



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**“COMPORTAMIENTO DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
A ENFERMEDADES EN VALLES ALTOS DE MÉXICO”**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL SE REQUIERE

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA:

ANGÉLICA MARÍA QUIROZ MILLÁN

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORIGINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Chapingo, Estado de México, Marzo de 2017.

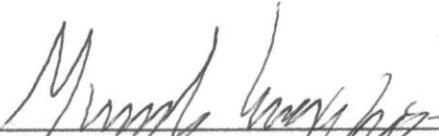


La tesis titulada “COMPORTAMIENTO DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A ENFERMEDADES EN VALLES ALTOS DE MEXICO”, que fue realizada por la alumna Angélica María Quiroz Millán bajo la dirección y colaboración del H. Consejo Particular de asesores abajo indicados, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de :

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



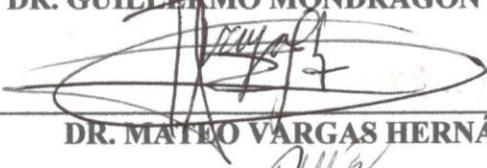
DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

CO-DIRECTOR:



DR. GUILLERMO MONDRAGÓN PEDRERO

ASESOR:



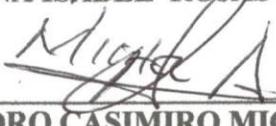
DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:



DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR:



DR. ALEJANDRO CASIMIRO MICHEL ACEVES

Chapingo, Estado de México, Marzo de 2017.

DATOS BIOGRÁFICOS



Angélica María Quiroz Millán, originaria de La Concepción, municipio de Pilcaya, Gro. Lugar en el que realizó los estudios de Prescolar y Primaria, los estudios a nivel Secundaria los curso en la Esc. Sec. Tec. “Jesús Arizmendi Rogel” y la Preparatoria en el Colegio de Bachilleres EMSAD 3(Educación Media Superior a Distancia), ambos en Pilcaya, Gro. La licenciatura la curso en el Colegio superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CEP-SAEGRO) (2006- 2010). Se desempeñó como Prestador de Servicios Profesionales en CADER`s (Centro de Apoyo al Desarrollo Rural) pertenecientes a la SAGARPA y en el programa Federal PESA (Proyecto estratégico para la Seguridad Alimentaria) (2010-2014). Posteriormente realizó los estudios de posgrado en la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2015-2016).

AGRADECIMIENTOS

Al **CONACyT** por la beca brindada para poder realizar los estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, en especial a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, por haber permitido realizar la maestría.

Al departamento de **Parasitología Agrícola**, por los recursos y facilidades brindadas para el desarrollo de esta investigación.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir** por aceptar dirigir mi trabajo, brindarme su amistad, sabiduría, confianza y apoyo mutuo.

Al **Dr. Guillermo Mondragón Pedrero** por su apoyo incondicional, amistad, sabiduría compartida y colaborar en todas las actividades realizadas en campo que hicieron posible este trabajo.

Al **Dr. Mateo Hernández Vargas** por su amistad, apoyo incondicional, colaboración y asesoría durante cada paso en la realización de esta investigación.

A la **Dra. Reyna I. Rojas Martínez** por su confianza, amistad, apoyo, asesoría y facilidades en el laboratorio a su cargo para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Alejandro Michel Aceves** por su amistad, confianza, motivación profesional para seguir con mis estudios, apoyo incondicional y asesoría brindada.

A **MC. Olivia Nabor Romero** por brindarme su amistad, compartir conmigo su tiempo y conocimientos teórico – prácticos en la realización de trabajos de laboratorio.

A **MC. María Guadalupe Hernández Deheza** por su amistad y conocimientos compartidos.

A los laboratoristas **Mariana Calzada Millán** y **Juan Feroso Ramírez** por su colaboración y facilidades brindadas en el laboratorio de micología.

A **Santiago Cabrera Rosas** por su apoyo en la realización de actividades de campo durante los ciclos del cultivo.

A **todos los profesores** que en este camino compartieron sus conocimientos y enriquecieron los míos.

A mis amigas **Paola Izquierdo Herrera y Marta Fernández Gamarra** por todo el apoyo brindado.

DEDICATORIA

A mi Esposo:

Joel Flores Hernández

Por ser un ejemplo de superación constante, brindarme su apoyo incondicional y ser inspiración para alcanzar mis metas y cumplir mis sueños en la superación personal y profesional.

A Mis Padres:

Carolina Millán Figueroa y Armando Quiroz Colín

Por ser quienes desde pequeña me inculcaron la responsabilidad y dedicación en cada una de las cosas de la vida y ahora tengo la satisfacción de alcanzar una meta más.

A toda mi familia:

Hermanas (os), sobrinas (os), suegros y cuñadas que han estado a mi lado dando fortaleza y entusiasmo en cada momento, siguiendo cada paso de esta etapa.

Índice general

	Página
DATOS BIOGRÁFICOS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	x
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Investigaciones relacionadas a enfermedades del frijol.....	4
4.2. Investigaciones referentes al frijol en el campo agrícola.....	8
4.3. Estrategias de defensa de la planta ante los patógenos: Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y defensinas.....	11
4.3.1. Defensinas	18
4.4. Fundamento de la extracción de ARN para su uso en PCR.....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Localización del experimento	27
5.2. Tratamientos	27
5.3. Diseño experimental	27
5.4. Manejo del cultivo	27
5.5. Variables evaluadas	28
5.6. Identificación en campo de las enfermedades	29
5.7. Análisis de sanidad de las semillas	29
5.8. Análisis de patógenos en el suelo	29
5.9. Análisis molecular para detectar Proteínas PR y defensinas	30
5.9.1. Muestras vegetales	30
5.9.2. Extracción de ARN de las muestras vegetales	30
5.9.3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los genes de interés	31
5.10. Análisis estadístico.....	31

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Análisis de la sanidad de semillas y suelo	32
6.2. Resultados en campo: ciclo PV-2015 y PV-2016.....	33
6.3. Rendimiento promedio de genotipos en 2 años	42
6.4. Análisis molecular de los genotipos	44
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. RECOMENDACIONES	46
IX. LITERATURA CITADA	47
APÉNDICE	58

Índice de cuadros

Cuadro	Pág.
1 Familias reconocidas de proteínas relacionadas con la patogénesis.....	14

Índice de figuras

Figura	Página
1 A) Micelio de <i>Rhizoctonia solani</i> , B) Conidios de <i>Alternaria</i> sp., C) microconidios y micelio de <i>Fusarium</i> sp., D) conidióforo <i>Aspergillus</i> sp. y E) conidióforo de <i>Penicillium</i> sp.....	32
2 Síntomas de las enfermedades del frijol y estructuras del patógeno. A) Roya, B) Mancha redonda, C) Pudrición radical, D) Mancha blanca, E) Tizón común, F) Tizón de halo, G)Antracnosis en vaina y follaje.....	34
3 Valor medio del ABCPE de la severidad de las enfermedades: antracnosis en vaina, antracnosis en follaje, tizón común y tizón de halo, en un análisis conjunto para los diferentes genotipos a través de los ciclos PV-2015 y PV-2016.....	35
4 Medias promedio de la incidencia (porcentaje de plantas con pudrición radical por genotipo) análisis combinado a través de los dos años e individuales por cada año.....	37
5 Valor medio del ABCPE de la severidad de las enfermedades: mancha blanca, mancha redonda y roya para los diferentes genotipos durante el ciclo PV-2015.....	41
6 Rendimiento (kg ha^{-1}) de los diferentes genotipos evaluados en ambos ciclos agrícolas.....	44
7 Electroforesis de en gel de agarosa de ARN de los genotipos Negro productor y Negro Chapingo, extraídos de hojas de frijol. Cada banda intensa corresponde a las subunidades ribosomales (mayor y menor) que indican la presencia de ARN óptimo y su apariencia es definida.....	45

COMPORTAMIENTO DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A ENFERMEDADES EN VALLES ALTOS DE MEXICO

RESPONSE OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) GENOTYPES TO DISEASES IN HIGH VALLEYS OF MEXICO

Angélica María Quiroz Millán¹, Santos Gerardo Leyva Mir²

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fuente vegetal de proteína, de importancia en la población. Se cultiva en varios países y en gran parte del territorio nacional. Sin embargo la producción ha sido afectada por la presencia de plagas y enfermedades que disminuyen el rendimiento o lo hacen poco redituable para el productor, lo que ha llevado a varios investigadores a buscar alternativas que mejoren las estrategias de control. El objetivo de la presente investigación fue identificar el grado de tolerancia a enfermedades de 14 genotipos e indagar sobre la producción de mecanismos de defensa a nivel molecular. Mediante la evaluación en dos ciclos de cultivo (2015-2016) establecidos a campo abierto se evaluó en 14 genotipos de frijol la severidad e incidencia de las diferentes enfermedades que se presentan, se seleccionaron dos genotipos contrastantes con mayor y menor grado de severidad a antracnosis a los cuales molecularmente se buscó la expresión génica de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Los resultados encontrados fueron que el material más mayor tolerancia a las enfermedades fue “Cacahuete bola” y el más susceptible “Pinto Saltillo”. Refiriéndose a antracnosis, el genotipo “Negro Productor” fue el más tolerante y “Negro Chapingo” el más susceptible, a los que se les analizo molecularmente, no obteniendo evidencias de la expresión de proteínas PR.

Palabras Clave: Enfermedades, Genotipos, Proteínas PR, Fabaceae, Resistencia

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a source of vegetable protein, with great importance in the population. It is cultivated in several countries and in much of the national territory. However, production has been affected by the presence of pests and diseases that diminish yield or make it unprofitable for the producer, which has led several researchers to seek for alternatives that improve control strategies. The aim of this research was to identify the degree of tolerance to diseases of 14 different genotypes and to investigate the production of defense mechanisms at the molecular level, through the evaluation of two crop cycles (2015-2016) established in the field. The severity and incidence of the different diseases that occurred in the genotypes was evaluated. Two contrasting genotypes were selected with a greater and lesser degree of damage resulting from anthracnose attack, to which the gene expression of pathogenesis-related (PR) proteins was molecularly sought. The results found were that the material most tolerant to the diseases was “Cacahuete Bola” and the most susceptible “Pinto Saltillo”. Referring to anthracnose, the genotype “Negro Productor” was the most tolerant and “Negro Chapingo” the most susceptible; a molecular analysis of these genotypes found no evidence of the expression of PR proteins.

Keywords: Diseases, Genotypes, PR Proteins, Fabaceae, Resistance

¹ Tesista

² Director

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se considera la principal fuente de proteínas vegetales en la dieta y su papel es aún más significativo para las clases de menores recursos, al no tener acceso a proteínas de origen animal (Muñoz, 2010); por ello se cultiva en gran parte del territorio mexicano. Los estados de Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa, con los principales productores con una producción de 289,532.89, 111,626.39, 96,051.33 y 84,399.02 toneladas anuales, respectivamente, son los principales productores, no demeritando a los demás estados que en conjunto generan una producción nacional de 969,146.28 de toneladas anuales con un rendimiento promedio de 620 kg ha⁻¹ (SIAP, 2015).

Como todos los cultivos, el frijol presenta problemas de plagas y enfermedades que ocasionan pérdidas en el rendimiento y/o demeritan la calidad del grano. Las enfermedades del frijol son causadas por diferentes organismos, entre los cuales están las bacterias, nematodos, hongos y virus, la importancia de cada uno de ellos depende del lugar, debido a la diversidad de climas y suelos existentes en México los cuales favorecerán el desarrollo de alguno en particular (Yerkes, 1980).

Actualmente el 20.3% del volumen de la producción nacional del frijol se destina al autoconsumo (SAGARPA - INEGI, 2014), estos productores no tienen acceso a muchas de las tecnologías en la producción.

Diseñar cultivos que respondan a demandas cambiantes del medio ambiente y del mercado, sólo puede lograrse de forma racional y expedita a través de la genética y la genómica (Estrada *et al.*, 2014). Gracias a la investigación, y el perfeccionamiento de diferentes técnicas tales como la manipulación genética se han desarrollado nuevas variedades con mayores bondades agronómicas. Desde el año 1990, trabajos de

mejoramiento genético han generado variedades con buen nivel de resistencia a enfermedades y con adaptación a todas las áreas frijoleras del trópico húmedo de México; sin embargo, con el paso de los años las variedades han sucumbido ante la variación patogénica (Becerra *et al.*, 1995). La combinación de las dos estrategias, selección tradicional y selección asistida con uso de biología molecular puede ser útil en el desarrollo de genotipos con resistencia durable (Gill-Langarica, 2008).

Hace falta mayor investigación respecto al comportamiento ante enfermedades de diferentes materiales genéticos, que permitan seleccionar y/o generar nuevas variedades con mejores características, disminuyendo la contaminación del medio ambiente y mejorando la calidad del grano.

II. OBJETIVOS

General

- Identificar la tolerancia o resistencia a enfermedades de 14 genotipos de frijol y detectar la producción de mecanismos de defensa a nivel molecular de dos de estos cultivares.

Particulares

- Seleccionar el mejor genotipo de frijol en cuanto a productividad y menor presencia de enfermedades.
- Detectar la producción de proteínas relacionadas con la Patogénesis (PR) y el gen defensina en dos genotipos de frijol que presentan susceptibilidad y tolerancia a *Colletotrichum lidemuthianum* (antracnosis)
- Contribuir en la generación de información para la creación de nuevas estrategias en el manejo de enfermedades de frijol.

III. HIPÓTESIS

- Los genotipos de frijol utilizados responden de manera diferencial a los patógenos en estudios, los cuales afectan el rendimiento del grano.
- Existe diferencia en la expresión de Proteínas PR de los genotipos al existir un estímulo, reduciendo la severidad del patógeno.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Investigaciones relacionadas a enfermedades del frijol

Al analizar perfiles de amplificación de huellas de ADN (DAF) de las plantas (progenitores y progenie F₂) inoculadas con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), en la cruce de Pinto Americano x Bayo Blanco, se detectaron dos fragmentos polimórficos, de alrededor de 2,500 pb y 500 pb que no están presentes en los progenitores y que están asociados a plantas resistentes. En los carriles que corresponden a plantas susceptibles, se detectó un polimorfismo de alrededor de 1,300 pb asociado a susceptibilidad que también está presente en los progenitores Pinto y Bayo, y plantas que mostraron fragmentos de DNA asociados a este carácter procedentes de la variedad Pinto Americano, desarrollaron síntomas de pudrición de raíz y marchitez, oscurecimiento del sistema vascular y coloración marrón rojiza, característica de las infecciones obstructivas causadas por *Fop* (Jiménez *et al.*, 2010).

Pseudomonas syringae en complejo de plantas (PSSC), afecta a cultivos como frijol, melón, pepino, okra y tomate, existiendo contradicciones respecto a su actividad generalista en lugar de especialista, como se cree actualmente, presenta incidencias que varían de 50 a 100% (en años epidémicos), siendo la semilla el principal vector del patógeno a larga distancia; los factores ambientales (lluvia y humedad) tienen un papel importante en la epidemiología de la enfermedad. El control de enfermedades en plantas anuales se basa con frecuencia en el control integrado de medidas culturales, variedades resistentes, productos biológicos y químicos (Lamichhane *et al.*, 2015).

Un estudio realizado en Egipto, demostró que el uso de phagos (ph1, ph2 y ph 1+2) en plantas de frijol después de la inoculación con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (causante de la enfermedad de tizón de halo) redujo significativamente la

severidad de la enfermedad en 58.57 a 61.14 y 70.8%, respectivamente, en comparación con los tratamientos *P. fluorescencia* (35.82%); *P. putidae* (22.17%) y extracto de ajo (30.54%). Siendo la aplicación de los fagos juntos (1+2) el tratamiento más eficaz (Hassaneman y El-meneisy, 2014).

Los genes *ARGK* y *AMTA* que se localizaron en un fragmento de 270 pb del mapa físico de *P. syringae* pv. *Phaseolicola*, un grupo completo de genes requeridos para la síntesis de faseolotoxina, pudieran estar agrupados en esta región y la región adyacente a NPS312. La presencia de elementos genéticos involucrados en transposición y movilización localizados en los límites del fragmento, se cree que son una isla de patogenicidad (Aguilera *et al.*, 2006).

Uromyces appendiculatus, causante de la roya del frijol, es uno de los patógenos más variables y una de las enfermedades más estudiadas en el mundo, sobre todo en países de clima templado ya que en el neotrópico la enfermedad no ha alcanzado niveles epidémicos, con excepción de Cuba. Lo anterior debido a que en el germoplasma de frijol están presentes muchos genes de resistencia, de amplio espectro y de herencia dominante (Araya, 2003).

En Guanajuato, en un experimento con iniciadores correspondientes a 22 marcadores moleculares de ADN mostraron que los genotipos de frijol PTB 08005 y Pinto Maverick, poseen los genes *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-7* y *Ur-11*, que los hacen resistentes a la enfermedad de la roya (Montero *et al.*, 2010).

En las plantas con caracteres de resistencia adquiridos se asume que son heredados, ya que por varias generaciones las plantas permanecen libres de daños, sospechando los autores de un fenómeno con base epigenética (Uwe *et al.*, 2015).

Se identificaron genes regulados transcripcionalmente durante una interacción incompatible entre el frijol común y el patógeno *Fusarium oxysporum* (Fop) utilizando ADNc y polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (ADNc-AFLP); generando un total de 8,730 fragmentos derivados de transcripción (TDFs) con 768 pares de iniciadores basados en la comparación de un genotipo moderadamente resistente y un susceptible, obteniendo secuencias completas de amplicones para 122 TDFs seleccionados, de los cuales 98 fueron identificados como genes homólogos que se relacionaron con el metabolismo, transducción de señales, síntesis y procesamiento de proteínas, desarrollo y organización del citoesqueleto, transporte de proteínas, expresión génica y el metabolismo del ARN, las reacciones redox, las respuestas de defensa y de estrés, el metabolismo energético y las respuestas hormonales. Permitiendo con este descubrimiento, comprender mejor los mecanismos de defensa y resistencia a Fop y patógenos similares (Xue *et al.*, 2015).

Un mapa genético de frijol común se construyó con 197 marcadores, incluyendo 152 RAPDs, 32 RFLPs, 12 SCARs, y 1 marcador morfológico. El mapa se estableció utilizando una población F2 de 85 individuos del cruce entre una línea derivada de la raza landesa Andecha (origen andino) y el genotipo mesoamericano A252. El mapa resultante cubre aproximadamente 1,401,9 cM, con una distancia media de marcador de 7,1 cM e incluye marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia a enfermedades para la antracnosis, al virus del mosaico común del frijol, al virus del mosaico amarillo dorado del frijol, al tizón bacteriano común y a la roya (Rodríguez *et al.*, 2006).

Líneas transgénicas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Flor de Mayo Anita expresan constitutivamente el gen defensina pdf 1.2, bajo el control del promotor CaMV-35S siendo resistentes al hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*. Reduciendo

significativamente la formación de lesiones y la proliferación en masa de esporas en las líneas T0, T1 y T3 en comparación con las plantas no transformadas. Un análisis del nivel de la expresión génica del gen pdf 1.2 por Q-PCR mostró que todas las plantas que fueron consideradas resistentes o tolerantes, tuvieron niveles similares de expresión transcripcional en oposición a las plantas susceptibles, las cuales no mostraron presencia de la transcripción pdf 1.2 (Espinosa *et al.*, 2013).

Poblaciones de *C. lindemuthianum* agente causal de la antracnosis del frijol, han sido objeto de estudios de virulencia y moleculares que respaldan la hipótesis de coevolución. En los últimos años se han introducido las técnicas moleculares para determinar la variabilidad genética en poblaciones del patógeno y su asociación con los centros de diversificación del frijol (Araya, 2003).

En México se han encontrado hasta 279 patotipos diferentes de *C. lindemuthianum* por lo que al ser un hongo con alta variabilidad se sugiere un monitoreo continuo de las poblaciones en los genotipos con resistencia conocida al patógeno, para poder identificar patotipos en desarrollo (Rodríguez *et al.*, 2006).

Se caracterizó el gen de resistencia a la antracnosis presente en la variedad de frijol Ouro Negro (Honduras 35) al estudiar las relaciones alélicas con los genes de resistencia a la antracnosis (*C. lindemuthianum*) de cultivares previamente caracterizados: Co-1 (MDRK), Co-12 (Kaboon), Co-13 (Perry Marrow), Co - 2 (Cornell 49 - 242), Co - 3 (México 222), Co - 4 (TO), Co - 42 (SEL 1308), Co - 5, además de determinar el espectro de resistencia en relación con 19 patótipos de *C. lindemuthianum*. Las pruebas de alelismo confirmaron que el gen dominante de resistencia a la antracnosis presente en Ouro Negro está situado en un locus distinto con los que se comparó, denominándolo Co-10. Al inocularlo con los 19 patótipos de *C. lindemuthianum* se demostró que Co-10 confiere resistencia solo a 17 de los

patótipos. Es importante esta contribución a los programas de mejoramiento del frijol que están en constante necesidad de nuevas fuentes de resistencia a la antracnosis (Álzate *et al.*, 2003).

4.2. Investigaciones referentes al frijol en el campo agrícola

El frijol común, se ha demostrado en ambientes tropicales, que el número de nudos y hojas, altura de la planta y longitud de entrenudos muestra asociación positiva significativa con el número de vainas y semillas y en consecuencia con el rendimiento, y que debido a su alta heredabilidad y facilidad de identificación, se podrían utilizar en la selección para el rendimiento (Singh y Gutiérrez, 1982).

En la evaluación de nueve genotipos de frijol en tres fechas de siembra en el Altiplano de México, el efecto del retraso en la fecha de siembra se manifestó en retraso en la emergencia, reducción en los días de floración y madurez, reducción en las ramas de segundo orden y en el rendimiento de grano (Hernández, 1995).

En el altiplano Central de México es común observar a *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (nombre común Tizón de halo) atacando genotipos de hábito determinado, principalmente de la raza nueva granada, lo que podría sugerir que estos materiales no poseen genes de resistencia contra las razas presentes en la región. Además, se ha observado que es la que ocurre más temprano durante el ciclo del cultivo del frijol de temporal. Genotipos como Pinto Villa, Amarillo de Calpan, Puebla 152, México 332, G 13746, Pinto Zapata, Negro Tacana, Negro INIFAP, FM 94006, Chihuahua 86 y Flor de Mayo M38, pertenecientes a las razas Jalisco, Durango y Mesoamericana, originarias de México mostraron ser inmunes y resistentes a *P. syringae* pv. *Phaseolicola*; en tanto que los genotipos andinos de la raza Nueva Granada mostraron alta susceptibilidad (Navarrete y Acosta, 2000).

En un estudio de incidencia y severidad del patógeno *P. syringae* en la mesa central de México, fue posible identificar genotipos inmunes y resistentes al tizón de halo, como Pinto Villa, Amarillo de Calpan, Puebla 152, México 332, G13746, Pinto Zapata, Negro Tacaná, Negro INIFAP. FM 94006, Chihuahua 86 y Flor de Mayo M38, pertenecientes a las razas Jalisco, Durango y Mesoamericana, razas originarias de México (Navarrete y Acosta, 2000).

En frijol tipo Flor de Mayo se determinó el rendimiento y reacción a enfermedades de un grupo de 14 líneas y dos testigos a través de 14 ambientes, 10 de temporal y cuatro de riego. Los ensayos se condujeron durante los ciclos primavera-verano 2008 y otoño-invierno 2008-2009. Las enfermedades de mayor distribución durante el ciclo de temporal fueron: Tizón común (*Xanthomonas campestris pv phaseoli*) y la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*); mientras que la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y el mildiú veloso (*Phytohphthora phaseoli*) mostraron un fuerte ataque en Riego. El ambiente de mayor rendimiento promedio fue en Celaya bajo riego (4.15 t ha⁻¹) y el menor se obtuvo en Texcoco bajo temporal (0.90 t ha⁻¹). El análisis conjunto detectó diferencias significativas ($p < 0.0001$) en rendimiento para ambiente, variedad e interacción, pero la mayor contribución a la variación observada correspondió al ambiente (91%) y la menor al genotipo (1%). La línea FMB 08030 mostró el mayor rendimiento promedio (2.06 t ha⁻¹) (Acosta *et al.*, 2010).

En zacatecas las variedades Flor de Mayo y Flor de Junio son susceptibles a antracnosis, muy afectadas por el hongo (Mena y Velázquez, 2010).

En el estado de México se hizo una evaluación de 70 genotipos de frijol, procedentes de 7 progenitores iniciales, encontrando que ante la presencia del patógeno *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*, los genotipos se comportaron en forma similar en campo e

invernadero, las correlaciones entre las variables epidemiológicas observadas en campo e invernadero resultaron positivas y en su mayoría altas, lo que sugiere que los genotipos acumularon resistencia genética al patógeno, lo cual mejoró su estabilidad a través de ambientes, concluyendo que el avance en resistencia a tizón común con tres ciclos de selección recurrente fue de 50 %, equivalente a 16 % por ciclo de selección. La resistencia acumulada se manifestó en un menor progreso de la enfermedad, periodo latente prolongado, menor duración de la epidemia, y valores bajos de severidad inicial y final. (Cruz *et al.*, 2004).

Entre genotipos de frijol negro en seis ambientes de Veracruz y Chiapas, se detectaron diferencias significativas en las reacciones a antracnosis, mancha angular, virus del mosaico dorado y roya. No hubo resistencia a la antracnosis en los materiales estudiados. Las enfermedades que afectaron significativamente el rendimiento de grano fueron antracnosis, seguida del virus del mosaico dorado mientras que la reacción a roya y mancha angular no mostraron correlación con el rendimiento. Se detectó efecto significativo en la interacción genotipo x ambiente, lo que señala que la respuesta de los genotipos varió de un ambiente de evaluación a otro. Los genotipos Icta Ju 97-1 y DOR-678 fueron los mejores con rendimientos superiores a 860 kg ha⁻¹ y adaptabilidad en los ambientes de prueba (López *et al.*, 2006).

Se evaluaron tres diferentes variedades de frijol (Pinto Laguna, Pinto Americano y Pinto Saltillo) en condiciones óptimas y subóptimas de humedad edáfica y su impacto en el patosistema en el período marzo-mayo. La condición óptima de contenido de humedad fue cercano a Capacidad de Campo y subóptimas cercano a Punto de Marchites. Las principales enfermedades presentes en el cultivo fueron: mustia hilachosa (*Thanatephorus*

cucumeris (Frank) Donk= *Rhizoctonia solani* Kuhn), marchites por *Rhizoctonia solani*, tizón común (*Xanthomonas phaseoli*) y el virus mosaico común del frijol (BCMV). No hubo efecto significativo en el patosistema del frijol por efecto del contenido de humedad, ni por la variedad utilizada para la mancha foliar, ni para el tizón común, pero si para la virosis y la marchites. La variedad Pinto Americano fue la más susceptible en el desarrollo de la virosis del frijol tanto en términos de incidencia (14.8 %) como de severidad (16.2 %); respecto a las variedades Pinto Laguna y Pinto Saltillo, las cuales fueron más resistentes. La marchites del frijol por pudrición de la raíz fue de las más agresivas con 28.4 % de incidencia en la variedad Pinto Americano que fue la más susceptible; en tanto que las variedades Pinto Laguna y Pinto Saltillo fueron las más resistentes con 8.5 y 10.2 % de marchites, respectivamente (Pedroza *et al.*, 2010).

4.3. Estrategias de defensa de la planta ante los patógenos: Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y defensinas.

Las plantas y los organismos patógenos han coevolucionado, así las primeras han logrado estrategias efectivas de resistencia al ataque de sus invasores. En plantas, la resistencia de manera general se lleva a cabo por barreras estructurales y químicas que induce como mecanismo de defensa. Entre las barreras estructurales existe la capa de cutícula (cutina; un polímero complejo de ácidos grasos esterificados recubiertos con ceras) y las deposiciones de lignina que dan rigidez a la pared celular. Las barreras químicas incluyen la presencia de componentes antimicrobianos, llamados fitoanticipinas. En conjunto, estas barreras forman la primera línea de defensa y pueden impedir la invasión con éxito de la mayoría de los microorganismos, sin embargo, cuando esto no es suficiente, las plantas activan mecanismos de defensa alternos que se activan al ataque de patógenos. Estos incluyen, la respuesta de hipersensibilidad, la generación de reacciones de

oxígeno (ROS), la acumulación de metabolitos secundarios como fitoalexinas, taninos y compuestos fenólicos, y la producción de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Las PR forman parte de un mecanismo inducible de resistencia, las cuales se expresan generalmente en gran proporción de tejidos vegetales al inicio de la infección (López *et al.*, 2014).

El término de proteínas PR se define para indicar "las proteínas que no son o sólo a concentraciones basales detectables en tejidos sanos, pero para los cuales se ha demostrado la acumulación a nivel proteico de condiciones patológicas y situaciones relacionadas en al menos dos o más combinaciones de plantas y patógenos" (Sels *et al.*, 2008).

La familia de las proteínas PR, contiene un grupo de genes heterogéneos que han sido ampliamente utilizados como marcadores moleculares en las respuestas de defensa de las plantas. La mayoría de ellas se expresan en un nivel basal bajo condiciones de crecimiento normales, pero pueden ser inducidos rápidamente por infecciones de patógenos (Liu *et al.*, 2013).

Existen diferentes tamaños moleculares, en las diferentes proteínas PR, que típicamente varía de 5 a 75 kDa (Sels *et al.*, 2008). La mayoría de las PR se expresan en tejidos de hojas normales, pero con diferentes patrones. Algunas se expresan constitutivamente, mientras que otras se expresan en niveles bajos en la etapa de siembra y niveles altos en la etapa adulta. Los diferentes patrones de expresión podrían implicar diferentes funciones. El descubrimiento de estos datos de la expresión de las PR en diversos tejidos, ha ilustrado que no solo son componentes importantes del mecanismo de defensa, sino que también puede mantener y regular el desarrollo normal de la planta (Li *et al.*, 2015).

La mayoría de las proteínas PR se distinguen por unas propiedades bioquímicas específicas como extractabilidad y estabilidad a valores de pH ácido (< 3), su termo

estabilidad o su alta resistencia a la acción de proteasas. Por otro lado, las proteínas PR presentan una localización celular dual (vacuolar y apoplástica), siendo el espacio extracelular de la planta su principal punto de acumulación. Asimismo, cada familia de proteínas PR muestra isoformas ácidas y básicas, situándose generalmente en el apoplasto y la vacuola respectivamente (Van Loon y Van Strien, 1999).

Sobre la base de sus propiedades estructurales y funcionales, existen 17 familias diferentes de proteínas PR que han sido identificadas hasta el momento en las plantas mono y dicotiledóneas (Jun-Jun y Abul, 2006).

Las familias están enumeradas en el orden en que fueron descubiertas. Un miembro tipo, por lo general el primero o más prominente, fue elegido y sobre la base de sus propiedades bioquímicas y biológicas comunes se define la familia. El papel de varias familias (Cuadro 1) se limita a la actividad patogénica, crecimiento y propagación, entre ellas la familia PR-2 como β -1,3-endoglucanasas y la PR-3, 4, 8 y 11 como endoquitinasas, podrían actuar contra los hongos. No todas las familias parecen estar representadas en todas las especies de plantas, y la ocurrencia y las propiedades de los diferentes miembros dentro de una familia pueden diferir fuertemente (Van Loon y Van Strien, 1999). Ejemplo de ello tenemos el informe de la proteína PR4, que presentó actividad Ribo nucleasa, en dos genotipos de trigo, mostrando actividad enzimática y anti fúngica, degradando el ARN del coleoptilo e inhibiendo el crecimiento de hifas y la germinación de esporas de *Fusarium culmorum* (Caporale *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Familias reconocidas de proteínas relacionadas con la patogénesis

Familia	Miembro	Propiedad biológica	Función	Símbolos del gen
PR-1	Tabaco PR-1 ^a	Desconocida	anti fúngica (oomycetos)/membrana celular	Ypr1
PR-2	Tabaco PR-2	1,3-b-glucanasa	anti fúngica/ pared celular	Ypr2 [Gns2('Glb')]
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII	anti fúngica/pared celular	Ypr3, Chia
PR-4	Tabaco "R"	Quitinasa tipo I, II	anti fúngica y ribonucleasa/ pared celular	Ypr4, chid
PR-5	Tabaco S	Análogo a Taumatina	anti fúngica (oomycetos)/ membrana celular	Ypr5
PR-6	Tomate inhibidor 1	Inhibidor de la proteínasa	anti insectos y nematodos/Proteínasa	Ypr6, Pis ('Pir1')
PR-7	Tomate P69	Endoproteínasa	Antimicrobiana/no definido	Ypr7
PR-8	Pepino	Quitinasa tipo III	anti fúngica, antibacteriana/ pared celular	Ypr8, Chib
PR-9	Tabaco –lignina formando peroxidasa	Peroxidasa de síntesis de lignina	múltiples patógenos/ actividad indirecta	Ypr9, Prx
PR-10	Perejil - PR1	Análogo de Ribonucleasa	Ribonucleasa contra posible ataque de virus/ARN del	Ypr10

			patogeno	
PR-11	Tabaco – quitinasa	Quitinasa tipo I	anti fúngica/pared celular	Ypr11, Chic
PR-12	Rábano Rs-AFP3	Defensina	antibacterianas y anti fúngicas/membrana celular	Ypr12
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Tionina	antibacterianas y anti fúngicas/membrana celular	Ypr13, Thi
PR-14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos	antibacterianas y anti fúngicas/lípidos	Ypr14, Ltp
PR-15	Cebada OxOa (germinado)	Oxalato oxidasa	Varios patógenos/membrana celular	Ypr15
PR-16	Cebada OxOLP	Análogo de oxalato oxidasa	Varios patógenos/membrana celular	Ypr16
PR-17	Tabaco PR p27	Desconocido	sin caracterizar	Ypr17

Fuente: (Van Loon y Van Strien, 1999).

Así, las PR-10 están reguladas por el medio ambiente y están ampliamente distribuidas en las plantas de semilla (Jun-Jun y Abul, 2006).

La familia PR-1 está fuertemente conservada y parece estar representada en todas las especies de plantas investigadas hasta la fecha. Se han encontrado homólogos en hongos,

insectos y vertebrados, incluidos los humanos, pero de todas las familias PR, su función es la menos entendida (Van Loon *et al.*, 2006).

Las PR-1 se han encontrado en diversos cultivos, entre ellos el frijol, en el que se les designó como PvPR1 y PvPR2 (Walter *et al.*, 1990). En haba (*Vicia faba* L.), PR-1 fueron sintetizadas en respuesta a ácido salicílico (SA), exhibiendo una fuerte actividad inhibidora de la diferenciación de estructuras de infección de *Uromyces fabae* (Rauscher *et al.*, 1999).

En diferentes plantas se han encontrado las PR-1, como una proteína de respuesta al estrés involucrado en el mecanismo de defensa (Shatters *et al.*, 2003) y es importante resaltar que, entre todas las proteínas PR-1, existe mucha similitud, desde un 35% estructuralmente, hasta un 56% y el 97% de identidad en pares de secuencias. En toda su estructura tiene cuatro alfa-hélices y cuatro hebras beta, comparten un número de residuos conservados, incluyendo seis cisteínas. Estos descubrimientos sugieren que la estructura molecular única de la PR-1 define un módulo de proteína que se ha conservado durante la evolución y debe servir a una o más funciones importantes (Van Loon y Van Strien, 1999).

A pesar de las funciones que cumplen las PR en las plantas, los patógenos logran infectar, un estudio en cebada (*Hordeum vulgare* L.), revela expresión diferencial de PR-b, en varias líneas isogénicas, siendo algunas más susceptibles que otras al mildiu (*Blumeria graminis* f.sp. hordei, Bgh), atribuyendo esto al silenciamiento de la expresión de PR-1 (Schatters *et al.*, 2003).

Dentro de la familia 5 es importante mencionar a las proteínas relacionadas con la patogénesis PR5 o taumatina (TLP o PR5), se acumulan en plantas en respuesta a la infección por patógenos o al estrés biótico y abióticos, así como los otros procesos fisiológicos (Liu *et al.*, 2012). Son polipéptidos de 200 aminoácidos que comparte una similitud de secuencia con la taumatina, una proteína de sabor dulce (Rout *et al.*, 2016).

Tiene un modelo 3D, que consiste en tres dominios característicos unidos en un pliegue compacto por puentes disulfuro. Debido a las altas similitudes entre las PR-5, todas las proteínas PR-5, comparten estas características estructurales comunes y algunas diferencias entre sus estructuras 3D individuales podría reflejarse sus funciones distintivas (Tachi *et al.*, 2009). Su localización en la planta es variada, PR5 de alto peso molecular se han encontrado en las vacuolas celulares, mientras que las más pequeñas se sitúan extracelularmente, ambas con la misma función antifúngica (Li *et al.*, 2015). La familia de PR5 es altamente redundante en las plantas y sus niveles de expresión puede variar de un órgano a otro y en respuesta a diferentes estímulos (Tachi *et al.*, 2009). La razón por qué las plantas producen gran variedad de PR no es claro. Sin embargo, se puede especular que, durante la evolución, las plantas han desarrollado muchos genes PR e isoformas para protegerse contra diversos tipos y razas de patógenos. De hecho, se conocen diferentes genes PR5 que son activados por diferentes señales. La mayoría, contienen una secuencia señal que dirige el péptido nascente a la ruta secretora, ya sea extracelular o vacuolar, una vez que esta es una proteína madura (Shatters *et al.*, 2003).

Entre los genes relacionados con la resistencia al estrés, las proteínas de tipo taumatina juegan un papel vital en la mejora de la resistencia, se identificaron 20 TLPs a través de la comparación y análisis de secuencias de *Brassica rapa* var. Osome, con otros TLPs relacionados a la patogénesis publicados y se encontró un alto grado de homología entre ellos, su expresión fue en órganos específicos, cuatro respondieron a la infección fúngica y siete genes mostraron respuestas a frío, sal, sequía y ácido abscísico (Ahmen *et al.*, 2013).

Al comparar PR5 en plantas, animales y nematodos, la estructural mostró una fuerte similitud, con una sola diferencia en los bucles expuestos en la superficie, lo que sugiere

que existe una conservación estructural evolutiva a lo largo de los diversos organismos en los que residen (Shatters *et al*, 2003).

En arroz (*Oryza sativa* var. Nipponbare), se comprobó que el etileno induce al menos tres importantes genes; PR10, PR1 básica (PR1b), y PR5 en las hojas de plántulas, además se descubrió que la inducción de estos genes PR, fue bloqueado parcialmente por cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas citoplasmáticas), lo que indica una participación del citoplasma en la inducción de la síntesis de proteína PR (Kumar *et al*, 2001).

Las proteínas PR-5 exhiben acción antifúngica contra muchos hongos, incluyendo *P. infestans*, un miembro de la clase oomycetes, esto debido a que tienen una función de permeabilización de membrana con selectividad a patógenos fúngicos que hace que esta clase de proteínas sea muy atractiva como defensas antifúngicas contra patógenos que no están controlados por otras proteínas PR (Datta y Muthukrishnan, 1999).

4.3.1. Defensinas

Varios informes demuestran que las defensinas son una parte integral del sistema inmunológico innato de la planta (de Beer y Vivier, 2011). Desde principios de 1990 se han estudiado y han sido identificadas en hojas, tubérculos, flores, vainas y semillas, en los tejidos del xilema, estomas, células de parénquima, y otras áreas periféricas. A pesar de que presentan múltiples funciones, de actividad antimicrobiana en las plantas, las defensinas se han observado principalmente contra los hongos (Lacerda *et al.*, 2014).

La función *in vivo* de las defensinas han sido poco claras, diferentes papeles les han sido atribuidos. Se expresan en semillas, mientras que otros están regulados por el desarrollo o son inducidas por diferentes factores de estrés abiótico (frío, sequía, metales pesados, déficit de potasio) y biótico (agentes patógenos microbianos) (Sels *et al.*, 2008).

Son los mayores grupos de péptidos antimicrobianos (AMP), constituidos de cisteína, tienen diversas secuencias y estructuras, estabilizados en formas compactas por tres o cuatro puentes disulfuro (Silva *et al.*, 2014). Lo que los hace ser moléculas tridimensionales (Lacerda *et al.*, 2014). Tienen al menos dos cargas positivas (lisina o arginina), son pequeñas, que van aproximadamente de 12 a 50 aminoácidos. Son los más representativos entre todos los grupos de eucariotas, que proporcionan la principal defensa, muy importante para el huésped contra microorganismos patógenos. Varios de estos péptidos presentan un efecto relevante frente a los hongos. Tienen una distribución muy amplia en todos los reinos eucarióticos conocidos: hongos, Plantas, Animales, y recientemente se han demostrado en un organismo bacteriano (Silva *et al.*, 2014). Estos péptidos antimicrobianos son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas (Téllez y Castaño, 2010). Su expresión puede ser regulada tanto a nivel transcripcional y post-transcripcional, y la regulación de la transcripción coordinada de los genes AMP puede conducir a la expresión de múltiples AMP en un solo sitio y esto dependerá del tipo de tejido o célula (Lai y Gallo, 2009). Se clasifican como proteínas promiscuas, ya que muestran numerosas actividades biológicas (Lacerda *et al.*, 2014).

Al igual que con otros amplificadores, los mecanismos de acción de algunas defensinas de plantas con actividad antifúngica implican unión a la membrana, la unión a la pared celular, la interacción con objetivos intracelulares que conducen a la apoptosis, permeabilización de la membrana, y la internalización mediada por receptor (Van der Weerden *et al.*, 2013).

La actividad biológica de los amplificadores está fuertemente influenciada por las interacciones péptido-membrana (Silva *et al.*, 2014), Probablemente no son circulantes, pero se expresan específicamente en los órganos sensibles y son inducidos por microbios en

el sitio de la infección o de manera sistémica (Maróti *et al.*, 2011). Se cree que la permeabilización de la membrana parece ser sólo uno de una gran variedad de mecanismo de acción de estas moléculas, aunque algunos estudios sugieren objetivos intracelulares (Lacerda *et al.*, 2014). Existen también dos hipótesis que tratan de explicar el mecanismo de acción de las defensinas: el modelo de la alfombra y el modelo de poro. En ambos, se describe la interacción defensinas - patógeno (cargas positivas con las cargas negativas presentes en la membrana celular de los patógenos), provocando un aumento de su permeabilización, causando pérdidas de células y la muerte por necrosis. Sin embargo, hay una hipótesis alternativa, donde las defensinas no dañan la membrana celular, sino que interactúan con los fosfolípidos, lo que lleva a un aumento de la permeabilidad de iones, o incluso el transporte de estos péptidos para el medio ambiente intracelular, incrementando el oxígeno reactivo (ROS) y activando la muerte celular programada (Hegedus y Marx, 2013). Sin embargo, un gran número de estudios sobre estos mecanismos de acción apuntan a la permeabilización de la membrana. Recientemente, se informó de dos péptidos que mostraban tal poder de permeabilización, el primero de ellos, en *Phaseolus vulgaris* permeabilizaba la membrana de *Mycosphaerella arachidicola*, entre otros hongos y el segundo, en *Picea glauca*, permeabilizando las membranas de *Verticillium dahliae*. Así podemos ver que la estabilización de los enlaces di sulfuro, el papel de los iones inorgánicos, sus características termoestables les brindan una actividad antifúngica, permitiendo una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas para las plantas (Lacerda *et al.*, 2014).

Diferentes funciones de estos péptidos podrían atribuirse a su dinámica del comportamiento en lugar de sus estructuras tridimensionales. Hasta la fecha, hay trece estructuras tridimensionales de defensinas determinadas para varias plantas, incluyendo

RsAFP1 and RsAFP2 en *Raphanus sativus*, Psd1 de *Pisum sativum*, VrD1/VrD2 en *Vigna radiata*, NaD1 en *Nicotiana glauca*, MtDef4 en *Medicago truncatula*, PhD1 en *Petunia hybrida*, Sd5 en *Saccharum officinarum*, SPE10 en *Pachyrrhizus erosus*, Lcdef en *Lens culinaris*, AhAMP1 en *Aesculus hippocastanum* y AhPDF1.1b en *Arabidopsis halleri*, no son las únicas especies de plantas en las que se han descubierto y muchos más genes defensinas probablemente están aún por descubrirse (Reza *et al.*, 2016). *Arabidopsis* es un organismo modelo de elección para la investigación en biología de las plantas. Integrando en un solo organismo las disciplinas clásicas en los campos de expansión de la genética y la biología molecular debido a las características de moleculares, fisiológicas y reproductivas que posee (Koornneef y Meinke, 2010). Además de los genes conocidos del genoma de *Arabidopsis*, existen más de 300 genes que codifican defensinas. Uno de estos genes codifica para AtPDFL2.1, un péptido antifúngico putativo de 55 aminoácidos, con seis residuos de cisteína en su secuencia primaria (Reza *et al.*, 2016). Anteriormente se creía que solo existían cinco diferentes genes defensinas identificados en la planta *Arabidopsis thaliana* como PDF1.1, PDF 1.2, PDF2.1, PDF2.2 y PDF2.3, expresándose en diferentes órganos de la planta. Siendo PDF1.1 específico de la semilla, predominando en las capas celulares externas del endospermo, así como los cotiledones e hipocotilo del embrión, PDF1.2, por otro lado, es una proteína relacionada con la patogénesis que no o débilmente se expresa en órganos de las plantas sanas, pero fuertemente inducida en hojas infectadas por hongos patógenos y PDF2.3 parece expresarse constitutivamente en todos los órganos de plantas sanas, excepto las raíces (Thomma y Broekaert, 1998). Actualmente *A. thaliana* tiene 13 genes Pdf divididos en dos grupos: tres genes del grupo 1 (Pdf1.2a, Pdf1.2b, y Pdf1.2c) que codifican el gen PDF 1.2, considerado una señal contra los Fitopatógenos a través del etileno y ácido jasmónico, dando respuesta de defensa a la planta. El otro grupo

de genes PDF1.1, se expresan constitutivamente en ciertos tejidos. Aunque la sobreexpresión de PDF1.1 ha resultado dar resistencia a plantas de *Arabidopsis* frente al patógeno *Cercospora beticola* (Reza, *et al.*, 2016). Se demostró que la única diferencia entre los tres genes (AtPDF1.2 a, b y c) que codifican el mismo péptido maduro (AtPDF1.2), corresponde a las señales de cada uno, debido a la ubicación en diferente cromosoma, así los péptidos AtPDF1.2a y AtPDF1.2c se encuentran en repetición en tándem en el cromosoma 5, mientras que AtPDF1.2b y AtPDF1.3 en el cromosoma 2 y AtPDF1.1 con dos miembros más AtPDF1.4 y AtPDF1.5, se localiza en el cromosoma 1 (Sels *et al.*, 2008). El gen PDF1.2 de *Arabidopsis* se utiliza comúnmente como marcador para la caracterización de la respuesta de defensa dependientes de jasmonato (Brown *et al.*, 2003). Diferentes estudios se han hecho para determinar las funciones de las defensinas en las plantas, principalmente para conocer su comportamiento frente a los hongos Fitopatógenos. Así en el año de 1998, se demostró que el nivel de expresión de PDF2.2 en las hojas de *A. thaliana* es regulado después de la infección con el patógeno *Alternaria bassicola* (Thomma y Broekaert, 1998). Actualmente sigue habiendo descubrimientos, tal es el caso que con uso de espectroscopia de solución multidimensional (RMN), se descubrió que AtPDFL2.1 a concentración aproximada de 18 μM , tiene actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium graminearum* del 98 %, mostrando un potente efecto inhibidor contra este hongo de $\text{IC}_{50} \sim 4 \mu\text{M}$, derivada a partir de curvas de dosis-respuesta (porcentaje de inhibición del crecimiento frente a la concentración de proteínas (Reza *et al.*, 2016). Así también en *Arabidopsis*, se caracterizó por primera vez la región promotora que regula positivamente la expresión basal del promotor de PDF1.2, obteniendo resultados que indican que la caja GCC desempeña un papel clave en la respuesta del jasmonato al promotor PDF1.2. Sin embargo, la delección o mutaciones específicas introducidas en el

núcleo de la caja GCC no abolió completamente, lo que sugiere que otro promotor situado aguas abajo de la caja GCC también puede contribuir a la respuesta del jasmonato, concluyendo que posiblemente la interacción del jasmonato con la caja GCC, regulan la expresión génica (Brown *et al.*, 2003). Mencionando muchos casos más, podemos ver cómo el descubrimiento de las defensinas corresponde a variadas funciones y están presentes en diferentes especies de plantas. Datos antiguos mas no obsoletos, establecen que PDF2.2 se expresa en todos los órganos de plantas sanas, excepto en los tallos y semillas y que PDF2.1 se expresa específicamente en las raíces y semillas (Thomma y Broekaert, 1998). Desde los años 90 ya se mencionaba la existencia de proteínas PR en frijol, así como otros cultivos tales como tabaco, pepino, tomate, guisantes, papa, amaranto, centeno, maíz y otras gramíneas que años anteriores se habían estudiado. En frijol se han descrito cuatro proteínas PR clasificadas como PR-1 a PR-4 en orden decreciente de su movilidad electroforética (Pérez, 1990). La defensina Rs-AFP2 (5,1 kD) está presente en semillas de la planta *Rhaphanus sativus*, interactúa con glucopyranosylceramida (GlcCer) presente en la membrana plasmática de las hifas de los hongos, aumenta el flujo del potasio (K⁺) y calcio (Ca²⁺), generando cambio potenciales en la membrana de las plantas, y ejerciendo una actividad antifúngica de amplio espectro, causando la reducción de hipersensibilidad y el crecimiento de las puntas de las hifas de los hongos fito patógenos (Jha y Chattoo, 2010).

Se han hecho varios intentos de plantas transgénicas, en tabaco y manzana la expresión de Rs-AFP2, un péptido de rábano que confiere resistencia al hongo fito patógeno *Alternaria longipes*, el mismo péptido en tomate contra *Alternaria solani*, *F.oxysporum*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*. El péptido

D4E1, proporcionó una resistencia cada vez mayor de tabaco contra *Aspergillus flavus* y *Verticillium dahliae* (Lai y Gallo, 2009).

La resistencia en papa transgénica que expresa el gen defensina AlfAFP contra *Verticillium dahliae* mostró ser más eficaz en condiciones de invernadero y en el campo que los métodos químicos, lo que la hace una opción útil para transformar plantas haciéndolas resistentes a hongos fitopatógenos (Lacerda *et al.*, 2014). La expresión constitutiva de Rs-AFP2 (5,1 kD) en *R. sativum*, suprime el crecimiento de *Magnaporthe oryzae* y *Rhizoctonia solani* por 77 y 45%, respectivamente, mejorando la resistencia de las plantas (Jha y Chattoo, 2010).

En *Phaseolus vulgaris* se aisló y caracterizó una defensina (PvD1) de semillas, e investigó la actividad antimicrobiana bajo el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos: *Fusarium solani*, *Fusarium laterithium*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. La inhibición se detectó cuando se permitió que estos hongos crecieran en presencia de 100 mg mL⁻¹ de PvD1 (Games *et al.*, 2008).

El uso de genes de péptidos antifúngicos para generar importantes rasgos agronómicos resistentes a las enfermedades por hongos se han visto con cierto escepticismo por los pensadores biotecnológicos (Lacerda *et al.*, 2014). La mayoría de las defensinas vegetales ya caracterizadas, muestran un patrón constitutivo de expresión regulado en respuesta al ataque de patógenos, lesiones y algunos tipos de estrés abiótico (de Beer y Vivier, 2011), la presencia de más de 300 defensinas en *Arabidopsis*, resalta la importancia funcional de estos genes, ya que están involucrados en diversas actividades biológicas, tales como, la tolerancia de metales pesados, bloqueo de canales iónicos, antifúngico-antibacterial e interacciones de reproducción guiando los tubos de polen a la micropilo ovular (Reza *et al.*, 2016). Aunque hay muchas plantas transformadas en el mercado con genes adicionales de

codificación para proteínas que confieren resistencia a los herbicidas y los insectos y plagas, todavía no hay una planta transgénica disponible contra hongos fitopatógenos, ni siquiera que contiene defensinas vegetales como el factor de resistencia (Lacerda *et al.*, 2014).

4.4. Fundamento de la extracción de ARN para su uso en PCR

La expresión de los genes es la base del metabolismo celular, y por ésta se entiende que el ADN se transcribe en ARN, que a su vez se traduce en proteínas. Esta secuencia ADN-ARN-proteínas, constituye el dogma central de la biología molecular. La expresión de genes o la presencia de ARNm (Ácido Ribonucleico mensajero), es la base para analizar el comportamiento de un organismo a nivel molecular ya que la simple presencia de ADN no indica la actividad de los genes (Eguiarte *et al.*, 2007).

Existen técnicas que permiten trabajar en sentido inverso al dogma central de la biología molecular, conocida como transcripción reversa.

Si en una reacción, se usa como sustrato ADN genómico, se habla de una PCR, pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm se le conoce como RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN y duplicarse en millones de partículas virales (Herschhorn y Hizi, 2010).

El ADNc se utiliza cuando se analiza la expresión del ARNm de algún gen de interés. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o

buffer y agua. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del experimento

El presente trabajo se realizó en el campo Agrícola experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (19° 17' N y 98° 53' O y 2250 msnm) y en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Interacción Planta-Patógeno-vector del Programa de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, en el estado de México. El trabajo en campo, se realizó en dos años, 2015 y 2016, durante el ciclo primavera – verano (PV) en condiciones de temporal.

5.2. Tratamientos

Los tratamientos evaluados fueron 13 genotipos diferentes de frijol, en el ciclo PV-2015: Canario, Flor de mayo 67, Línea elite 4, Pinto saltillo, Flor de mayo Anita, Blanco tabasco, Negro Chapingo, Pinto Durango, Flor de mayo 202, Rayado rojo, Negro productor, Flor de mayo 199 y Cacahuete bola. En el ciclo PV-2016, se agregó el frijol peruano, evaluando así 14 genotipos. Los cuales se obtuvieron por selección de semilla de ciclos anteriores.

5.3. Diseño experimental

La distribución de los tratamientos en el experimento fue en un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones (Infante y Zarate, 1984). El tamaño de la unidad experimental fue de 4 × 0.8 m, en la que se sembraron en 4 surcos las semillas separadas uniformemente a 10cm, la parcela útil fue de 0.4 × 0.3 m (dos surcos centrales), la cual se delimitó por 8 plantas para la toma de datos.

5.4. Manejo del cultivo

La preparación del terreno fue mecánica. La siembra del ciclo PV-2015 se realizó el 3 de junio y la de PV-2016 el 21 de mayo. La densidad de siembra fue de 40 semillas por hilera, un total de 160 semillas por unidad experimental.

En ambos años se usó el mismo manejo de plagas y malezas. No se aplicó ningún producto fungicida para permitir a los materiales la expresión de su potencial genético. El herbicida aplicado fue la mezcla de Fomesafen 750 ml + Metalaclor 1 lha⁻¹ al día siguiente de la siembra y durante el ciclo del cultivo el manejo de malezas fue manual. Para el manejo de plagas se usó el insecticida químico, Ometoato a dosis de 600 ml ha⁻¹ a los 41 y 49 dds (días después de la siembra).

5.5. Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron, porcentaje de severidad (PS (%)), porcentaje de incidencia (PI (%)) y rendimiento (kg ha⁻¹).

La evaluación de la variable PS, se hizo cada 10 días, iniciando la evaluación a los 47 dds, revisando semanalmente el cultivo para detectar síntomas presentes de cada una de las enfermedades, en cada una de las 8 plantas marcadas, se determinó el porcentaje de daño en los folíolos y vainas utilizando la escala visual modificada de 0, 1, 10, 25, 50 y 100 del manual de la Sociedad Americana de Fitopatología 1971 (A manual of assessment keys for plant diseases) (James, 1971). Con los promedios de los datos obtenidos se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) mediante la ecuación:

$$ABCPE = \frac{Y_i + (Y_i + 1)}{2} [(T_i + 1) - T_i]$$

donde Y_i es la intensidad de la enfermedad en el periodo i -ésimo en %, y T_i es el periodo i -ésimo de evaluación en días, de manera que las unidades serán (%-días) (Pedroza, 1995), utilizando el Software Microsoft Excel, para posteriormente ser analizados estadísticamente con el software SAS system (SAS, 2014).

Para el PI se contaron las plantas con síntomas de raíz dando el valor 0 y 1 (0 = sana y 1 = enferma), hasta finalizar el ciclo y se determinó la proporción respecto al total, para finalmente construir una curva del progreso de la enfermedad.

El rendimiento, se determinó con el peso del grano a cosecha de cada uno de los tratamientos por parcela útil, y el resultado se extrapoló a kg ha^{-1} .

5.6. Identificación en campo de las enfermedades

Para determinar cuál era la enfermedad que se presentaba en cada planta se utilizó literatura relacionada con enfermedades de frijol utilizando la sintomatología descrita y las ilustraciones como referencia (Campos, 1987). Además se tomaron muestras vegetales, se hicieron preparaciones en Papa Dextrosa Agar (PDA) en el laboratorio para el crecimiento del patógeno y se identificaron morfológicamente (Pastor y Shwartz, 1994).

5.7. Análisis de sanidad de las semillas

Se siguió el protocolo para análisis de muestras vegetales de Koneman *et al.* (1990). Se tomaron seis semillas de cada uno de los genotipos, se preparó medio de cultivo PDA y se cultivaron en cajas Petri en condiciones de laboratorio permitiendo así el crecimiento de patógenos. Cinco días después, se observaron coloración y crecimiento de las cepas, se tomó una fracción del micelio y se hicieron preparaciones con lacto fenol y se colocaron una a una al microscopio, determinando mediante identificación morfológica el patógeno involucrado (Pastor y Shwartz, 1994).

5.8. Análisis de patógenos en el suelo

Se realizó un muestreo de suelo en forma aleatoria (“zig-zag”), en 10 sitios a lo largo y ancho del terreno en donde se estableció el experimento, se mezclaron y homogenizaron las 10 muestras simples, cada una de 100 g, y se tomó solo una muestra compuesta de 250 g, la cual fue llevada al laboratorio. De los 250g solo se tomó 1g el cual fue diluido en un tubo de ensayo con 100ml de agua destilada estéril, de la cual se tomó 1ml y se diluyó nuevamente en otro tubo de ensayo así hasta la tercera muestra de la que se tomó 1ml y fue colocado en medio de cultivo PDA para permitir el crecimiento de microorganismos

Koneman *et al.* (1990). Se obtuvieron colonias de hongos siete días después, los cuales fueron identificados morfológicamente (Pastor y Shwartz, 1994).

5.9. Análisis molecular para detectar Proteínas PR y defensinas

Para poder detectar la presencia-ausencia de las proteínas PR y gen defensina en los genotipos de frijol se realizó el análisis molecular siguiendo los pasos de obtención de muestras vegetales, extracción de ARN y finalmente el desarrollo de la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para cada una de las muestras.

5.9.1. Muestras vegetales

Durante el primer ciclo (PV-2015), se seleccionaron los genotipos en las etapas de mayor y menor incidencia del patógeno *C. lindemuthianum*, para la colecta de muestras de material vegetal en el siguiente ciclo (PV-2016) y realizar las pruebas moleculares en laboratorio.

Las muestras de material vegetal fueron colectadas de los genotipos Negro Chapingo y Negro productor en tres etapas del desarrollo fenológico del cultivo: primeras hojas verdaderas (V3:19dds), prefloración (R5:39 dds), y formación de vaina (R7: 68 dds), cinco muestras por cada genotipo en cada etapa. Del ápice de cada planta se tomaron aproximadamente 100 g de material vegetal, colocando las muestras en frascos de plástico e inmediatamente en nitrógeno líquido para su congelación y traslado en hielera a un refrigerador con temperatura de -80°C .

5.9.2. Extracción de ARN de las muestras vegetales

Basándose en el protocolo modificado de extracción de ARN por el método del trizol, (Farell, 2010), las muestras vegetales congeladas fueron procesadas con cinco repeticiones. El resultado de la extracción fue cuantificado con el uso del NanoDrop y se verificó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.9.3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los genes de interés

La PCR en unión con la transcripción en reversa (RT-PCR) fue la técnica utilizada para estimar la presencia del gen de interés (Proteínas PR1, PR-5 y defensina) siguiendo el protocolo modificado de Farell (2010), en el que primeramente se obtuvo ADNc a partir de las muestras de ARN, se estabilizaron las condiciones de amplificación del termociclador de acuerdo a los iniciadores utilizados (**gen defensina** (F:5'-GGGACGTAACAGATAC-3' y R:5'-GGCTTCTCGCACACTTCTG-3'), **PR-1** (F:5'-TTCTTCCCTCGAAAGCTCAA-3' y R: 5'-TTGCAACTGATTATGGTTCCAC-3') y **PR-5** (F: 5'-CGTACAGGCTGCAACTTTGA-3' y R: 5'-AGTGAAGGTGCTCGTTTCGT-3')) para obtener un producto PCR, para el cual se verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador Bio-Rad® mediante el software GelDoc.

5.10. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el uso del programa SAS (Statistical Analysis System 9.0) (SAS, 2014), usando un modelo correspondiente a un diseño de bloques completos al azar ($Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$), para determinar la diferencia entre tratamientos se usó la prueba de diferencia mínima significativa honesta de Tukey, con nivel de significancia al 5% (DSH, $p = 0.05$) (Infante y Zarate, 1984).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de la sanidad de semillas y suelo

De las semillas se obtuvieron 38 aislados con crecimiento diferente, correspondientes a cinco especies y géneros de hongos que fueron identificados morfológicamente basándose en la descripción de Barnettt y Hunter (1972); Pastor y Shwartz (1994) como *Rhizoctonia solani* (52.6%), *Fusarium solani* (21%), *Alternaria* sp (21%) y *Aspergillus* sp. (5.4%); del suelo solo se obtuvieron 3 aislados, los cuales correspondieron a *R. solani*, *F. solani* y *Penicillium* sp. (Figura 1).

Los resultados anteriores coinciden con lo encontrado por García *et al.* (2014), en un estudio similar, quienes identificaron un total de 679 aislados fúngicos pertenecientes a 34 especies de 20 géneros; De estas, *Penicillium* sp. (78.4%), *Rhizoctonia solani* (77.5%), *Aspergillus niger* (68.6%) y *Fusarium solani* (51.0%), fueron las más frecuentes; *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp., no tuvieron gran importancia durante el ciclo del cultivo.

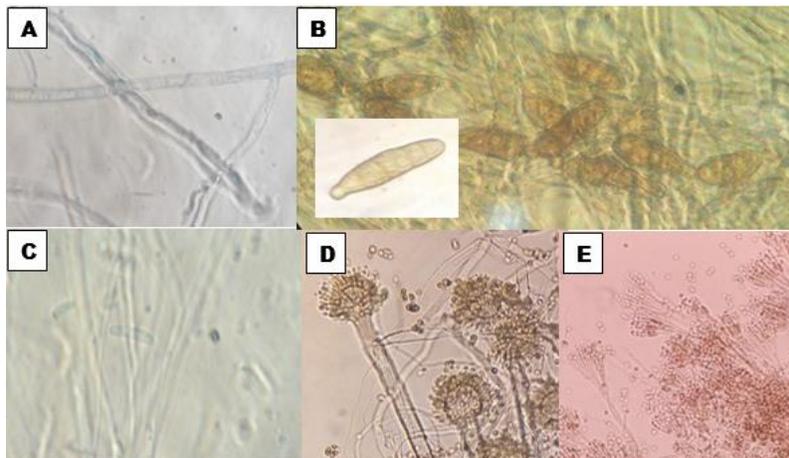


Figura 1. A) Micelio de *Rhizoctonia solani*, B) Conidios de *Alternaria* sp., C) microconidios y micelio de *Fusarium* sp., D) conidióforo *Aspergillus* sp. y E) conidióforo de *Penicillium* sp.

6.2. Resultados en campo: ciclo PV-2015 y PV-2016

Durante el ciclo PV-2015, se presentaron las enfermedades de Tizón del halo (*Pseudomonas savastanoi* pv *phaseolicola* (Burkholder), tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith), antracnosis en follaje y vaina (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.; Scrib)), mancha redonda (*Chaetoseptoria wellmanii* (Sacc)), mancha blanca (*Pseudocercospora albida*) y roya (*Uromyces appendiculatus* (Pers.; Unger), var. *appendiculatus* (sin. *U. phaseoli* Reven; Wint.)), mientras que para el ciclo PV-2016 sólo se presentaron las enfermedades de Tizón del halo, Tizón común, antracnosis en follaje y vaina (Figura 2) que coinciden con las enfermedades presentes reportadas en México (Campos, 1987). La diferencia en los resultados obtenidos se atribuye a las condiciones meteorológicas presentadas en el desarrollo del experimento ya que durante el primer ciclo (2015) la humedad relativa (90%) y precipitación (578 mm) fueron superiores al del 2016 (HR = 80% y precipitación = 378 mm) (UACH, 2016), debido a la planeación más temprana del experimento, además Navarrete y Acosta (1996) mencionan que la posibilidad del uso de semilla del ciclo anterior favorece la fuente de inóculo de algunas enfermedades, de ahí la importancia de emplear semilla sana (Navarrete y Acosta, 1996).

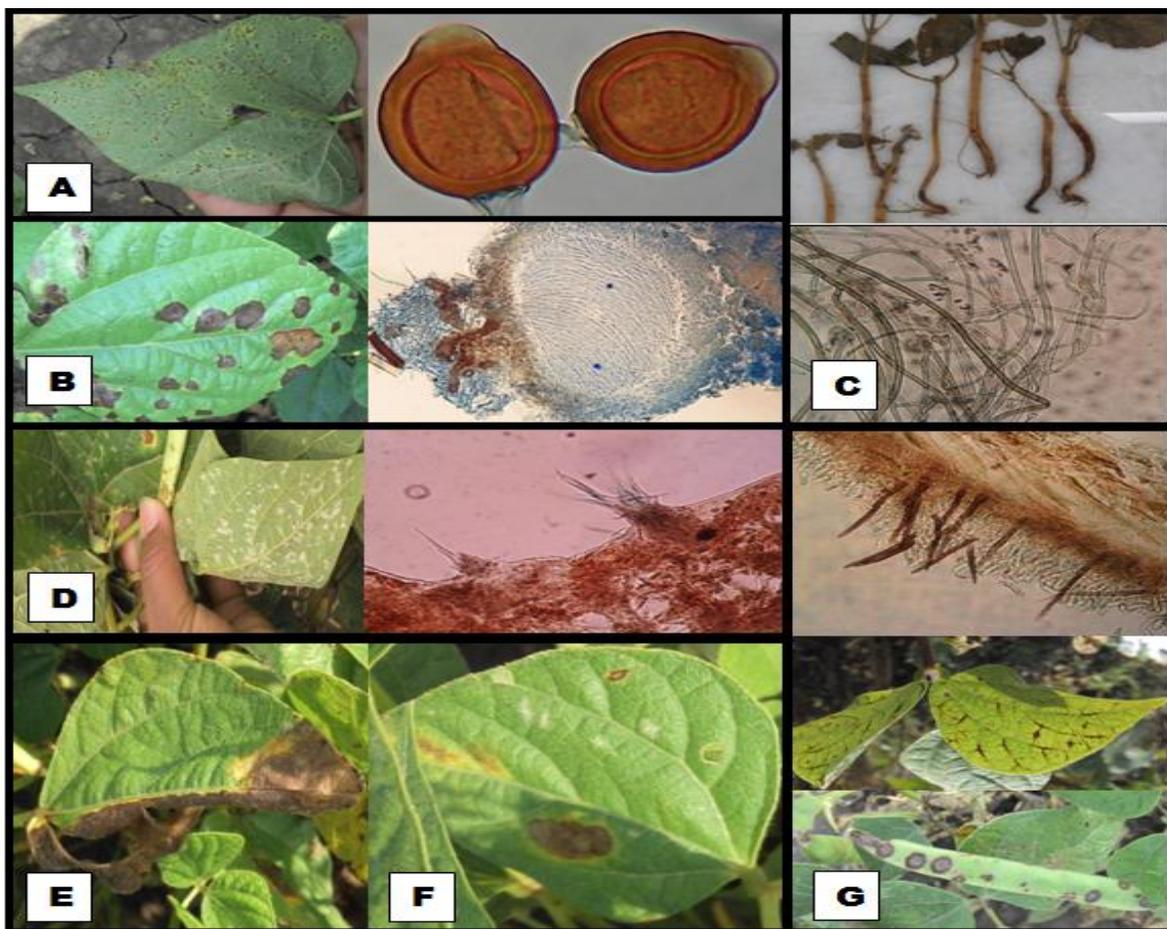


Figura 2. Síntomas de las enfermedades del frijol y estructuras del patógeno. A) Roya, B) Mancha redonda, C) Pudrición radical, D) Mancha blanca, E) Tizón común, F) Tizón de halo, G) Antracnosis en vaina y follaje.

Las interacciones de los factores fotoperiodo, temperatura, genotipo, disponibilidad de nutrientes y humedad, ya sea en exceso o deficiencia, afectan la fenología del frijol principalmente durante el llenado del grano, así como ataques severos de enfermedades e insectos defoliadores durante la etapa reproductiva, al acelerar la madurez (Campos *et al.*, 2002). Lo que conduce a afirmar que la falta de homogeneidad de condiciones en los ciclos favoreció el desarrollo de más enfermedades en el ciclo 2015 que en el 2016. Por lo tanto el análisis estadístico fue generado de manera conjunta (Montgomery, 2005) para ambos años en las enfermedades de Tizón de halo, Tizón común, Antracnosis en follaje y vaina, por la

coincidencia de valores estadísticos obtenidos de manera individual, mientras que para las enfermedades de Mancha blanca, Mancha redonda y roya fue de manera separada debido a que solo se presentaron en el año 2015 durante el cual la precipitación fue más alta (578 mm) (UACH, 2016).

Los resultados del análisis de varianza y comparación múltiple de medias que se discuten a continuación se localizan en el apéndice en los Cuadros 1A- 4A.

En ambos años se observó que todos los genotipos presentaron más de una enfermedad durante el ciclo del cultivo (Cuadro 1A). Las enfermedades con mayor incidencia fueron Tizón de halo, Tizón común, antracnosis en follaje y vaina, alcanzando en algunos genotipos el 100% de la incidencia y PS de hasta 100%. Datos de enfermedades que coinciden con lo reportado para México (Campos, 1987). En la siguiente grafica (Figura 3) se puede observar que de manera general los genotipos Pinto saltillo y Negro Chapingo fueron los más afectados y los genotipos Cacahuate bola, Negro productor y Flor de mayo 199, los que resultaron más resistentes.

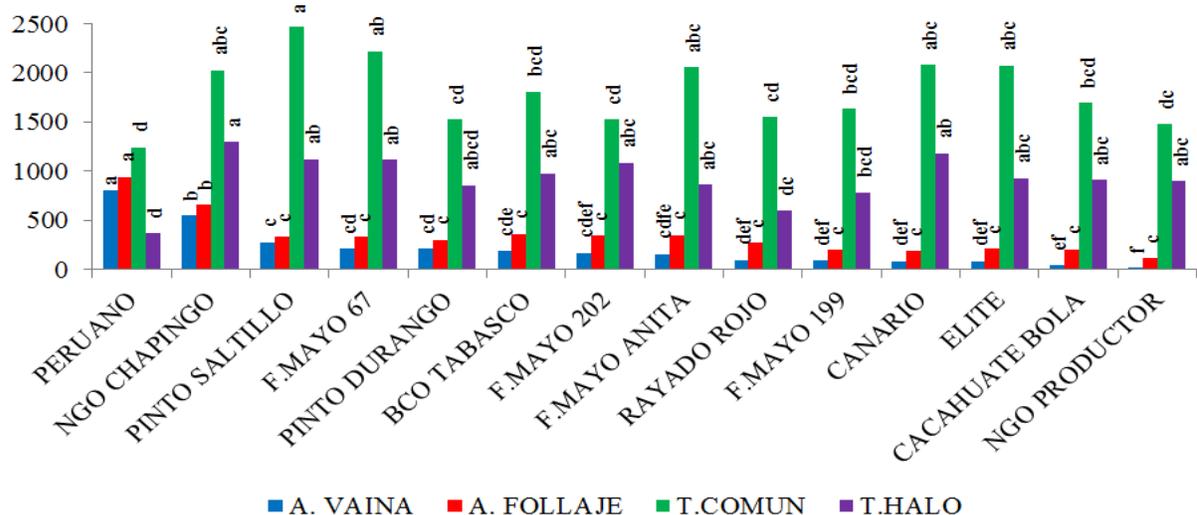


Figura 3. Valor medio del ABCPE de la severidad de las enfermedades: antracnosis en vaina, antracnosis en follaje, tizón común y tizón de halo, en un análisis conjunto para los diferentes genotipos a través de los ciclos PV-2015 y PV-2016. *Medias con la misma

letra, no son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$).

Los tizones se presentaron en las etapas vegetativas mientras que el resto de las enfermedades son más frecuentes en etapa reproductiva. Al evaluar 28 genotipos de frijol en campo se obtuvo la misma reacción, diferencias en las enfermedades durante el cultivo y para cada una de ellas genotipos altamente susceptibles y altamente resistentes (Navarrete y Acosta, 1996)

La incidencia de tizón común y del halo se presentó a los 37dds. Resultado similar obtuvieron Navarrete y Acosta (2000), quienes, al comparar genotipos de frijol respecto a la resistencia de tizón de halo, la enfermedad se presentó a los 40 dds, afirmando que tizón de halo es una enfermedad que ocurre más temprano durante el ciclo de cultivo del frijol de temporal. Así también Prudencio *et al.* (2008), afirman que a los 67 dds en todas las variedades de frijol susceptibles presentan una incidencia promedio de tizón de halo mayor al 50%, mientras que en tizón común se alcanza hasta los 85 dds.

La incidencia de pudrición radical (Cuadro 2A), no presentó diferencia significativa entre años ($P=0.2205$); sin embargo, la interacción genotipo x año fue significativa ($P=0.0225$) así como para genotipo ($P=0.0083$). Los datos demuestran que los genotipos durante el año 2015 fueron los más afectados y presentaron diferencias en cuanto a la susceptibilidad por el ataque de patógenos de raíz, así en ambos años el más dañado fue el genotipo Rayado rojo y el menos fue Elite (Figura 4).

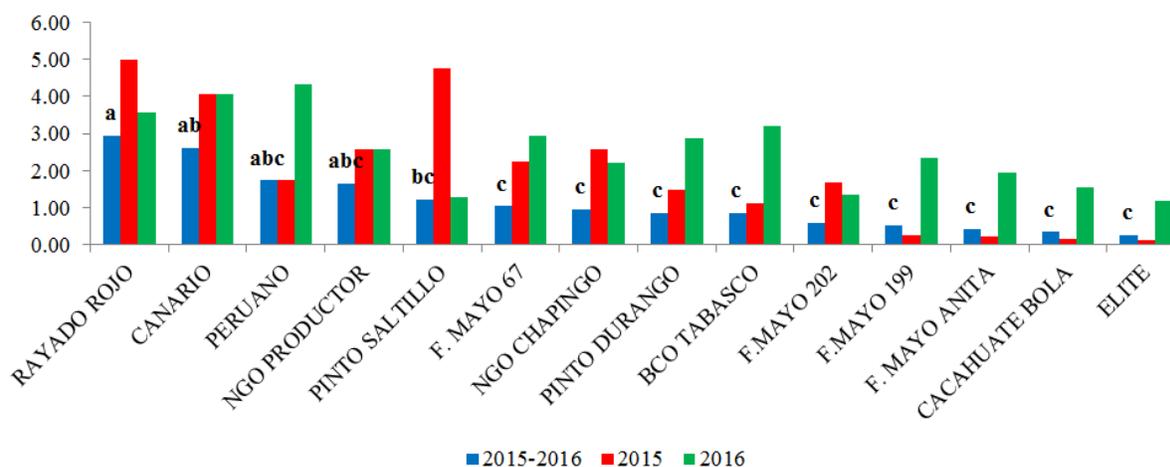


Figura 4. Medias promedio de la incidencia (porcentaje de plantas con pudrición radical por genotipo) análisis combinado a través de los dos años e individuales por cada año. *Medias con la misma letra, no son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$).

Esto se atribuye a la presencia de humedad en el suelo por la precipitación que fue mayor durante el 2015 (578 mm) (UACH, 2016) y a las características agronómicas y genéticas de los genotipos, para generar raíces secundarias de anclaje y oponerse al desarrollo de patógenos, ya que todavía no se ha identificado una línea de frijol común que tenga un alto nivel de resistencia a los patógenos del suelo (Beaver *et al.*, 2002). Para mejorar la resistencia a pudriciones de raíz Allende *et al.*, (2006) recomiendan buscar variedades de buenos atributos agronómicos, hacer cruzamientos con otras que tengan fuentes de resistencia a hongos causantes de pudriciones de raíz, o mediante selecciones individuales dentro de cada variedad.

Los análisis de severidad de enfermedades, se hicieron de manera conjunta para ambos ciclos (PV: 2015-2016) respecto a Tizón de halo, Tizón común, antracnosis en follaje y vaina. Debido que para el año 2016 no se presentaron las enfermedades de mancha blanca, mancha redonda y roya, las cuales fueron analizadas de manera independiente. De este

conjunto de datos obtenemos mayores ABCPE para el ciclo PV-2015 por cada enfermedad analizada, observando que las enfermedades bacterianas (tizón de halo y tizón común) son las que alcanzan mayores valores de PS y por lo tanto de ABCPE (Figura 3). La semilla es el principal vehículo de transmisión del patógeno, estas enfermedades suelen desarrollarse en forma favorable en climas fríos con humedad relativa alta (Rodríguez, 2010), los cuales fueron los principales factores que estuvieron presentes en el desarrollo de este experimento.

Respecto a la severidad de la enfermedad Tizón de halo, el genotipo Negro productor presentó la mayor ABCPE siendo así el genotipo más afectado por la enfermedad en ambos años, por el contrario, el genotipo peruano fue el menos afectado. Para este análisis el efecto del año fue altamente significativo ($P < 0.0001$) puesto que las condiciones climáticas favorecieron más el desarrollo de la enfermedad en el ciclo PV-2015 obteniendo altos PS en algunos genotipos, cuyo efecto de los mismos resultó con diferencias significativas ($P=0.0003$). Cuando se conjuntan las condiciones de alta humedad relativa, hospedante susceptible y patógeno virulento, la infección causa el necrosamiento de todo el follaje afectando notablemente las vainas, perdiéndose la tolerancia o resistencia de los materiales, ya que la lluvia y labores de cultivo diseminan la enfermedad. Teniendo mayor incidencia en climas húmedos con temperaturas frías (Rodríguez, 2010). Además, la posibilidad de que *P. syringae* produzca toxinas como la faseolotoxina, inhibe la producción de compuestos antibacterianos como las fitoalexinas; faseolina faseolinisoflavano, coumestrol y kievitona en genotipos susceptibles (Navarrete y Acosta, 2000).

En el análisis del ABCPE respecto a la enfermedad Tizón común los efectos del año y genotipos resultaron altamente significativos ($P < 0.0001$), no así para la interacción de éstos, que es significativa ($P=0.0116$). Se formaron varias agrupaciones respecto a las

comparaciones de medias, siendo los genotipos contrastantes Pinto saltillo el de mayor y Peruano el que menor daño presentó. La incidencia aumenta con la lluvia, ya que se disemina por salpique e insectos, y la severidad se incrementa con la humedad relativa, presentando una fuerte defoliación lo que reduce la capacidad fotosintética (Mayek *et al.*, 1995; Rodríguez, 2010), variando anualmente, siendo influenciados por factores biológicos y climáticos, así como las prácticas del cultivo (Fourie, 2002).

Entre genotipos se detectaron diferencias altamente significativas respecto a la enfermedad antracnosis, aunque no se detectó resistencia total en ninguno de los genotipos evaluados, ya que todos tuvieron presencia de síntomas de la enfermedad.

La severidad de antracnosis en follaje tuvo efectos altamente significativos ($P < 0.0001$) en año y genotipo, en tanto que la interacción año x genotipo fueron significativos al 1% ($P=0.0153$), los genotipos Peruano y Negro Chapingo fueron los más afectados, en contraste Negro Productor y Canario que fueron los de menor PS respecto al total del área bajo la curva.

La severidad respecto a la enfermedad Antracnosis en vaina presentó diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) en cuanto al año y genotipo e interacción año x genotipo, coincidiendo con la antracnosis de follaje en los genotipos que presentaron la mayor y menor área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Aceves y Acosta (1992), atribuyen que la mayor frecuencia de variedades con resistencia a antracnosis ocurre en los genotipos con grano de color negro. Sin embargo, en este experimento no coincide del todo, puesto que Negro Chapingo fue uno de los genotipos más afectados y en contraparte Canario que es semilla clara resultó resistente. Datos similares encontraron González *et al.* (1977), de los diferentes genotipos evaluados los que presentaron mayor resistencia a la antracnosis fue el grupo de frijoles Bayos, mientras que Navarrete y Acosta (1996),

encontraron al evaluar 28 diferentes genotipos de frijol entre negros y claros que todos presentaron la enfermedad, siendo susceptibles. Esto puede deberse a que se asocia a la enfermedad con el tamaño de la semilla y características genéticas de compatibilidad o incompatibilidad con el patógeno (Gallego *et al.*, 2010).

En este experimento los resultados para ambos años coinciden en el comportamiento de la antracnosis respecto a los diferentes genotipos (Cuadro 1A). Araya y Araya (2000), sugieren que para determinar la estabilidad de genotipos en el tiempo, permitiendo atribuir tolerancia a la enfermedad y ser utilizados en programas de mejoramiento, se requiere al menos evaluar durante dos ciclos su comportamiento. Sin embargo, la antracnosis es una enfermedad que sigue afectando significativamente el rendimiento del grano de frijol (López *et al.*, 2006; López *et al.*, 2015). Por lo que Araya (2003) recomienda para el mejoramiento genético del frijol combinar los genes presentes en los genotipos de los dos orígenes del frijol existentes (mesoamericano y andino), para obtener una resistencia más durable a la antracnosis del frijol, ya que el patógeno presenta gran variabilidad patogénica, que refleja procesos de coevolución en el patosistema.

En el análisis estadístico del ciclo PV-2015 para las enfermedades de mancha blanca (*Pseudocercospora albida*), mancha redonda (*Chaetoseptoria wellmanii* (Sacc)), y roya (*Uromyces appendiculatus* (Cuadro 3A), se tuvieron los siguientes resultados (Figura 5):

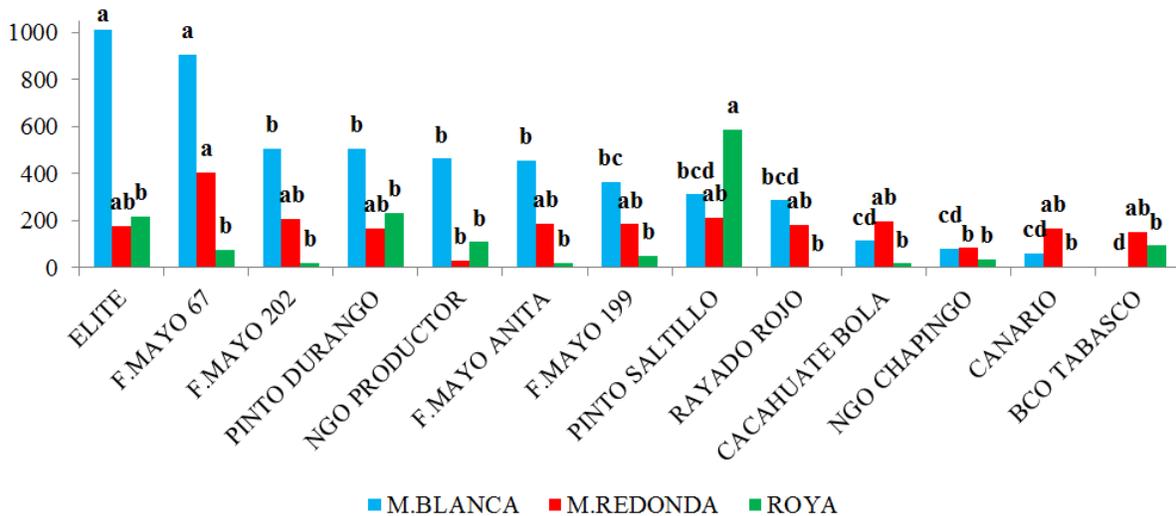


Figura 5. Valor medio del ABCPE de la severidad de las enfermedades: mancha blanca, mancha redonda y roya para los diferentes genotipos durante el ciclo PV-2015. *Medias con la misma letra, no son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$).

Los genotipos presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) para el análisis del ABCPE de la mancha blanca, formando tres grupos en la separación múltiple de medias, considerando al genotipo Elite como el más afectado por la enfermedad y el Blanco Tabasco el que menos presentó daños.

La mancha redonda causó diferencias significativas ($P = 0.0227$) entre genotipos, quien fue determinante para el desarrollo de la enfermedad, contrastando en tres grupos la separación de medias, siendo los genotipos Flor de mayo 67 el más afectado y el Negro productor al que menos afectó la enfermedad (Figura 5).

La roya fue una de las enfermedades que se considera con los valores de severidad menores presentados y la que el genotipo Rayado rojo no la presentó. Las diferencias entre genotipos fueron altamente significativas ($P < 0.0001$), dos grupos diferenciaron este comportamiento, el genotipo Pinto saltillo que fue el más severamente dañado y el Rayado

rojo que no presentó la enfermedad, no teniendo diferencias para el resto de genotipos con referencia al que no fue dañado (Figura 5).

Respecto a mancha blanca, mancha redonda y roya, solo se presentaron en este ciclo debido a que existieron las condiciones adecuadas de HR, temperatura, precipitación, e inóculo para su desarrollo. Garcés *et al.* (2012), mencionan que cuando se desarrolla el cultivo en temporadas secas o de baja precipitación y humedad, la roya no se presenta o existe con baja incidencia y severidad. Así mismo González *et al.* (1977), mencionan que la mancha angular coincide con las condiciones alta humedad, aunque se considera de poca importancia su presencia cuando aparece en etapas maduras. Tosqy *et al.* (2012), indican que ambas enfermedades no representan afectación considerable al rendimiento si aparecen en etapas tardías (R8), cuando la planta inició la formación de grano, pero si se presenta en etapas tempranas pueden existir daños considerables.

Estos resultados claramente muestran diferencias en las ABCPE, debido a la variabilidad de concentración de inóculo de los diferentes patógenos entre genotipos, lo que favorece la infección de cultivos posteriores. En el cuadro 5-A, del apéndice se puede ver una notación con valores asignados de acuerdo al grado de severidad de cada genotipo, que permite clasificarlos de manera generalizada como más susceptibles o tolerantes a las enfermedades, lo cual pudiera servir de referencia al momento de elegir un material para la siembra, haciendo énfasis en que las variedades resistentes o parcialmente resistentes tienden a reducir el inóculo disminuyendo el desarrollo de las enfermedades (Melloy *et al.*, 2010).

6.3. Rendimiento promedio de genotipos en 2 años

La variable rendimiento (Figura 6 y Cuadro 4A), presentó diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) para cada uno de los años y marginalmente significativas entre

los diferentes genotipos ($P=0.0669$), siendo el año 2016 en el que se obtuvieron los rendimientos más altos, promedio estimado de $1,411 \text{ kg ha}^{-1}$ a diferencia del 2015 que fue de 727 kg ha^{-1} . Viéndose afectado por la presencia de más enfermedades, similar a estudios realizados en frijol por López *et al.* (2006), en los que el rendimiento se vio afectado por diferencias en condiciones como humedad relativa, textura y PH del suelo, manejo del cultivo y presencia diferencial de enfermedades, variando la respuesta del genotipo de un ambiente de evaluación a otro.

De estos resultados, la agrupación entre genotipos generó tres conjuntos, sobresaliendo el genotipo Pinto Durango con una media de $1,543 \text{ kg ha}^{-1}$ como el mayor productor de grano y Negro Chapingo con 452 kg ha^{-1} como el de menor rendimiento. Esto se debe a la afectación de las diferentes enfermedades, destacando que Negro Chapingo fue severamente afectado por la antracnosis, disminuyendo el rendimiento, no así reflejado en Peruano, donde el análisis toma solo el dato único del 2016, porque solo se estableció durante ese ciclo. Coincidiendo con lo mencionado por López *et al.* (2015), que los genotipos de mayor rendimiento mostraron resistencia a la antracnosis y los de menor rendimiento fueron los más susceptibles a diversas enfermedades.

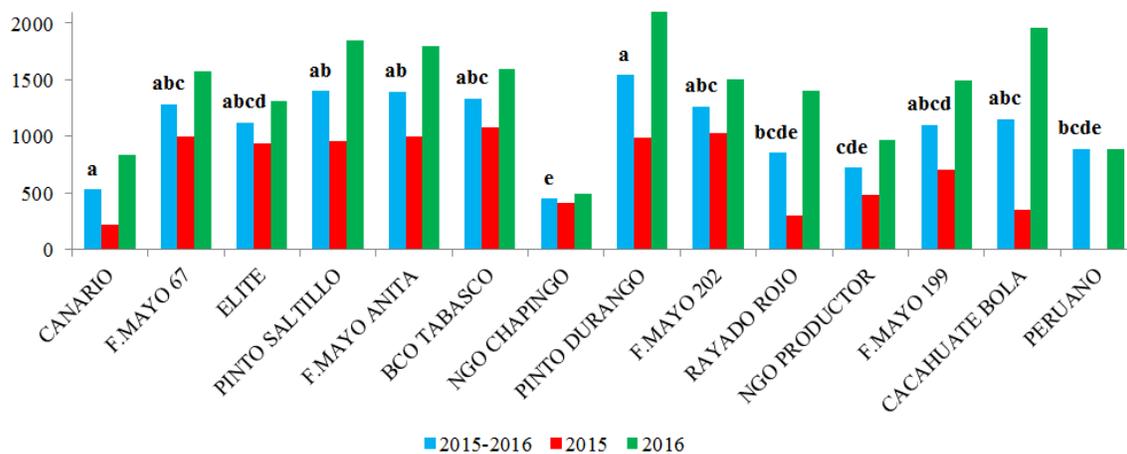


Figura 6. Rendimiento (kg ha^{-1}) de los diferentes genotipos evaluados en ambos ciclos agrícolas. *Medias con la misma letra, no son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$).

6.4. Análisis molecular de los genotipos

Se obtuvo un bandeo de los genotipos Negro productor y Negro Chapingo (Figura 7), en donde se comprobó la integridad del ARN, las concentraciones obtenidas variaron desde 1,933.44 a 4,108.24 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ y la razón de pureza varió entre 1.20 y 2. No se observó degradación de ninguna muestra en la corrida electroforética. De ARN obtenido se generó ADN complementario (Cuadro 6A); sin embargo, a pesar de que se hicieron los procesos de manera adecuada no se encontró la evidencia de proteínas PR ni de genes defensina. No es la primera vez que sucede, Gallego *et al.* (2010), en un análisis de genotipos de frijol mediante marcadores moleculares tipo SCAR, tampoco encontró en los materiales en estudio, la presencia de genes asociados con la resistencia a antracnosis, justificándose en que no se evaluaron los genotipos adecuados.

En el presente estudio se cree que en los resultados generados influyeron diferentes factores bióticos y abióticos, ya que las muestras de los genotipos evaluados se tomaron del experimento establecido en campo y los tiempos no fueron adecuados, debiéndose hacer

mayor monitoreo de la expresión de la planta a través del ciclo del cultivo. Esto puede deberse a que los promotores reguladores de la expresión génica pueden estar de manera constitutiva o activarse por inducción, su nivel de expresión varía de acuerdo con determinadas condiciones, por ello para regular la expresión de manera específica es necesaria la manipulación de los patrones regulatorios en condiciones controladas (Bajaj y Mohanty, 2005).

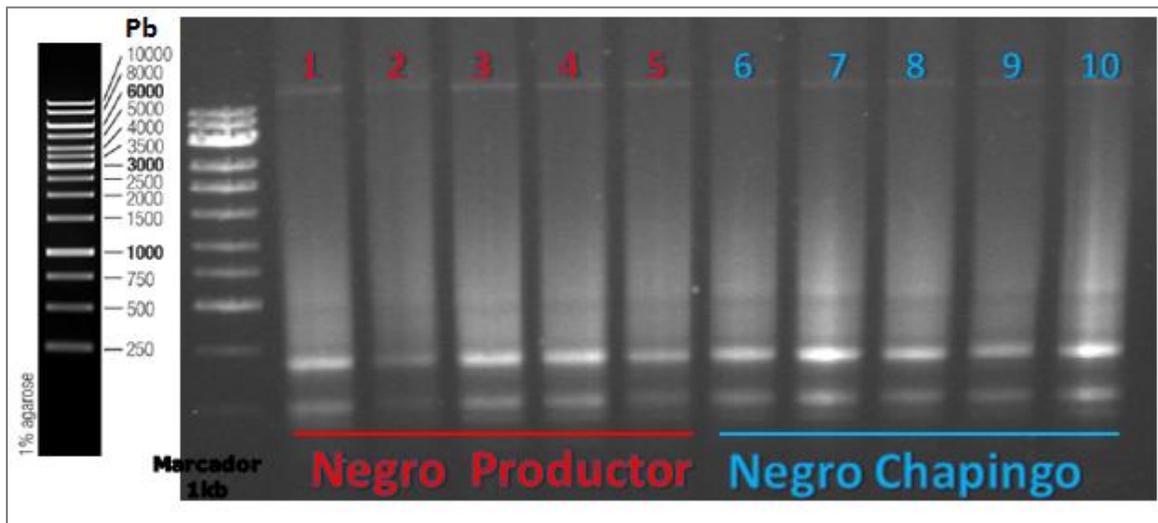


Figura 7. Electroforesis de en gel de agarosa de ARN de los genotipos Negro productor y Negro Chapingo, extraídos de hojas de frijol. Cada banda intensa corresponde a las subunidades ribosomales (mayor y menor) que indican la presencia de ARN óptimo y su apariencia es definida.

VII. CONCLUSIONES

- Ninguno de los genotipos evaluados en campo fue resistente de manera general, ya que todos presentaron síntomas de alguna enfermedad.
- Considerando todas las enfermedades, los genotipos más tolerantes fueron Flor de mayo 199, Negro Productor y Cacahuete bola, los más susceptibles Pinto saltillo, Flor de mayo 67 y Negro Chapingo.
- El genotipo con mayor rendimiento en grano fué Pinto Durango.

VIII. RECOMENDACIONES

- Hace falta comparar la relación costo beneficio, de cada genotipo para elegir el de mayor conveniencia, así como también el hábito de consumo en la población objetivo.
- Se recomienda planear la siembra de cultivo de manera temprana para las condiciones del estado de México en el mes de mayo, ya que permite reducir la incidencia y severidad de enfermedades, así como también usar semillas libres de patógenos y elegir preferentemente genotipos tolerantes.
- Existen avances de biología molecular y fito mejoramiento del frijol, pero es necesario desarrollar mayores soluciones prácticas que permita a los productores resolver problemáticas de manera sustentable.

IX. LITERATURA CITADA

- Aceves, R.J. y Acosta, G.J. 1992. Reacción a antracnosis del frijol de familias F2 y sus progenitores bajo condiciones de invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 23(1):17-28.
- Acosta, G.J.; Sánchez, G.B.; Mendoza, H.F.; Jiménez, H.Y.; Salinas, P.R.; Rosales, S. R.; Navarrete, M. R.; Zandate, H.R.; Alvarado, M.S. y Padilla, R.J. 2010. Rendimiento y reacción a enfermedades en frijol tipo Flor de Mayo en riego y temporal. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 1 (1):65-75.
- Aguilera, A. S.; López, L. K.; López, J.; Hernández, F. A. y Álvarez, M. 2006. Identificación y análisis de un fragmento cromosómico de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* involucrado en la síntesis de faseolotoxina. Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV IPN-Unidad Irapuato. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2): 160- 161.
- Ahmed, N.U.; Parka, J.I; Junga, H.J.; Kangb, K.K.; Limc, Y.P.; Hurd, Y. and Nou, I.S. 2013. Molecular characterization of thaumatin family genes related to stresses in *Brassica rapa*. *Scientia Horticulturae* 152(1): 26–34.
- Allende, A.G.; Acero, G.G.; Padilla, R. J y Mayek, P.N. 2006. Comportamiento agronómico y características físico-químicas del grano de frijol en Aguascalientes, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 29 (1): 89 – 93.
- Álzate, M. A.; Costa, M.R.; Arruda, K.M.; de Barros, E.G. y Alves, M. M. 2003. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. *Euphytica* 133 (2): 165–169.

- Araya, C. y Araya, R. 2000. Avances en la selección de fuentes de resistencia las principales enfermedades del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 11(2): 25-29.
- Araya, C. M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatología Brasileira* 28(1):221-228.
- Bajaj, S. y Mohanty, A. 2005. Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 3(3): 275–307.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. Macmillan. 218p.
- Beaver, J.; Godoy, G.; Rosas, C. y Steadman. 2002. estrategias para seleccionar frijol común con mayor resistencia a mustia hilachosa. *Agronomía Mesoamericana* 13(1): 67-72.
- Becerra E.; López, E.; y Acosta, J. 1995. Resistencia genética y control químico de la roya del frijol en el trópico húmedo de México. *Agronomía Mesoamericana* 6(7): 61-67.
- Brown, R.L.; Kazan, K.; McGrath, K.C.; Maclean, D.J. and Manners, J.M. 2003. A Role for the GCC-Box in Jasmonate-Mediated Activation of the PDF1.2 Gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 132(2): 1020-1032.
- Campos A. J., 1987. *Enfermedades del frijol*. Trillas (reimpresión 2011). México D. F. 132p.
- Campos, E.A.; Castillo, G. F. y Acosta, G.J. 2002. Respuesta al fotoperiodo de familias segregantes de frijol de alto potencial de rendimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(1):9-15.

- Caporale, C.; Di Berardino, I.; Leonardi, L.; Bertini, L.; Cascone, A.; Buonocore, V. and Caruso, C. 2004. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. Federation of European Biochemical Societies (FEBS). 575p.
- Cruz, I. S.; Ramírez, V. P.; García, E.R.; Castillo, G.F. y Sandoval, I. J. 2004. Selección para resistencia a tizón común en frijol. Revista Fitotecnia Mexicana 27 (2): 141 – 147.
- Datta, S. K. and Muthukrishnan, S. 1999. Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Editor, CRC Press. SBN. pp 124.
- De Beer, A. y Vivier, M. A. 2011. Four plant defensins from an indigenous South African *Brassicaceae* species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. BMC Res notes 459(4):2-19.
- Eguiarte, L.; Souza, V. y Aguirre, X .2007. Ecología molecular. Las herramientas moleculares: extracción de ácidos nucleicos. Primera edición. 594p.
- Herschhorn, A. and Hizi, A. 2010. Retroviral reverse transcriptases. Cellullar and Molecular Life Sciences 67(16): 2717-2747.
- Espinosa, H. E.; Quintero, J. A.; Sánchez, G.B.; Acosta, G. J. y Mora, A. M.2013. Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común transgénico, expresando el gen defensina de *Arabidopsis thaliana*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4 (7): 1027-1042.
- Estrada, G.; Guillén, G.; Olivares, J. E.; Díaz, C.; Alvarado, X. y Sánchez, F. 2007. La transformación genética y genómica del frijol. Biotecnología 14(3): 281-290.
- Farell, R. E. J. 2010. RNA methodologies. A Laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press. Inc. Pennsylvania, USA. 742 p.

- Fourie, D. 2002. Distribution and Severity of Bacterial Diseases on Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. *Journal of Phytopathology* 150(4): 220–226.
- Games, P.D.; Dos Santos, I.S.; Mello, E. O.; Diz, M. S.; Carvalho, A.O.; de Souza-Filho, A.O.; Da Cunha, M.; Vasconcelos, I.M.; Ferreira, B.S. and Gomes, V.M. 2008. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides* 29(12) : 2090 – 2100.
- García, D.; Martínez, E. y Cantillo, P. T. 2014. Hongos asociados a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas en Cuba. *Biotecnología Vegetal* 14(2): 99 – 105.
- Garcés, F. R.; Zabala, P.R.; Díaz, C.G. y Vera, A. D. 2012. Evaluación agronómica y fitosanitaria de germoplasma de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el trópico húmedo ecuatoriano. *Revista Científica UDO Agrícola* 12 (2): 230-240.
- Gill-Langarica, H. R. 2008. Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Revista Mexicana de fitopatología*. Volumen 26 (2): 164-176.
- Gallego, C.; Ligarreto, M. A.; Garzón, G. L.; Oliveros, G. O. y Rincón, R.L. 2010. Rendimiento y reacción a *colletotrichum lindemuthianum* en cultivares de fríjol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 63 (2): 5477-5488.
- González, L.; Gutiérrez, R.; Cascante, F y Portilla, E. 1977. Combate de enfermedades foliares en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante el uso limitado de fungicidas. *Agronomía Costarricense* 1 (2): 107-118.
- Hassan-eman, O. y El-Meneisy, A. A. 2014. Biocontrol of halo blight of bean caused by *Pseudomonas phaseolicola*. *International Journal of Virology* 10 (3):235-242.

- Hegedus, N., and Marx, F. 2013. Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews* 26(4): 132–145.
- Hernández H.C. 1995. Fenología y rendimiento de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de diversos orígenes en tres fechas de siembra. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 78p.
- Infante, S. G. y Zarate, D.G.1984. Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Editorial trillas. Primera edición. México. 643p.
- James, C. 1971. A Manual of Assessment keys for Plant Diseases. Canada Department of Agriculture. The American Phytopathological Society. Publication No. 1450. Key No. 3.3.1 and 3.3.2.
- Jha, S. and Chattoo B. B. 2010. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Research* 19(3): 373–384.
- Jiménez, G. J. C.; Valadez, M. E. y Marbán, M. N. 2010. Evaluación y caracterización de *Phaseolus* spp. como fuente de resistencia a *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16(2): 99-105.
- Jun-Jun, L. y Abul K.M. E. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68(1-3): 3–13.
- Koneman, E. W., Allen, S.D., Jarida, W. M., Schreckenberger, P.C., y Winn, W. C. 1990. *Diagnostico Microbiologico: texto y atlas*. Quinta edición. Editorial panamericana. Pp 965-990.
- Koornneef, M. and Meinke, D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* 61(6): 909–921.

- Kumar, G. A., Randeep, R., Jwa, N. 2001. Differential induction of three pathogenesis-related genes, PR10, PR1b and PR5 by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (*Oryza sativa* L.) seed lings. *Juornal Plant Physiology* 158(1):133–137.
- Lacerda A.F.; Vasconcelos E.A.R.; Pelegrini P.B. and Grossi de Sa M.F. 2014. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology* 5(2): 1-10.
- Lai Y. and Gallo R.L. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* 30(3): 131–141.
- Lamichhane, J. R.; Messean, A. y Morris, C.E. 2015. Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of general Plant pathology* 81 (5): 331-350.
- Li, X.; Gao, L.; Zhang, W.; Liu, J.; Zhang, Y.; Wang, H. and Liu, D. 2015. Characteristic expression of wheat PR5 gene in response to infection by the leaf rust pathogen, *Puccinia triticina*. *Journal of Plant Interactions* 10(1):132-141.
- Liu, D.; He, X.; Li, W.; Chen, C. and Ge, F. 2012. Molecular cloning of a thaumatin-like protein gene from *Pyrus pyrifolia* and overexpression of this gene in tobacco increased resistance to pathogenic fungi. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 111(1): 29–39.
- Liu, W.; Zhang, F.; Zhang, W.; Song, L.; Wu, W. and Chen, Y. 2013. *Arabidopsis* Di19 Functions as a Transcription Factor and Modulates PR1, PR2, and PR5 Expression in Response to Drought Stress. *Molecular plant.* 6 (5): 1487-1502.
- López, P. S.; Portela, D.D; Rojas, A. y Chaparro, G.A. 2014. Los péptidos antimicrobianos de origen vegetal con un breve enfoque en las proteínas de transferencia de lípidos. Bogotá Colombia. *Revista Mutis* 4(1):51-61.

- López, S. E.; Tosquy, V.O.; Villar, S.B.; Ugalde, A.F. y Cumpiàn G. J. 2006. Adaptabilidad de genotipos de frijol resistentes a enfermedades y a suelos ácidos. Rev. Fitotec. Mex. 29 (1): 33 – 39.
- López, S. E.; Tosquy, V.O.; Villar, S.B; Acosta, G.J; Rodríguez, R.J. y Andrés, M.P. 2015. Rendimiento y estabilidad de líneas mejoradas de frijol negro en Veracruz y Chiapas, México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 38 (2): 173 – 181.
- Maróti G.; Kereszt A.; Kondorosi É. and Mergaert P. 2011. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Research in microbiology 162 (4): 363-374.
- Mayek, P.N.; Pedroza, F.J.; Villareal, G.L. y Valdes, L. C. 1995. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. Revista Mexicana de Fitopatología 13 (1):1-9.
- Melloy, P.; Hollaway, G.; Luck, J.; Norton, I.; Aitken, E. and Chakraborty, S. 2010. Production and fitness of *Fusarium pseudograminearum* inoculum at elevated carbon dioxide in FACE. Global Change Biology 16(12): 3363 – 3373.
- Mena, C. J. y R. V. Velázquez, 2010. Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol en Zacatecas. Folleto Técnico No. 24. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 83 p.
- Montgomery, D.C.2005. Diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial Limusa. Segunda edición. México.686p.
- Montero, T. V.; Acosta, J.; Gallegos, B.; Guerrero, G. Z.; Sánchez, G. B. y González, C. M. 2010. Combinación de genes de frijol que le confieren resistencia contra *uromyces appendiculatus* (pers.) unger . Revista Fitotec. Mex. 33 (4): 111 –115.

- Muñoz, S.R. 2010. Frijol, Rica fuente de proteínas. CONABIO. Biodiversitas, 89(1):7-11.
- Navarrete, M.R. y Acosta, G.J. 1996. Identificación de genotipos de frijol con resistencia a múltiples enfermedades en la mesa central de México. Agricultura Técnica Mexicana. 22 (2): 187-197.
- Navarrete, M.R. y Acosta, G.A. 2000. Resistencia de frijol al Tizón de halo en el valle de México y progreso de la enfermedad. Revista Fitotecnia Mexicana. 23(1):17-28.
- Pastor, C.M. y Shwartz, H.F. 1994. Problemas de producción del frijol en los trópicos. Segunda edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 805p.
- Pedroza, S. A. 1995. Epidemiología agrícola, principios y prácticas. Editorial de la unidad regional Universitaria de zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo. 87 p.
- Pedroza, S. A.; Samaniego, G.J. y Chávez, R.J. 2010. Fitosanidad en tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones favorables y desfavorables de humedad edáfica. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 9(1):53-59.
- Pérez, S.1990. Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) en plantas. La Habana, Cuba. Biotecnología aplicada 7(2): 121-131.
- Prudencio, S. J.M.; Navarrete, M. R; Navarrete, M.J. y Acosta, G. J. 2008. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el valle de México. Agricultura Técnica en México 34 (2): 201-212.
- Rauscher, M.; Adam, A.L.; Wirtz, S.; Guggenheim, R.; Mendgen, K. and Deising, H.B. 1999. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean, Plant Journal. 19 (6): 625–633.

- Reza, O.; Xia, Y.; Porcelli, F.; Bohlmann, H. and Veglia, G. 2016. NMR Structure and Conformational Dynamics of At-PDFL2.1, a Defensin-like Peptide from *Arabidopsis thaliana*, *BBA - Proteins and Proteomics*. 1864 (12): 1739-1747.
- Rodríguez, G.R.; Acosta, G.J.; González, C.M y Simpson, J. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura técnica en México* 32 (1): 101-114.
- Rodríguez, M. L. 2010. Enfermedades bacterianas en hortalizas. *Enfermedades del frijol*. Universidad Autónoma Chapingo. 1ª edición. Pp 181-187.
- Rout, E.; Nanda, S. and Joshi, R.K. 2016. Molecular characterization and heterologous expression of a pathogen induced PR5 gene from garlic (*Allium sativum* L.) conferring enhanced resistance to necrotrophic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 144(2): 345–360.
- SAGARPA-INEGI. 2014. Encuesta nacional agropecuaria (ENA) 2014 información relevante. Nota Técnica de Encuesta Nacional Agropecuaria. Boletín de prensa núm. 328/15. p8.
- SAS (Statistics Analysis System). 2014. SAS/STAT User's guide. 13.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sels, E.; Mathys, J.; De Coninck, B.; Cammue, B. and De Bolle, M. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(11): 941–950.
- Shatters, R.G.; Boykin, L.M.; Lapointe, S.L.; Hunter, W.B. and Weathersbee III, A.A. 2003. Phylogenetic and Structural Relationships of the PR5 Gene Family Reveal an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Tax. *Journal of Molecular Evolution* 63(1): 12-29.

- SIAP, 2015. Producción agrícola anual de frijol, riego más temporal ordenada por estado del año 2015. En la red: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp Consulta: 09/02/17.
- Silva P.M.; Goncalves, S. and Santos N.C. 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front Microbiol* 5(97): 1–17.
- Singh, S.P. and Gutiérrez, J.A. 1982. Source of some architectural traits in dry bush beans *Phaseolus vulgaris* L. Annual Republic Bean Improvist Cooperation. 25(1):6-8.
- Tachi, H.; Fukuda-Yamada, K.; Kojima, T.; Shiraiwa, M. and Rakahara, H. 2009. Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high salt stress. *Plant Physiol Biochemistry* 47(1):73–79
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C. y Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Revista media graphic* 2(2): 70-78.
- Téllez, G.A y Castaño, J.C. 2010. Péptidos antimicrobianos. *Revista colombiana infection* 14(1):55-67.
- Thomma, B.P. and Broekaert, W. F.1998. Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Biochem*, 36 (7): 533-537.
- Tosqy, V. O.; López, S.E.; Esqueda, E. V.; Acosta, G.J.; Ugalde, A.J. y Villar, S.B. 2012. Rendimiento y reacción a enfermedades de genotipos de frijol en condiciones de temporal y humedad residual. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (4): 727-737.
- UACH. 2016. Estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo. Consulta directa para la obtención de la información.

- Uwe, C.; Beckers, G.; Langenbach, C. and Jaskiewicz, M. 2015. Priming for Enhanced Defense. Department of Plant Physiology, RWTH Aachen University, Aachen 52056, Germany; Annual Review Phytopathology. 53(1):97–119.
- Van der Weerden, N.L.; Bleackley, M.R., and Anderson, M.A. 2013. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. Cellular and Molecular Life Sciences. 70(19): 3545–3570.
- Van Loon, L.C.; Rep, M. and Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44(1): 135–162.
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological Molecular Plant Pathology 55(2):85–97.
- Walter, M.H.; Liu, J.W.; Grand, C.; Lamb, C.J. and Hess, D. 1990. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor induced transcripts are members of a ubiquitous new class of proteins including pollen allergens. Molecular and General Genetics MGG 222(2): 353–60.
- Xue, R.; Wu, J.; Zhu, Z.; Wang, L.; Wang, X.; Wang, S. and Blair, M.W. 2015. Differentially Expressed Genes in Resistant and Susceptible Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes in Response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. PLOS ONE 10(6): 1-20.
- Yerkes, W. 1980. Enfermedades y plagas del frijol en México. Folleto 912. Universidad Autónoma Chapingo. México. 45p.

APÉNDICE

Cuadro 1 A. Comparación múltiple de medias del análisis combinado del valor del ABCPE en la severidad de las enfermedades presentadas en ambos ciclos.

Genotipo	Antracnosis				Tizón común	Tizón de halo		
	En vaina		En follaje					
Peruano	807.87	A	938.23	A	1243.10	D	369.40	D
N. Chapingo	546.14	B	657.36	B	2028.20	BAC	1295.30	A
P. Saltillo	278.05	C	331.30	C	2473.20	A	1122.30	BA
F. Mayo 67	212.23	DC	331.13	C	2217.30	BA	1117.90	BA
P. Durango	211.12	DC	304.00	C	1525.20	DC	849.50	BDAC
B. Tabasco	191.72	DCE	362.77	C	1802.80	BDC	977.20	BAC
F. Mayo 202	166.58	DFCE	345.86	C	1531.40	DC	1085.00	BAC
F. Mayo Anita	158.59	DFCE	348.98	C	2057.80	BAC	861.80	BAC
Rayado Rojo	92.40	DFE	273.45	C	1554.80	DC	595.20	DC
F. Mayo 199	87.98	DFE	200.83	C	1633.30	BDC	777.50	BDC
Canario	80.79	DFE	191.40	C	2080.90	BAC	1179.30	BA
Elite	79.71	DFE	208.17	C	2073.80	BAC	928.90	BAC
C. Bola	42.61	FE	205.54	C	1692.70	BDC	908.90	BAC
N. Productor	17.43	F	117.10	C	1474.50	DC	900.80	BAC

*Medias con la misma letra, por columnas, no son estadísticamente diferentes; DSH:

Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$)

Cuadro 2 A. Medias promedio de la incidencia (porcentaje de plantas con pudrición radical por genotipo) análisis combinado y anual.

Genotipo	% pudrición radical
Rayado Rojo	2.95 BAC
Canario	2.60 C
Peruano	1.74 BC
Negro Productor	1.65 C
Pinto Saltillo	1.22 C
Flor de Mayo 67	1.04 C
Negro Chapingo	0.95 C
Pinto Durango	0.87 C
Blanco Tabasco	0.87 A
F. Mayo 202	0.61 C
F. Mayo 199	0.52 BA
F. Mayo Anita	0.43 C
Cacahuate Bola	0.35 C
Elite	0.26 BAC

*Medias con la misma letra, por columnas, no son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$)

Cuadro 3 A. Valor medio del ABCPE de la severidad de las enfermedades: mancha blanca, mancha redonda y roya para los diferentes genotipos durante el ciclo PV-2015.

Genotipo	Mancha Blanca	Mancha Redonda	Roya
Elite	1011.50 A	176.85 BA	218.50 B
F. Mayo 67	907.13 A	404.48 A	76.13 B
F. Mayo 202	506.75 B	205.56 BA	19.75 B
Pinto Durango	506.50 B	168.04 BA	232.00 B
Negro Productor	462.63 B	27.65 B	107.75 B
F. Mayo Anita	454.25 B	186.85 BA	20.75 B
F. Mayo 199	363.13 CB	183.99 BA	49.50 B
Pinto Saltillo	310.75 CBD	210.20 BA	585.25 A
Rayado Rojo	284.88 CBD	182.99 BA	0.00 B
Cacahuate Bola	113.25 CD	198.22 BA	16.38 B
Negro Chapingo	77.63 CD	83.76 B	34.00 B
Canario	61.63 CD	166.00 BA	3.63 B
Blanco Tabasco	5.25 D	150.76 BA	92.38 B

* Medias con la misma letra, por columnas, no son estadísticamente diferentes; DSH:

Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$)

Cuadro 4 A. Resultados de la variable rendimiento para los diferentes genotipos evaluados y separación de medias del análisis combinado.

Genotipo	Rendimiento (kg ha^{-1})		
	Análisis combinado	Año 2015	Año 2016
Pinto Durango	1543.00 A	986.21	2099.72
Pinto Saltillo	1401.90 BA	959.38	1844.48
Flor de Mayo Anita	1396.40 BA	998.44	1794.35
Blanco Tabasco	1336.00 BAC	1079.69	1592.27
Flor de Mayo 67	1285.40 BAC	996.88	1573.99
Cacahuate Bola	1152.10 BAC	348.13	1956.05
Flor de mayo 202	1265.70 BAC	1030.33	2501.84
Flor de Mayo 199	1101.30 BDAC	706.25	1496.27
Elite	1120.80 BDAC	932.03	1309.65
Peruano	887.50 BDEC	0.00	887.50
Rayado Rojo	851.60 BDEC	302.39	1400.74
Negro Productor	723.50 DEC	484.38	962.70
Canario	528.40 DE	218.75	837.98
Negro Chapingo	451.80 E	407.03	496.49

* Medias con la misma letra, por columnas, no son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey ($p=0.05$)

Cuadro 5 A. asignación de valores 1-14 de acuerdo al grado de severidad por enfermedad en cada genotipo

Genotipo	Valor asignado por enfermedad								TOTAL
	AF	AV	TC	TH	PxR	MB	MR	RY	
Pinto Saltillo	9	12	14	12	10	6	12	13	88
Flor de mayo 67	8	11	13	11	9	12	13	8	85
Negro Chapingo	13	13	9	14	8	3	2	6	68
Flor de Mayo 202	10	8	4	10	5	11	11	4	63
Peruano	14	14	1	1	12	X	X	X	42
Pinto Durango	7	10	3	4	7	10	5	12	58
Elite	5	3	11	8	1	13	6	11	58
Flor de Mayo Anita	11	7	10	5	3	8	9	5	58
Blanco Tabasco	12	9	8	9	6	1	3	9	57
Canario	2	4	12	13	13	2	4	2	52
Rayado Rojo	6	6	5	2	14	5	7	1	46
Flor de Mayo 199	3	5	6	3	4	7	8	7	43
Negro Productor	1	1	2	6	11	9	1	10	41
Cacahuate Bola	4	2	7	7	2	4	10	3	39

X= no se estableció durante el cultivo; AF= antracnosis en follaje, AV= antracnosis en vaina, TC= tizón común, TH= tizón de halo, PxR= pudrición radical, MB= mancha blanca, MR= mancha redonda, RY= roya.

Cuadro 6 A. valores y absorbancias obtenidos de ácidos nucleicos (ARN- ADNc) en las diferentes repeticiones.

Muestreo	Repetición	Negro Productor				Negro Chapingo			
		ARN		ADNc		ARN		ADNc	
		ng μl^{-1}	Pureza 260/280						
1	R1	3,212.13	1.94	1,389.17	1.59	3,663.18	1.79	1,417.49	1.61
	R2	2,651.98	2.04	1,500.34	1.59	2,478.56	1.88	1,151.10	1.60
	R3	3,379.56	1.91	1,253.57	1.59	3,393.49	2.04	1,213.79	1.59
	R4	1,933.44	2.11	1,278.54	1.59	2,370.71	1.85	1,340.37	1.53
	R5	2,915.61	2.02	1,122.27	1.58	3,481.36	2.00	1,213.79	1.55
2	R1	3,729.56	1.66	367.33	1.60	3,566.72	1.78	244.77	1.80
	R2	4,026.89	1.44	374.50	1.20	3,930.88	1.31	248.96	1.30
	R3	4,108.24	1.20	340.62	1.16	3,923.59	1.26	249.79	1.80
	R4	3,955.63	1.58	349.33	1.18	3,939.95	1.39	261.45	2.10
	R5	3,195.98	1.94	1,288.83	1.65	3,935.91	1.28	255.63	1.70
3	R1	3,607.17	1.78	1,141.76	1.62	3,803.24	1.63	1,138.42	1.70
	R2	3,399.61	1.88	1,058.03	1.63	3,809.94	1.62	1,418.21	1.76
	R3	3,165.18	1.93	1,085.62	1.69	3,909.13	1.42	1,748.44	1.81
	R4	3,106.73	1.94	981.65	1.69	3,970.31	1.40	1,198.80	1.70
	R5	3,489.12	1.82	1,147.53	1.66	3,943.17	1.39	388.94	1.27