

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL TIZÓN COMÚN BACTERIANO
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): CARACTERÍSTICAS,
PATOGENICIDAD Y CONTROL

APERTURA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA INDUCIDA EN PLANTAS DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) POR EL “TIZÓN COMÚN BACTERIANO” E
INDUCTORES DE RESISTENCIA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
INDUCIDA POR *Trichoderma asperellum* y *Bacillus pumilus*

Y

PERFIL METABOLÓMICO DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN
RESPUESTA A LOS INDUCTORES QUÍMICOS Y MICROBIANOS

Artículos

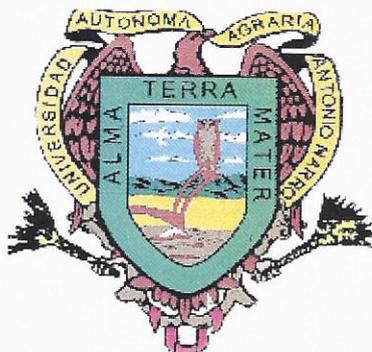
Que presenta NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL TIZÓN COMÚN BACTERIANO
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): CARACTERÍSTICAS,
PATOGENICIDAD Y CONTROL

APERTURA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA INDUCIDA EN PLANTAS DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) POR EL “TIZÓN COMÚN BACTERIANO” E
INDUCTORES DE RESISTENCIA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
INDUCIDA POR *Trichoderma asperellum* y *Bacillus pumilus*

Y
PERFIL METABOLÓMICO DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN
RESPUESTA A LOS INDUCTORES QUÍMICOS Y MICROBIANOS

Artículos

Que presenta NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA


Dr. Gabriel Gallegos Morales

UAAAN

Saltillo, Coahuila


Dr. Raúl Rodríguez Herrera

UA de C

Diciembre 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL TIZÓN COMÚN BACTERIANO
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): CARACTERÍSTICAS,
PATOGENICIDAD Y CONTROL

APERTURA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA INDUCIDA EN PLANTAS DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) POR EL “TIZÓN COMÚN BACTERIANO” E
INDUCTORES DE RESISTENCIA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
INDUCIDA POR *Trichoderma asperellum* y *Bacillus pumilus*

Y

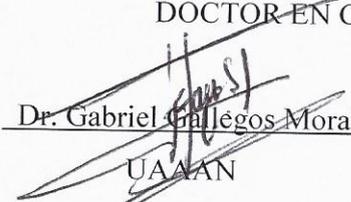
PERFIL METABOLÓMICO DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN
RESPUESTA A LOS INDUCTORES QUÍMICOS Y MICROBIANOS

Artículos

Que presenta NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA


Dr. Gabriel Gallegos Morales

UAAN

Saltillo, Coahuila


Dr. Francisco Castillo Reyes

INIFAP

Diciembre 2015

ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL TIZÓN COMÚN BACTERIANO
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): CARACTERÍSTICAS,
PATOGENICIDAD Y CONTROL

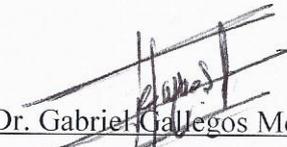
APERTURA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA INDUCIDA EN PLANTAS DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) POR EL “TIZÓN COMÚN BACTERIANO” E
INDUCTORES DE RESISTENCIA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
INDUCIDA POR *Trichoderma asperellum* y *Bacillus pumilus*

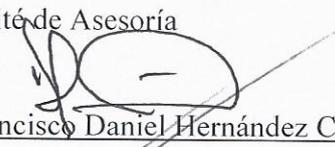
Y
PERFIL METABOLÓMICO DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN
RESPUESTA A LOS INDUCTORES QUÍMICOS Y MICROBIANOS

Artículos

Elaborado por NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría


Dr. Gabriel Callegos Morales

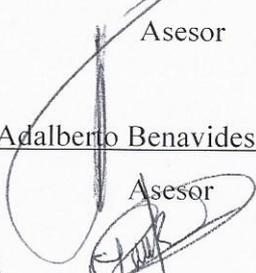
Asesor Principal


Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor


Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Asesor


Dr. Adalberto Benavides Mendoza

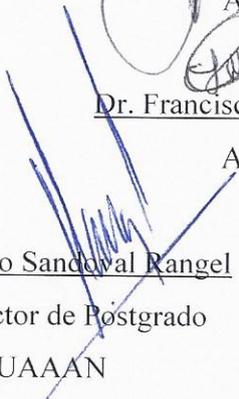
Asesor


Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor


Dr. Francisco Castillo Reyes

Asesor


Dr. Alberto Sandoval Rangel

Subdirector de Postgrado

UAAAN

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2015

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser mi casa de estudios por muchos años y porque hoy me da identidad para siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por sus pagos puntuales y por apoyarme en la realización de mi estancia en el CINVESTAV. Muchos días de estos.

Al Departamento de Parasitología Agrícola por haberme dado la oportunidad de adentrarme en el vasto mundo de la Parasitología Agrícola y por ser un complemento muy importante para mi formación profesional.

A mis asesores:

Dr. Gabriel Gallegos Morales, por su paciencia y consejos acertados, y por haber confiado en mí. Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo** y **Dra. Yisa María Ochoa Fuentes** por sus enseñanzas, asesorías y consejos inteligentes. Al **Dr. Adalberto Benavides Mendoza** por sus sabias recomendaciones y orientación. Al **Dr. Raúl Rodríguez Herrera** y **Dr. Francisco Castillo** por haber colaborado valiosamente en la revisión de mis artículos y la tesis, y por sus valiosas sugerencias.

Al personal del Laboratorio de Fisiología de la Defensa Vegetal en el CINVESTAV unidad Irapuato, en especial al **Dr. John Délano Frier** y **cDR. Julio Massange Sánchez** por su apoyo en la realización de los estudios metabolomicos.

A mis **compañeros** de las diferentes asignaturas, en verdad fue un gusto conocerlos.

Dedicatoria

A MIS PADRES

Sr. Gregorio Francisco Francisco y Sra. Guadalupe Francisco Vega. Porque fueron los pilares que me impulsaron para emprender el viaje que me trajo aquí. Aunque no estuvieron conmigo físicamente durante mi trayecto académico, siempre estuvieron moralmente acompañándome.

Especialmente a mi esposa la **Ing. Teresita Juárez Delgado**, por su apoyo incondicional y por confiar siempre en mí y por soportarme. Mis triunfos, son tuyos también. A mi hijo **Oswaldo Francisco Juárez**, de quien espero ser siempre un ejemplo. Ustedes son el motor de mis emprendimientos.

A mis hermanos Celerina y Moises, por apoyarme en mi decisión de salir adelante y por ser mis compañeros desde pequeños, cuanto daría porque volvieramos a ser niños.

A mis sobrinos, Esmeralda y Fabían a quienes quiero y extraño mucho, espero que también lleguen a sentir la pasión del maravilloso mundo de la ciencia.

A Dios, por mantenerme en el buen camino y por cuidar a mis seres queridos.

Gracias por tanto.

Artículo publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología. Volúmen 31, Número 2, 2013.

Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control
Fundamental aspect of Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Characteristic, Pathogenicity and Control

¹Nazario Francisco-Francisco, ¹Gabriel Gallegos-Morales*, ¹Yisa María Ochoa-Fuentes, Francisco D. Hernández-Castillo, ²Adalberto Benavides-Mendoza, ³Francisco Castillo-Reyes.

¹Departamento de Parasitología y ²Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México; ³Campo Experimental Saltillo, INIFAP, carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119. Num. 9515, Colonia Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. * Autor para correspondencia: ggalmor@uaaan.mx

Resumen. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Smith) es la bacteria que ocasiona el tizón común bacteriano del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) síntoma que se caracteriza por la aparición de manchas con aspecto de tizón con un halo amarillo en hojas, tallos, y frutos reduciendo así el rendimiento del cultivo. La taxonomía de este patógeno ha sido muy cambiante debido a su variabilidad genética. La semilla infectada es la forma más eficiente de dispersión de la enfermedad entre las áreas cultivadas, el éxito de la infección y la multiplicación bacteriana en el tejido hospedero frecuentemente depende de factores de virulencia y del sistema de secreción. Los métodos de manejo que se emplean para contrarrestar la enfermedad en campo no han sido efectivos, no obstante, la constante búsqueda de nuevos enfoques como el empleo de agentes de biocontrol e inductores de resistencia, abren nuevas expectativas para su control.

Palabras clave adicionales: Diagnóstico bacteriano, factores de virulencia, control biológico.

Abstract. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) (Smith) is the bacterium that causes common bacterial blight in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) characterized by irregular necrotic staining with yellow halo on leaves, stems, and fruits with crop yield reduction. The taxonomy of this pathogen has been changing due their genetic variability. Infected seeds are one of the most efficient forms of disease dispersal between cultivated areas, the infection and bacterial multiplication in the host tissue often depend on the virulence factors and their secretion system. Management methods that are used to counter the disease in the field have not been effective, however, the constant search for new approaches as the use of biocontrol agents and resistance inducers, open new prospects for control.

Additional keywords: Diagnosis of bacterial, virulence factors, biological control.

El género *Xanthomonas* comprende un grupo de bacterias fitopatógenas Gram negativas dentro de la clase III Gammaproteobacteria (Saddler y Bradbury, 2005). Sus especies son típicamente de forma de bacilo con un solo flagelo polar, son aerobios obligados y requieren una temperatura óptima para su crecimiento de 28°C (Torres *et al.*, 2009). Las colonias bacterianas crecidas en medio artificial son usualmente amarillas debido a la presencia de pigmento en las membranas conocido como xanthomonadina, el cual las protege del daño oxidativo (He *et al.*, 2011). Dentro de este género, la especie *X. axonopodis* afecta a un amplio rango de hospedantes, encontrándose especies cultivadas de importancia económica (Hayward, 1993), entre ellos el frijol (*Phaseolus vulgaris*) ocasionando la enfermedad del tizón común bacteriano causado por el patovar *phaseoli*.

Esta enfermedad, aún con las afectaciones que provoca en los campos de cultivo, como la reducción en el rendimiento de hasta un 47%, no se encuentra en status cuarentenado. En México se ubica dentro de los primeros cuatro problemas fitosanitarios que afectan al cultivo, principalmente en las áreas productoras del Altiplano (López, 1991).

Los síntomas del tizón común bacteriano son manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por un delgado halo amarillo. Estas manchas pueden desarrollarse en el borde o en diferentes áreas de las hojas. Las pérdidas en el rendimiento son aún mayores bajo condiciones de clima tropical, como en Etiopía en donde se reporta que por cada porcentaje de severidad del tizón común bacteriano se registraron pérdidas de

aproximadamente 3.9 a 14.5 kg/ha de semilla (Tadele, 2006). En las vainas y semillas ocasiona manchas rojizas irregulares con presencia de exudados amarillos cuando la humedad relativa es alta. También pueden afectar las semillas, las cuales se tornan arrugadas, o pueden permanecer asintomáticas y manifestarse en las plantas desarrolladas (Saettler, 1989).

Actualmente, la enfermedad es controlada por la aplicación de algunos métodos como los tratamientos químicos, el manejo cultural del cultivo, el control biológico, y el uso de variedades resistentes, principalmente. Diversos estudios sobre el patovar *phaseoli* como: la sobrevivencia epifítica, diversidad genética, genes de virulencia y patogenicidad, entre otros (Mahuku *et al.*, 2006; Prudencio-Sains *et al.*, 2008; Jacques *et al.*, 2005), resultaron en la propuesta de diferentes alternativas de control del patógeno, tal como el empleo de variedades resistentes (Liu *et al.*, 2009), y más recientemente la inducción de resistencia sistémica mediante microorganismos benéficos (Osdaghi *et al.*, 2011).

El propósito del presente escrito es revisar aspectos fundamentales del patógeno, los mecanismos de dispersión del inóculo, sus efectos fisiológicos sobre las plantas, y el manejo de la enfermedad que se emplea actualmente. Todo esto con la finalidad de contribuir al entendimiento del comportamiento del agente causal del tizón común bacteriano.

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Hasta 1984 el género *Xanthomonas* comprendía seis especies entre las cuales la especie *X. axonopodis* no figuraba como tal. El agente causal del tizón común bacteriano era conocido como *X. campestris* pv. *phaseoli* (Bradbury *et al.*, 1984). No fue hasta 1995 cuando se propone la reclasificación del género por Vauterin *et al.*, (1995). Actualmente, el manual de bacteriología sistemática de Bergey's (Saddler y Bradbury, 2005) ubica a este agente de la siguiente manera:

División: Bacteria.

Phylum XIV: Proteobacteria.

Clase III: Gammaproteobacteria.

Orden III: Xanthomonadales.

Familia I: Xanthomonadaceae.

Sin embargo, debido a varias reclasificaciones taxonómicas, la nomenclatura actual de las 19 especies y 140 patovares que conforman el género *Xanthomonas* está aún sujeta a debate según Rademaker *et al.* (2005).

Existen dos variantes de este agente reconocido en la reclasificación por Vauterin *et al.*, (1995), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *Fuscans*. Este último agente se ha reclasificado como una nueva especie, mediante el uso de enzimas de restricción (El-sharkawy y Huisingh, 1971), perfil de plasmidos (Lazo y Gabriel, 1987) e hibridización de DNA, asignándose como *X. fuscans* subs. *fuscans* (Xff) (Schaad *et al.*, 2005).

El tamaño promedio del genoma de Xap es de 3850.6±48.9 y 3584.3±68.1 kb para Xff, la confirmación de la diferencia genética de los dos agentes fue corroborada mediante la electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE, del inglés pulse-field gel electrophoresis) y por el polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés restriction fragment length polymorphism) con la enzima de restricción *XbaI* (Chan y Goodwin, 1999b). Un mapa físico del cromosoma BXP65 de Xff se ha construido por PFGE e hibridación Southern (Chan y Goodwin, 1999a) lo cual ha permitido una mejor comprensión de la taxonomía y virulencia de este fitopatógeno.

Estudios previos demostraron que las cepas de Xap y Xff eran genéticamente diferentes y que podrían ser agrupados dentro de cuatro linajes distintos, tres correspondientes a Xap y el restante a Xff. Las cepas de Xap mostraron ser más heterogéneas que los de Xff (Alavi *et al.*, 2008).

X. axonopodis pv. *phaseoli* crece en medios de cultivo artificiales como TB y KB con morfología colonial de color amarillo mucoide no fluorescente (Abd-Alla y Bashandy, 2010). Xff en medio YDCA produce un pigmento café difusible. No producen endosporas, son motiles con flagelación polar y son considerados aerobios obligado presentando metabolismo oxidativo (Saddler y Bradbury, 2005).

Ambos agentes presentan diferencias en los requerimientos nutricionales. Así por ejemplo, pueden utilizar manitol, maltosa y trealosa como fuente de carbono (Cuadro 1) (Abd-Alla y Bashandy, 2010). Inducen una reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, son negativas en la pudrición de papa, no se desarrollan en presencia de cloruro de sodio al 2.5%, e hidrolizan gelatina (Osdaghi 2010). Una característica particular del agente Xff es la hidrólisis de almidón, lo cual se manifiesta por un área translúcida que rodean a las colonias en un medio conteniendo dicho compuesto y es visible aún sin la revelación con lugol (Jacques *et al.*, 2005).

Técnicas de diagnóstico

Estas van desde el uso de pruebas para detección en semillas con o sin síntomas (Karavina *et al.*, 2008), uso de bacteriófagos (Kahveci y Maden, 1994), medios de cultivo selectivos (Sheppard *et al.*, 2007), pruebas serológicas como la inmunofluorescencia y el ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés enzyme-linked immunosorbent assay) (Wong, 1991), PCR (Audy *et al.*, 1994), e hibridaciones con PCR y RFLP (Zamani *et al.*, 2011).

También se han desarrollado varios medios de cultivo semiselectivos como el MT (Goszczyńska y Serfontein, 1998), XCP1 (Popović *et al.*, 2009) y más recientemente el PTSA (Denardin y Agostini, 2013), el cual provee mejor desarrollo y conteo de las colonias bacterianas. No obstante, el medio de cultivo semiselectivo más empleado es el MXP el cual contiene almidón de papa, dado que sobre este mismo medio pueden utilizarse varios antibióticos y otros químicos, tales como cristal violeta, el cual limita el crecimiento de bacterias Gram-positivas, cefalexina, que inhiben el crecimiento de

enterobacterias, y kasugamicina antibiótico que limita el crecimiento de las *Pseudomonas* (Jacques *et al.*, 2005).

Las técnicas de rutina para probar lotes de semilla libres de la bacteria emplean pruebas serológicas como la inmunofluorescencia por tinción de células y también la técnica ELISA. El inconveniente de las pruebas serológicas es que ninguna discrimina entre células viables y no viables y la especificidad de las reacciones es muy dependiente de la calidad de los anticuerpos.

Para la detección e identificación de esta bacteria, también se han descrito algunas técnicas de amplificación por PCR. En general, los ensayos de PCR son rápidos y muy específicos, pero la cuantificación es difícil y la amplificación es propensa a la inhibición por contaminantes presentes en las muestras de semillas. La citometría de flujo (FCM) es una técnica que permite de manera rápida el análisis multiparamétrico y la cuantificación de partículas, tales como las células bacterianas. El análisis se basa en el tamaño y granulometría, y puede emplear la emisión de luz fluorescente, después de teñir con un tinte fluorescente (Tebaldi *et al.*, 2010).

DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

X. axonopodis pv. *phaseoli* se encuentra presente en gran parte del mundo. Su distribución esta parcialmente asociada con su habilidad para infectar las semillas de ambos genotipos resistentes y susceptibles. Así por ejemplo, en Serbia 20 de 23 cultivares de frijol comercialmente sembrados son susceptibles (Popović *et al.*, 2009). En Irán la enfermedad se observó por primera vez en el verano de 1998, los estudios realizados en los siguientes años mostraron que la enfermedad aumentó en las regiones del cultivo en la provincia de Markazi donde se detectó que las pérdidas en campos equipados con sistema de riego por aspersión se incrementaron la enfermedad (Lak *et al.*, 2002).

En el continente Africano se registró su presencia principalmente en Sudáfrica, donde se detectó en 682 campos de producción de semilla (Fourie, 2002), en Uganda se registró hasta un 40% en la pérdida de rendimiento en los cultivos de frijol (Saettler, 1989), Egipto reportó que en granos almacenados por largos períodos de tiempo 5 muestras de cada 7 resultaron contaminadas con la bacteria (Abd-Alla y Bashandy, 2010). Las semillas provenientes de Zimbawe analizadas mediante dos métodos de

detección arrojaron que, ambas, semillas guardadas por largo tiempo así como las semillas certificadas estaban contaminadas con este agente, siendo las semillas con mayor tiempo de almacenamiento las que presentaron mayor nivel de población bacteriana (Karavina *et al.*, 2008).

En el continente Americano también se tienen registros. En Ontario, Canadá, Wallen y Jackson (1975) reportaron una pérdida en rendimiento del 38%. En los Estados Unidos, los problemas con esta bacteria se registran en regiones productoras de frijol como lo son Colorado, Nebraska, y Wyoming en donde la enfermedad volvió a surgir después de una ausencia de más de 30 años (Harveson y Schwartz, 2007). En Brasil se encuentra diseminada en todas las regiones productoras de frijol, no obstante los mayores daños se reportaron en los estados de Paraná, Rio de Janeiro, Sao Paulo y en la región central de Brasil (Pereira-Torres *et al.*, 2009). En México la enfermedad del tizón común bacteriano se registra desde 1991, y representa una de las enfermedades más frecuentes en los campos de cultivo del frijol (Campos, 1991).

IMPORTANCIA ECONÓMICA

X. axonopodis pv. *phaseoli* (Xap) es una bacteria que ataca al cultivo de frijol (*P. vulgaris*) en todo el mundo, no obstante también ataca a cultivos como *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray., *Vigna aconitifolia* L., *V. unguiculata* L., *V. radiata* L., *Lablab purpureus* L., *Mucuna deeringiana* (Bort.), *Lupinus polyphyllus* (Lindl.), *Chenopodium álbum* L., *Amaranthus retroflexus* L., y *Echinochloa crus-galli* L., (de O. Carvalho *et al.*, 2011; Gent *et al.*, 2005). En el cultivo del frijol la subespecie *fuscans* puede sobrevivir en forma endófito y epífita en los residuos de la cosecha así como en las semillas, puede transmitirse por los conductos vasculares hasta afectar los brotes de las plantas (Jacques *et al.*, 2005).

La entrada de la bacteria a las plantas es a través de estomas e hidátodos. En las superficies foliares, sobrevive en espacios protegidos del ambiente como en los estomas, la parte basal de los tricomas y en los desniveles de las nervaduras formando una biopelícula de protección (Jacques *et al.*, 2005). Es una bacteria que comparte características similares con otras especies del mismo género, como el Sistema de Secreción Tipo III, el cual es un sistema de transporte que permite a la bacteria introducir proteínas a la célula hospedero (Hajri *et al.*, 2009).

El patovar *phaseoli* es un agente de importancia económica por diversas razones. La más sobresaliente es debido a que ataca a uno de los cultivos de mayor consumo en el mundo, el frijol (*P. vulgaris*). Esta leguminosa forma parte de la dieta alimentaria humana y es una fuente rica en carbohidratos (fibra, almidón, y oligosacáridos), proteína vegetal, vitaminas y minerales como ácido fólico y hierro, así como antioxidantes y muy poca cantidad de grasa (Mederos 2013).

En el mundo, en 2006, la industria del frijol fue valuada en 180 y 1,200 millones de dólares en Canadá y los Estados Unidos respectivamente (<http://www.pulsecanada.com/>, consultada el 18 de Septiembre de 2013). En países como Brasil y México donde la actividad agrícola es una importante fuente de trabajo y de divisas por la exportación del producto se ve severamente perjudicada por la afectación de amplias extensiones de cultivo por esta bacteria. Tan solo en 2012, en México se sembró 1, 700, 513 ha (Fuente: SAGARPA, 2012).

La bacteria Xap no solo ataca al frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de campo, sino también especies emparentadas como: *P. lunatus* L., *Vigna aconitifolia* L. y *V. radiata* L.. *Lablab purpureus* L. y *Mucuna deeringiana* (Bort.). considerados como posibles hospederos naturales. *Phaseolus coccineus* L., *P. acutifolius* Gray. y *Lupinus polyphyllus* (Lindl.). son hospederos por inoculación artificial (Bradbury, 1986). También ataca en invernadero a especies como *Vigna unguiculata* L. (de O. Carvalho *et al.*, 2011), *Chenopodium álbum* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Echinochloa crus galli* L., entre otras especies (Gent *et al.*, 2005).

Los efectos adversos de la enfermedad son observados tanto en regiones tropicales como en subtropicales. Las semillas contaminadas internamente o incluso externamente constituye la fuente primaria del inoculo. Se calcula que una concentración del inoculo de 1×10^3 ufc/ml es suficiente para causar la enfermedad (Darrasse *et al.*, 2007). El tizón común bacteriano ha sido una de las enfermedades que han conducido a grandes pérdidas en el cultivo de frijol a escala industrial en la producción de semillas en varias partes del mundo, como en Irán (Lak *et al.*, 2002), y Sudáfrica (Fourie, 2002) donde representa la principal limitante para su exportación.

En Etiopia se reporta que por cada porcentaje de aumento de la severidad del tizón común bacteriano hay una pérdida de aproximadamente 3.9 a 14.5 kg/ha de semilla

(Tadele, 2006). La exportación de semillas se ve afectada debido a la disminución de la calidad por la coloración café, principalmente en el frijol blanco, para la industria alimenticia (Yu *et al.*, 2000), pero también existe un alto riesgo de propagación de la bacteria en semillas que no manifiestan síntomas visibles debido a una baja densidad de población bacteriana en la semilla o que son inferiores a los niveles de detección técnica (Osdaghi *et al.*, 2010). Finalmente, el intento de control de la enfermedad propicia el aumento en los costos de producción.

MECANISMOS DE DISPERSIÓN Y EFECTOS FISIOLÓGICOS

X. axonopodis pv. *phaseoli* se disemina principalmente a través de la semilla. La concentración mínima requerida para que la contaminación sea exitosa debe ser superior a 1×10^3 ufc/ml, una vez dentro de esta constituye un vehículo que la mantiene por largos periodos de manera asintomática hasta el crecimiento de la nueva planta (Darrasse *et al.*, 2007). Dentro de la semilla la bacteria puede sobrevivir mediante la formación de una película o biofilm que la protege de las condiciones ambientales desfavorables. También puede sobrevivir en restos vegetales y en el suelo, durante el golpeteo de las gotas de lluvia puede ser llevado a las partes aéreas de las plantas y entrar a través de aberturas naturales o heridas (Jacques *et al.*, 2005).

Una peculiaridad de esta especie es que puede colonizar otras especies vegetales como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) o el amaranto (*Amaranthus sp.* L.) bajo condiciones de alta humedad y temperatura. Con temperaturas frescas y lluvias escasas el patógeno sobrevive de 65 a 180 días en las plántulas sobre la superficie del suelo, y de 30 a 120 días una vez incorporadas al suelo (Torres *et al.*, 2009). En estas especies vegetales sin embargo, se ha observado que las poblaciones son menores comparativamente a las encontradas en las plantas de frijol y la sobrevivencia epifítica de este agente es menor (Gent *et al.*, 2005).

El tizón común bacteriano ocurre frecuentemente en climas templados y tropicales. Una característica importante para el desarrollo de la enfermedad son los factores de virulencia y en las especies de *Xanthomonas* se han reconocido varios, entre ellos las estructuras de la superficie bacteriana, principalmente los polisacáridos extracelulares como el xantano. Este polisacárido causa el marchitamiento en las plantas por la obstrucción del flujo hídrico en los vasos del xilema. La evidencia experimental

sugiere que el xantano también suprime las respuestas de defensa vegetal tal como la deposición de callosa en la pared celular vegetal, presumiblemente por la quelación de iones de calcio divalente que están presentes en los espacios extracelulares de la célula vegetal (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). Otro factor de virulencia son los lipopolisacáridos, los cuales son los mayores componentes de la membrana externa bacteriana que las protege de las condiciones ambientales (Boher *et al.*, 1997).

Los mecanismos de patogenicidad que las especies de *Xanthomonas* emplean presentan cierta similitud (Buttner y Bonas, 2010). De manera general, la bacteria ocasiona disminución de la fotosíntesis, por la interferencia de xantano en el intercambio de las triosas fosfato/fosfato en la membrana de los cloroplastos (Jiao *et al.*, 1999). Fisiológicamente, esta bacteria induce cambios en la fuente de energía o produce un desacoplamiento en la bomba de protones en el plasmalema, esto ocasiona la disminución en la fotosíntesis (Novacky, 1982). No obstante, existen diferencias en la agresividad entre los agentes Xap y Xff, esta última resulta ser más agresiva (Mutlu, 2008).

Estos agentes subsisten dentro de las lagunas de protoxilema en una matriz de sustancia amorfa, una combinación de los materiales de la pared celular disueltos y los exopolisacáridos de la bacteria; posiblemente por la reducción en la síntesis de sacarosa que ocasiona la presencia del xantano (Jiao *et al.*, 1996). La matriz amorfa es el compuesto que va llenando los espacios intercelulares del mesófilo durante la colonización del tejido foliar (Boher *et al.*, 1997). En plantas de caupi (*Vigna unguiculata* L.), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* provoca que los cloroplastos del mesófilo presenten cambios morfológicos, volviéndolos más esféricos. En algunos casos se observa una desorganización de la membrana y la acumulación de granos de almidón y de cloroplastos (de O. Carvalho *et al.*, 2011).

La progresión de enfermedad ocasiona que la matriz amorfa se propague hacia el interior de las células parenquimatosas adyacentes al xilema, después de haber disuelto las paredes de las células del parénquima, y así pasan al interior del xilema. Si la entrada de la bacteria es a través del tejido vascular, ésta pasa del xilema hacia las células vecinas o bandas vasculares a través de la penetración de los espacios intercelulares desarrollados por la disolución de las paredes celulares entre las células del mesófilo

foliar (de O. Carvalho *et al.*, 2011). No obstante, la bacteria también puede entrar a través de las semillas.

MÉTODOS DE CONTROL

Algunos métodos de control que se usan actualmente para el manejo del tizón común bacteriano dan resultados escasos o medianamente efectivos debido a la naturaleza de la infección o al desconocimiento de su uso. Entre estos resaltan el control químico, cultural, biológico, y mejoramiento genético principalmente.

Control químico

No existen reportes de control químico eficaces para esta enfermedad. No obstante, se han empleado diversos fungicidas como mezclas de Bordeaux, el oxiclورو de cobre, el sulfato de cobre, los cuales son aplicados antes de la aparición de los síntomas, así como también antibióticos como la estreptomina (Saettler, 1989). Los altos costos, residuos químicos potenciales y la resistencia entre las cepas de *Xap* son los efectos adversos del uso de estas aplicaciones químicas. Las aplicaciones de fertilizantes foliares ha dado buenos resultados, por ejemplo, la aplicación de manganeso redujo la severidad de la enfermedad hasta en un 49% en plantas de frijol bajo invernadero (Viecelli y Moerschbacher, 2013).

Debido a que la semilla es el principal vehículo de propagación de la bacteria, se han utilizado químicos como tolilfluanida (1,1-dicloro-N-[(dimetilamino)-sulfonil]-1-fluoro-N-(4-metilfenil) metanosulfonamida) el cual ha mostrado reducir la transmisión de la bacteria de la semilla a la planta comparado a semillas no tratadas en experimentos de laboratorio e invernadero (Lopes *et al.*, 2008). El uso de antibióticos para el tratamiento de semillas por inmersión en polietilenglicol al 25% o glicerol 60% da buenos resultados, no disminuye la germinación, aunque sí reduce ligeramente el vigor de las plantas (Liang *et al.*, 1992).

Antibióticos como la Tetraciclina y Clorotetraciclina en soluciones de polietilenglicol, reducen con mayor efectividad la población de *Xap*, pero suelen ser fitotóxicos. En cambio, las soluciones de polietilenglicol con Estreptomina reducen pero no erradican las poblaciones internas de la bacteria en semillas contaminadas naturalmente y causan pocos efectos fitotóxicos (Liang *et al.*, 1992). El tratamiento con el antibiótico Estreptomina a razón de 100 µg/ml más el fungicida Captan al 0.2%, o

simplemente en agua caliente (52°C por 10 minutos) seguido por la adición de Estreptomina (100 µg/ml) erradican la bacteria de semillas infectadas naturalmente y reducen el número de plántulas infectadas desde un 80% al 5% en lotes de semilla inoculados (Jindal 1991).

Control cultural

Con frecuencia se alude que el empleo de semillas libres de enfermedades es la adecuada para el control de esta enfermedad. No obstante, aún con el empleo de semilla no contaminada es posible la aparición de síntomas, debido principalmente a que con la presencia de una semilla contaminada por cada 20,000 es suficiente para la transmisión del inoculo al campo de cultivo (Darrasse *et al.*, 2007). La rotación de cultivares puede ser clave en el control de la enfermedad, no obstante, se ha observado que plantas resistentes en zonas templadas son susceptibles bajo otras condiciones como en las zonas tropicales (Gent *et al.*, 2005).

Por otra parte, se recomienda que en la rotación de cultivos se evite en lo posible el esquema frijol-cebolla, dado que la cebolla puede proveer una fuente de inóculo por la colonización epífita asintomática (Gent *et al.*, 2005). Asimismo, se debe tener en cuenta que el uso del sistema de riego por aspersión favorece la dispersión de la bacteria en comparación con otros sistemas de riego (Akhavan *et al.*, 2013). Una práctica recomendada es la eliminación de malezas susceptibles y de otras plantas hospederas de los alrededores del cultivo (Ovies y Larrinaga, 1988). El manejo de las fechas de siembra que eviten las condiciones óptimas de desarrollo de la enfermedad también son recomendados.

Control biológico

Dentro de este apartado destaca el empleo de microorganismos benéficos principalmente bacterianos, ya sea para la antibiosis o por la inducción de resistencia sistémica. Se ha observado por ejemplo, que algunos aislados bacterianos de *Pseudomonas sp.*, *Bacillus cereus*, y *Rhodococcus fascians* que son compatibles con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, presentan actividad protectora contra la enfermedad del Tizón Común Bacteriano; el efecto es atribuido a una protección sistémica al ser comprobado que las plantas provenientes de semillas microbiolizadas eran capaces de generar callosidad (Zanatta *et al.*, 2007).

En estudios de confrontación se ha observado que algunas cepas de *Paenibacillus polymixa* producen metabolitos de naturaleza peptídica que inhiben el crecimiento de *X. campestris* pv. *phaseoli* in vitro después de 12 horas de incubación, también reducen la incidencia de la enfermedad in vivo de hasta un 28 (Mageshwaran *et al.*, 2011; Mageshwaran *et al.*, 2012). De igual manera, algunas cepas de *Pseudomonas sp.* y *Rahnella aquatilis* han mostrado controlar eficientemente hasta en un 39% esta enfermedad al ser aplicados desde las semillas, principalmente por la formación de compuestos fenólicos y la alta actividad peroxidasa (da Silva *et al.*, 2008; Sallam, 2011).

El mecanismo por el cual la microbiolización de las semillas produce este resultado no se encuentra totalmente entendido, no obstante, las evidencias apuntan a que estos compuestos provocan alteraciones metabólicas en las plantas, principalmente por el aumento en el contenido de proteínas solubles totales y la actividad polifenol oxidasa (Silva *et al.*, 2009). Otros microorganismos como *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* se han evaluado por su capacidad para activar la resistencia de cultivares de frijol común lográndose obtener semillas de mayor peso en el campo (Osdaghi *et al.*, 2011).

También se han utilizado compuestos con actividad inductora como el Bion y BioZell-2000[®], los cuales no muestran tener efecto inhibitorio sobre el patógeno cuando son aplicados directamente pero aplicados a las plantas suprimen la aparición de la enfermedad del tizón común bacteriano hasta en un 68% y 50% y con ello una disminución de la población bacteriana del 50% y 45% respectivamente (Abo-Elyousr, 2006). Sustancias como el acibenzolar-S-methyl se han probado como inductores de resistencia ante esta bacteria en los campos de cultivo, aunque en invernadero el producto no resulta ser eficiente (Soares *et al.*, 2004).

Control por mejoramiento genético

El mejoramiento de las plantas de frijol ante este patógeno ha sido realizado mediante la identificación y aprovechamiento de Locus de Caracteres Cuantitativos distribuidos a través de todo el genoma, los cuales se expresan bajo la influencia del ambiente, presión de selección del patógeno, madurez y tejido de la planta (semilla, hoja o vaina) (Santos *et al.*, 2003). A partir de esto, se han desarrollado dos líneas promisorias con alto rendimiento y resistencia al estrés hídrico que manifiestan

características de resistencia al tizón común bacteriano como la línea TRAS-MST1, la cual proviene del cruce de 2 cultivares de frijol desarrollados en México (Porch *et al.*, 2012).

En la búsqueda de resistencia genética se ha hecho especial énfasis en los genes determinantes de la patogénesis de esta bacteria (Darsonval *et al.*, 2008). Por ejemplo, se han reconocido algunos efectores de este género con presunto papel en la supresión de defensas vegetales (Kay y Bonas, 2009). Hajri *et al.* (2009) identificaron dos clases de genes dentro de los repertorios T3E (efectores tipo III) (*avrBs2*, *xopN*, *xopF1*, *xopX*, *phA1*, *xopE2*, *avrXacE3* y *xopQ*). Los productos de estos genes pueden jugar distintos papeles en la patogenia de las cepas. Acorde a la patogenicidad, los genes del núcleo T3E podrían proveer funciones de virulencia de amplia utilidad y entonces etiquetar componentes ampliamente conservados entre un amplio rango de hospederos. La pérdida de estos repertorios T3E ubicuos podría conducir a la pérdida de competitividad para el patógeno (Hajri *et al.*, 2009).

La forma en que las plantas de frijol reconocen a estos posibles inductores no se ha elucidado completamente. Sin embargo, se reconoce la presencia de pequeñas secuencias de ARN conocidas como miRNA que median la expresión genética y participan en los eventos de señalización en la interacción parásito hospedero *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-*Manihot esculenta* (yuca). En esta interacción se ha encontrado la expresión diferencial de 56 familias miRNA en la planta de yuca (*Manihot esculenta* C.) en respuesta a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, algunas de las más importantes son la miR160, miR167, miR390, y miR393, los cuales afectan a los receptores de auxina y por lo tanto regulan la señalización de auxinas (Pérez-Quintero *et al.*, 2012).

Las fuentes de resistencia genética a este patógeno han sido identificados tanto en frijol como en especies relacionadas, *P. aculifolius* y *P. coccineus*, no obstante muchos de ellos también son heredados como locus de caracteres cuantitativos (QTL) y varían en sus niveles de efectos genéticos y sus expresiones están influenciados por las condiciones ambientales (Kelly *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2006). Finalmente, la audacia del agente causal del tizón común bacteriano ha superado todas estas barreras de control.

CONCLUSIONES

El Tizón Común Bacteriano se ha estudiado ampliamente y representa un problema frecuente en los campos de cultivo de frijol. No obstante, la variabilidad del patógeno y la diversidad de técnicas de identificación y diagnóstico sugieren seleccionar con cautela las más apropiadas para propósitos de estudio del patógeno. Por otro lado, el manejo de la enfermedad es dirigido hacia la implementación del uso de los genes de resistencia a través del mejoramiento varietal y la inducción de la resistencia vegetal mediante inductores bióticos o abióticos. Sin embargo, el mejor manejo estaría dado por el conocimiento del patógeno y la prevención del mismo mediante la integración de los diferentes métodos apropiados para su manejo y control.

LITERATURA CITADA

- Abd-Alla, M.H., and Bashandy, S.R. 2010. Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:291-292.
- Abo-Elyousr, K.A. 2006. Induction of systemic acquired resistance against common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Egyptian Journal of Phytopathology* 34:41-50.
- Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. 2008. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3295-3301.
- Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M.R., Nazemi, A., and Zamani, Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. *Springer Plus* 2:41.
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C., and Gilbertson, R.L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *x-c phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain-reaction. *Phytopathology* 84:1185-1192.
- Bradbury, J.F. 1984. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. p. 187. In: Krieg NR and Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. London, England 199-210.
- Bradbury, J.F. 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International Mycological Institute. London, England 332p.
- Boher, B., Nicole, M., Potin, M., and Geiger, J.P. 1997. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10: 803-811.
- Buttner, D., and Bonas, U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Review* 34:107-133.
- Campos, A.J. 1991. *Enfermedades del frijol*. Editorial Trillas. Primera edición. México 70 - 73.
- Chan, J., and Goodwin, P.H. 1999a. A physical map of the chromosome of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* BXPF65. *Fems Microbiology Letters* 180: 85-90.
- Chan, J., and Goodwin, P.H. 1999b. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. *European Journal of Plant Pathology* 105:867-878.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E., and Jacques, M.A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119:203-215.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C. and Jacques, M. 2008. The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in

- transmission to seeds of susceptible beans. *Applied and Environmental Microbiology* 2669-2678.
- da Silva, E.G., Moura, A.B., Deuner, C.C. y Farias, D.R. 2008. Estudio de mecanismos de biocontrol de crecimientos bacterianos del feijoeiro por bacterias. *Revista Ceres* 55:377-383.
- Denardin, N.D.Á., and Agostini, V.A. 2013. Detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant fuscans in common bean seeds. *Journal of Seed Science* 35:428-434.
- de O. Carvalho, A., Cunha, M.D., Rodríguez, R., Sudré, C.P., Santos, I.S., Fernández, K.V.S., Rabelo, G.R., and Gomes, V.M. 2011. Ultrastructural changes during early infection of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* leaves by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and an unexpected association between chloroplast and mitochondrion. *Acta Physiologia Plantarum* 33:2025-2033.
- El-Sharkawy, T.A., and Huisingh, D. 1971. Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Journal of General Microbiology* 68:155-2033.
- Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. *Journal of Phytopathology Phytopathologische Zeitschrift* 150:220-226.
- Gent, D.H., Lang, J.M., and Schwartz, H.F. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* 89:558-564.
- Goszczyńska, T., and Serfontein, J.J. 1998. Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods* 32:65-72.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., and Lemaire, C. 2009. A “repertoire for repertoire” hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* 4: e6632.
- Harveson, R.M., and Schwartz, H.F. 2007. Bacterial diseases of dry edible beans in the central high plains. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2007-0125-01-DG.
- Hayward, A.C. 1993. The hosts of *Xanthomonas*. p. 1-95. In: Swings J and Civerolo EL. *Xanthomonas*. Chapman and Hall, Ltd. London, England 1-119.
- Heitz, T., Segond, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Prasad, V., and Brunner, F. 1994. Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis related (PR) protein a new plant chitinase/lysozyme. *Mol. Gen. Genet* 245:246-254.
- He, Y.W., Wu, J.E., Zhou, L., Yang, F., He, Y.Q., Jiang, B.L., and Zhang, L.H. 2011. *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 948-957.
- Hildebrand, D.C., Palleroni, N.j., and Schroth, M.N. 1990. Deoxyribonucleic-acid relatedness of 24 *Xanthomonas* strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *Journal of Applied Bacteriology* 68: 263-269.
- <http://www.pulsecanada.com>. Consultada el 18 de Septiembre de 2013.

- Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied Environmental Microbiology* 71:2008-2015.
- Jiao, J., Grodzinski, B., and Goodwin, P. 1996. Photosynthesis and export during steady-state photosynthesis in bean leaves infected with the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Canadian Journal of Botany* 74:1-9.
- Jiao, J., Goodwin, P., and Grodzinski, B. 1999. Inhibition of photosynthesis and export in geranium grown at two CO₂ levels and infected with *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. *Plant Cell and Environmental* 22:15-25.
- Jindal, K.K. 1991. Physical and chemical agents for the eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from bean seeds. *Plant Disease Research* 6:68-71.
- Kahveci, E., and Maden, S. 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by bacteriophages. *Journal of Turkish Phytopathology* 23:79-85.
- Karavina, C., Chihya, J., and Tigere, T.A. 2008. Detection and characterization of *Xanthomonas phaseoli* (E. F. SM) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) seed collected in Zimbabwe. *Journal of Sustainable Development in Africa* 10:105-119.
- Kay, S., and Bonas, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol* 12:37-43.
- Kelly, J.D., Gepts, P., Miklas, P.N. and Coyne, D.P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res* 82:135-154.
- Lak, M.R., Shams-bakhsh, M., and Bahar, M. 2002. Identification of the bacterial agent of bean leaf and pod blight in Markazi province. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resource* 6:231-243.
- Lazo, G.R., and Gabriel, D.W. 1987. Conservation of plasmids DNA- sequences and pathovar identifications of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*.77:448-453.
- Liang, L.Z., Halloin, J.M., and Saettler, A.W. 1992. Use of polyethylene-glycol and glycerol as carriers of antibiotics for reduction of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean-seeds. *Plant Disease* 76:875-879.
- Liu, S., Yu, K., and Park, S.J. 2009. Marker-assisted breeding for resistance to common bacterial blight in common bean. In: *Plant Breeding*, Huttunen, N., and Sinisalo, T. (eds), pp. 211-226. Nova Scientific Publisher, New York, U.S.A.
- López, F. L. C. 1991. Definición de prioridades de investigación fitopatológica para la zona templada del Altiplano Central de México. *Agricultura Técnica Mexicana* 17:17-54.
- Lopes, L.P., Alves, P.F.R., Zandoná, C., Nunes, M.P., and Mehta, Y.R. 2008. A semi-selective medium to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds and its eradication through seed treatment with tolylfluanid. *Summa Phytopathologica* 34:287-288.
- Mageshwaran, V., Mondal, K.K., Kumar, U., and Annapurna, K. 2012. Role of antibiosis on suppression of bacterial common blight disease in French bean by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15. *African Journal of Biotechnology* 11:12389-12395.

- Mageshwaran, V., Walia, S., Govindasamy, V., and Annapurna, K. 2011. Antibacterial activity of metabolite produced by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15 against *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Indian Journal of Experimental Biology* 49: 229-233.
- Mahuku, G.S., Jara, C., Henriquez, M.A., Castellanos, G., and Cuasquer, J. 2006. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. *Journal of Phytopathology* 154:35-44.
- Mederos, Y. 2013. Revisión bibliográfica: indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas* 27:55-62.
- Mhedbi-Hajri, N., Jacques, M.A., and Koebnik, R. 2011. Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae. *Bacterial Adhesion* 71-89.
- Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.E., and Blair, M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica* 147:105-131.
- Mutlu, N. 2008. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subs. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. *Plant Disease* 92:546-554.
- Novacky, A. 1982. Relationship between membrane potential and ATP level in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* infected cotton cotyledons. *Physiological Plant Pathology* 21:237-249.
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., and Lak, M.R. 2010. Study on common bean seed lots for contamination with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by BIO-PCR technique. *Journal of Agricultural Technology* 6:503-513.
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., Reza-Lak, M., and Yhatami-Maleki, H. 2011. Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and decrease of common bacterial blight. *Phytopathology Mediterranean* 50:45-54.
- Ovies, J., and Larrinaga, L. 1988. Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* by a wild host. *Ciencia y Técnica en la Agricultura, Protección de Plantas* 11:23-30.
- Pereira-Torres, J., Fernández-da, Silva-Junior, T.A., y Maringoni, A.C. 2009. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathol* 35: 136-139.
- Pérez-Quintero, A.L., Quintero, A., Urrego, O., Vanegas, P., and López, C. 2012. Bioinformatic identification of cassava miRNAs differentially expressed in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *BMC Plant Biology* 12:29.
- Popović, T., Balaž, J., Gavrilović, V., and Aleksić, G. 2009. Distribution and characterization of phytopathogenic bacteria on commercial bean crop in Vojvodina [Serbia]. *Plant Protection* 60:101-125.
- Porch, T.G., Urrea, C.A., Beaver, J.S., Valentin, S., Peña, P.A., and Smith, J.R. 2012. Registration of TARS-MST1 and SB-DT1 multiple-stress-tolerant black bean germplasm. *Journal of Plant Registrations* 6:75-80.

- Prudencio-Sains, J.M., Navarrete-Maya, R., Navarrete-Maya, J., y Acosta-Gallegos, J.A. 2008. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el valle de México. *Agricultura Técnica en México* 34:201-212.
- Rademaker, J.L., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and Bruijn, F.J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95:1098-1111.
- Saddler, G.S., and Bradbury, J.F. 2005. Xanthomonadales ord. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* 63-122.
- SAGARPA. 2012.
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=202 Consultada el 1 de Octubre de 2012.
- Sallam, N.M. 2011. Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*, *Archives of Phytopathology And Plant Protection* 44:20, 1966-1975.
- Santos, A.S, Bressan-Smith, R.E., Pereira, M.G., Rodrigues, R., and Ferreira, C.F. 2003. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira* 28: 5–10.
- Saettler, A.W. 1989. Assessment of yield loss caused by common blight of beans in Uganda. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 35: 113-114.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., and Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *Citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. rem.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* 28:494-518.
- Sheppard, J., Kurowski, C., and Remeus, P.M. 2007. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. *International Rules for Seed Testing* 7-021
- Silva, E.G.D., Moura, A.B., Bacarin, M.A., and Deuner, C.C. 2009. Metabolic alterations on bean plants originated from microbiolization of seeds with *Pseudomonas* sp. and inoculated with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Summa Phytopathologica* 35: 98-104.
- Soares, R.M., Maringoni, A.C., and Lima, G.P. 2004. Inefficiency of acibenzolar-S-methyl in induction of resistance against bacterial wilt in common bean. *Fitopatologia Brasileira* 29: 373-377.
- Tadele, T. 2006. Effect of common bacterial blight severity on common bean yield. *Tropical Science* 46: 41-44.
- Tebaldi, N.D., Peters, J., Souza, R.M., Chitarra, L.G., Zouwen, P., Bergervoet, J., and Wolf, J. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. *Tropical Plant Pathology* 35: 213-222.

- Torres, J.P., Maringoni, A.C., and Silva, T.A.F. 2009. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in Common Bean Leaflets on Soil. *Journal of Plant Pathology* 91: 195-198.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472–489.
- Viecelli, C.A., and Moerschbacher, T. 2013. Control of the common bacterial blight in the bean crop by using foliar fertilizers. *Scientia Agraria Paranaensis* 12: 66-72.
- Wallen, V.R., and Jackson, H.R. 1975. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. *Phytopathology* 65: 942-948.
- Wong, W.C. 1991. Methods for recovery and immunodetection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seed. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 124-129.
- Yu, K., Park, S.J. and Poysa, V. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breed* 119: 411-415.
- Zamani, Z., Bahar, M., Jacques, M.A., Lak, M.R., and Akhavan, A. 2011. Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR–RFLP analyses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2371-2378.
- Zanatta, Z. G.C.N., Moura, A.B., Maia, L.C., y dos Santos, A.S. 2007. Biossay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 511-515.

PHYTON

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY
REVISTA INTERNACIONAL DE BOTANICA EXPERIMENTAL

ISSN 0031 9457

Founded 1951 by Miguel Mario Raggio & Nora Moro de Raggio
Fundada en 1951 por Miguel Mario Raggio & Nora Moro de Raggio

Editor-in-Chief: Dr. Carlos A. Busso

Publicada por/ Published by: FUNDACIÓN RÓMULO RAGGIO

Director General: Dr. Mario Miguel Raggio

Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA) ARGENTINA

TEL: 54-11-4796-1456 / TELFAX: 54-11-4791-0868

www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar / fund_r_raggio@hotmail.com

FECHA: 2 de julio de 2015

Ing. Nazario Francisco Francisco
Departamento de Parasitología Agrícola
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Buenavista, Saltillo
Coahuila, México.

De nuestra mayor consideración:

El manuscrito “**Apertura y conductancia estomática inducida en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por el “tizón común bacteriano” e inductores de resistencia**”

por los autores: **Francisco Francisco N, G Gallegos Morales, A Benavides Mendoza, FD Hernández Castillo, F Castillo Reyes y R Rodríguez Herrera**

ha sido recibido para consideración de publicación en PHYTON INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY y se encuentra en etapa de revisión (número de orden 6804).

Saludamos a Ud. muy atentamente,

Alejandra Krüsemann de Raggio
Por los Editores de PHYTON

Apertura y conductancia estomática inducida en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por el “tizón común bacteriano” e inductores de resistencia.

Stomatal aperture and conductance induced in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) by “common bacterial blight” and inducers resistance.

(Con 1 Tabla y 3 Figuras)

¹Francisco Francisco N, ¹G Gallegos Morales, ²A Benavides Mendoza, ¹FD Hernández Castillo, ³F Castillo Reyes y ⁴R Rodríguez Herrera.

¹Departamento de Parasitología y ²Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1993. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México; ³Campo Experimental Saltillo, INIFAP, carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119. Num. 9515, Colonia Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. ⁴Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas s/n, Colonia República, 25280 Saltillo, Coahuila, México

Titulo corto: Apertura y conductancia estomática en frijol.

Autor para correspondencia: Dr. Gabriel Gallegos Morales, Fax 52(844)-4110226; Teléfono 52(844)-4110326; *email* ggalmor@uaaan.mx

Sistema operativo y procesador de texto: Windows XP – Microsoft word 2010

Resumen. El objetivo del presente trabajo fue la medición de la apertura y conductancia estomática de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como respuesta a la aplicación de

los compuestos químicos: ácido jasmónico (0.5 mM) y ácido salicílico (2 mM); de los microorganismos benéficos: *Trichoderma asperellum* (10^5 esporas/ml) y *Bacillus pumilus* (10^5 UFC/ml), así como a la inoculación con los agentes causantes del “tizón común bacteriano” *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) y *Xanthomonas fuscans* subs. *fuscans* (*Xff*). Los tratamientos fueron aplicados foliarmente 24 horas antes de la inoculación con las bacterias *Xap* y *Xff*. A un grupo de plantas tratadas sin confrontación con los patógenos bacterianos les fue registrada la conductancia estomática en los días 2, 4, 6, 10 y 14 después de los tratamientos, así mismo fue registrada la apertura y conductancia estomática de las plantas en confrontación 24 horas después de la inoculación con dichos patógenos bacterianos. Los resultados mostraron que las plantas sin confrontación incrementaron la conductancia estomática en respuesta a la aplicación con ácido jasmónico en un rango de 2 a 6 días, de forma contraria se registró que la aplicación de *B. pumilus* dio lugar a una menor conductancia en todos los días del ensayo. Las plantas también mostraron respuestas a la inoculación con los agentes bacterianos. El agente *Xap* estimuló a las plantas a una menor apertura estomática y el agente *Xff* ocasionó una mayor conductancia. El estudio muestra que la apertura y conductancia estomática de las plantas del frijol muestran respuestas particulares a los tratamientos con las sustancias inductoras de la defensa vegetal y de los agentes bacterianos.

Palabras clave: Ácido jasmónico, salicilatos, *B. pumilus*, *Xanthomonas fuscans*.

Abstract. The aim of this study was to measure the opening and stomatal conductance of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to the application of: chemical compounds: jasmonic acid (0.5 mM) and salicylic acid (2 mM); beneficial microorganisms: *Trichoderma asperellum* (10^5 spores/ml) and *Bacillus pumilus* (10^5 CFU/ml) and by inoculation with the causative agents of "common bacterial blight" *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) and *Xanthomonas fuscans* subs. *fuscans* (*Xff*). The foliar treatments were applied 24 hours before inoculation with bacteria *Xap* and *Xff*. In one group of plants without confrontation with bacterial pathogens was recorded stomatal conductance on days 2, 4, 6, 10 and 14 after treatment; also was recorded opening and stomatal conductance of plants in confrontation 24 hours after inoculation with these bacterial pathogens. The results showed that plants without

confrontation increased stomatal conductance in response to jasmonic acid application in a range of 2 to 6 days, in contrast, it was registered that application of *B. pumilus* stimulated plants conductance less every day of the assay. The plants also showed responses to inoculation with bacterial agents. The *Xap* agent stimulated plants to lower stomatal opening. The *Xff* agent caused a greater conductance, which was reflected in increased stomatal opening. The study showed that openness and stomatal conductance of bean plants was a function of the bacterial agents and by resistance inducer.

Key words: Jasmonic acid, salicylates, *B. pumilus*, *X. fuscans*.

INTRODUCCIÓN

La resistencia inducida es un “estado fisiológico” en donde se observa un aumento en la capacidad defensiva de las plantas. Este aumento se observa de forma natural como respuesta a distintos estímulos bióticos y abióticos, y se obtiene también con la aplicación en la epidermis vegetal de algunos compuestos químicos, de microorganismos, así como de metabolitos producidos por las mismas plantas durante los eventos de adquisición de tolerancia a diversas enfermedades (Pieterse *et al.*, 2014). Muchas especies de plantas responden asimismo al contacto con diversos fitopatógenos, tales respuestas, como la formación de barreras estructurales (Traw y Bergelson, 2003) forman parte de la primera línea de defensa vegetal. Aunque la multiplicación de los patógenos usualmente es específico a órganos particulares, su entrada frecuentemente toma lugar en sitios distantes debido a la amplia presencia de aberturas naturales o provocadas en las plantas (Melotto *et al.*, 2008).

Las bacterias fitopatógenas, a diferencia de otros microorganismos patógenos, tienen la capacidad de entrar a través de las aberturas naturales, como los estomas, o de heridas en las plantas y transmitirse por vías internas. Los estomas son importantes componentes de la resistencia de las plantas a la entrada de fitopatógenos en general y su mecanismo de apertura y cierre impacta de forma directa las relaciones hídricas de la planta, lo cual se ve reflejado en la conductancia estomática (Melotto *et al.*, 2008). Melotto *et al.* (2006) mostraron que los estomas manifiestan diferentes patrones de apertura y cierre estomático en respuesta al contacto con patógenos microbianos. Una observación clave que mostraron fue que estas aberturas cierran en respuesta a algunas bacterias. También

señalaron que los patógenos han desarrollado la capacidad de estimular la reapertura de los estomas para facilitar su invasión al interior de las hojas, mostrando con esto, que la apertura y cierre de los estomas está regido por la naturaleza del exopolisacarido presente en los microbios.

Ciertas bacterias comunes como *Pseudomonas syringae* han servido como un modelo útil para el estudio de las interacciones de los microorganismos patógenos con las plantas (Melotto *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta hace poco se diseñaron estudios para descifrar los mecanismos usados por otros patógenos bacterianos para adaptarse a sus hospederos vegetales, particularmente los del género *Xanthomonas*. Este género esta constituido por 27 especies que causan enfermedades a más de 400 especies vegetales, entre los que figuran muchos cultivos de importancia económica. Estas bacterias se caracterizan por presentar polisacaridos extracelulares (como el xantano) que le sirven como factor de virulencia (Dow *et al.*, 2003). El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como cultivo de importancia económica es hospedero de las especies *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas fuscans* subs. *fuscans* los cuales causan síntomas de tizón foliar, siendo la segunda especie más virulenta y ocasiona pérdidas en la producción de hasta un 82% (Wallen y Jackson, 1975). Es de suponer que estos patógenos también modifican la apertura estomatica de las plantas de frijol, por lo que el entendimiento del mecanismo de apertura y cierre de estomas, como linea primaria de defensa de las plantas mediada por inductores de defensa, se vuelve un factor crítico que pudiera conducir a un mejor ingenio de protección hacia los patógenos.

En lo referente a los inductores de defensa, se han utilizado con frecuencia diferentes microorganismos benéficos, tales como los antagonistas naturales *Trichoderma* spp. y diversas bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Bacillus* spp. (Heil and Bostock, 2012). Así mismo, varios compuestos químicos, naturales y sintéticos, se han usado para encontrar una respuesta de aumento en la capacidad defensiva de las plantas. No obstante, la aplicación directa de las sustancias estandar que caracterizan las vías principales de defensa, ácido salicílico para la Resistencia Sistémica Adquirida y ácido jasmónico para la Resistencia Sistémica Inducida, son valiosos como controles experimentales en los ensayos de inducción. Acorde a lo antes expuesto, el presente trabajo se realizó con la finalidad de documentar la variación en la apertura y

conductancia estomática de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como respuesta al tratamiento con los microorganismos benéficos: *Trichoderma asperellum* y *Bacillus pumilus*; de los compuestos químicos: ácido salicílico y ácido jasmónico; y de los patógenos bacterianos *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas fuscans* subs. *fuscans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de los patógenos bacterianos. Se colectaron en el campo las hojas de plantas de frijol var. “Pinto Nacional” con síntomas de Tizón Común Bacteriano (TCB) a las cuales se les desinfectó la epidermis en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por dos minutos. De las hojas desinfectadas se tomaron pequeñas porciones de 1 cm² del margen de los tizones foliares para macerarlas en agua destilada estéril contenida en un tubo de ensayo. De la suspensión resultante del macerado se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³ de la cual se tomaron 100 µL para colocarla en medio semiselectivo TB para *Xanthomonas* (10 mL de Tween 80, 10 g de Bacto Peptona, 18 g de Bacto agar, 10 g de KBr, 0.250 g de CaCl₂, 0.2 g de H₃BO₃, 75 mg de Cicloheximida, 25 mg de Cephalexina, 6 mg de S-Fluorouracil y 1000 mL de agua destilada) (Schaad *et al.*, 2001). La identificación de los aislamientos se realizó mediante la observación de las características morfológicas como la forma celular, motilidad, y formación de esporas, y mediante pruebas bioquímicas en la que se observó la tinción Gram, crecimiento en medio TB, pigmentación del medio, estriado del medio, hidrólisis de almidón, licuefacción de gelatina, producción de levana, formación de indol, aerobiosis, reducción del nitrato, y fermentación de compuestos de carbono (glucosa) (Abo-Elyousr, 2006; Almeida *et al.*, 2014).

Pruebas de patogenicidad. Para la prueba de patogenicidad se realizó una multiplicación de las colonias amarillas obtenidas de las placas con medio TB identificadas como *Xanthomonas sp.* y de estas se formó una suspensión la cual se ajustó a una concentración de 10⁸ UFC/ml por nefelometría (acorde a la escala de McFarland) (Klement *et al.*, 1990). Se utilizaron plantas con 15 días de germinación. Estas fueron inoculadas en la nervadura principal de las hojas cotiledonares con 0.01 mL de la suspensión bacteriana con la ayuda de una jeringa para insulina. Después de la

inoculación las plantas se colocaron bajo invernadero a una temperatura de 20 a 30°C con una humedad que osciló entre el 60 al 80% y fueron observadas diariamente hasta la aparición de los síntomas.

Preparación de los tratamientos y aplicación. Los tratamientos aplicados fueron: ácido salicílico a 2 mM (AS) (Sigma-Aldrich), ácido jasmónico (AJ) a 0.5 mM (Sigma-Aldrich), *Trichoderma asperellum* (Ta) (10^5 esporas/ml) y *Bacillus pumilus* (B) (10^5 UFC/ml), los cuales se asperjaron en hojas cotiledonares de frijol 24 horas antes de la inoculación de la nervadura media con los patógenos bacterianos. Las cepas utilizadas fueron tomadas del cepario del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, los cuales fueron identificados previamente por Hernández-Castillo *et al.* (2011) y Guillén-Cruz *et al.* (2006), respectivamente.

Medición de la apertura y conductancia estomática. Para estas mediciones se realizaron dos establecimientos experimentales, el primero fue para medir la conductancia estomática inducida por los tratamientos en plantas sin inoculación del patógeno a través de diferentes días, y el segundo para medir el efecto de la inoculación de los patógenos bacterianos sobre la conductancia y la apertura estomática de las plantas tratadas previamente con los tratamientos descritos. En esta última se incluyó un control experimental el cual consistió del tratamiento de las plantas con los compuestos químicos y microbianos sin la inoculación del patógeno (plantas confrontadas). En las plantas tratadas sin confrontación con las bacterias *Xap* y *Xff* se registró la conductancia estomática en los días 2, 4, 6, 10 y 14 después de los tratamientos. Esta fue tomada de las hojas de cuatro plantas por tratamiento con un porómetro foliar (SC-1, Decagon Devices, Pullman, WA). Así mismo, a las plantas en confrontación les fue registrada la conductancia y apertura estomática 24 horas después de la inoculación con los patógenos bacterianos. Para determinar la apertura estomática se tomaron impresiones epidérmicas de las hojas de tres plantas por tratamiento ello se tomaron impresiones de las hojas de 3 plantas por tratamiento en la mañana al medio día y por la tarde (total nueve plantas) a una temperatura que osciló de 19 a 28°C. Las impresiones foliares se obtuvieron colocando pegamento para PVC con una brocha en las epidermis adaxial y abaxial de las hojas sobre la que fue colocada una cinta adhesiva transparente y esta sobre un portaobjetos para su observación al microscopio compuesto. La apertura

estomática fue obtenida midiendo la abertura de los estomas centrales de 3 campos visuales a 40x de aumento con un microscopio compuesto con cámara digital integrada y la medición se realizó con el software AxioVision Rel. 4.8. La conductancia estomática de las plantas confrontadas fue registrada en 4 plantas por tratamiento en la mañana y en la tarde (total 8 plantas) bajo las mismas condiciones especificadas anteriormente.

Los experimentos fueron conducidos bajo un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial. Se realizó un análisis de varianza de las mediciones tanto de la conductancia como de la apertura estomática. Las salidas gráficas, bajo la misma escala, muestran las medias con barras verticales que denotan intervalos de confianza al 0.95.

RESULTADOS

Aislamiento de los patógenos bacterianos y prueba de patogenicidad. Se observó la presencia de dos aislados que presentaban la formación de colonias amarillas pero con diferencias en la pigmentación del medio de cultivo TB, los cuales visualmente indicaban pertenecer a las agentes causales *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas fuscans* subs. *fuscans*. Esto nos llevó a realizar la identificación mediante pruebas morfológicas y bioquímicas. Las características se enlistan en la Tabla 1.

Ambos aislados mostraron las mismas propiedades morfológicas pero con la única diferencia en la pigmentación del medio de cultivo en las pruebas bioquímicas del *aislado 2*. Mediante las pruebas de patogenicidad se pudo observar que el *aislado 2* ocasionó los síntomas típicos del TCB 15 días después de la inoculación a las plantas y con mayor severidad de la enfermedad a diferencia del surgimiento de los síntomas en el día 22 por el *aislado 1*. La mayor severidad de la enfermedad del TCB ha sido observada en plantas afectadas por el agente bacteriano *X. fuscans* subs. *fuscans* en comparación a *X. axonopodis* subs. *fuscans* (Almedia *et al.*, 2014). La Figura 1 muestra los síntomas característicos del TCB inducido por los aislados, cabe señalar que ambos aislados mostraron el típico color amarillo de las colonia 48 horas después de ser sembrados en una placa con medio KB o TB, 96 horas después logró apreciarse el estriado del medio, sin embargo para este tiempo sale a relucir la pigmentación del *ailado 2* el cual es característico para *Xanthomonas fuscans*. subs. *fuscans*, anteriormente conocido como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* subs. *fuscans* (Xapf) (Francisco *et al.*, 2013). Por

las características morfológicas, bioquímicas y patogénicas de los aislados bacterianos se concluye ya que las bacterias fitopatógenas aisladas corresponden a las bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) y *X. fuscans* subs. *fuscans* (*Xff*).

Medición de la conductancia y apertura estomática. El análisis de varianza de la conductancia estomática de las plantas sin confrontación medida en los días 2, 4, 6, 10, y 14 después de los tratamientos del primer establecimiento experimental mostró diferencia altamente significativa para el efecto de los tratamientos. El tratamiento con ácido jasmónico fue el que estimuló una mayor conductancia abaxial principalmente en los días 2, 4, y 6 (Figura 2b y 2f). Por su parte, *B. pumilus* promovió una menor conductancia estomática (Figura 2e y 2f) lo cual fue coincidente con la mínima apertura estomática registrada en las plantas control del segundo establecimiento experimental (Figura 3b). A través del ANVA pudo apreciarse que la conductancia de la epidermis abaxial de las plantas testigo y de las plantas tratadas con ácido salicílico no cambió en los diferentes días en comparación a las plantas tratadas con ácido jasmónico, *T. asperellum* y *B. pumilus* (Figura 2a y 2c). Así mismo, el análisis de varianza de la epidermis abaxial y adaxial como fuente de variación para las plantas testigo mostraron un valor P inferior en comparación con las plantas bajo los diferentes tratamientos (Figura 2a).

Por otra parte, el ANVA de la conductancia y apertura estomática del segundo establecimiento experimental mostró diferencia significativa por efecto de los patógenos bacterianos. Pudo constatarse que las plantas inoculadas con la bacteria *Xff* manifestaron mayor conductancia y apertura estomática en comparación a las plantas inoculadas con la bacteria *Xap* y los tratamientos control (Figura 3a). Así mismo, fue detectado el efecto de interacción entre el factor tratamiento y la epidermis, en la que los tratamientos con ácido salicílico y jasmónico fueron los que promovieron una mayor conductancia abaxial en respuesta a la inoculación con *Xff*. Por su parte, la apertura estomática solo fue significativamente diferente en la epidermis adaxial de las plantas tratadas con *B. pumilus* en las plantas control (Figura 3b). Es oportuno señalar, que la correlación encontrada entre la apertura y conductancia estomática fue de 0.73.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de ácido jasmónico, *B. pumilus* y de los agentes causantes del tizón común bacteriano sobre las plantas afectan la conductancia y apertura estomática. Esta respuesta fue detectable a través del registro de la conductancia en varios días después de la aplicación de las sustancias a las plantas sin confrontación. La mayor conductancia en las plantas ocasionada por los tratamientos de ácido jasmónico y de ácido salicílico fue incrementada con la inoculación de la bacteria *X. fuscans* subs. *fuscans*.

Los estomas son aberturas naturales que han sido reconocidos como el mayor punto de entrada para los patógenos bacterianos (Zeng *et al.*, 2010). Por lo tanto, el cierre estomático es la primera respuesta de las plantas al contacto con estos patógenos microbianos. No obstante, se ha documentado que algunos fitopatógenos tienen la capacidad de ocasionar una reapertura estomática, lo cual podría explicar la respuesta observada por la aplicación de la bacteria *X. fuscans* en este estudio (Melotto *et al.*, 2006). Cabe señalar que la bacteria *X. fuscans* subs. *fuscans* es reportada como el agente causal más virulento del TCB en frijol (Mutlu *et al.*, 2008). Dicha virulencia es atribuida, entre otras, a la naturaleza del exopolisacarido que la protege de factores ambientales (Büttner y Bonas, 2010), por lo que este estudio manifiesta una posible interferencia de los factores de virulencia en el mecanismo de apertura y cierre de estomas.

Por otro lado, resalta el hecho de que las plantas tratadas con *B. pumilus* promovieran una respuesta de menor apertura estomática. Estas respuestas son coincidentes con los reportados en otros trabajos en el sentido de que las plantas al estar en contacto con los microorganismos (principalmente benéficos), también responden con un cierre estomático (Melotto *et al.*, 2006), el cual se corrobora con la aplicación de esta bacteria benéfica. La aplicación foliar de este microorganismo estaría a favor de la protección preventiva de los cultivos contra las bacterias.

En contraparte, llama la atención el hecho de que algunas sustancias como el ac. jasmonico y salicílico ocasionen de manera desfavorable una configuración abierta de los estomas por varios días y aún más en presencia del agente *X. fuscans*, situación que

permitiría el acceso del fitopatógeno. Esta última respuesta probablemente se debe a que las plantas responden de manera diferente a la aplicación de los inductores químicos. Como es bien sabido, la aplicación de estos compuestos químicos han sido excelentes promotores de la resistencia vegetal a las enfermedades, por lo que la dosis manejada en este estudio (0.5 mM), el cual es la dosis mayormente empleada (Traw y Bergelson, 2003), desestabiliza el mecanismo de apertura y cierre estomático y tendría un efecto negativo en el metabolismo de las plantas. Adicionalmente estos cambios en la configuración estomática, abierta o cerrada, repercuten de manera directa o indirecta en varios procesos fisiológicos como la respiración o la fotosíntesis (Grimer *et al.*, 2012).

Nuestros resultados muestran la afectación negativa del ácido jasmónico (0.5 mM) y ácido salicílico (2 mM) ante la presencia del agente causal más virulento del tizón común bacteriano en frijol, debido a que ocasionan una amplia apertura estomática, lo cual sugeriría el ensayo de una dosis o concentración inferiores a los empleados en este ensayo previo a su recomendación para su uso extensivo como inductores de defensa.

REFERENCIAS

- Abo-Elyousr, K.A. (2006). Induction of systemic acquired resistance against common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Egyptian Journal of Phytopathology* 34: 41-50.
- Almeida, I.M.G.D., L.M.R. Rodrigues y L.O.S. Beriam (2015). *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* causing wilt symptoms in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico* 82: 1-3
- Büttner, D., y U. Bonas (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS microbiology reviews* 34: 107-133.
- Castillo, F.D., A.M. Padilla, G.G. Morales, M.C. Siller, R.R. Herrera, C.N. Gonzales, y F.C. Reyes (2011). In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Science* 6: 410-417.
- Dow, J.M., L. Crossman, K. Findlay, Y.Q. He, J.X. Feng y J.L. Tang (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.: 10995-11000.
- Francisco, N.F., G.G. Morales, Y.M.O. Fuentes, F.D.H. Castillo, A.B. Mendoza y F.C. Reyes (2013). Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: 147-160.
- Grimmer, M.K., M.J. Foulkes y N.D. Paveley (2012). Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *Journal of experimental botany* 63: 4321-4331.
- Guillén-Cruz R., F.D. Hernández-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. Rodríguez-Herrera, C.N. Aguilar-González, E. Padron-Corral y M.H. Reyes-Valdés (2006). *Bacillus spp.* como biocontrol en un suelo Infestado con *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 105-114.
- Heil, M., y R.M. Bostock (2001). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* 89; 503-512.
- Klement, Z., K. Rudolph y D.C. Sands (1990). *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Melotto, M., W. Underwood, J. Koczan, K. Nomura y S.Y. He (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Melotto, M., W. Underwood y S.Y. He (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46: 101-122
- Mutlu, N., A.K. Vidaver, D.P. Coyne, J.R. Steadman, P.A. Lambrecht y J. Reiser (2008). Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. *Plant Disease* 92: 546-554.
- Pieterse, C.M., C. Zamioudis, R.L. Berendsen, D.M. Weller, S.C. Van Wees y P.A. Bakker (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347-375.
- Schaad, N.W., J.B. Jones y W. Chun (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd Ed. APS Press. Minnesota.

- Traw, M.B. J. Bergelson (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1367-1375.
- Wallen, V.R. y H.R. Jackson (1975). Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. *Phytopathology* 65: 942-948.
- Zeng, W., M. Melotto y S.Y. He (2010). Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 599-603.

Leyendas de las tablas

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de los aislados bacterianos.

Table 1. Morphological and biochemical characteristic of bacterial isolated.

Tabla 1. Francisco *et al.*

Prueba	Aislado bacteriano	
	<i>Aislado 1</i>	<i>Aislado 2</i>
Forma celular (Barra)	+	+
Tinción gram	-	-
Pigmentos fluorescente	-	-
Motilidad	+	+
Formación de esporas	-	-
Tinción de gram	-	-
Crecimiento en medio KB, TB y YDC	+	+
Pigmentación del medio TB	-	+ Café difusible
Hidrólisis en almidón	+	+
Hidrolisis de gelatina	-	-
Hidrolisis de Tween 80	+	+
Estriado del medio	+	+

Licuefacción de gelatina	+	+
Producción de levana.	+	+
Formación de indol	+	+
Aerobiosis	+	+
Reducción de nitrato	-	-
Prueba de patogenicidad	+	+

Las pruebas fueron confirmadas por duplicado; (+) positivo y (-) negativo.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Síntomas de tizón común bacteriano ocasionado por el aislado 1 (a) y el aislado 2 (b). Las colonias amarillas corresponden al primer aislado y las cafés al segundo (c).

Figure 1. Symptoms of common bacterial blight caused by isolated 1 (a) and isolated 2 (b). Yellow colonies correspond to the first isolated and brown to the second isolated (c).

Figura 2. Conductancia estomatica registrada de las plantas sin confrontación en los días 2, 4, 6, 10 y 14 después de los tratamientos. La figura **f** muestra el efecto de los tratamientos como fuente de variación en la que se incluyen todos los días analizados. Las abarras denotan un intervalo de confianza al 95%. Los valores P fueron obtenidos por diferentes ANVA. To, testigo; AJ, ácido jasmónico; AS, ácido salicílico; Ta, *T. asperellum*; B, *B. pumilus*.

Figure 2. Stomatal conductance registered from plants without challenge on 2, 4, 6, 10 and 14 days after treatments. Figure **f** shows the effects of treatment as source of variation in that was included all days analyzed. Vertical bars denote 0.95 confidence intervals. P values were obtained by different ANVA. To, control; jasmonic acid; AS, salicylic acid; Ta, *T. asperellum*; B, *B. pumilus*.

Figura 3. Conductancia y apertura estomatica de las plantas con y sin (control) confrontación por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) y *X. fuscans* subs. *fuscans* (*Xff*) 24

horas después de la inoculación. To, testigo; AJ, ácido jasmónico; AS, ácido salicílico; Ta, *T. asperellum*; B, *B. pumilus*.

Figure 3. Conductance and stomatal aperture registered from plants with or without (control) challenge by *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) and *X. fuscans* subs. *fuscans* (*Xff*) 24 hours after inoculation. Vertical bars denote 0.95 confidence intervals. P values were obtained by different ANVA. To, control; jasmonic acid; AS, salicylic acid; Ta, *T. asperellum*; B, *B. pumilus*.

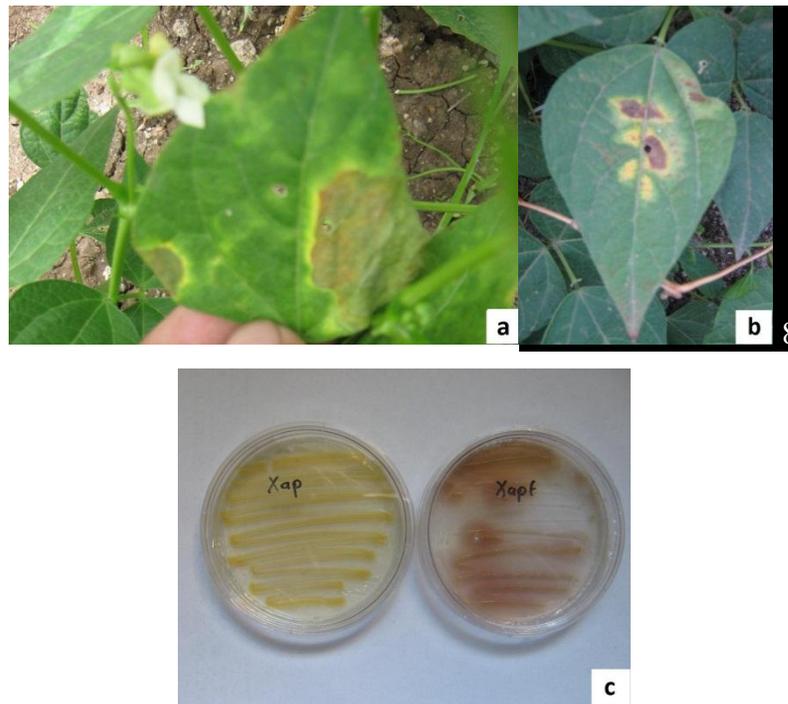


Figura 1. Francisco *et al.*

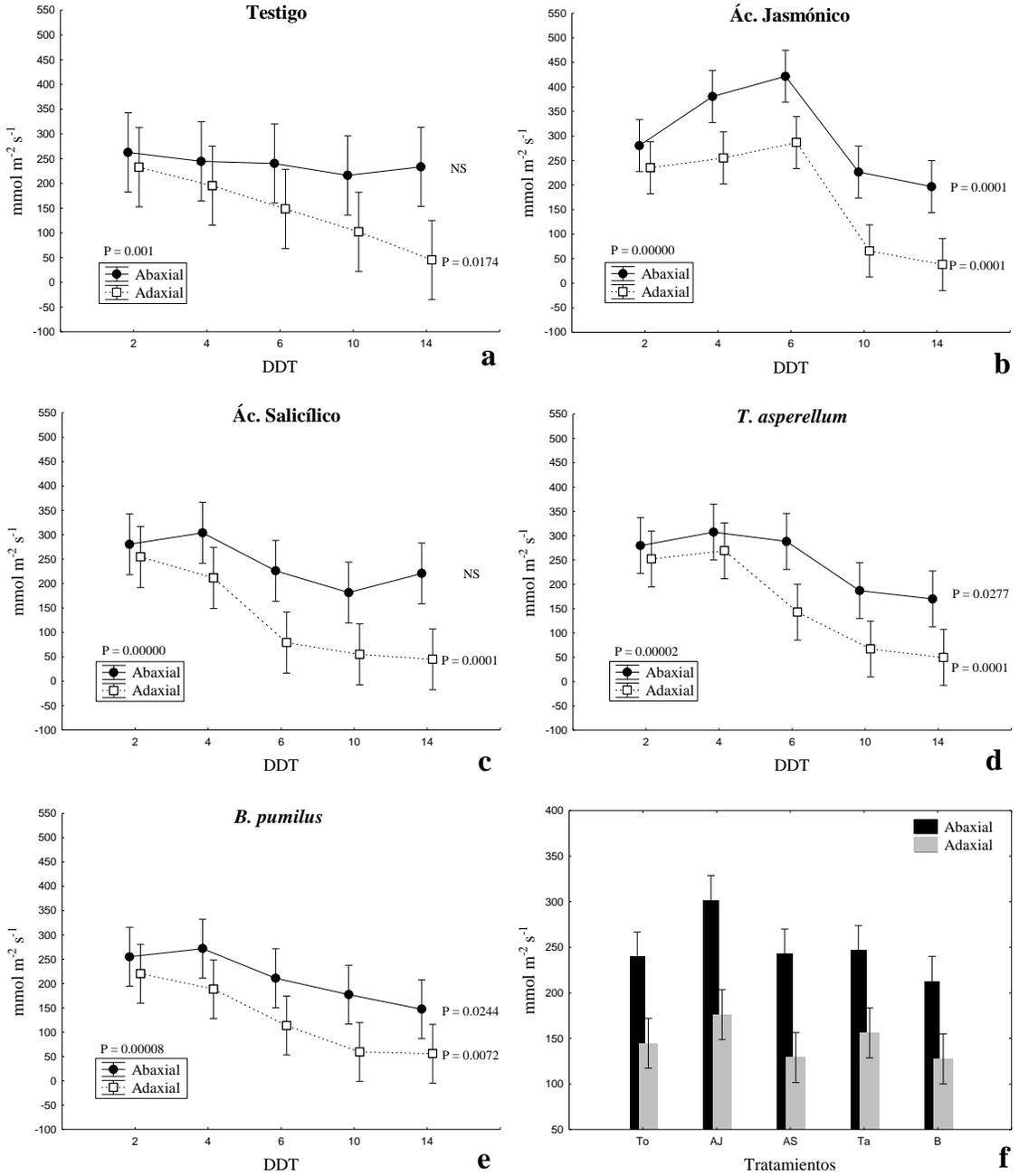


Figura 2. Francisco *et al.*

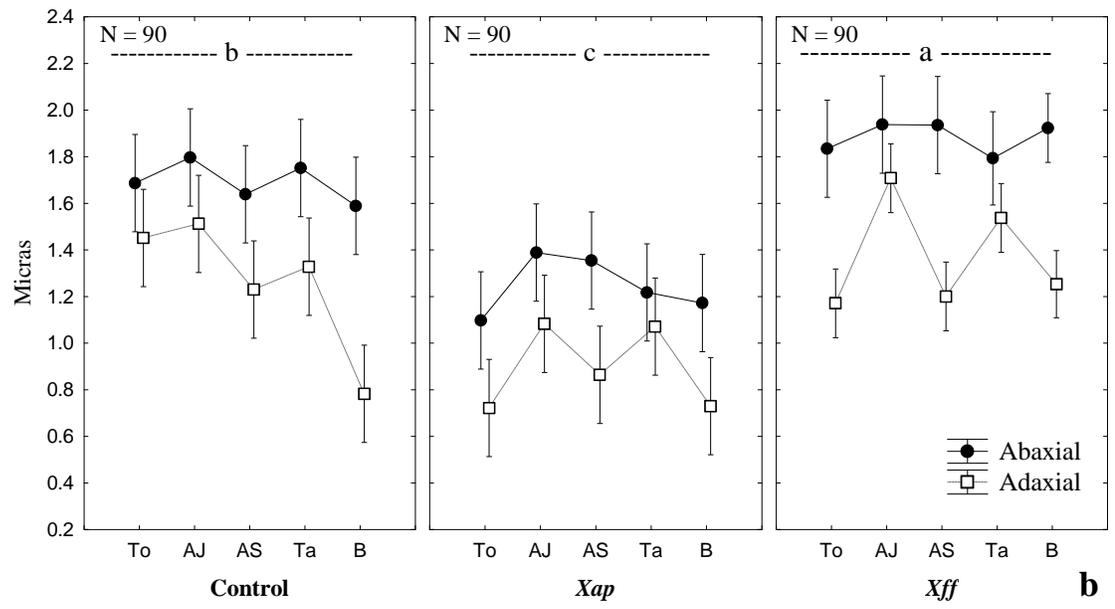
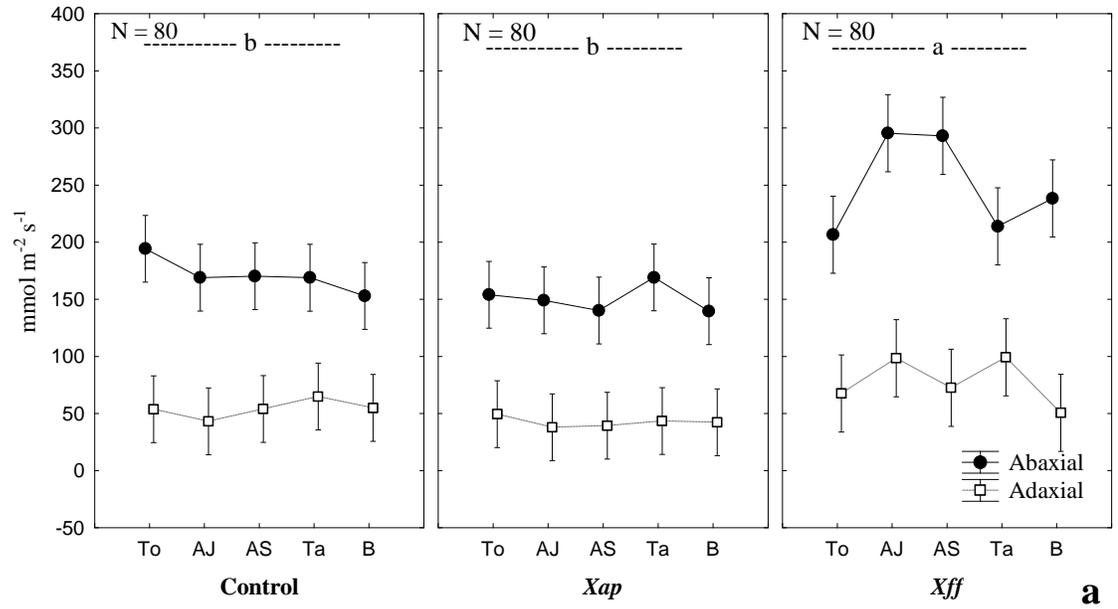


Figura 3. Francisco *et al.*

Actividad Antioxidante en Plantas de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Inducida por *Trichoderma asperellum* y *Bacillus pumilus*.

¹Nazario Francisco-Francisco, ¹Gabriel Gallegos-Morales*, ¹Yisa Maria Ochoa-Fuentes ²Adalberto Benavides-Mendoza, ¹Francisco D. Hernández-Castillo, ³Francisco Castillo-Reyes y ⁴Raúl Rodríguez-Herrera.

¹Departamento de Parasitología y ²Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México; ³Campo Experimental Saltillo, INIFAP, carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119. Num. 9515, Colonia Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. ⁴Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Boulevard. Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas s/n, Colonia República, 25280 Saltillo, Coahuila, México * Autor responsable (ggalmor@uaaan.mx).

INTRODUCCIÓN

La resistencia de las plantas a los patógenos tales como hongos, bacterias y virus, frecuentemente depende de la capacidad de la planta para reconocer el patógeno oportunamente en el proceso de infección (Berger *et al.*, 2007). El evento de reconocimiento conduce a una necrosis de los tejidos infectados. A este proceso se le conoce como “respuesta hipersensible”; esta involucra la activación de compuestos preexistentes, como enzimas y metabolitos secundarios, antes que los cambios en la expresión de los genes. Uno de los procesos más notables que se presentan en la respuesta hipersensible, es la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo cual es conocido como “estallido oxidativo” (Mur *et al.*, 2008). Esta respuesta de las plantas hacia los patógenos ha sido observada en diversas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas en la que se incluyen cacahuete, mangle, arroz, entre otros (Livingstone *et al.*, 2005; Cheeseman, 2006; Tanabe *et al.*, 2011).

Las EROS son intermediarios tóxicos que resultan de la reducción del oxígeno molecular. Las especies predominantes detectadas en la interacción planta-patógeno son el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻). Frente a esta situación las

plantas generan enzimas antioxidantes que impiden el daño que potencialmente puede ocasionarse a sí mismo. La enzima catalasa, convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Gill and Tuteja, 2010). La enzima superóxido dismutasa, dismuta el anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, varios compuestos químicos como el ácido salicílico y ácido jasmónico (Vlot *et al.*, 2009; Karzan y Manners, 2008), han sido identificados como inductores de la resistencia vegetal por excelencia. Así mismo, varias especies de *Trichoderma* spp. y de *Bacillus* spp. (Djonovic *et al.*, 2006; Ongena *et al.*, 2007) han mostrado la capacidad de aumentar los niveles de actividad enzimática en varias especies vegetales de importancia económica. No obstante, se ha observado que el aumento en la actividad de dichas enzimas inducidas por los inductores mencionados es inestable y solo es perceptible por un lapso corto de tiempo, observándose una alta actividad en el transcurso de horas, días, e incluso semanas (Gechev *et al.*, 2006; El-Khallal, 2007), y con respuesta fluctuante entre las diferentes especies vegetales (Türkan *et al.*, 2005). Es por ello que es evidente la necesidad de estudiar el potencial de inducción del sistema antioxidante por los diferentes inductores conocidos en las diferentes etapas fenológicas de las plantas. En este trabajo se muestra la actividad catalasa, peroxidasa, y superóxido dismutasa que se producen por la aplicación de ácido salicílico, ácido jasmónico, *Trichoderma asperellum*, y *Bacillus pumillus* en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Las semillas de frijol cv. Pinto Nacional se sembraron en macetas individuales con turba como sustrato, el cual fue esterilizado previamente en autoclave a 120°C por 15 minutos. Las semillas fueron acondicionadas en cámara bioclimática a una temperatura de 28±2°C y una humedad relativa de 35±7%. Después de 5 días, una vez germinadas las semillas, fueron trasladadas a un invernadero bajo una temperatura de 28±5°C y 55±10% de humedad relativa. El día de la germinación fue considerado como día 1 del experimento. Las plantas fueron regadas diariamente y fertilizadas dos veces por semana con 30 mL de la solución NPK (15:16:17) del fertilizante Peter a una concentración de 2000 mg/L.

Preparación de tratamientos.

Los tratamientos consistieron en: ácido salicílico (Sigma-Aldrich), ácido jasmónico (J-2500, Sigma-Aldrich), *Trichoderma asperellum*, y *Bacillus pumilus*. Los aislados *T. asperellum* y *B. pumillus* fueron tomados del cepario del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, los cuales fueron identificados previamente por Hernández-Castillo *et al.* (2011) y Guillén-Cruz *et al.* (2006), respectivamente.

Por otra parte, *T. asperellum* y *B. pumilus* fueron multiplicados en placas de Petri conteniendo PDA, dejándolos en crecimiento por 10 y 2 días respectivamente. Los tratamientos se realizaron asperjando las hojas cotiledonares con 1 mL de ácido salicílico (2 mM) y ácido jasmónico (0.5 mM). El inóculo de *T. asperellum* consistió de 1 mL de 10^5 esporas/mL, contados en cámara Neubauer. El inóculo de *B. pumilus* consistió de 1 mL de 10^5 UFC/mL, el cual fue ubicado con por Nefelometría en la escala de Mcfarland. La aplicación de los tratamientos se efectuó 7 días después de la germinación de las semillas y la segunda aplicación se realizó 7 días posteriores a la primera aplicación. Con el propósito de comparar la permanencia de los efectos de los tratamientos, se realizó una única colecta 7 días después de la segunda aplicación. Las muestras resultantes fueron liofilizadas durante 24 horas.

Preparación del extracto y determinación del contenido de proteína soluble total.

El extracto proteico se obtuvo colocando 0.2 g del tejido liofilizado en tubos para microcentrifuga y se agregó 1.5 mL de buffer fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0.1 M a pH 7.0, posteriormente fue sometido a microcentrifugación a 12000 rpm por 10 min a 4°C. La determinación total de proteínas solubles fue realizado mediante el método Bradford (Bradford, 1976), usando albumina de suero bovino como estandar.

Actividad antioxidante.

La actividad catalasa (CAT) fue determinada acorde al método propuesto por Ramos *et al.* (2010). La mezcla de la reacción se realizó con 0.1 mL de extracto proteico. La reacción fue iniciada con la adición de 1 mL de peróxido a 100 mM. La reacción fue detenida por la adición de 0.4 mL ácido sulfúrico al 5%. La actividad enzimática fue estimada calculando la descomposición del peróxido por min/mg de proteína. Se llevó a

cabo midiendo 2 tiempos de reacción, tiempo 0 y 1 minuto de reacción a una longitud de onda de 275 nm en un espectrofotómetro (Thermo-Spectronic, Biomate, USA). La actividad específica fue expresada en unidades/mg de proteína. La actividad peroxidasa (POX) fue medida empleando la metodología de Baskaran *et al.* (2009). La mezcla de la reacción (1.2 mL) se realizó con 0.1 mL de extracto proteico, 0.5 mL de Buffer 100 mM, 0.2 mL de pirogalol, y 0.2 mL de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo 1 minuto después con la adición de ácido sulfúrico al 5%. Las lecturas se tomaron a una longitud de onda de 420 nm. En ambas determinaciones se utilizó el mismo extracto enzimático. La actividad Superóxido Dismutasa (SOD) se realizó mediante el kit 19160 (Sigma-Aldrich). El procedimiento fue realizado siguiendo el protocolo del kit. Brevemente, se depositó 20 µL de cada muestra en los pocitos de la microplaca para ELISA, se agregó 200 µL de la solución de trabajo del kit. La mezcla fue agitada ligeramente para mezclar y posteriormente incubarla a 37°C por 20 min. Pasado este tiempo se agregó 20 µL de la solución enzimática del kit. La absorbancia de la mezcla fue leída a 450 nm usando un lector de microplacas y la actividad SOD fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición (actividad SOD)} = \frac{((\text{blanco 1} - \text{blanco 3}) - (\text{simple A} - \text{blanco 2}))}{(\text{blanco 1} - \text{blanco 3})} \times 100.$$

Donde el blanco 1 fue una mezcla de la solución de trabajo (200 µL) y la solución enzimática del kit (20 µL) conteniendo 20 µL de agua doblemente destilada. El blanco 2 contuvo el extracto vegetal (20 µL) con la solución de trabajo (200 µL) y el buffer de dilución (20 µL), mientras que al blanco 3 se le agregó agua destilada (20 µL) más la solución de trabajo y la solución enzimática en las mismas cantidades.

Análisis estadístico.

El experimento se realizó bajo un diseño bloques completamente al azar con los cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Las medias son presentadas con una desviación estándar (DE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento con ácido salicílico disminuyó significativamente el contenido proteico en un 12% en relación al testigo. Por el contrario, las plantas asperjadas con *T. asperellum*

mostraron un incremento del 15% la cantidad de proteínas. Se registró diferencia significativa en la actividad CAT entre los tratamientos aplicados 14 días antes de muestreo (DAM). El ácido jasmónico incremento 42% la actividad respecto al testigo, en contraparte las plantas asperjadas con *B. pumilus* redujeron la actividad en un 28%. El análisis de la actividad POX registró diferencia significativa en ambas aplicaciones (7 y 14 DAM). Los tratamientos del 7 DAM mostraron que el ácido salicílico incrementó la actividad hasta 350% con respecto al testigo y por el contrario *T. asperellum* redujo en 23% la actividad de dicha enzima. Las plantas tratadas 14 DAM aún presentaban la misma fluctuación entre los tratamientos. La actividad SOD solo mostró diferencia significativa en los tratamientos aplicados 7 DAM. En esta resalta el incremento en la actividad manifestada por las plantas asperjadas con *T. asperellum*, con una superioridad de 113% en relación al testigo (Figura 1).

La disminución en el contenido proteico observado en las plantas tratadas con ácido salicílico, obedece a un posible estrés ocasionado por esta hormona. Previos trabajos muestran que las leguminosas, como en *Vicia faba* L., disminuyen el contenido proteico aún a concentraciones de 0.2 mM de ácido salicílico, pero al mismo tiempo la incrementa ante factores abióticos (Azoos, 2009). Caso contrario se ha observado al aplicar los inductores microbianos, como la especie *T. harzianum* el cual aumenta los niveles proteínicos hasta en 40% en plantas de *Cicer arietinum* L. (Moradi *et al.*, 2012).

La mayor actividad CAT y POX observada por la aplicación de las sustancias hormonales, ácido salicílico y jasmónico, respectivamente, es una constante reportados en varios trabajos. Estas hormonas son por excelencia las vías que representan las principales rutas de señalización, la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (RSI). No obstante, los niveles en la actividad enzimática fluctúan en el transcurso de horas, y su manifestación no es estable (Chan y Tían, 2006).

La alta actividad superóxido dismutasa observada por la aplicación de *T. asperellum* en los primeros 7 días es similar a la observada en algunos otros trabajos. No obstante, la aplicación de *T. viridae* simultáneamente con *Suillus luteus*, en plantas de *Pinus sylvestris* var. *Mongolica*, registran un incremento en la actividad enzimática superóxido dismutasa en comparación a la actividad enzimática catalasa y peroxidasa aún después

de treinta días posteriores a la inoculación (Yin *et al.*, 2014). Esta respuesta diferente puede deberse a que las plantas responden de forma distinta dependiendo de la familia a la que pertenezcan, tal como lo demuestra Türkan *et al.* (2005) al comparar la actividad enzimática inducida por la aplicación del compuesto polietilenglicol (PEG) en las plantas de *P. vulgaris* y *P. acutifolius*, observando una alta actividad superóxido dismutasa en los primeros 7 días y con una notoria disminución a 14 días.

Por otro lado, otros trabajos reportan la disminución en la actividad enzimática por la aplicación de *Trichoderma* en algunas especies de plantas. La leguminosa *Vigna mungo* L. inoculada con *T. viride* muestra una disminución en la actividad catalasa en comparación a las plantas inoculadas con agentes patógenos (Prasad *et al.*, 2013). Esta respuesta fue similar a la observada en este estudio, donde se observa una clara disminución de la actividad catalasa en las plantas tratadas con *T. asperellum* 14 días previos al muestreo.

Por otra parte, en este trabajo la especie bacteriana *B. pumilus* indujo una mínima actividad de las enzimas estudiadas en comparación al resto de los tratamientos. Previas investigaciones muestran que la mezcla de cepas de *B. amyloliquefaciens* y *B. pumilus* consistentemente inducen un incremento en la actividad enzimática en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), el cual fue más notorio después de haber sido inoculadas con los fitopatógenos (Jetiyanon, 2007). Esto sugiere que, la activación de los mecanismos de defensa en algunas especies vegetales inoculadas con microorganismos benéficos induce una alta actividad solo después de interactuar con agentes patógenos, y el cual podría explicar los resultados observados.

CONCLUSIÓN

Los microorganismos benéficos *T. asperellum* y *B. pumilus* modifican de manera diferente el contenido proteico y la capacidad antioxidante de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pinto Nacional. *T. asperellum* promueve altos niveles de proteína soluble y de actividad enzimática, solo superado por los inductores hormonales, ácido salicílico y jasmónico, en la actividad catalasa y peroxidasa, respectivamente. La actividad enzimática manifestada por las aplicaciones de *B. pumilus* no resulta significativa en comparación a *T. asperellum*.

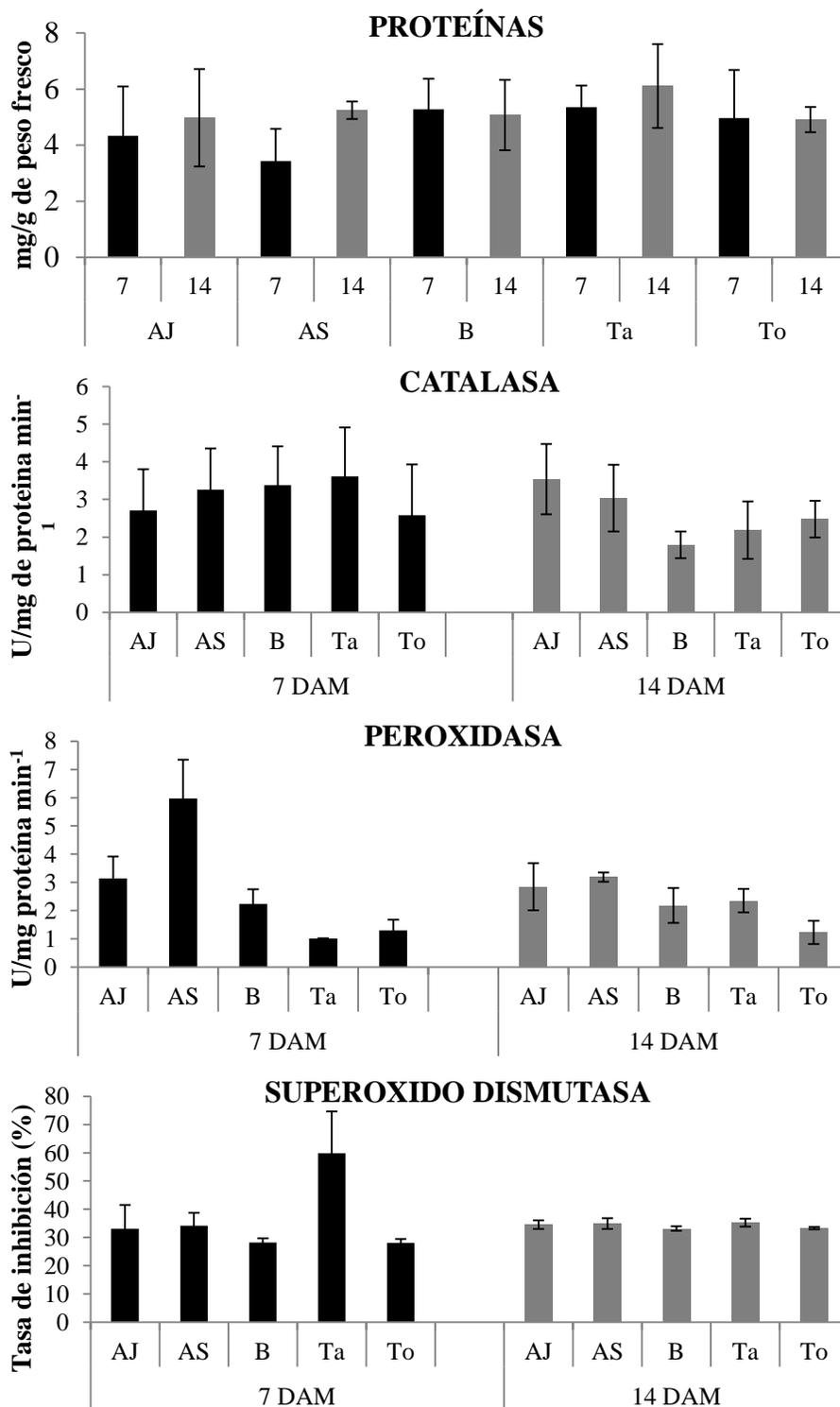


Figura 1. Contenido de proteína soluble, actividad específica catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas con ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS), *B. pumilus* (B), *T. asperellum* (Ta), y el testigo (To) asperjadas con los tratamientos 7 y 14 días antes de muestreo (DAM).

LITERATURA CITADA

- Adam, A. L., Bestwick, C. S., Barna, B., and Mansfield, J. W. 1995. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta*, 197(2), 240-249.
- Azooz, M. M. 2009. Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *Int J Agric Biol*, 11(4), 343-350.
- Baskaran, L., Sundaramoorthy, P., Chidambaram, A. L. A., and Ganesh, K. S. 2009. Growth and physiological activity of greengram (*Vigna radiata* L.) under effluent stress. *Bot. Res. Int*, 2(2), 107-114.
- Berger, S., Sinha, A. K., and Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of experimental botany*, 58(15-16), 4019-4026.
- Bissenbaev, A. K., Altybaeva, N. A., and Kolbaeva, G. A. 2007. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hormone regulating programmed cell death of wheat aleurone layer. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5, 38-43.
- Chan, Z., and Tian, S. 2006. Induction of H₂O₂-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 39(3), 314-320.
- Cheeseman, J. M. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany*, 57(10), 2435-2444.
- Djonovic, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., and Kenerley, C. M. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 838-853.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Jetiyanon, K. 2007. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biological control*, 42(2), 178-185.
- Kazan, K., and Manners, J. M. 2008. Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant physiology*, 146(4), 1459-1468.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., and Cardinali, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661, 23-67.
- Livingstone, D. M., Hampton, J. L., Phipps, P. M., and Grabau, E. A. 2005. Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiology*, 137(4), 1354-1362.
- Moradi, H., Bahramnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A., and Haji-Allahverdipoor, K. 2012. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusariums* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *Plant Omics Journal*. 5(2): 68-74.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., and Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of experimental Botany*, 59(3), 501-520.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., and Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of

- induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*,9(4), 1084-1090.
- Prasad, B. S., Kamala, G., and Ganesh, P. S. 2013. Efficacy of *Trichoderma viride* to induce disease resistance and antioxidant responses in legume *Vigna Mungo* infested by *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 3(2), 285-293.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P., and Watkins, C. B. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology*, 115(1), 137-149.
- Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K. I., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., ... and Minami, E. 2011. The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,24(2), 163-171.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., and Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
- Yin, D., Deng, X., Chet, I., and Song, R. 2014. Physiological Responses of *Pinus sylvestris* var. *Mongolica* Seedlings to the Interaction Between *Suillus luteus* and *Trichoderma virens*. *Current microbiology*, 69(3), 334-342.

