NEF de todas las variedades. Después de identificar todos los nectarios peciolares de cada planta, los nectarios fueron lavados con agua destilada para evitar residuos de NEF que interfirieran con las mediciones. Este lavado se realizó una hora antes de la primer medición, a las 06:00 h. Se realizó de acuerdo a lo reportado por Heil y colaboradores (2000 y 2001).

Posteriormente, para cada variedad, seis plantas fueron asperjadas con agua destilada (plantas control) y seis plantas tratadas con ácido jasmónico 1 mM (ambos tratamientos por aspersión en las hojas). Después de 24 h, se cuantificó la secreción de NEF de cada planta utilizando 20 µL de agua destilada. Se realizaron lavados de todos los nectarios y se cuantificó la cantidad de solidos solubles presentes en el néctar colectado con un refractómetro portable (ATAGO®, Tokio, Japón). El refractómetro fue calibrado con agua destilada antes de su uso, y el prisma y la lámina plástica se limpiaron y recalibraron después de cada medición. El volumen total de néctar colectado fue medido directamente del refractómetro con tubos capilares graduados (capilares de 5 µl Corning®, New York, USA). El néctar colectado fue almacenado a -20 °C para su posterior análisis.

Las hojas de cada planta fueron cortadas y secadas a 50 °C por 72 horas en horno y posteriormente pesadas en balanza analítica (Adventurer™ Pro AV53, OHAUS®, USA). El NEF fue reportado como mg de sólidos solubles por gramo de peso seco, realizado de acuerdo a Heil y colaboradores (2000 y 2001).

4.4 Cuantificación de la secreción temporal de NEF

Con el fin de hacer comparaciones sobre la temporalidad de la secreción de NEF entre variedades silvestres y domesticadas, se seleccionaron cuatro variedades: dos variedades domesticadas y dos variedades silvestres. Para hacer comparaciones entre cada grupo de plantas se seleccionó la variedad que secretara mayor cantidad de NEF y la que secretara menor cantidad. Para las variedades domesticadas, se seleccionó la variedad criolla NSL como la variedad más productora de NEF y la variedad mejorada FJM como la que menos cantidad de NEF secretó. En cuanto a las variedades silvestres, se tomó la variedad Pv11 como la variedad silvestre que secretó más NEF y la variedad Pv27 como la que secretó la menor cantidad. A las cuatro variedades seleccionadas se les cuantificó la cantidad de NEF secretado cada tres horas durante 24 h continuas, comenzando las mediciones a las 07:00 h.

Se seleccionaron 108 plantas de cuatro semanas de edad o con cinco o seis hojas verdaderas de cada variedad. Se lavaron todos los nectarios peciolares de cada planta con agua destilada a las 06:00 h (una hora antes de la primer medición que comenzó a las 07:00 h) para evitar residuos de NEF que interfirieran con las mediciones. Posteriormente, 54 plantas fueron asperjadas con agua destilada (plantas control) y 54 plantas tratadas con ácido jasmónico 1 mM (ambos tratamientos por aspersión en las hojas), esto para cada variedad de las cuatro seleccionadas. Una hora después de aplicar los tratamientos (07:00 h) se comenzó a cuantificar la secreción de NEF. De manera similar a la cuantificación realizada a las 24 h, se seleccionaron seis plantas control y seis plantas inducidas con AJ y se cuantificó la cantidad de NEF. Se utilizaron 20 μ L de agua destilada, se realizaron lavados de todos los nectarios y al néctar colectado se le cuantificó la cantidad de sólidos solubles con un refractómetro portable. Antes de realizar las mediciones se calibró el refractómetro con agua destilada. Para medir el volumen del néctar colectado, se utilizaron tubos capilares graduados de 5 μ L (Corning®, New York, USA). Este procedimiento se repitió en cada medición (cada tres horas durante 24

horas continuas). El néctar colectado en cada medición fue almacenado a -20 °C para análisis posteriores.

Para determinar la cantidad de NEF secretado en mg de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hojas, se cortaron las hojas de cada planta y se secaron en horno a 50 °C durante 72 h.

4.5 Determinación de la actividad de invertasa

Para cuantificar la actividad de la enzima invertasa de pared celular (CWIN por sus siglas en inglés: Cell wall invertase) en las variedades domesticadas (NSL y FJM) y silvestres (Pv11 y Pv27), se colectó tejido de nectarios peciolares de nueve plantas seleccionadas por tratamiento (tres plantas control y tres tratadas con AJ) de cada variedad. Se eligió la invertasa de pared celular porque se sabe que es la que está involucrada en el transporte de sacarosa del floema hacia el tejido del nectario. Los nectarios colectados fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Se hicieron “pools” de tres plantas (para cada tratamiento) y se analizaron tres réplicas biológicas por cada tratamiento.

La actividad enzimática fue cuantificada como describe Ruhlmann y col. (2010) con algunas modificaciones. Brevemente, se pesaron 50 mg de tejido de nectarios molidos y se mezclaron con 500 µl de solución amortiguadora HEPES/NaOH a 50 mM frío, a 4 °C (con pH 8.0, constituido por 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ y 50 mM de HEPES). Las muestras fueron incubadas en hielo durante 10 min y después se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla restante (que contenía la pared celular con las invertasas de interés) fue lavada tres veces con 500 µl de solución amortiguadora HEPES/NaOH, como se describe anteriormente. Posteriormente, las pastillas fueron lavadas con 500 µl de citrato de sodio 80 mM frío, a 4 °C (con pH de 4.8) y centrifugadas a 13 000 rpm (decantando el sobrenadante).

Para determinar la actividad de invertasa, se tomó el método que utilizó Heil y col. (2005, 2014) y se realizaron algunas modificaciones: se añadieron 300 µl de

citrato de sodio 80 mM a temperatura ambiente (con pH de 4.8) a las pastillas del procedimiento anterior, se mezclaron y se incubaron a 37 °C durante 5 min (Vortemp ®, Woodbridge, USA). Las muestras fueron después centrifugadas a 11 000 rpm durante cinco min a temperatura ambiente. Se tomaron 30 µl del sobrenadante de cada muestra, se colocaron en una microplaca de 96 pozos y a cada muestra se le añadieron 180 µl de la solución de reacción HK (Glucose (HK) Assay Kit Product Code GAHK-20, Sigma-Aldrich). Se midió la absorción a 340 nm en un lector de microplacas (µQuant ®, Winooski, USA). Enseguida, se añadieron 100 µl de sacarosa (100 mM) a las muestras en la microplaca, después de alcanzar el estado estacionario y se realizaron lecturas de absorción cada 10 min durante 75 min (Figura 5). La actividad de la invertasa se calculó a partir de la pendiente del incremento lineal de la absorción después de la adición de sacarosa.

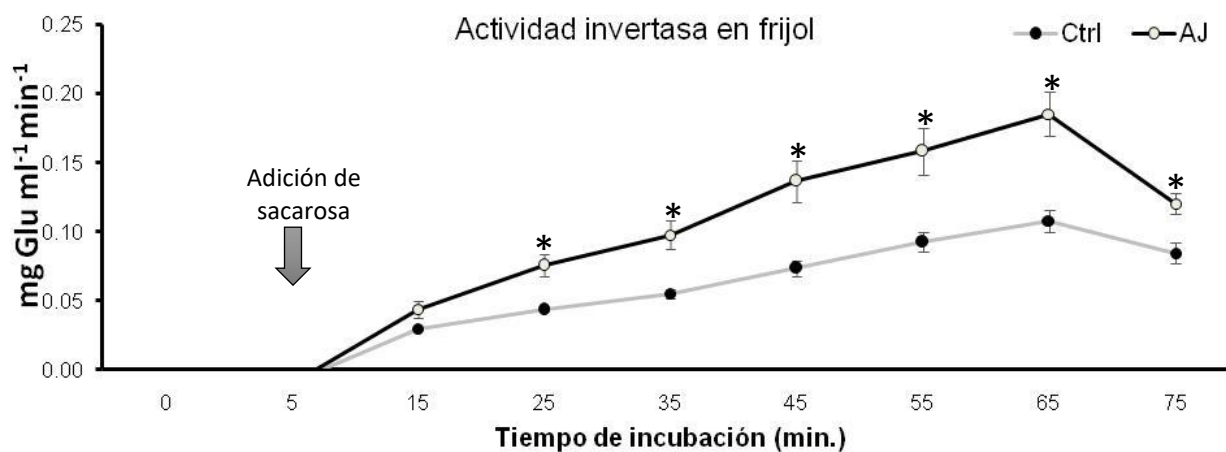


Figura 5. Curva de la actividad de invertasa en frijol (variedad FJM). Se observa que la enzima es inducida por la aplicación exógena de AJ a las plantas. Las barras representan la media ± EE (n = 3), t de student, * p ≤ 0.05.

4.6 Análisis de azúcares

Para determinar la cantidad de azúcares presentes en el néctar colectado (Glucosa = Glu, Fructosa = Fru y Sacarosa = Suc) de las 4 variedades

seleccionadas, se derivatizaron las muestras obtenidas de NEF y analizaron en un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (por sus siglas en inglés GC-EIMS).

Para ello, al néctar colectado se le agregaron 0.5 ml de agua destilada. De la mezcla, se tomaron 20 μ l y se secaron por vacío (equipo MAXY dry plus®, USA). Las pastillas restantes fueron derivatizadas con 80 μ l de BSTFA (N, O-Bis(trimetilsilil) trifluoro-acetamida con trimetilclorosilano, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y 20 μ l de pirimidina (J. T. Baker®, Xalostoc, México). Posteriormente, se incubaron a 80° durante 30 minutos. Después de la incubación se agregaron 100 μ l de isoctano y posteriormente se analizaron con el sistema GC-EIMS (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA).

Se utilizó una columna de HP-5MS (5% Fenil metil siloxano: 30 m de longitud, 0.250 μ m de diámetro y 0.25 μ m de capa, Agilent Technologies, California, USA). El programa utilizado tuvo temperatura inicial del horno de 70 °C por 5 min, un incremento de 5 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 280 °C (mantenida durante 5 min). El tiempo de corrida fue de 52 min. Se inyectó 1 μ l de muestra de manera automática por el cromatógrafo. La identificación de los azúcares (Glu, Fru y Suc) fue realizado comparando el espectro de las sustancias estándar con la biblioteca de espectros de masas del Instituto Nacional de Normas y Tecnologías (Nist® 0.5).

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de NEF en variedades silvestres y domesticadas.

La cuantificación de NEF se realizó en dos temporadas distintas: la primer medición se realizó en la temporada Otoño - Invierno y la segunda en la temporada Primavera - Verano.

En los resultados de la primer temporada (Otoño - Invierno) se encontró que la variedad que secretó mayores cantidades de NEF después de 24 h de aplicar los tratamientos fue la variedad criolla NSL (Figura 6). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la variedad NSL en comparación con todas las variedades utilizadas, así como entre el tratamiento control y el tratamiento con AJ en esta variedad (Tabla 2, $p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de dos factores). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos (plantas control y tratadas con AJ) en ninguna variedad además de NSL.

La secreción mínima de NEF se observó en FJM con medias de 0.06 y 0.07 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$ (tratamiento control y AJ respectivamente), comparando con NSL que fue de 0.48 y 0.75 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$ respectivamente. Al hacer la comparación del efecto del tratamiento y la variedad en la secreción de NEF, se puede ver que por separados tienen un efecto significativo pero en conjunto no (Tabla 2, ANOVA de dos factores, $p < 0.05$).

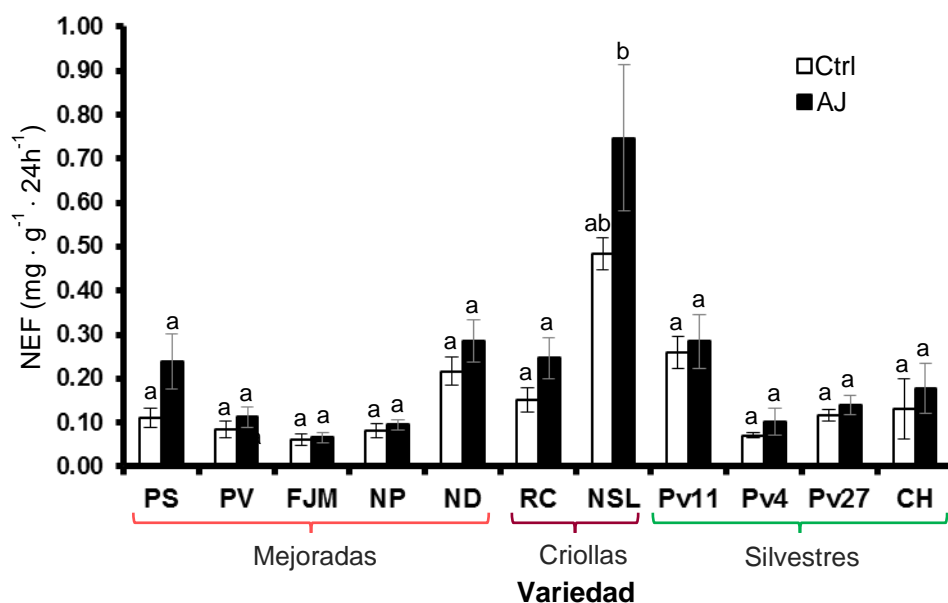


Figura 6. Secreción de NEF de frijol común en temporada Otoño - Invierno. El NEF se cuantificó 24 h después de aplicar los tratamientos. La variedad criolla NSL secretó mayor cantidad de NEF, comparando las variedades silvestres y domesticadas. PS = Pinto Saltillo; PV = Pinto Villa; FJM = Flor de Junio Marcela; NP = Negro Papaloapan; ND = Negro Durango; RC = Rosa de Castilla; NSL = Negro San Luis; Pv11 = *P. Vulgaris* 11; Pv4 = *P. vulgaris* 4; Pv27 = *P. vulgaris* 27; CH = Chihuahua; AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la secreción de NEF (miligramos de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hoja por 24 h) \pm EE (n = 6). Diferentes letras indican diferencias significativas entre todas las combinaciones de factores (ANOVA de dos factores, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 2 para los efectos del tratamiento y la variedad en la secreción de NEF.

Tabla 2. Influencia de la variedad y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF de distintas variedades de frijol común. Temporada Otoño – Invierno.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	n_p^2
Variedad	2.914	10	0.291	19.154	0.000	0.635
Tratamiento	0.144	1	0.144	9.462	0.003	0.079
Variedad * Tratamiento	0.170	10	0.017	1.117	0.356	0.092

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, n_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

Las cuantificaciones de NEF realizadas en el segundo experimento (temporada de Primavera – Verano) indican que las variedades NSL, ND y NP con más actividad produjeron en promedio entre 0.3 y 0.7 mg de NEF por gramo de peso seco por 24

h, mientras que las tasas de producción más bajas se observaron en las variedades Pv27, Pv4 y FJM con secreciones entre 0.02 y 0.11 mg de NEF por gramo de peso seco por 24 h (Figura 7).

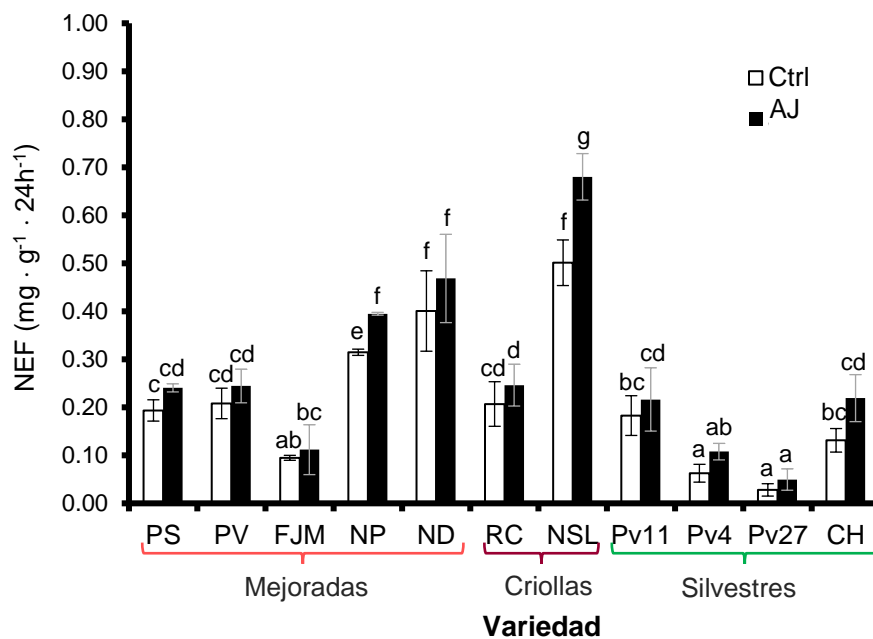


Figura 7. Secreción de NEF en temporada Primavera-Verano. Se observa de manera general que las variedades domesticadas secretan mayores cantidades de NEF en comparación con las silvestres. PS = Pinto Saltillo; PV = Pinto Villa; FJM = Flor de Junio Marcela; NP = Negro Papaloapan; ND = Negro Durango; RC = Rosa de Castilla; NSL = Negro San Luis; Pv11 = *P. Vulgaris* 11; Pv4 = *P. vulgaris* 4; Pv27 = *P. vulgaris* 27; CH = Chihuahua; AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la secreción de NEF (miligramos de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hoja por 24 h) \pm EE (n = 6). Diferentes letras indican diferencias significativas entre todas las combinaciones de factores (ANOVA de dos factores, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 3 para los efectos del tratamiento y la variedad en la secreción de NEF.

Al igual que en el primer experimento realizado en Otoño-Invierno, al evaluar el efecto que tiene el tipo de variedad y tratamiento aplicado en la secreción de NEF sólo se encontraron diferencias significativas cuando se evalúan por separado (Tabla 3).

Por otra parte, a diferencia de la primer cuantificación de NEF realizado en Otoño-Invierno, se observó que las variedades domesticadas secretaron mayor cantidad de NEF en comparación con las variedades silvestres. En esta cuantificación se

observaron diferencias significativas entre tratamientos en las variedades domesticadas NSL, PS y NP ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de dos factores).

Tabla 3. Influencia de la variedad y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF de distintas variedades de frijol común. Temporada Primavera – Verano.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	n_p^2
Variedad	3.550	10	0.355	34.784	0.000	0.760
Tratamiento	0.192	1	0.192	18.790	0.000	0.146
Variedad * Tratamiento	0.116	10	0.012	1.139	0.340	0.094

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, n_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

5.2 Curvas de secreción de las variedades seleccionadas

5.2.1. Variedades domesticadas

La curva de secreción de la variedad criolla NSL solo presentó diferencias significativas entre tratamientos a las 07:00 h, en la primer medición después de la aplicación del tratamiento (Figura 8; $p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Después de 24 h de aplicar los tratamientos se observó el pico máximo de secreción, donde las plantas control secretaron mayor cantidad de néctar comparadas con las plantas tratadas con AJ (con medias de 0.43 y 0.33 respectivamente), pero sin diferencias significativas. El aumento de la secreción de NEF inducida por AJ ocurrió durante las primeras horas de tratamiento, que en este caso corresponden a horas con luz (durante el día).

El análisis de los efectos de la hora y el tratamiento en la secreción de NEF reveló diferencias significativas entre las horas pero no en la respuesta a la aplicación de AJ solamente ($p < 0.05$, Tabla 4). La interacción del efecto hora y tratamiento resultó ser significativo ($p < 0.05$), lo cual indica que cada factor depende del otro para que se lleve a cabo una secreción significativa de NEF.

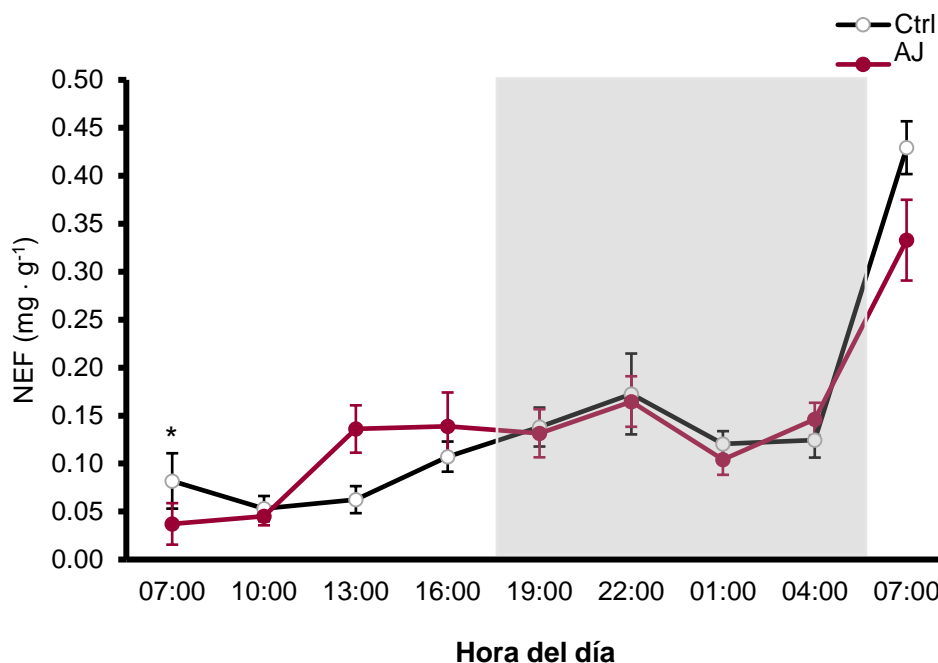


Figura 8. Secreción temporal de NEF en la variedad criolla NSL. Se cuantificó la secreción de NEF cada tres horas durante 24 h. El pico máximo de secreción en esta variedad se dio a las 24 h, observando que las plantas tratadas con AJ secretaron menos néctar comparando con las plantas control. AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la secreción de NEF (miligramos de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hoja) \pm EE ($n = 6$). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 4 para los efectos del tratamiento y la hora en la secreción de NEF.

Tabla 4. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad criolla NSL.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	n_p^2
Hora	24.064	3	8.842	131.791	0.000	0.963
Tratamiento	0.014	1	0.014	0.768	0.421	0.133
Hora * Tratamiento	1.942	3	0.573	6.117	0.004	0.550

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, n_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

La secreción de NEF de la variedad domesticada FJM (línea mejorada seleccionada la que menos NEF secreta), no presentó diferencias significativas entre tratamientos pero sí entre las horas del día (Figura 9; Tabla 5). En las mediciones realizadas durante 24 h, se observó que las plantas tratadas con AJ

aumentaron su secreción durante el día (resultados similares a la variedad NSL en plantas tratadas con AJ, aunque ambas variedades sin diferencias significativas) y disminuyeron la secreción durante la noche. El pico mínimo de secreción ocurrió a las 07:00 y 22:00 h (con medias de 0.036 y 0.39 mg de NEF respectivamente) y el pico máximo a las 13:00 h (con media de 0.099 mg de NEF).

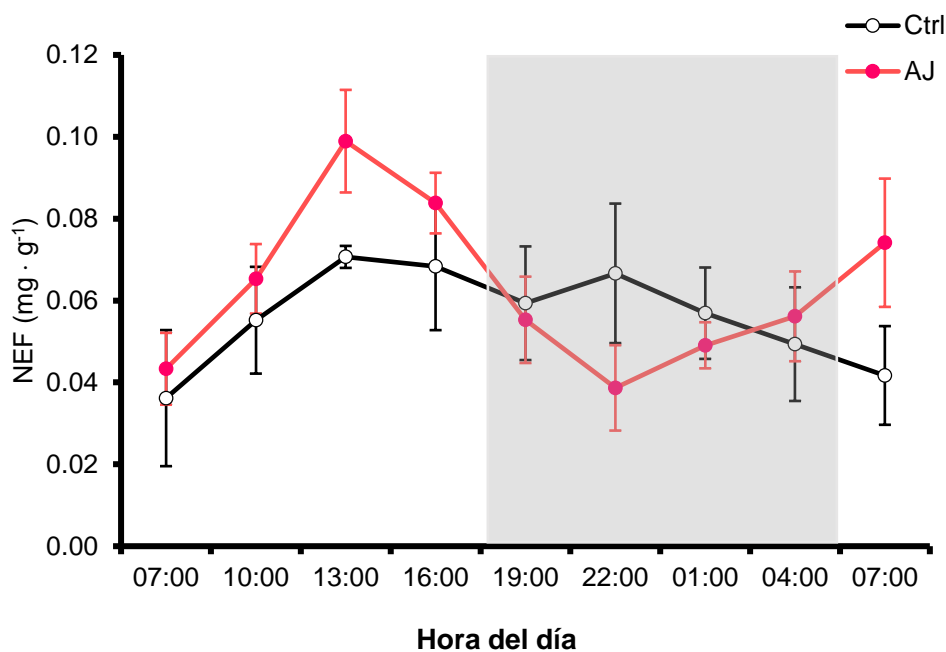


Figura 9. Secreción temporal de NEF en la variedad domesticada FJM. Se realizaron mediciones cada 3 h de la cantidad de néctar secretado (utilizando refractómetro se midió la cantidad de sólidos solubles) durante 24 h. Se observó una mayor secreción durante el día (mayor en plantas tratadas con AJ). AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la secreción de NEF (miligramos de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hoja) \pm EE (n = 6). No se encontraron diferencias significativas entre todas las combinaciones de factores (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 5 para los efectos del tratamiento y la hora en la secreción de NEF.

Con el análisis ANOVA de medidas repetidas sólo se observó un efecto significativo en la secreción de NEF cuando se evaluó la hora (Tabla 5), el tratamiento de manera individual no presentó diferencias significativas ni la combinación de ambos (hora * tratamiento).

Tabla 5. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad domesticada FJM.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.017	8	0.002	3.196	0.007	0.390
Tratamiento	0.001	1	0.001	0.387	0.561	0.720
Hora * Tratamiento	0.008	8	0.001	1.584	0.161	0.241

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

5.2.2 Variedades silvestres

En la variedad Pv11 (seleccionada como una de las variedades silvestres que más NEF secretó), la curva de secreción presentó diferencias significativas entre tratamientos solo a las 24 h después de comenzar las mediciones (Figura 10; $p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Se observa que la secreción de NEF en plantas tratadas con AJ disminuyó durante el día (comparando con plantas control) y aumenta durante la noche. En cambio, en las plantas control, se observa una tendencia hacia un aumento en la cantidad de néctar durante el día (resultados contrarios a los observados en las variedades domesticadas), aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas, Tabla 6). Se detectó el pico máximo de secreción a las 24 h después de comenzar las mediciones en plantas tratadas con AJ (con un promedio de 0.287 mg de sólidos solubles), mientras que en plantas control se detectó a la 13:00 h (con un promedio de 0.242 mg de sólidos solubles), durante el día.

No se observó un efecto significativo en la secreción de NEF del tratamiento aplicado, de la hora, así como de la combinación de ambos, como se puede ver en la Tabla 6.

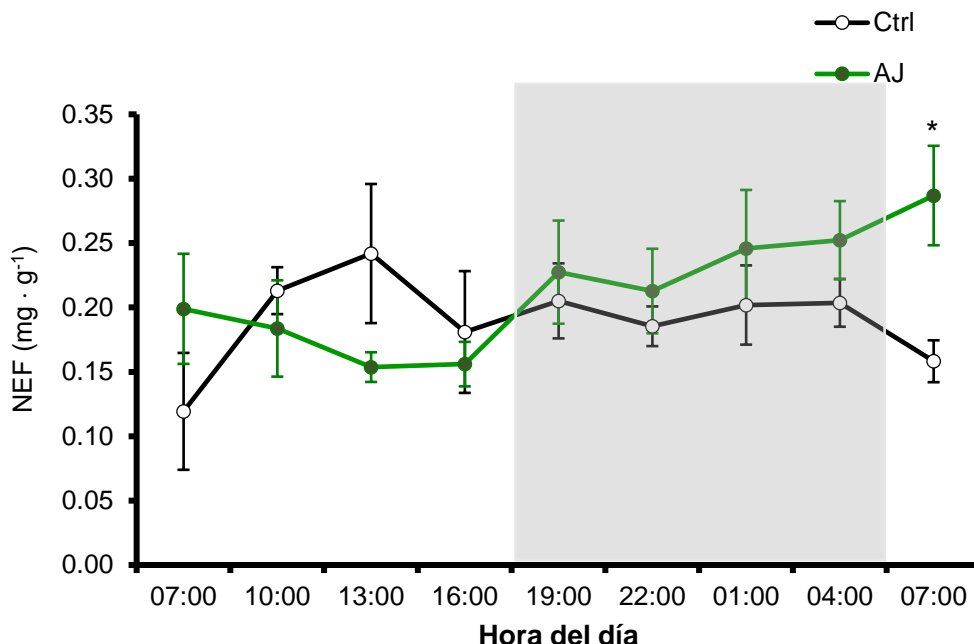


Figura 10. Plantas tratadas con AJ secretan mayor cantidad de NEF durante la noche en la variedad silvestre Pv11. Cuantificando nectar cada 3 h durante 24 h, se observó en esta variedad que plantas tratadas con AJ secretaron mayores cantidades de nectar durante la noche, comparadas con plantas control, que secretaron mayores cantidades de nectar durante el día. AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la secreción de NEF (miligramos de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hoja) \pm EE (n = 6). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 6 para los efectos del tratamiento y la hora en la secreción de NEF.

Tabla 6. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad criolla silvestre Pv11.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.057	8	0.007	0.943	0.491	0.159
Tratamiento	0.014	1	0.014	3.441	0.123	0.408
Hora * Tratamiento	0.099	6	0.017	1.867	0.120	0.272

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

La curva de secreción de la variedad Pv27 (línea silvestre que secretó menos NEF) presentó diferencias significativas entre tratamientos a diferentes horas: a las 07:00, 10:00, 16:00, 01:00 h y además, 24 h después de aplicar los tratamientos (Figura 11; $p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Se observaron dos

picos máximos de secreción, esto en plantas tratadas con AJ, a las 10:00 y 04:00 h (con promedios de 0.197 y 0.254 mg de sólidos solubles respectivamente, Figura 10). La secreción de NEF de plantas tratadas con AJ aumentó durante la noche (resultados similares a los observados en la variedad silvestre Pv11).

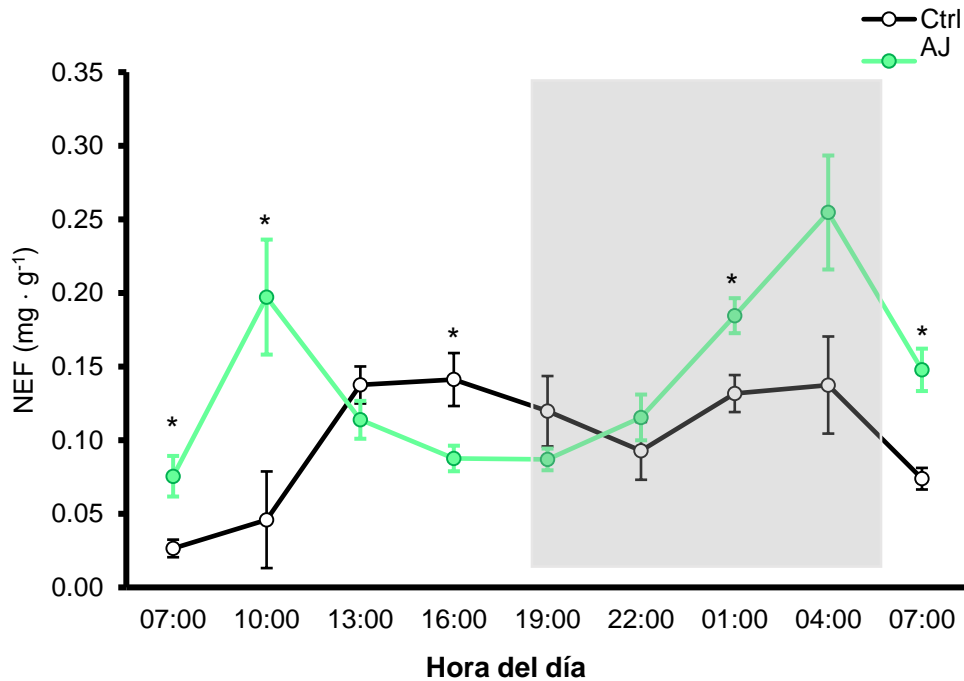


Figura 11. Secreción temporal de NEF en la variedad silvestre Pv27. El pico máximo de secreción en esta variedad se observó a las 04:00 h en plantas tratadas con AJ (significativamente mayor comparado con plantas control). De manera similar, se observó un pico a las 10:00 h. Se realizaron mediciones cada 3 h durante 24 h. AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la secreción de NEF (miligramos de sólidos solubles por gramo de peso seco de tejido de hoja) \pm EE (n = 6). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 7 para los efectos del tratamiento y la hora en la secreción de NEF.

El análisis estadístico reveló que la hora y la interacción de la hora con el tratamiento tenían un efecto significativo en la secreción de NEF ($p < 0.05$, Tabla 7), lo cual indica que la secreción de NEF en la variedad Pv27 en el esquema experimental usado depende de la hora de aplicación de la hormona.

Tabla 7. Análisis del efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la secreción del NEF en la variedad silvestre Pv27.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.152	6	0.028	5.457	0.001	0.522
Tratamiento	0.042	1	0.042	12.314	0.170	0.711
Hora * Tratamiento	0.114	5	0.025	8.394	0.000	0.627

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

El análisis de la secreción temporal de NEF mostró patrones diferentes de secreción en cuanto a variedades domesticadas y silvestres. De manera general, las variedades domesticadas utilizadas secretan mayores cantidades de NEF durante el día cuando se tratan con AJ, por el contrario, las variedades silvestres secretan mayores cantidades por la noche cuando se asperjan con AJ.

5.3 La actividad de invertasa en las variedades silvestres y cultivadas.

5.3.1 Variedades domesticadas

Al cuantificar la actividad de invertasa en la variedad criolla NSL, se observaron diferencias significativas entre plantas control y plantas tratadas con AJ) a las 17:00 h (Figura 12; $p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Se observó una mayor actividad de la enzima durante el día, presentando el pico máximo de actividad enzimática a las 13:00 h en plantas tratadas con AJ (con una media de $0.136 \text{ mg Glu} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). A las 22:00 h se observó la menor actividad de la enzima (con promedio de $0.720 \text{ mg Glu} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) en plantas control. Se observa además, que la actividad de esta enzima mostró una tendencia hacia un aumento con la aplicación exógena de AJ (aunque no significativamente).

No se encontró una correlación significativa entre el tratamiento y la hora * tratamiento con la secreción de NEF (Tabla 8), pero si se observaron diferencias significativas entre las horas en que se realizaron las mediciones.

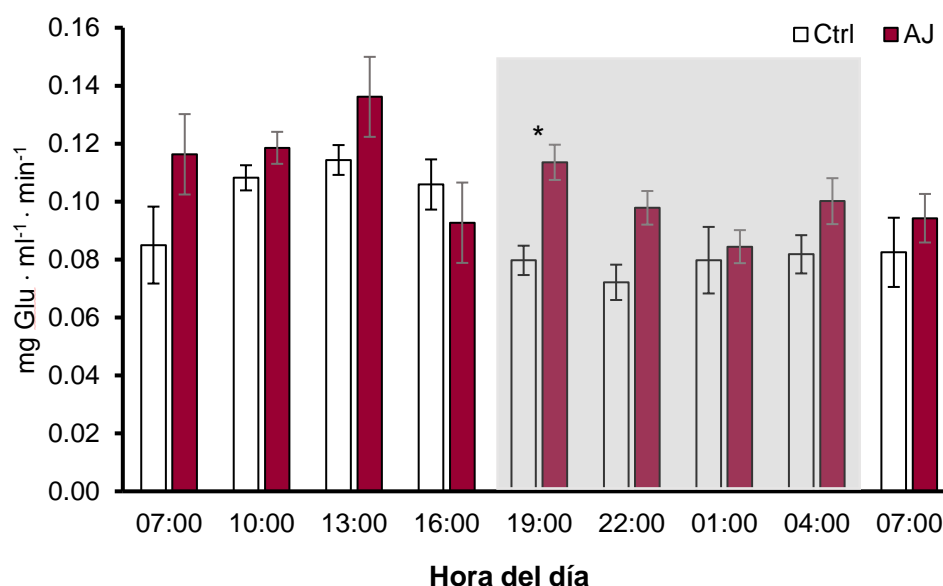


Figura 12. Cuantificación de la actividad de invertasa en la variedad criolla NSL. Se cuantificó la actividad de la enzima invertasa a diferentes horas del día. Se observa una mayor actividad durante el día, y además que la enzima es inducible por AJ. AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la actividad de la enzima para hidrolizar sacarosa (microgramos de glucosa liberada por mililitro por minuto) \pm EE (n = 3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre todas las combinaciones de factores (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 8 para los efectos del tratamiento y la hora en la actividad de la invertasa.

Tabla 8. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad criolla NSL.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.009	8	0.001	5.036	0.003	0.716
Tratamiento	0.003	1	0.003	5.220	0.150	0.723
Hora * Tratamiento	0.003	5	0.000	1.459	0.280	0.422

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

Así mismo, en la variedad domesticada FJM, se observó una mayor actividad enzimática durante el día (aunque sin diferencias significativas), obteniendo el pico máximo de actividad a las 10:00 y 13:00 h (con promedios de 0.071 y 0.061 mg Glu · ml⁻¹ · min⁻¹ respectivamente, Figura 13). Estos resultados coinciden con los

obtenidos en la variedad NSL, donde la mayor actividad de la enzima se dió durante el día y aumentó cuando se aplicó de manera exógena AJ. En esta variedad no se observaron diferencias significativas entre tratamientos a ninguna hora (Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las horas en las que se realizaron las mediciones y en la interacción de la hora con el tratamiento aplicado (Tabla 9).

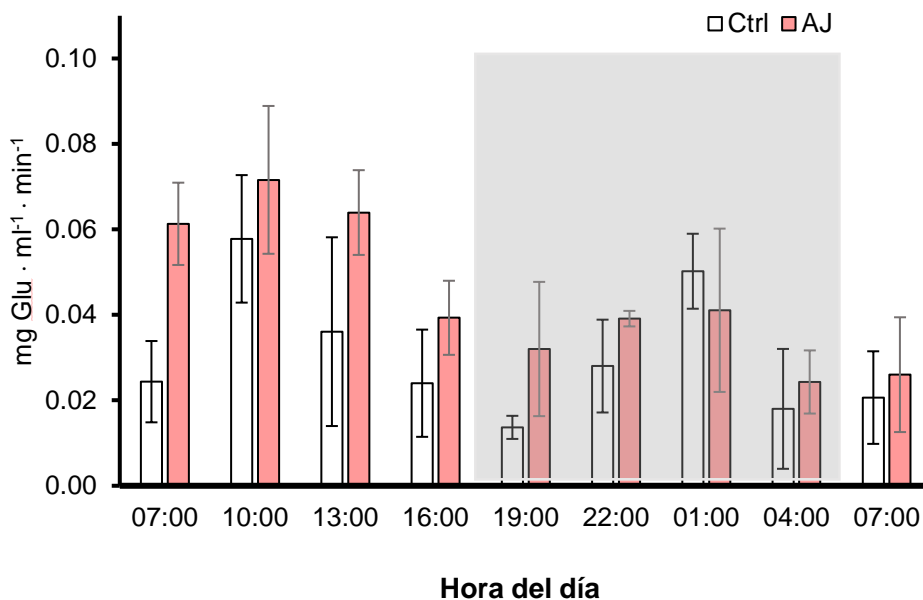


Figura 13. La actividad de la enzima invertasa aumenta en plantas inducidas con AJ durante el día en la variedad domesticada FJM. Se observa una mayor actividad de la enzima durante el día. Además, se observa que la actividad de la enzima es inducida por la aplicación de AJ (sólo a algunas horas del día). AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la actividad de la enzima para hidrolizar sacarosa (microgramos de glucosa liberada por mililitro por minuto) \pm EE (n = 3). No se encontraron diferencias significativas entre todas las combinaciones de factores (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 9 para los efectos del tratamiento y la hora en la actividad de la invertasa.

Tabla 9. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad domesticada FJM.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.010	8	0.001	2.507	0.056	0.556
Tratamiento	0.003	1	0.003	9.892	0.088	0.832
Hora * Tratamiento	0.002	8	0.000	0.499	0.840	0.200

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

5.3.2 Variedades silvestres

Por otra parte, en la variedad silvestre Pv11, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos a ninguna hora del día (Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas, Tabla 10). Interesantemente, la mayor actividad se presentó durante el día en las plantas control (con excepción de las 22:00 h y también 24 h después de comenzar los tratamientos, Figura 14). El pico máximo de actividad se observó a las 10:00 h (con un promedio de $0.118 \text{ mg Glu} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) cuando las plantas se trataron con AJ. Se observó también, que durante la noche disminuyó la actividad de la enzima, con una menor actividad a la 01:00 h (con promedio de $0.323 \text{ mg Glu} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

El análisis estadístico reveló diferencias significativas sólo entre las horas en las que se realizaron las mediciones, pero no entre los tratamientos aplicados ni tampoco entre la interacción de ambos factores (Tabla 10).

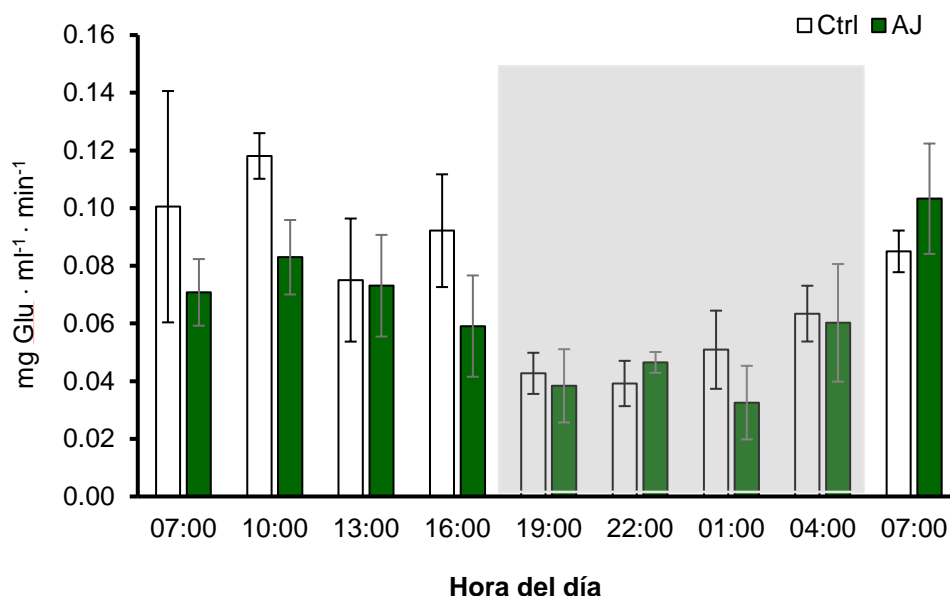


Figura 14. La actividad de invertasa se ve aumentada en plantas control durante el día en la variedad silvestre Pv11. Se observó en esta variedad una menor actividad de la enzima invertasa durante la noche. Además, durante el día, en las plantas control se detectó mayor actividad de la enzima. AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la actividad de la enzima para hidrolizar sacarosa (microgramos de glucosa liberada por mililitro por minuto) \pm EE (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos, sólo entre variedades (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 10 para los efectos del tratamiento y la hora en la actividad de la invertasa.

Tabla 10. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad silvestre Pv11.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.026	8	0.003	4.560	0.005	0.695
Tratamiento	0.002	1	0.002	0.754	0.477	0.274
Hora * Tratamiento	0.004	3	0.001	0.613	0.644	0.235

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

Finalmente, en la variedad silvestre con menos secreción de NEF (Pv27), se observaron diferencias significativas entre tratamientos a las 07:00 h (24 h después de iniciar los tratamientos) en la actividad de invertasa ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA

de medidas repetidas). En esta variedad, la actividad de la enzima se mantuvo más o menos estable, decayó a las 19:00 h y comenzó a aumentar ligeramente durante la noche (Figura 15). Se observó además que cuando se aplicó AJ como tratamiento, aumentó ligeramente la actividad sin importar si fuese de día o de noche (con excepción de las 16:00 y 22:00 h). La enzima presentó menor actividad a las 01:00 h en plantas control (con promedio de $0.025 \text{ mg Glu} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), esto fué, durante la noche. Por el contrario, la actividad máxima de la enzima se observó 24 h después de aplicar los tratamientos, esto fué, a las 07:00 h (con una media de $0.114 \text{ mg Glu} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

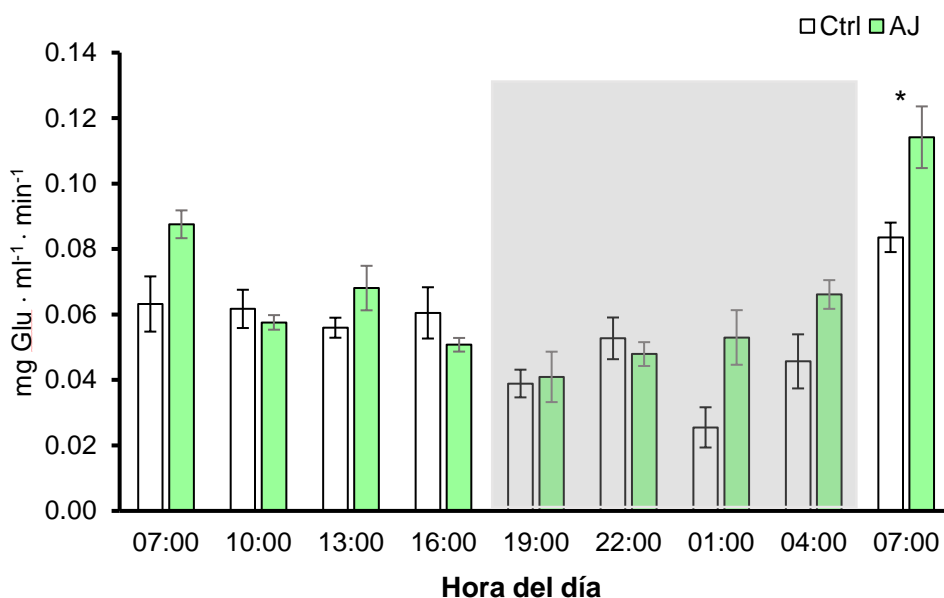


Figura 15. Cuantificación de la actividad de invertasa en la variedad silvestre Pv27. Se observaron diferencias significativas a las 24 h después del tratamiento. AJ = Ácido Jasmónico; Ctrl. = Control. Las barras representan la media de la actividad de la enzima para hidrolizar sacarosa (microgramos de glucosa liberada por mililitro por minuto) \pm EE (n = 3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre todas las combinaciones de factores (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver Tabla 11 para los efectos del tratamiento y la hora en la actividad de la invertasa.

En el análisis estadístico se encontraron efectos significativos de la hora, de la interacción de la hora con el tratamiento aplicado en la actividad de invertasa, aunque no del tratamiento aplicado solamente (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ) en la actividad de la enzima invertasa de nectarios extraflorales de frijol común, utilizando la variedad silvestre Pv27.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Hora	0.016	4	0.004	19.664	0.000	0.908
Tratamiento	0.002	1	0.002	16.960	0.054	0.895
Hora * Tratamiento	0.003	8	0.000	2.916	0.033	0.593

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

En resumen, la actividad de invertasa se vió aumentada durante el día en las variedades silvestres y domesticadas, y la aplicación exógena de AJ aumentó ligeramente la actividad de la invertasa en todas las variedades a distintas horas, aunque no significativamente.

5.4 Cuantificación de azúcares de las variedades seleccionadas

5.4.1 Variedades domesticadas

Se obtuvieron las curvas temporales del contenido de azúcares en el NEF de las variedades seleccionadas (NSL y FJM como variedades domesticadas, Pv11 y Pv27 como variedades silvestres) para analizar la cantidad de azúcares presentes en el néctar secretado a diferentes horas del día, en plantas con y sin tratamiento por AJ.

En la variedad NSL (variedad domesticada con mayor secreción de néctar) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a ninguna hora del día ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas, Tabla 12).

Se obtuvieron cantidades más altas de sacarosa que de fructosa y glucosa. En esta variedad domesticada, se observó que el néctar con mayor cantidad de azúcares (fru, glu y sac) se obtuvo 24 h después de aplicar los tratamientos en las plantas control, con promedios de 9.76, 8.08 y 17.52 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Figura

16). Se encontró, además, que durante las primeras horas después de aplicar los tratamientos el néctar secretado contenía menos azúcares que horas posteriores.

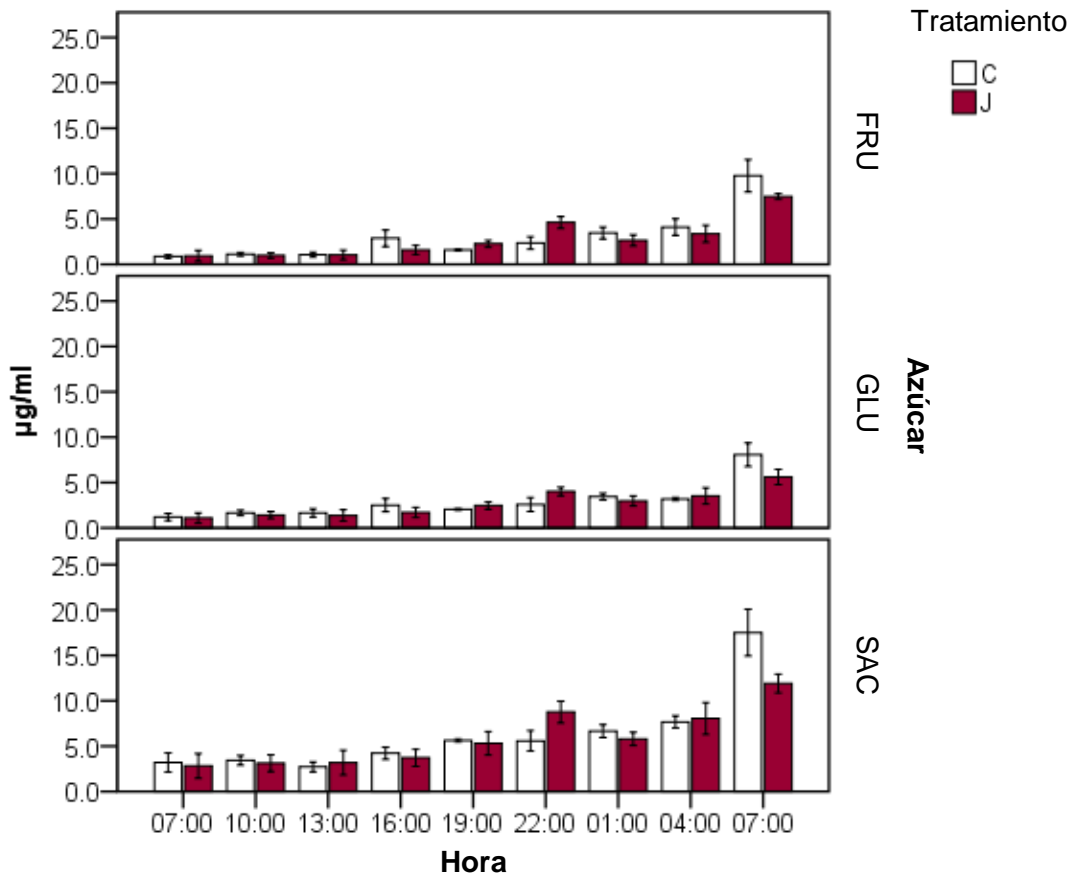


Figura 16. La mayor cantidad de azúcares en la variedad criolla NSL se encontró 24 h después de aplicar los tratamientos. Se cuantificó glucosa, fructosa y sacarosa cada 3 h durante 24 h en plantas tratadas con AJ y control. Se observó que los azúcares medidos no son inducibles por AJ y que la mayor cantidad de azúcares se obtiene en plantas control después de 24 h de iniciar los tratamientos. J = Ácido Jasmónico; C = Control; FRU = Fructosa; GLU = Glucosa; SAC = Sacarosa. Las barras representan la media \pm EE (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos a ninguna hora del día (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver **Error! No se encuentra el origen de la referencia.Tabla 11** para los efectos del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento en la secreción de NEF.

En el análisis estadístico se observaron diferencias significativas en cuanto al tipo de azúcar medido, también con respecto a la hora y a la combinación de ambos factores (azúcar * hora, Tabla 12), lo cual indica que se secretaron distintas cantidades de glucosa, fructosa y sacarosa a lo largo del día, sin embargo, si se

aplica AJ no cambia significativamente la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa en el néctar con respecto al control.

Tabla 12. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad criolla NSL.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	n_p^2
Azucar	373.579	2	186.789	1234.366	0.000	0.998
Hora	979.989	7	143.891	20.763	0.000	0.912
Tratamiento	3.914	1	3.914	0.724	0.484	0.266
Azucar * Hora	104.521	16	6.533	10.726	0.000	0.843
Azucar * Tratamiento	0.339	2	0.169	0.587	0.598	0.227
Hora * Tratamiento	79.465	2	48.545	2.068	0.257	0.508
Azucar * Hora * Tratamiento	15.529	3	6.101	2.009	0.229	0.501

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, n_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

Por otra parte, en la variedad domesticada FJM (variedad domesticada que secretó menos NEF) se observaron diferencias significativas entre tratamientos a las 22:00 h y también 24 h después de ser aplicados los tratamientos en los tres azúcares cuantificados ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Además, la cuantificación de azúcares indicó que la cantidad máxima para los tres tipos de azúcares se obtuvo entre las 19:00 y 22:00 h en plantas control (Figura 17). En plantas inducidas con AJ, la cantidad máxima de los tres tipos de azúcares no ocurrió en horas compartidas.

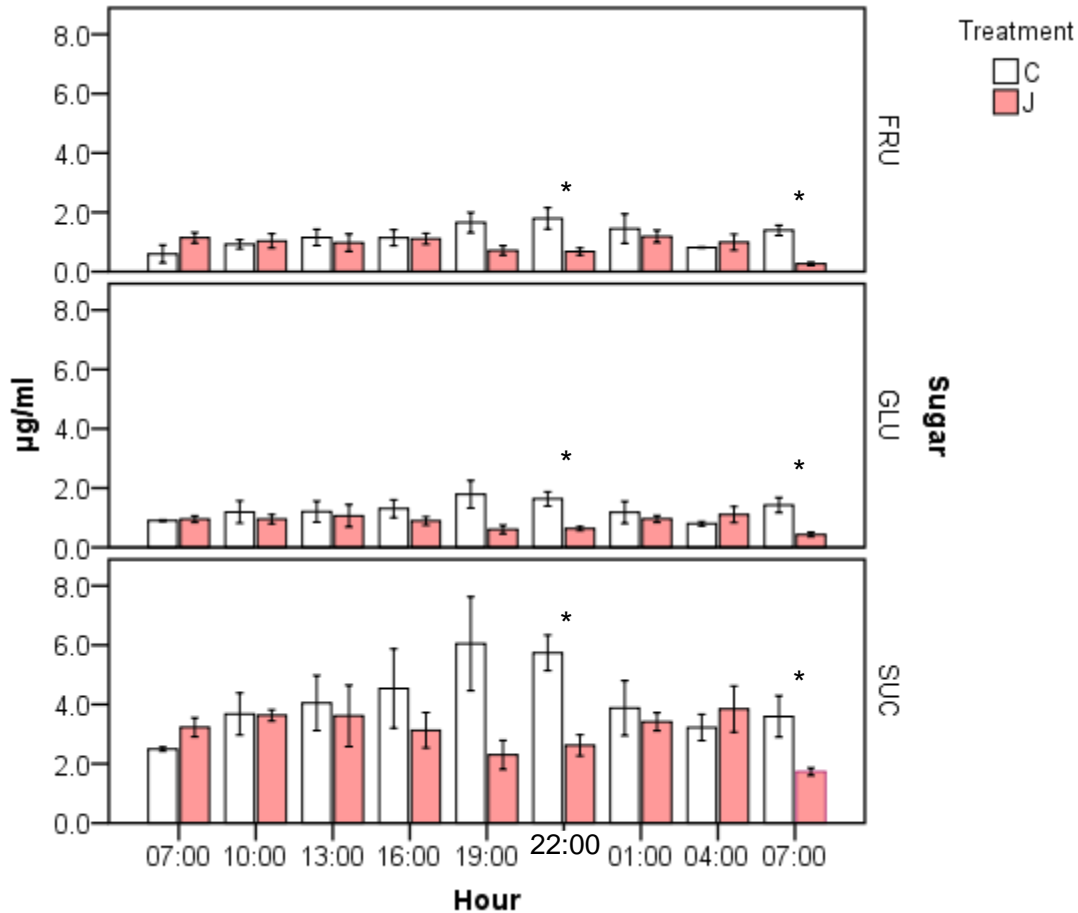


Figura 17. Plantas no tratadas secretan mayor cantidad de azúcares en la variedad domesticada FJM. Se cuantificó la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa en nectar colectado cada 3 h durante 24 h, en plantas control e inducidas con AJ. Se observó que los azúcares cuantificados no son inducibles por AJ en la variedad domesticada FJM. J = Ácido Jasmónico; C = Control; FRU = Fructosa; GLU = Glucosa; SAC = Sacarosa. Las barras representan la media \pm EE (n = 3). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver **Tabla 11** Tabla 13 para los efectos del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento en la secreción de NEF.

Se observó que sólo el tipo de azúcar presentó diferencias significativas en el análisis de medidas repetidas (ANOVA). El tratamiento y la hora de manera general no mostraron un efecto significativo en la secreción de los distintos azúcares en el NEF, así como la combinación de ambos los factores (Tabla 13). Esto es, que bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente trabajo, con la aplicación de AJ a las plantas, no secretaron más azúcares (de manera significativa) y tampoco se observaron diferencias en las cantidades de los distintos azúcares en el NEF a lo largo del día.

Tabla 13. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad domesticada FJM.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Azúcar	232.427	1	231.373	105.216	0.009	0.981
Hora	9.254	8	1.157	0.810	0.604	0.288
Tratamiento	14.912	1	14.912	8.656	0.099	0.812
Azúcar * Hora	5.883	7	0.903	1.051	0.441	0.344
Azúcar * Tratamiento	4.613	1	4.613	4.923	0.157	0.711
Hora * Tratamiento	27.963	3	10.667	3.884	0.087	0.660
Azúcar * Hora *	9.778	3	3.022	4.157	0.058	0.675
Tratamiento						

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

Comparando los resultados obtenidos en la variedad criolla NSL con la variedad mejorada FJM (variedades domesticadas), se observa una relación entre la cantidad de néctar secretado con la concentración de azúcares, ya que el néctar obtenido de la variedad NSL (variedad que secretó mayores cantidades de NEF) se encontró más concentrado de azúcares, pero sin diferencias significativas entre tratamientos y el NEF de la variedad mejorada FJM (variedad que menos secreta NEF) presentó menos cantidad de los tres azúcares medidos.

5.4.2 Variedades silvestres

En la variedad silvestre Pv11 (seleccionada por ser la variedad silvestre que presentó mayor producción de néctar) se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos a las 16:00 h únicamente para fructosa y glucosa ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas) con mayores cantidades en plantas control (Figura 18. Cantidad de azúcares en el NEF de la variedad silvestre Pv11. **Se observó que la mayor secreción de plantas tratadas en inducidas con AJ se da a las 22:00 h y 24 h después del tratamiento. J = Ácido Jasmónico; C = Control; FRU = Fructosa; GLU = Glucosa; SAC = Sacarosa. Las barras representan la media \pm EE (n = 3). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq$**

0.05). Ver Tabla 11 Tabla 14 para los efectos del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento en la secreción de NEF.Figura 18). Además, cuando las plantas eran tratadas con AJ, aumentó ligeramente la cantidad de glucosa en el néctar durante la noche (22:00 h en adelante). La secreción de sacarosa tuvo variaciones a lo largo del día en plantas tratadas y control. El pico máximo de sacarosa en las plantas control fue después de 24 h de iniciados los tratamientos (con un promedio de 6.18 $\mu\text{g/ml}$) y en plantas tratadas con AJ a las 22:00 h (con una media de 5.70 $\mu\text{g/ml}$). En cuanto a la aplicación de AJ y su efecto en la concentración de sacarosa en el NEF, se observó un incremento considerable de este azúcar con respecto al control a las 19:00 h (aunque sin diferencias significativas), incluso aumentó a las 22:00 h (Figura 18).

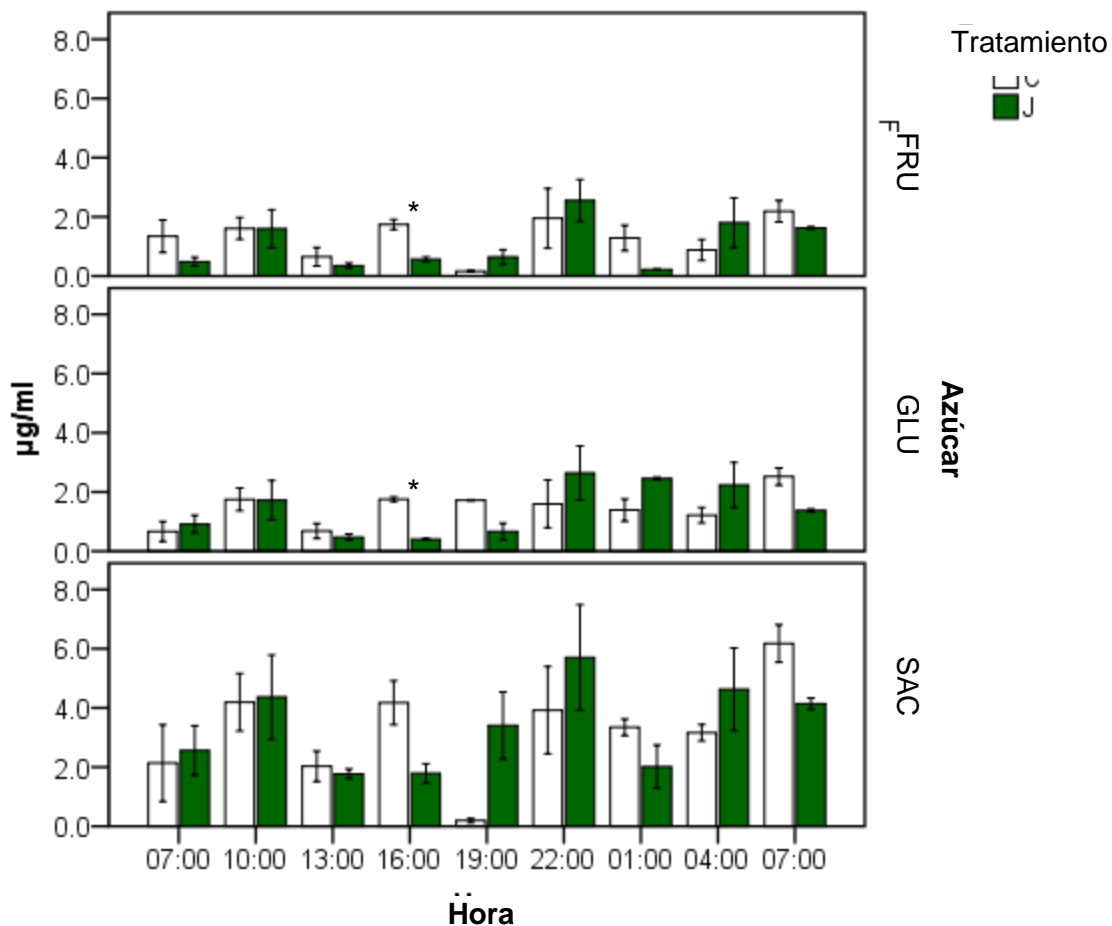


Figura 18. Cantidad de azúcares en el NEF de la variedad silvestre Pv11. Se observó que la mayor secreción de plantas tratadas en inducidas con AJ se da a las 22:00 h y 24 h después del tratamiento. J = Ácido Jasmónico; C = Control; FRU = Fructosa; GLU = Glucosa; SAC = Sacarosa.

Las barras representan la media \pm EE (n = 3). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver **Tabla 11** Tabla 14 para los efectos del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento en la secreción de NEF.

En el análisis de los factores que afectan la secreción de los distintos azúcares se observaron diferencias significativas en el tipo de azúcar que se secreta, así como en la interacción de los factores azúcar * hora * tratamiento, como se puede ver en la Tabla 14. Esto explica la variación en las cantidades de los distintos azúcares a lo largo del día (Figura 18).

Tabla 14. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad silvestre Pv27.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Azucar	0.015	2	0.008	0.066	0.938	0.032
Hora	52.856	8	6.607	9.728	0.000	0.829
Tratamiento	0.062	1	0.062	0.119	0.763	0.056
Azucar * Hora	2.191	16	0.137	3.498	0.001	0.636
Azucar * Tratamiento	0.021	2	0.011	0.120	0.890	0.056
Hora * Tratamiento	5.822	8	0.728	1.773	0.157	0.470
Azucar * Hora *	1.122	16	0.070	1.490	0.164	0.427
Tratamiento						

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

En la cuantificación de azúcares del NEF de la variedad Pv27 (variedad silvestre con menor producción de néctar) se observaron diferencias significativas entre tratamientos a las 10:00 h en cuanto a la cantidad de fructosa ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Durante la noche, este azúcar va aumentando ligeramente conforme pasan las horas (aunque no de manera significativa, Figura 19). En cuanto a glucosa, se puede ver que este azúcar aumentó en plantas control comparando con plantas tratadas entre las 13:00 y 19:00 h. También se observó este aumento en fructosa y sacarosa a las mismas horas. Finalmente, analizando las cantidades de sacarosa en el néctar en la variedad Pv27, se observaron diferencias significativas entre tratamientos a las 19:00 h ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de medidas repetidas). Cabe mencionar que las cantidades de sacarosa

obtenidas fueron similares a las de glucosa y fructosa, esto resulta interesante ya que en las otras variedades se obtuvieron mayores cantidades de sacarosa en el NEF. En esta variedad cuando las plantas se inducen con AJ, aumentan ligeramente los niveles de sacarosa durante la noche, mientras que durante el día son mayores los niveles de sacarosa en las plantas control (aunque no de manera significativa).

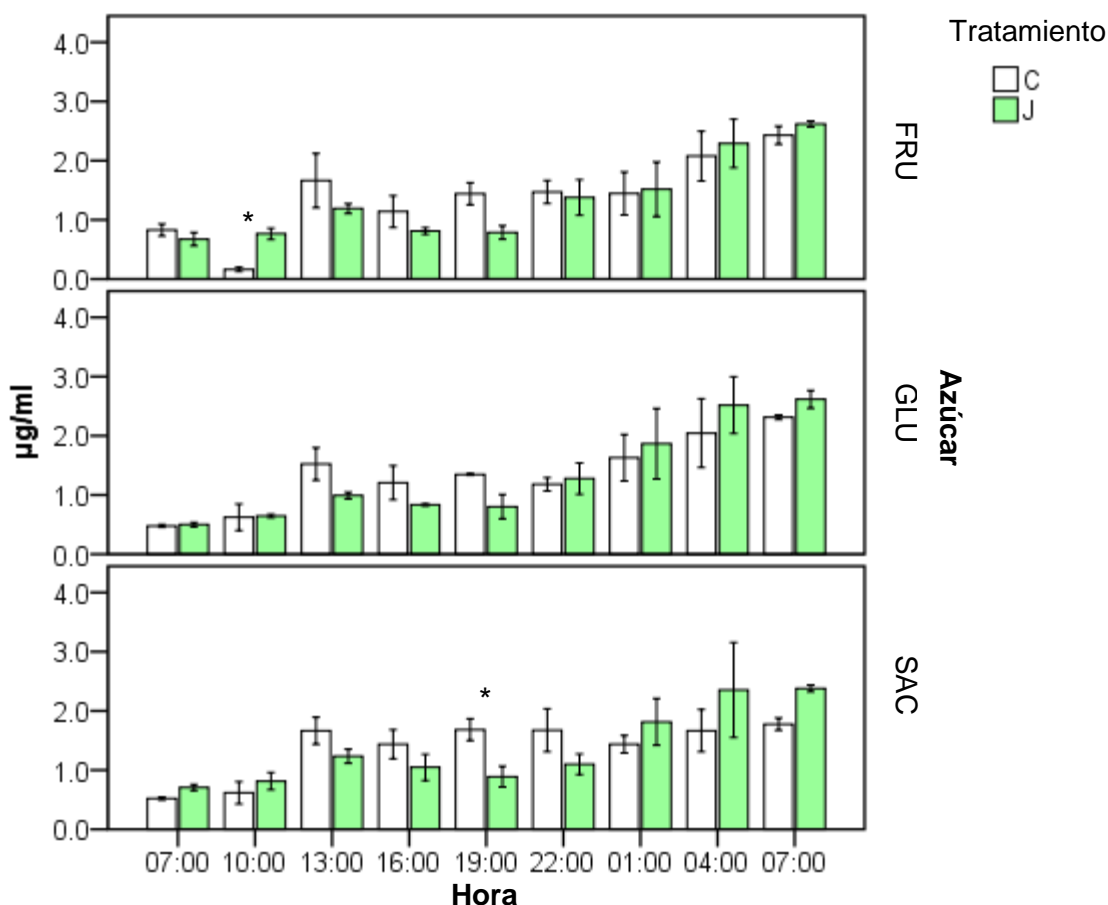


Figura 19. La secreción de NEF en plantas inducidas se da en mayores cantidades durante la noche en la variedad silvestre Pv27. Se observó que la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa en plantas inducidas incrementa durante la noche. Por otra parte, la cantidad de sacarosa resultó ser menor o igual a la cantidad de glucosa y fructosa. J = Ácido Jasmónico; C = Control; FRU = Fructosa; GLU = Glucosa; SAC = Sacarosa. Las barras representan la media \pm EE (n = 3). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas, Post hoc prueba Bonferroni, $p \leq 0.05$). Ver **Tabla 11** para los efectos del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento en la secreción de NEF.

Al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas en el tipo de azúcar y en la interacción del tipo de azúcar con la hora y el tratamiento (Tabla 15), pero en los demás factores como hora, tratamiento o en las distintas interacciones, no se observaron diferencias significativas.

Tabla 15. Resultados de las interacciones del tipo de azúcar, la hora y el tratamiento aplicado (plantas control y tratadas con AJ), en la secreción de NEF utilizando la variedad silvestre Pv11.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	η_p^2
Azucar	144.043	2	72.022	290.522	0.000	0.993
Hora	87.010	2	39.684	4.602	0.082	0.697
Tratamiento	0.100	1	0.100	0.327	0.625	0.141
Azucar * Hora	22.977	4	5.188	3.488	0.054	0.636
Azucar * Tratamiento	0.764	2	0.382	2.464	0.201	0.552
Hora * Tratamiento	35.298	8	4.412	1.197	0.360	0.374
Azucar * Hora * Tratamiento	24.158	15	1.660	3.104	0.005	0.608

ANOVA de medidas repetidas con ajuste de Bonferroni: los valores con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se representan en negritas. gl = grados de libertad, F = valor de F, Sig. = valor p, η_p^2 = Eta al cuadrado parcial.

Al cuantificar los azúcares en el NEF en las variedades seleccionadas, de manera general se observó que en las variedades domesticadas la aplicación exógena de AJ disminuyó la cantidad de azúcares en el NEF, y que el NEF de plantas control tiende a tener mayor cantidad de azúcares con respecto a las plantas tratadas con AJ, tanto durante el día como en la noche. En cuanto a las variedades silvestres, la cantidad de azúcares se mostró más variable entre tratamientos a lo largo del día. Las plantas tratadas con AJ secretaron NEF con mayor cantidad de azúcares durante la noche y cuando no son inducidas (controles) la mayor cantidad de azúcares se observa durante el día.

6. DISCUSIÓN

El objetivo principal del trabajo realizado era investigar si la domesticación influye en la secreción de NEF en el frijol común. En los resultados obtenidos se observó que de manera general las variedades domesticadas secretan mayor cantidad de NEF en el día (aunque sin diferencias estadísticamente significativas) y durante la noche disminuye la secreción en plantas tratadas con AJ. Por el contrario, las variedades silvestres secretan mayor cantidad de néctar cuando son tratadas con AJ durante la noche.

Diversos estudios demuestran que la secreción de NEF es inducida por AJ en frijol lima (Heil, 2004; Radhika et al. , 2010; Hernandez-Cumplido et al., 2016) y no sólo en frijol lima, sino también en algunas otras especies de diferentes familias se ha observado esta inducción (

Tabla 16. Especies en las cuales se ha observado una inducción de NEF por la aplicación AJ.). En el presente trabajo sólo se observó la inducción en tres variedades diferentes que fueron NSL, PS y NP ($p < 0.05$, Bonferroni, ANOVA de dos factores), las cuales son variedades domesticadas. También se ha reportado que la respuesta de la secreción de NEF al AJ en frijol lima es dependiente de luz (Radhika et al., 2010; Millán-Cañongo et al., 2014). De manera contraria, en los datos obtenidos se observa que la secreción en plantas tratadas con AJ de las variedades silvestres incrementa durante la noche. Un factor que no se ha discutido y que podría afectar los resultados obtenidos es el ritmo circadiano de la planta, y no realmente la luz sea lo que afecta.

En cuanto a la actividad de la invertasa, no se pudo detectar una inducción por la aplicación exógena de AJ en ninguna de las variedades utilizadas. Además, se observó que la actividad se mantuvo o aumentó durante el día y disminuyó durante la noche, en plantas tratadas con AJ y controles. Sólo en un estudio relacionado a la secreción del NEF de una planta también se ha investigado el papel correspondiente de la invertasa y se ha reportado que la invertasa de pared celular

responde a la aplicación exógena de AJ (Millán-Cañongo et al., 2014). En este estudio, utilizaron plantas de *Ricinus communis* bajo condiciones naturales y asperjaron las hojas con AJ 1 mMol, reportaron una mayor actividad de la enzima

<i>Familia</i>	<i>Especie</i>	<i>Referencia</i>	en
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Macaranga tanarius</i>	(Heil et al., 2001)	
	<i>Ricinus communis</i>	(Millán-Cañongo et al., 2014; Radhika et al., 2008)	
<i>Fabaceae</i>	<i>Acacia farnesiana, Acacia cochliacantha, Acacia macracantha, Leucaena leucocephala</i>	(Heil et al., 2004)	
	<i>Phaseolus lunatus</i>	(Heil, 2004; Radhika et al. , 2010; Hernandez-Cumplido et al., 2016)	
	<i>Prosopis juliflora</i>	(Heil, 2004)	
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	(Escalante-Pérez et al., 2012)	
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum dulcamara</i>	(Lortzing, Calf, Böhlke, Schwachtje, Kopka, Geuß, Kosanke, van Dam, et al., 2016)	

plantas tratadas con AJ. Por el momento, el número muy limitado de reportes y el uso de diferentes especies no permite una generalización, y más estudios serán requeridos para entender las relaciones entre el nivel de AJ, la actividad de la invertasa de pared celular y la secreción de NEF en plantas.

Tabla 16. Especies en las cuales se ha observado una inducción de NEF por la aplicación AJ.

Existe evidencia genética, fisiológica y correlativa que indica que la invertasa juega un papel importante en la secreción de néctar. Por ejemplo, se ha observado que la actividad de esta enzima es requerida para la secreción de néctar floral en *Arabidopsis* (Kram & Carter, 2009; Ruhlmann et al., 2010). En un estudio se encontró actividad del gen CELL WALL INVERTASE 4 (AtCWINV4, At2g36190), involucrado en la secreción de néctar floral. En este trabajo, utilizando mutantes de *Arabidopsis* donde se silenciaba este gen, se encontró que las mutantes no producían néctar floral (Ruhlmann et al., 2010). En *Ricinus communis* la invertasa de pared celular se mostró más activa algunas horas antes del pico de secreción de NEF y su disminución precedió a la disminución de la secreción de NEF (Millán-Cañongo et al., 2014), lo cual sugiere que está involucrada en la carga de sacarosa del floema al nectario. Esto también se observó en plantas de *Acacia cornígera*, en nectarios extraflorales (Orona-Tamayo et al., 2013).

En cuanto a la cantidad de azúcares encontrados en el NEF del presente proyecto, se observó mucha variabilidad de acuerdo a la hora, el tipo de azúcar y en la variedad utilizada. En las variedades domesticadas se observa que la aplicación exógena de AJ disminuye la concentración de los azúcares analizados a lo largo del día. En las variedades silvestres se observa una mayor cantidad de azúcares durante el día en plantas control y durante la noche un aumento en la concentración de azúcares en plantas tratadas con AJ.

En la literatura se ha reportado que en nectarios extraflorales de caupí (de estípulos de hojas y de inflorescencias de tallos) se observaron concentraciones distintas de sacarosa que tuvieron variaciones en radios de 1.5:1:1 a 0.5: 1:1 en sacarosa: glucosa: fructosa respectivamente (Pate, Peoples, Storer, & Atkins, 1985b). En el néctar extrafloral de *Ferocactus acanthodes* var. *leconte* las cantidades de sacarosa superaban las de glucosa y fructosa. Se discute en el trabajo que la calidad y composición del néctar varía en relación a la fenología reproductiva de la planta (Ruffner & Clark, 1986). En el néctar extrafloral de *Macaranga tanarius* se encontraron mayores cantidades de fructosa que de otros seis azúcares identificados (Heil et al., 2000). Recientemente se encontró en plantas

de *Solanum dulcamara*, un incremento de sacarosa en el néctar extrafloral de plantas inducidas con metil jasmonato, un precursor del jasmónico (Lortzing, et al., 2016), en este mismo estudio se analizó la composición química del néctar extrafloral, y en esta especie se observa una cantidad alta de sacarosa comparada con otros azúcares. De manera general la composición del néctar está dado por la especie y el tipo de consumidores que se necesitan atraer, es por ello que se observan diferencias en las concentraciones y tipo de compuestos observados en el presente proyecto.

Se observaron algunas incongruencias en los datos obtenidos, comparando con lo ya reportado. En este punto es importante saber que muchos factores que no se controlaron pudieron intervenir en los experimentos realizados y los cuales, por lo tanto, pudieron haber generado datos muy poco reproducibles o incongruentes. Por ejemplo, desde hace mucho tiempo, varios investigadores se han dado cuenta que la secreción del NEF en condiciones de invernadero o cámaras de crecimiento, es menos reproducible que en condiciones de campo. A parte, la secreción del NEF se ve influenciada por muchos factores internos como, por ejemplo, la edad de la hoja o el estadio ontogenético de la planta, y factores externos, tanto bióticos como abióticos. Por lo tanto, algunos de los factores que pudieron tener un efecto en los datos obtenidos son: (1) errores experimentales, (2) daño invisible o algunos otros factores no controlados que causaron que las plantas se indujeran desde antes, (3) infecciones no detectadas que causaron una inducción de la vía del ácido salicílico, la cual inhibe a la ruta del AJ, (4) inhibición por falta de consumo o reabsorción, (5) condiciones de luz, entre otros. En el presente trabajo se observó que algunos factores de manera individual tienen un efecto en la secreción del néctar, pero la combinación de los factores no resulta en un efecto significativo (ver Tabla 3 como ejemplo). A continuación se discuten algunos reportes donde se ha observado un efecto de los factores antes mencionados en la secreción de NEF o incluso de NF.

6.1. Factores involucrados en la secreción del nectar

6.1.1. NEF no es siempre inducible por daño o la aplicación exógena de AJ

Varios reportes involucran el efecto de varios factores en la secreción de néctar, ya sea floral o extrafloral. Por ejemplo, se observaron variaciones en la producción de néctar extrafloral entre seis especies de *Inga*, y este efecto se relacionó con la cantidad de hormigas presentes, con la presión por herbívoros y con un efecto de la luz en la cantidad del néctar secretado (Bixenmann et al., 2011). De manera similar, en plantas de *Passiflora edulis* se encontró que cuando son expuestas a luz roja o rojo lejano, suprimen la respuesta a NEF, desencadenada por herbivoría simulada o la aplicación de metil jasmonato bajo condiciones de invernadero (Izaguirre et al., 2013). En el artículo de Bixenmann et al. (2011) se discuten algunos trabajos donde se observaron variaciones por factores bióticos o abióticos. Los autores llegaron a la conclusión que en condiciones ambientales caracterizadas por una continua presión por herbívoros, se puede esperar una secreción constitutiva del NEF. Utilizando dos especies del género *Populus* (*Populus trichocarpa* y *Populus tremula* x *Populus tremuloides*), se observó que en la primer especie ni la aplicación de heridas mecánicas ni la aplicación de ácido jasmónico, indujeron la secreción del NEF, sino la infestación por insectos chupadores. (Escalante-Pérez et al., 2012). En el presente trabajo se utilizaron diferentes variedades de la misma especie, un elemento que podría ser un factor a considerar en la comparación de secreción de NEF, ya que como se ha reportado, la secreción de néctar es muy variable incluso en plantas del mismo género o especie, como se observa en los resultados del presente trabajo.

Por otra parte, las plantas usualmente expresan múltiples defensas químicas y mecánicas de manera simultánea. En otro trabajo utilizando diferentes genotipos de frijol lima se observó la expresión de dos sistemas de defensa: 1) defensa constitutiva por medio de compuestos cianogénicos y tricomas o 2) defensa inducible en la producción de COV's, NEF o en la actividad de la polifenol oxidasa (Ballhorn et al., 2013). Estos resultados indican que si se enciende una vía (por ejemplo la vía del ácido salicílico, AS), la otra vía se inhibe (por ejemplo la vía del AJ). Es probable que esto haya ocurrido en las plantas utilizadas, una posible

infección no detectada, la presión por algunos herbívoros que no se observaron o simplemente errores en las colectas del nectar.

6.1.2. COV's

Se ha comprobado en diversos estudios que el NEF responde a volátiles emitidos por otras plantas, ya sea infestadas por herbívoros, patógenos o volátiles emitidos de manera basal (Choh et al., 2006; Choh et al., 2006; Heil & Adame-Álvarez, 2010; Heil & Kost, 2006; Heil & Silva Bueno, 2007; Kost & Heil, 2006).

6.1.3. Infestación o infecciones

Muchos trabajos reportaron una inhibición mútua entre la ruta del AJ y la ruta del AS, la segunda siendo inducida en general por infecciones, ya sea por virus, bacterias, hongos o herbívoros (Heil & Bostock, 2002; Thaler et al., 2012). Por lo tanto, se esperaría que todo lo que induce la vía del AS debería inhibir al NEF. Sorprendentemente, hay muy pocos reportes. Uno de ellos es el realizado por Hernández-Zepeda (2015), en el cual se observa que aplicando AS en nectarios de plantas de *Acacia*, se inhibía la secreción de NEF, pero aplicando AS con AJ, fenidona (un inhibidor de la ruta del AJ) y estómagos de hormiga (contienen el compuesto que induce NEF en plantas de *Acacia*) se restauraba la secreción de NEF.

En un trabajo usando frijol lima, se observó que plantas colonizadas por hongos endófitos respondieron a la aplicación exógena de AJ con una disminución de la secreción del NEF bajo condiciones de invernadero (Navarro-Melendez & Heil 2014). Por contrario, la inoculación con hongos endófitos en plantas de *Vicia faba* incrementó la producción de néctar extrafloral, así como la infestación por áfidos. De manera contraria, cuando las plantas fueron simultáneamente inoculadas con el

endófito e infestadas con los áfidos, resultó en un decremento de la producción de NEF, todo bajo condiciones de invernadero (Jaber & Vidal, 2009).

6.1.4. Dependencia del consumo

Plantas de *Macaranga tanarius* donde el néctar fue removido diariamente durante varios días mostraron una disminución en la producción de néctar. Se utilizaron plantas donde insectos consumidores de néctar tuvieron acceso ellas, y se observó que después de que los insectos consumieron el néctar, la producción de néctar extrafloral aumentó. En plantas a las que los insectos no tuvieron acceso durante una semana no revelaron ningún aumento marcado en la producción del EFN durante este lapso de tiempo (Heil et al., 2000). Estos resultados indican que la producción del néctar es dependiente del consumo. Esto se ha observado en otros trabajos. Por ejemplo, en plantas de diferentes especies de *Inga* se encontró que la producción de NEF se inducía cuando las hormigas estaban presentes en las plantas (Bixenmann et al., 2011).

Esto también se ha observado en algunos trabajos utilizando néctar floral. En el néctar floral de *Helleborus foetidus*, se observó que cuando distintas especies de abejas visitan el nectario, causan un efecto en la cantidad de azúcares presentes en el néctar. Las especies *Andrena*, *Apis mellifera*, y *Lasioglossum* no tuvieron efecto alguno en la cantidad de azúcares, pero las especies *Bombus terrestris* y *B. pratorum*, indujeron una reducción en la cantidad de sacarosa, un incremento en la cantidad de fructosa y un leve incremento en la cantidad de glucosa (Canto et al., 2008). También se observó en plantas de *Penstemon speciosus* que cuando el néctar floral fue removido cada hora durante 6 h, el doble de néctar fue secretado acumulativamente como cuando el néctar se retiró sólo al principio y al final del mismo período de 6 horas, esto bajo condiciones de campo. Estos resultados indican que la remoción del néctar floral estimula su reposición (Castellanos et al, 2002)

6.1.5. Reabsorción

El fenómeno donde el néctar no consumido se reabsorbe se ha reportado en diferentes especies en néctar floral y extrafloral desde hace mucho tiempo (Burquez & Corbet, 1991; Cardoso-Gustavson et al., 2013; Escalante-Pérez et al., 2012; Langenberger & Davis, 2002; Nepi et al., 2011; Nepi et al., 2001; Nepi & Stpicyńska, 2008; Nicolson, 1995; Pederson et al., 1958; Wist & Davis, 2005; Ziegler & Lüttge, 1959). Describiendo algunos ejemplos en néctar floral, tenemos a Agthe (1951): el autor reemplazó el NF de *Euphorbia pulcherrima* (planta de origen mexicano) con una solución acuosa de 50 % glucosa con “Kaliumfluoreszein“ en una concentración 1:500, y observó en nectarios “viejos” los cuales ya no secretaron nectar que la tinción entró al tejido del nectario en 7 de 75 casos, hasta al floema del nectario (Agthe, 1951). Por otra parte, en plantas de alfalfa, se utilizó sacarosa marcada con C¹⁴ para demostrar la reabsorción del néctar y su distribución en la planta, esto en nectarios florales (Pederson et al., 1958). Utilizando ácido glutámico marcado con C¹⁴, Ziegler & Lüttge (1959) aplicaron una solución al 1% en nectarios florales de *Daucus carota* y de *Abutilon* y en nectarios extraflorales de *Viburnum opulus* y encontraron radioactividad en el tejido del nectario y aún en partes de la planta más alejadas (Ziegler & Lüttge, 1959). En néctar extrafloral de plantas de *Populus tremula x Populus tremuloides* se ha visto que continuamente secretan néctar y el exceso es reabsorbido por endocitosis (Escalante-Pérez et al., 2012). En 2013, Cardoso-Gustavson y col. propusieron un método eficiente para obtener una demostración visual de la reabsorción del néctar, adaptando el uso de “Lucifer Amarillo CH” (en inglés Lucifer Yellow CH, LYCH), un colorante impermeable fluorescente en una membrana que puede entrar en la vacuola por endocitosis (Cardoso-Gustavson et al., 2013). Este método se comprobó en NF, en plantas de *Cucurbita pepo L.* en las cuales se ha comprobado que el néctar es reabsorbido y en plantas de *Passiflora edulis* Sims, en NEF, que se ha comprobado que no se reabsorbe. Muchos estudios respaldan la reabsorción del néctar, uno de los factores que pudo influenciar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

6.1.6. Dependencia de condiciones de luz

Las condiciones de luz también juegan un papel importante en la cantidad de néctar que se secreta. Lo demuestran estudios como el que realizaron Izaguirre y col. en el 2013 donde se observa una disminución en la cantidad de NEF cuando mantienen las plantas en condiciones de luz de rojo lejano. En plantas de frijol lima, se demostró que la secreción de NEF en respuesta a la aplicación exógena de AJ es dependiente de luz. En los resultados obtenidos se observa un decremento de NEF en plantas tratadas con AJ durante la noche. Esta modulación fue afectada por la composición espectral (luz roja o rojo lejano) pero no por la intensidad de la luz (Radhika et al., 2010). Por el contrario, en plantas de *Senna mexicana* var. Chapmani la intensidad de la luz afectó la producción de NEF, pero no la relación entre luz roja y rojo lejano. Las plantas que se mantuvieron en condiciones limitadas de luz produjeron significativamente menos NEF (Jones & Koptur, 2015b).

En otro reporte donde utilizaron plantas de distintas especies de *Inga*, observaron que las plantas que tenían más acceso a luz en el sotobosque donde se realizaron los experimentos, incrementaban la secreción de NEF (Bixenmann et al., 2011). De la misma manera, en plantas de *Mallotus japonicus* se observó que en tratamientos donde se utilizaba más luz, aumentaba el tamaño de los nectarios extraflorales y a su vez, la cantidad de NEF secretado (Yamawo & Hada, 2010).

6.1.7. Interacciones entre múltiples factores

Como ya se mencionó, son muchos los factores involucrados en la secreción del NEF. Los datos del presente estudio no concuerdan con muchos de los reportes de la literatura, un fenómeno que se puede explicar parcialmente por el uso de diferentes especies. Sin embargo, aun en la literatura, se observa que la secreción cambia completamente en plantas de la misma especie, y en muchos de los trabajos no se observa una correlación en los datos.

En los datos obtenidos en el presente trabajo, se observó de manera general que la temporada influye en la cantidad de NEF secretado en diferentes variedades de

frijol común. Esto podría estar relacionado con las condiciones climáticas, ya que en temporada de Otoño – Invierno existe una reducción en la temperatura y humedad, lo cual para el frijol se sabe que son factores importantes para que se mantenga y reproduzca de manera adecuada. Es por ello que quizá la planta invierta sus recursos en mantenerse y no en defensa.

El aumento en la secreción de néctar durante la noche en las variedades silvestres tratadas con AJ, se pudo deber a una posible inducción por patógenos o daño por herbívoros que no se detectó. También pudo ser causada por la inducción de COV's de plantas vecinas. Otro efecto importante que pudo haber estado involucrado es la reabsorción y la cantidad de luz. La primera se da cuando hay falta de consumo, y en el presente proyecto las mediciones se realizaron dentro de 24 h continuas. La segunda pudo verse afectada ya que los experimentos se realizaron bajo condiciones de invernadero y la calidad de la luz varía. También podría ser que este aumento esté relacionado con la presión que existe por herbívoros, o que de manera indirecta la domesticación potenció un rasgo defensivo indirecto, como es el caso de NSL, pero sólo en algunas variedades. Habría que incluir más variedades y comparar su secreción bajo condiciones de campo.

La actividad de la invertasa no mostró una respuesta estadísticamente significativa a la aplicación exógena de AJ y en términos generales se mantuvo más activa durante el día. Como aun así, se observó una relación en cuanto a la actividad de la enzima con la cantidad de NEF secretado en las variedades domesticadas y silvestres, la aparente falta de inducción de la invertasa por AJ podría representar una consecuencia de inducción de la ruta del AJ por múltiples factores no controlados en plantas control.

La calidad del néctar (en cuanto a azúcares presentes) tiene una relación con la cantidad del néctar secretado. Esto es, plantas de variedades domesticadas que secretaron mayor cantidad de néctar, también se encontró mayor cantidad de azúcares y viceversa, plantas de variedades silvestres que secretaron menos cantidad de néctar, tenían menos cantidad de azúcares en el NEF.

Con los datos obtenidos se tiene un primer acercamiento a la secreción de NEF en variedades domesticadas y silvestres, así como en la composición de los azúcares que tiene el NEF de cada variedad a distintas horas del día. También se tienen datos acerca del comportamiento de la invertasa durante 24 h en plantas tratadas con AJ, una parte aún poco estudiada con relación a la aplicación exógena de AJ.

7. CONCLUSIONES

Se ha demostrado en múltiples estudios que la domesticación ha disminuido la expresión de diferentes rasgos de defensa (Bellota et al., 2013). Sin embargo, hasta la fecha, los trabajos sobre los efectos de la domesticación se enfocaron en los rasgos de defensa directa. El presente estudio se enfocó en estudiar un posible efecto positivo de la domesticación en un rasgo defensivo indirecto: la secreción de NEF.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la respuesta de la secreción del NEF y de la actividad de la invertasa a la aplicación exógena de AJ depende, entre otros, de la variedad usada. La secreción de NEF, actividad de invertasa y calidad del néctar, fue más variable en las variedades silvestres (Pv11 y Pv27) comparando con las variedades domesticadas (NSL y FJM). Se requieren futuros estudios que comprueben lo observado en éste, y controlen muchos de los factores implicados en la secreción de NEF.

8. PERSPECTIVAS

Determinar la actividad de algunos de los genes involucrados en la síntesis y secreción del NEF (algunos de los ya conocidos como SWEET9 y CWIN4).

Evaluar si se repiten los valores de secreción bajo condiciones de campo y evaluar a su vez su posible uso como biocontrol de herbívoros en las variedades comerciales utilizadas.

Evaluar si existe reducción de daño por herbivoría bajo condiciones de campo cuando aumentan las secreciones de NEF (comprobar especialmente los ritmos nocturnos).

Analizar los componentes del néctar (aminoácidos, COV's, proteínas) y relacionar los compuestos con el tipo de herbívoros que se atraen.

Evaluar si hay cambios en los rendimientos de semilla al aumentar la secreción de NEF bajo condiciones de campo.

9. REFERENCIAS

- Agthe, C. (1951) Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars. *Berichte der schweizerischen Botanischen Gesellschaft*, 61, 240-274. doi: <https://doi.org/10.3929/ethz-a-000093175>
- Baker, H.G. & Baker, I. (1982). Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In: M.H. Nitecki (Ed.), *Biochemical aspects of evolutionary biology* (pp. 131–172). Chicago: University of Chicago Press.
- Baker, H.G. & Baker, I. (1983). Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: C.E. Jones, & R.J. Little (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology* (pp. 117–141). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Acosta Díaz, E., Acosta Gallegos, J. A., Amador Ramírez, M. D., & Padilla Ramírez, J. S. (2008). Relación entre índice de área foliar y rendimiento en frijol bajo condiciones de secano. *Agricultura Técnica En México*, 34(1), 13–20.
- Acosta-Díaz, E., Acosta-Gallegos, J. A., Amador-Ramírez, M. D., & Padilla-Ramírez, J. S. (2009). Efecto del riego suplementario en la producción de biomasa y grano de frijol de temporal en Zacatecas, México. *Agricultura Técnica En México*, 35(2), 157–167.
- Acosta-Díaz, E., Trejo-López, C., Ruiz-Posadas, L. del M., Padilla-Ramírez, J. S., & Acosta-Gallegos, J. A. (2004). Adaptación del frijol a sequía en la etapa reproductiva. *Terra Latinoamericana*, 22(1), 49–58. Retrieved from <http://148.215.2.11/articulo.oa?id=57311208006>
- Arimura, G. I., Kost, C., & Boland, W. (2005). Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734(2), 91–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.03.001>
- Baker, H. G., Opler, P. A., & Baker, I. (1978). A Comparison of the Amino Acid Complements of Floral and Extrafloral Nectars. *Botanical Gazette*, 139(3),

322–332. <https://doi.org/10.1086/337008>

Baker H. G. and Baker Irene. (1973). Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature*, 241, 543–545.

Balick, M. J. (1984). Ethno botany of Palms in the Neotropics. *Advances in Economic Botany*, 1, 9–23.

Ballhorn, D. J., Godschalx, A. L., & Kautz, S. (2013). Co-Variation of Chemical and Mechanical Defenses in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 39(3), 413–417. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0255-6>

Bellota, E., Medina, R. F., & Bernal, J. S. (2013). Physical leaf defenses - altered by *Zea* life-history evolution, domestication, and breeding - mediate oviposition preference of a specialist leafhopper. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 149(2), 185–195. <https://doi.org/10.1111/eea.12122>

Belt, T. (1874). *The naturalist in Nicaragua*. London,: J. Murray,.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.1390>

Bixenmann, R. J., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2011). Is extrafloral nectar production induced by herbivores or ants in a tropical facultative ant-plant mutualism? *Oecologia*, 165(2), 417–425. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1787-x>

Burquez, A., & Corbet, S. A. (1991). Do flowers reabsorb nectar? *Functional Ecology*, 5(3), 369–379. <https://doi.org/10.2307/2389808>

Buxbaum, F. (1927). Zur Frage des Eiweissgehaltes des Nektars. (Vorläufige Mitteilung). *Planta*, 4(5), 818–821. <https://doi.org/10.1007/BF01911267>

Camacho Villa, T. C., Maxted, N., Scholten, M., & Ford-Lloyd, B. (2005). Defining and identifying crop landraces. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(3), 373–384. <https://doi.org/10.1079/PGR200591>

Canto, A., Herrera, C. M., Medrano, M., Pérez, R., & García, I. M. (2008).

- Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): An experimental test. *American Journal of Botany*. Botanical Society of America, Inc. <https://doi.org/10.2307/27793029>
- Cardoso-Gustavson, P., & Davis, A. R. (2015). Is nectar reabsorption restricted by the stalk cells of floral and extrafloral nectary trichomes? *Plant Biology*, *17*(1), 134–146. <https://doi.org/10.1111/plb.12208>
- Cardoso-Gustavson, P., Robazzi Bignelli Valente Aguiar, J. M., Ricardo Pansarin, E., & de Barros, F. (2013). A light in the shadow: the use of Lucifer Yellow technique to demonstrate nectar reabsorption. *Plant Methods*, *9*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-20>
- Carter, C., Healy, R., O'Tool, N. M., Naqvi, S. M. S., Ren, G., Park, S., ... Thornburg, R. W. (2007). Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant Physiology*, *143*(1), 389–99. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089326>
- Carter, C., & Thornburg, R. W. (2004). Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in Plant Science*, *9*(7), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.008>
- Caspary, R. (1848). De nectariis. *Bonn: Adolphum Marcum*, 56. Retrieved from https://books.google.com.mx/books/about/De_nectariis_Commentationem_botanicam_co.html?id=8XdRmgEACAAJ&redir_esc=y
- Castellanos, M. C., Wilson, P., & Thomson, J. D. (2002). Dynamic nectar replenishment in flowers of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, *89*(1), 111–8. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.1.111>
- CESAVEG. (2007). Manual de Plagas y Enfermedades en Frijol, 3–24.
- Chacón, S. M. I., Pickersgill, B., & Debouck, D. G. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(3), 432–

444. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1842-2>

- Chen, Y. H., & Bernal, C. C. (2011). Arthropod diversity and community composition on wild and cultivated rice. *Agricultural and Forest Entomology*, 13(2), 181–189. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00510.x>
- Chen, Y. H., Gols, R., & Benrey, B. (2015). Crop Domestication and Its Impact on Naturally Selected Trophic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 35–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020601>
- Choh, Y., Kugimiya, S., & Takabayashi, J. (2006). Induced production of extrafloral nectar in intact lima bean plants in response to volatiles from spider mite-infested conspecific plants as a possible indirect defense against spider mites. *Oecologia*, 147(3), 455–460. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0289-8>
- Choh, Y., & Takabayashi, J. (2006). Herbivore-Induced Extrafloral Nectar Production in Lima Bean Plants Enhanced by Previous Exposure to Volatiles from Infested Conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*, 32(9), 2073–2077. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9130-z>
- Cid Ríos, J. Á., Reveles Hernández, M., Velásquez Valle, R., & Mena Covarrubias, J. (2014). *Producción de semilla de Frijol. Folleto técnico No. 63. Campo experimental Zacatecas*. Calera, Zacatecas, México. Retrieved from <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/produccionSemillaFrijol.pdf>
- Corbet, S. A., & Delfosse, E. S. (1984). Honeybees and the nectar of *Echium plantagineum* L. in southeastern Australia. *Austral Ecology*, 9(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1984.tb01351.x>
- Córdoba Campos, O. (2011). *Inducción de defensa directa e indirecta en plantas de frijol (Phaseolus vulgaris L. y Phaseolus coccineus L.) y su relación con la domesticación Tesis que presenta Maestro en Ciencias*. Cinvestav-Unidad Irapuato.
- Córdova-Campos, O., Adame-Álvarez, R. M., Acosta-Gallegos, J. A., & Heil, M. (2012). Domestication affected the basal and induced disease resistance in

- common bean (*Phaseolus vulgaris*). *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 367–379. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9995-3>
- Dávila-Flores, A. M., DeWitt, T. J., & Bernal, J. S. (2013). Facilitated by nature and agriculture: performance of a specialist herbivore improves with host-plant life history evolution, domestication, and breeding. *Oecologia*, 173(4), 1425–1437. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2728-2>
- Delpino, F. (1886). Funzione mirmecofila nel regno vegetale. In *Memoria della Accademia delle Scienze dell' Instituto di Bologna* (pp. 215–323).
- Doust, A. (2007). Architectural Evolution and its Implications for Domestication in Grasses. *Annals of Botany*, 100(5), 941–950. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm040>
- Duke, S. ., Canel, C., Rimando, A. ., Telle, M. ., Duke, M. ., & Paul, R. . (2000). Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity (pp. 121–151). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(00\)31008-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(00)31008-4)
- Enneking, D., & Wink, M. (2000). Towards the elimination of anti-nutritional factors in grain legumes. In R. Knight (Ed.), *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*. (pp. 671–683). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4385-1_65
- Escalante-Pérez, M., Jaborsky, M., Lautner, S., Fromm, J., Müller, T., Dittrich, M., ... Ache, P. (2012). Poplar Extrafloral Nectaries: Two Types, Two Strategies of Indirect Defenses against Herbivores. *Plant Physiology*, 159, 1176–1191. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196014>
- Escoto Gudiel, N. D. (2004). *Cultivo de Frijol. Manual técnico para uso de empresas privadas, consultores individuales y productores*. Honduras. Retrieved from <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/REf01e74.pdf>
- Evans, L. T. (1993). *Crop evolution, adaptation and yield*. Cambridge UK: Cambridge University Press. Retrieved from

<http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/life-sciences/natural-resource-management-agriculture-horticulture-and/crop-evolution-adaptation-and-yield?format=PB&isbn=9780521295581#QiUD0XDqqYGh5xcO.97>

Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108(3), 229–257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb04159.x>

Fidgor, W. (1891). Über die extranuptialen Nectarien von *Pteridium aquilinum*. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 9, 293–295.

FIRA. Panorama Agroalimentario. Frijol 2016 (2016). México.

Fraenkel, G. S. (1959). The Raison d'Être of Secondary Plant Substances. *Science*, 129(3361), 1466–1470. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/129/3361/1466.long>

Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). *Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America*. BRIT. Retrieved from <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54291>

Frey-Wyssling, A. (1955). The Phloem Supply to the Nectaries. *Acta Botanica Neerlandica*, 4(3), 358–369. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1955.tb00337.x>

Frey-Wyssling, A., & Hausermann, E. (1960). Deutung der gestaltlosen nektarien. *Berichte Der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft*, 70, 150–162. <https://doi.org/10.5169/seals-49480>

Frey-Wyssling, A., Zimmermann, M., & Maurizio, A. (1954). Über den enzymatischen Zuckerumbau in Nektarien. *Experientia*, 10, 490–91.

Gaffal, K. P., Friedrichs, G. J., & El-Gammal, S. (2007). Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. *Annals of Botany*, 99(4), 593–607. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm002>

- Gardener, M. C., & Gillman, M. P. (2002). The Taste of Nectar : A Neglected Area of Pollination Ecology. *Oikos*, 98(3), 552–557. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.980322.x>
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156(2), 145–169. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x>
- Gepts, P. (2010). Crop Domestication as a Long-Term Selection Experiment. In *Plant Breeding Reviews* (pp. 1–44). Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470650288.ch1>
- Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In A. van Schoonhoven & O. (Oswaldo) Voysest (Eds.), *Common beans: research for crop improvement* (pp. 7–53). Wallingford, UK: C.A.B. International in association with Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Gols, R., Bukovinszky, T., Van Dam, N. M., Dicke, M., Bullock, J. M., & Harvey, J. A. (2008). Performance of Generalist and Specialist Herbivores and their Endoparasitoids Differs on Cultivated and Wild Brassica Populations. *Journal of Chemical Ecology*, 34(2), 132–143. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9429-z>
- Gols, R., Wagenaar, R., Bukovinszky, T., van Dam, N. M., Dicke, M., Bullock, J. M., & Harvey, J. A. (2008). Genetic variation in defense chemistry in wild cabbages affects herbivores and their endoparasitoids. *Ecology*, 89(6), 1616–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18589526>
- Gonzalez Torres, G., Mendoza Hernández, F. M., Cobarrubias Prieto, J., Morán Vazquez, N., & Acosta Gallegos, J. A. (2008). Rendimiento Y Calidad De Semilla De Frijol En Dos Épocas De Siembra En La Región Del Bajío. *Agricultura Técnica En México*, 34(4), 421–430. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/agritm/v34n4/v34n4a5.pdf>
- González-Teuber, M., Eilmus, S., Muck, A., Svatoš, A., & Heil, M. (2009).

- Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. *The Plant Journal*, *58*, 464–473.
- González-Teuber, M., & Heil, M. (2009a). Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(9), 809–813. Retrieved from www.landesbioscience.com
- González-Teuber, M., & Heil, M. (2009b). The Role of Extrafloral Nectar Amino Acids for the Preferences of Facultative and Obligate Ant Mutualists. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(4), 459–468. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9618-4>
- González-Teuber, M., Pozo, M. J., Muck, A., Svatos, A., Adame-Alvarez, R. M., & Heil, M. (2010). Glucanases and chitinases as causal agents in the protection of Acacia extrafloral nectar from infestation by phytopathogens. *Plant Physiology*, *152*(3), 1705–15. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148478>
- González-Teuber, M., Silva Bueno, J. C., Heil, M., Boland, W., Bennett, R., Wallsgrave, R., ... Pringle, R. (2012). Increased Host Investment in Extrafloral Nectar (EFN) Improves the Efficiency of a Mutualistic Defensive Service. *PLoS ONE*, *7*(10), e46598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046598>
- Heil, M. (2004). Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology*, *92*(3), 527–536. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00890.x>
- Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, *178*(1), 41–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x>
- Heil, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, *16*(4), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.01.003>
- Heil, M. (2015). Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: A Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020753>
- Heil, M., & Adame-Álvarez, R. M. (2010). Short signalling distances make plant

- communication a soliloquy. *Biology Letters*, 6(6), 843–845.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0440>
- Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503–512. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf076>
- Heil, M., Fiala, B., Baumann, B., & Linsenmair, K. E. (2000). Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*, 14(6), 749–757. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00480.x>
- Heil, M., Greiner, S., Meimberg, H., Krüger, R., Noyer, J.-L., Heubl, G., ... Boland, W. (2004). Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature*, 430(6996), 205–208.
<https://doi.org/10.1038/nature02703>
- Heil, M., Koch, T., Hilpert, A., Fiala, B., Boland, W., & Linsenmair, K. E. (2001). Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1083–1088.
<https://doi.org/10.1073/pnas.031563398>
- Heil, M., & Kost, C. (2006). Priming of indirect defences. *Ecology Letters*, 9(7), 813–817. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00932.x>
- Heil, M., & Silva Bueno, J. C. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5467–5472. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610266104>
- Hernandez-Cumplido, J., Forter, B., Moreira, X., Heil, M., & Benrey, B. (2016). Induced Floral and Extrafloral Nectar Production Affect Ant-pollinator Interactions and Plant Fitness. *Biotropica*, 48(3), 342–348.
<https://doi.org/10.1111/btp.12283>

- Hilker, M., & Meiners, T. (2006). Early Herbivore Alert: Insect Eggs Induce Plant Defense. *Journal of Chemical Ecology*, 32(7), 1379–1397.
<https://doi.org/10.1007/s10886-006-9057-4>
- Izaguirre, M. M., Mazza, C. A., Astigueta, M. S., Ciarla, A. M., & Ballaré, C. L. (2013). No time for candy: Passionfruit (*Passiflora edulis*) plants down-regulate damage-induced extra floral nectar production in response to light signals of competition. *Oecologia*, 173(1), 213–221.
<https://doi.org/10.1007/s00442-013-2721-9>
- Jaber, L. R., & Vidal, S. (2009). Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: Do endophytes induce extrafloral-mediated defences in vicia faba? *Functional Ecology*, 23(4), 707–714.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01554.x>
- Johns, T. (1989). *A chemical-ecological model of root and tuber domestication in the Andes*. (Foraging and farming: the evolution of plant exploitation, Ed.), Harris DR, Hillman GC. London. Retrieved from
<https://geoscience.net/research/002/007/002007804.php>
- Johns, T., & Alonso, J. G. (1990). Glycoalkaloid change during the domestication of the potato, *Solanum* Section *Petota*. *Euphytica*, 50(3), 203–210.
<https://doi.org/10.1007/BF00023646>
- Jones, D. A. (1998). Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry*, 47(2), 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00425-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00425-1)
- Jones, I. M., & Koptur, S. (2015a). Dynamic extrafloral nectar production: The timing of leaf damage affects the defensive response in senna mexicana var. *Chapmanii* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 102(1), 58–66.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1400381>
- Jones, I. M., & Koptur, S. (2015b). Quantity over quality: Light intensity, but not red/far-red ratio, affects extrafloral nectar production in *Senna mexicana* var. *chapmanii*. *Ecology and Evolution*, 5(18), 4108–4114.
<https://doi.org/10.1002/ece3.1644>

- Kelly, J. D. (2004). ADVANCES IN COMMON BEAN IMPROVEMENT: SOME CASE HISTORIES WITH BROADER APPLICATIONS. *Acta Horticulturae*, (637), 99–122. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.637.11>
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2001). Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science*, 291(5511), 2141–2144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 299–328. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135207>
- Koptur, S. (1979). Facultative Mutualism between Weedy Vetches Bearing Extrafloral Nectaries and Weedy Ants in California. *American Journal of Botany*, 66(9), 1016–1020. <https://doi.org/10.2307/2442565>
- Koptur, S. (1992). Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants - Second Part. *Insect Plant Interactions*. Retrieved from <http://kdb.kew.org/kdb/detailedresult.do?id=88170>
- Kost, C., & Heil, M. (2005). Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology*, 6(3), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2004.11.002>
- Kost, C., & Heil, M. (2006). Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94(3), 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01120.x>
- Kram, B. W., Bainbridge, E. A., Perera, M. A. D. N., & Carter, C. (2008). Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant Molecular Biology*, 68(1–2), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9361-1>
- Kram, B. W., & Carter, C. J. (2009). *Arabidopsis thaliana* as a model for functional nectary analysis. *Sexual Plant Reproduction*, 22(4), 235–246. <https://doi.org/10.1007/s00497-009-0112-5>

- Kuo, J., & Pate, J. S. (1985). The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp): I. Morphology, anatomy and fine structure. *Planta*, 166(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/BF00397381>
- Langenberger, M. W., & Davis, A. R. (2002). Temporal changes in floral nectar production, reabsorption, and composition associated with dichogamy in annual caraway (*Carum carvi*; Apiaceae). *American Journal of Botany*, 89(10), 1588–1598. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.10.1588>
- Leiss, K. A., Cristofori, G., van Steenis, R., Verpoorte, R., & Klinkhamer, P. G. L. (2013). An eco-metabolomic study of host plant resistance to Western flower thrips in cultivated, biofortified and wild carrots. *Phytochemistry*, 93, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.011>
- Leitner, M., Boland, W., & Mithöfer, A. (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 167(2), 597–606. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01426.x>
- Lindig-Cisneros, R., Benrey, B., & Espinosa-García, F. J. (1997). Phytoalexins, Resistance Traits, and Domestication. Status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(8), 1997–2011. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006485.38713.8c>
- Lindig-Cisneros, R., Dirzo, R., & Espinosa-García, F. J. (2002). Effects of domestication and agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in *Phaseolus* beans. *Ecological Research*, 17(3), 315–321. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2002.00491.x>
- Linnaeus, C. (1735). *Systema Naturae*. Retrieved from https://www.kth.se/polopoly_fs/1.199546!/Menu/general/column-content/attachment/Linnaeus--extracts.pdf
- López-Salinas, E., Tosquy-Valle, O. H., Villar-Sánchez, B., Ugalde Acosta, F. J., Cumpián-Gutierrez, J., & Becerra Leor, E. N. (2007). Negro papaloapan, a new bean cultivar for the tropical areas of veracruz and chiapas, Mexico.

Agricultura Técnica En México, 33(2), 197–200.

- Lortzing, T., Calf, O. W., Böhlke, M., Schwachtje, J., Kopka, J., Geuß, D., ...
Kopka, J. (2016). Extrafloral nectar secretion from wounds of *Solanum dulcamara*. *Nature Plants*, 2(5), 16056.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.56>
- Maffei, M. E., Mithöfer, A., & Boland, W. (2007a). Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science*, 12(7), 310–316.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.001>
- Maffei, M. E., Mithöfer, A., & Boland, W. (2007b). Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2946–2959.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.016>
- Mathur, V., Wagenaar, R., Caissard, J.-C., Reddy, A. S., Vet, L. E. M., Cortesero, A.-M., & Van Dam, N. M. (2013). A novel indirect defence in Brassicaceae: Structure and function of extrafloral nectaries in *Brassica juncea*. *Plant, Cell & Environment*, 36(3), 528–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02593.x>
- Millán-Cañongo, C., Orona-Tamayo, D., & Heil, M. (2014). Phloem Sugar Flux and Jasmonic Acid-Responsive Cell Wall Invertase Control Extrafloral Nectar Secretion in *Ricinus communis*. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 760–769.
<https://doi.org/10.1007/s10886-014-0476-3>
- Mithen, R. F., Lewis, B. G., Heaney, R. K., & Fenwick, G. R. (1987). Glucosinolates of wild and cultivated Brassica species. *Phytochemistry*, 26(7), 1969–1973.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81740-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81740-9)
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu. Rev. Plant Biol*, 63, 431–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Mithöfer, A., Wanner, G., & Boland, W. (2005). Effects of Feeding Spodoptera

- littoralis on Lima Bean Leaves. II. Continuous Mechanical Wounding Resembling Insect Feeding Is Sufficient to Elicit Herbivory-Related Volatile Emission. *Plant Physiology*, 137(3). Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/137/3/1160>
- Nee, M. (1990). The domestication of cucurbita (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44(S3), 56–68. <https://doi.org/10.1007/BF02860475>
- Nepi, M., Cresti, L., Guarnieri, M., & Pacini, E. (2011). Dynamics of Nectar Production and Nectar Homeostasis in Male Flowers of *Cucurbita pepo* L. *International Journal of Plant Sciences*, 172(2), 183–190. <https://doi.org/10.1086/657648>
- Nepi, M., Guarnieri, M., & Pacini, E. (2001). Nectar Secretion, Reabsorption, and Sugar Composition in Male and Female Flowers of *Cucurbita pepo*. *International Journal of Plant Sciences*, 162(2), 353–358. <https://doi.org/10.1086/319581>
- Nepi, M., & Stpiczyńska, M. (2008a). The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate nectar features. *Naturwissenschaften*, 95(3), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0307-2>
- Nepi, M., & Stpiczyńska, M. (2008b). The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate nectar features. *Naturwissenschaften*, 95(3), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0307-2>
- Nicolson, S. W. (1995). Direct Demonstration of Nectar Reabsorption in the Flowers of *Grevillea robusta* (Proteaceae). *Functional Ecology*, 9(4), 584–588. <https://doi.org/10.2307/2390148>
- Nicolson, S. W., Nepi, M., & Pacini, E. (2007). *Nectaries and Nectar*.
- Nieuwenhuis von Uexküll-Güldenband, M. (1906). Extraflorale Zuckerausscheidungen und Ameisenschutz. In *Annales du Jardin botanique de Buitenzorg* (pp. 195–328).
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*,

144(1), 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>

- Orona-Tamayo, D., Wielsch, N., Escalante-Pérez, M., Svatos, A., Molina-Torres, J., Muck, A., ... Heil, M. (2013). Short-term proteomic dynamics reveal metabolic factory for active extrafloral nectar secretion by *Acacia cornigera* ant-plants. *The Plant Journal*, 73(4), 546–554.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12052>
- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H. (1997). De Novo Biosynthesis of Volatiles Induced by Insect Herbivory in Cotton Plants. *Plant Physiology*, 114, 1161–1167.
<https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1161>
- Paris, H. S. (1989). Historical Records, Origins, and Development of the Edible Cultivar Groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 43, 423–443. <https://doi.org/10.2307/4255187>
- Pate, J. S., Peoples, M. B., Storer, P. J., & Atkins, C. A. (1985). The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) II. Nectar composition, origin of nectar solutes, and nectary functioning. *Planta*, 166(1), 28–38.
<https://doi.org/10.1007/BF00397382>
- Pederson, M. W., Lefevre, C. W., & Wiebe, H. H. (1958). Absorption of C14 Labeled Sucrose by Alfalfa Nectaries. *Science*, 127, 758–759.
<https://doi.org/10.1126/science.127.3301.758-a>
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany*, 100(5), 925–40.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm193>
- Radhika, V., Kost, C., Bartram, S., Heil, M., & Boland, W. (2008). Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta*, 228, 449–457.
<https://doi.org/10.1007/s00425-008-0749-6>
- Radhika, V., Kost, C., Boland, W., & Heil, M. (2010). Towards elucidating the differential regulation of floral and extrafloral nectar secretion. *Plant Signaling*

& *Behavior*, 5(7), 924–6. <https://doi.org/10.4161/psb.5.7.12134>

Radhika, V., Kost, C., Mithöfer, A., & Boland, W. (2010). Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17228–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009007107>

Rose, U., Manukian, A., Heath, R. R., & Tumlinson, J. H. (1996). Volatile Semiochemicals Released from Undamaged Cotton Leaves (A Systemic Response of Living Plants to Caterpillar Damage). *Plant Physiology*, 111(2). Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/111/2/487>

Rosenthal, J. P., & Dirzo, R. (1997). Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: Evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology*, 11(3), 337–355. <https://doi.org/10.1023/A:1018420504439>

Rosenthal, J. P., & Welter, S. C. (1995). Tolerance to herbivory by a stem-boring caterpillar in architecturally distinct maizes and wild relatives. *Oecologia*, 102(August 2015), 146–155. <https://doi.org/10.1007/BF00333245>

Ruffner, G. A., & Clark, W. D. (1986). Extrafloral Nectar of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae): Composition and Its Importance to Ants. *American Journal of Botany*, 73(2), 185–189. <https://doi.org/10.2307/2444171>

Ruhlmann, J. M., Kram, B. W., & Carter, C. J. (2010). CELL WALL INVERTASE 4 is required for nectar production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 395–404. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp309>

Schwanitz, F. (1966). *The Origin of Cultivated Plants*. Cambridge, MA: Harvard University Press. Retrieved from <https://www.abebooks.co.uk/book-search/title/the-origin-of-cultivated-plants/author/schwanitz-f/>

Shuel, R. W. (1952). Some factors affecting nectar secretion in red clover. *Plant Physiology*, 27, 95–110. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC540307/pdf/plntphys00396->

0104.pdf

- Singh, S. P. (2001). Broadening the Genetic Base of Common Bean Cultivars. *Crop Science*, 41(6), 1659. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.1659>
- Smartt, J., & Simmonds, N. W. (1995). *Evolution of crop plants*. New York: John Wiley & Son.
- Smith, L. L., Lanza, J., & Smith, G. C. (1990). Amino Acid Concentrations in Extrafloral Nectar of *Impatiens Sultani* Increase after Simulated Herbivory. *Ecology*, 71(1), 107–115. <https://doi.org/10.2307/1940251>
- Stpiczynska, M., Davies, K. L., & Gregg, A. (2005). Comparative Account of Nectary Structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 95(5), 749–756. <https://doi.org/10.1093/aob/mci081>
- Sujana, G., Sharma, H. C., & Manohar Rao, D. (2012). Pod surface exudates of wild relatives of pigeonpea influence the feeding preference of the pod borer, *Helicoverpa armigera*. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(2), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s11829-011-9179-7>
- Tauzin, A. S., & Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5, 293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00293>
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Tilman, D. (1978). Cherries, Ants and Tent Caterpillars: Timing of Nectar Production in Relation to Susceptibility of Caterpillars to Ant Predation. *Ecology*, 59(4), 686–692. <https://doi.org/10.2307/1938771>
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., & Lewis, W. J. (1990). Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science*, 250(4985). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/250/4985/1251.long>

- Van Poecke, R. M. P., & Dicke, M. (2004). Indirect Defence of Plants against Herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a Model Plant. *Plant Biology*, 6(4), 387–401. <https://doi.org/10.1055/s-2004-820887>
- Vassilyev, A. E. (2010). On the mechanisms of nectar secretion: revisited. *Annals of Botany*, 105(3), 349–54. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp302>
- Wäckers, F. L., & Bonifay, C. (2004). HOW TO BE SWEET? EXTRAFLOREAL NECTAR ALLOCATION BY *GOSSYPIUM HIRSUTUM* FITS OPTIMAL DEFENSE THEORY PREDICTIONS. *Ecology*, 85(6), 1512–1518. <https://doi.org/10.1890/03-0422>
- Wagner, R. E., Mugnaini, S., Sniezko, R., Hardie, D., Poulis, B., Nepi, M., ... von Aderkas, P. (2007). Proteomic evaluation of gymnosperm pollination drop proteins indicates highly conserved and complex biological functions. *Sexual Plant Reproduction*, 20(4), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s00497-007-0054-8>
- Walter, D. E. (1996). Living on Leaves: Mites, Tomenta, and Leaf Domatia. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 101–114. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.000533>
- Wist, T. J., & Davis, A. R. (2005). Floral Nectar Production and Nectary Anatomy and Ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany*, 97(2), 177–193. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj027>
- Yamawo, A., & Hada, Y. (2010). Effects of light on direct and indirect defences against herbivores of young plants of *Mallotus japonicus* demonstrate a trade-off between two indirect defence traits. *Annals of Botany*, 106(1), 143–8. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq093>
- Ziegler, H., & Lüttge, U. (1959). Über die Resorption von C¹⁴-Glutaminsäure durch sezernierende Nektarien. *Die Naturwissenschaften*, 46(5), 176–177. <https://doi.org/10.1007/BF00629741>
- Zimmermann, M. (1953). Paperchromatographische Untersuchungen u"ber die

pflanzliche Zuckersekretion. *Ber. Schweiz. Bot. Ges*, 63, 402–429.

Zimmermann, M. (1954). Über die Sekretion saccharosespaltender Transglukosidasen im pflanzlichen Nektar. *Experientia (Basel)*, 15(3), 145–146. <https://doi.org/10.1007/BF02158524>

Zohary, D. (1999). Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46(2), 133–142. <https://doi.org/10.1023/A:1008692912820>