



UAdeO
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
OCCIDENTE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
Unidad Regional Los Mochis
Departamento de Investigación y Posgrado
Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente

Proyecto de tesis

***Identificación* molecular de frijoles criollos de Cofre de Perote, Veracruz, susceptibilidad contra *Sclerotinia sclerotiorum*, e inducción de defensa por micorrización**

Presenta:

I.A Alejandra Vallejo Sánchez

Para obtener el grado de:

Maestra en Fitopatología y Medio Ambiente

Directora

Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal

Codirectora

Dra. Melina López Meyer.

Asesores (ras)

Dr. Rubén Félix Gastélum

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero

Los Mochis, Sinaloa, julio de 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día 04 del mes julio del año 2024, la que suscribe Alejandra Vallejo Sánchez alumna del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente con número de matrícula 22021309, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la: Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal y la Dra. Melina López Meyer y cede los derechos del trabajo titulado “Identificación molecular de frijoles criollos de Cofre de Perote, Veracruz, susceptibilidad contra *Sclerotinia sclerotiorum*, e inducción de defensa por micorrización.”, a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Alejandra Vallejo Sánchez
Lic. Alejandra Vallejo Sánchez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Los Mochis Sinaloa, a 04 de julio 2024

Asunto: carta conclusión de tesis para opción de grado.

Dra. Karla Mariela Sandoval Cota
Jefa del Departamento de Investigación y Posgrado
Unidad Regional Los Mochis

Presente.-

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante: **Alejandra Vallejo Sánchez** Matrícula: **22021309**

Nombre de Tesis: **“Identificación molecular de frijoles criollos de Cofre de Perote, Veracruz, susceptibilidad contra *Sclerotinia sclerotiorum*, e inducción de defensa por micorrización”.**

Nombre del Programa Educativo: **Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.**

A t e n t a m e n t e.



Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal
Directora de Tesis



UAdeO
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
OCCIDENTE


El presente trabajo de investigación titulado "Identificación molecular de frijoles criollos de Cofre de Perote, Veracruz, susceptibilidad contra *Sclerotinia sclerotiorum*, e inducción de defensa por micorrización" realizado por la Lic. Alejandra Vallejo Sánchez con matrícula: 22021309, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestra en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:



Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal
Directora de Tesis

Dra. Melina López Meyer
Co-Directora de Tesis



Dr. Rubén Félix Gastélum
Asesor



Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero
Asesora

Los Mochis, Sinaloa a 04 de julio de 2024

El trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología en la Universidad Autónoma de Occidente bajo la dirección de la Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal y en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la codirección de la Dra. Melina López Meyer. El presente trabajo fue apoyado económicamente a través de los proyectos: CONAHCyT PRONAI 305184 y Proyecto SIP-IPN 20230746. La alumna Alejandra Vallejo Sánchez agradece a CONAHCyT por la beca de maestría (registro 1229055).

DEDICATORIA

A la vida misma por tenerme en este mágico lugar.

A mis padres por crear en mí, la lucha y fortaleza por conseguir mis sueños.

A mis hermanos que, desde la distancia, me ayudan a seguir paso a paso.

“Me gusta pensar en todas esas personas que me enseñaron cosas que nunca había imaginado antes”.

Charles Bukowski

AGRADECIMIENTOS

Es inusual y resultará egoísta para algunos, agradecer en primera instancia a la persona que desde siempre ha creído que puedo lograr los sueños, que los caminos que siempre elijo no son los más comunes, fáciles y conllevan un gran esfuerzo, dedicación, tristezas y alegrías, pero sobre todo, aprender a ser resiliente en el proceso. Esa persona soy yo misma, y me agradezco por culminar este proceso personal y profesional que me hizo ser una persona más sabia y no desfallecer en el intento.

Creo que necesitaría el mismo número de páginas que comprende esta tesis para escribir los agradecimientos, porque soy una persona afortunada de tener en mi vida un gran número de personas que me apoyan en cada instante de mi vida, que son pacientes al leer y escuchar los dramas que llevan el día a día. Por nombrar algunos círculos, la familia que estando lejos de la tierra se valora más y que por ellos, aunque hayan desacuerdos, siempre están ahí; los amigos(as), soy de las pocas personas que puede decir que tengo un gran número de amigos que realmente están en las buenas y las malas y que desde lejos atienden mis requerimientos personales; los nuevos amigos(as) que se incluyeron en la lista en estos dos años, espero dejar huella en sus corazones, porque ustedes la han dejado en mí y espero que la vida conforme nos unió, así mismo, perdure en el tiempo esa amistad.

Es primordial contar con el apoyo académico, porque sin este, no estuviera escribiendo estas palabras. Agradezco porque me dieron la oportunidad de enfrentar un nuevo reto, por ser los emisores de nuevos conocimientos, porque a veces me quería ubiqutinar, pero de la mano de ustedes, de mis directoras, de mis asesores (internos y externos), logré fluir y aplica la frase “lenta, pero segura”. Es un crecimiento exponencial el que se logra al final de este arduo proceso, tan así, que como dice una de las Dras. “y quedas con más ganas de seguir, que te postulas a un doctorado (¿masoquismo o gusto al arte?)”.

“me había olvidado que las personas normales tienen límites”
Sheldon Cooper

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	10
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. HIPÓTESIS	14
V. OBJETIVOS	15
5.1. OBJETIVO GENERAL	15
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1. LUGAR DE ESTUDIO Y COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.	16
6.2. PROPAGACIÓN DE PLÁNTULAS DE FRIJOL CRIOLLO PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	16
6.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE FRIJOLES CRIOLLOS	18
6.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN	18
6.3.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	19
6.4 ENSAYO UNO. SUSCEPTIBILIDAD A <i>S. SCLEROTIUM</i> Y TIEMPO DE MICORRIZACIÓN EN TRES MORFOTIPOS DE FRIJOL DE TRES COMUNIDADES DEL COFRE DE PEROTE, VERACRUZ	21
6.4.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE FRIJOLES CRIOLLOS	21
6.4.2. PROPAGACIÓN DE PLANTAS DE FRIJOLES CRIOLLOS Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE HMA	21
6.4.3. OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS A LAS 6 SEMANAS DE INOCULACIÓN	23
6.5. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES	24
6.5.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i> .	24
6.5.2. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD DE TRES MORFOTIPOS DE FRIJOL EN HOJA DESPRENDIDA	24
6.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
6.6. ENSAYO DOS. EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN SOBRE LA INFECCIÓN POR <i>S. SCLEROTIUM</i>	27
6.6.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE PLANTAS	27
6.6.2. PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN DE HMA. TINCIÓN DE RAÍCES CON WGA-ALEXA FLUOR 488	28 29
6.6.3. CÁLCULO DE PESO SECO TOTAL DE LA PLANTA	30
6.6.4. ENSAYO DE DEFENSA CONTRA <i>S. SCLEROTIUM</i> POR MICORRIZACIÓN EN HOJA DESPRENDIDA	30
6.6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1. COLECTA DE MATERIAL VEGETAL	32
7.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	33
7.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR	33
7.2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	34
7.3. ENSAYO UNO. SUSCEPTIBILIDAD A <i>S. SCLEROTIUM</i> Y TIEMPO DE MICORRIZACIÓN EN TRES MORFOTIPOS DE FRIJOL DE TRES COMUNIDADES DEL COFRE DE PEROTE	37
7.3.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE FRIJOLES CRIOLLOS	37
7.3.2. OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS A LAS 6 SEMANAS DE INOCULACIÓN	38
7.3.3. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD DE TRES MORFOTIPOS DE FRIJOL EN HOJA DESPRENDIDA	39
7.4. ENSAYO DOS. EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN SOBRE LA INFECCIÓN POR <i>S. SCLEROTIUM</i>	43
7.4.1. PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN DE HMA.	43
7.4.2. PESO SECO DE LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA Y ALTURA DE LA PLANTA	45
7.4.3. ENSAYO DE DEFENSA CONTRA <i>S. SCLEROTIUM</i> POR MICORRIZACIÓN EN HOJA DESPRENDIDA	47
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO UNO	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos empleados para la identificación molecular de los frijoles criollos	<u>18</u>
Tabla 2. Secuencias de referencia para la identificación de frijoles criollos	<u>20</u>
Tabla 3. Composición de la solución Long Ashton	<u>23</u>
Tabla 4. Medias del área de lesión a las 40 horas de infección en hoja desprendida de tres especies de frijol en tres comunidades de Cofre de Perote	<u>48</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localización geográfica de los municipios Ayahualulco, Xico y Acajete	<u>5</u>
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<u>8</u>
Figura 3. Procedimiento para obtención de plántulas para extracción de ADN. A-B. desinfección superficial de la semilla C-D. Germinación de semillas de frijol en cámara húmeda por de 5 días. E. Trasplante de semillas germinadas a macetas de 750 mL y obtención de plántulas	<u>17</u>
Figura 4. Ensayo de hoja desprendida para susceptibilidad y defensa por micorrización contra <i>S. sclerotiorum</i> .	<u>25</u>
Figura 5. Foliolos infectados con un disco de PDA con micelio de <i>S. sclerotiorum</i> . Los foliolos marcados con el color morado, indica que a las 40 horas la infección por el hongo llegó al borde de la hoja, esta hora se tuvo en cuenta para el análisis estadístico	<u>26</u>
Figura 6. Plantas de frijol sembradas en cuarto de crecimiento controlado. Las etiquetas azules son plantas de frijol de Matlalapa; etiquetas naranjas de Ocoatepec; y etiquetas moradas de Encinal II	<u>27</u>
Figura 7. Tinción de raíces para observación de estructuras fúngicas	<u>28</u>
Figura 8. Características morfológicas de tres morfotipos de frijol de la zona Cofre de Perote. Ayocote, flor característica color naranja a rojo, semillas de colores mantequilla, negro, pintos, violeta. Enredador, flor color lila a rosa, semillas pequeñas de colores azules, rosas, rojas. Gordo, flor color blanca, semillas ovaladas, grandes color mantequilla	<u>31</u>
Figura 9. Electroforesis en gel 1% con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV, de las extracciones de ADN genómico de plantas de frijol. MPM (marcador de peso molecular PROMEGA 1KB). Oco, Ocoatepec; Coa, Coatitilan; Sau, Saucal	<u>32</u>
Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR. ITS, (<i>trnL</i>) cloroplástico y el espaciador intergénico <i>rbcl</i> cloroplástico. 1. Control negativo. 2. MPM (Invitrogen). A-B-C. Morfotipo Ayocote, Ocoatepec planta PA2, Ocoatepec planta PB2, Matlalapa, Saucal, Zapotal. D-E-F. Morfotipo Enredador, Coatitilan, Encinal, Matlalapa, Ocoatepec, Ocoatepec mantequilla, Ocoatepec ojo de cabra, Saucal. G-H-I. Morfotipo Gordo, Coatitilan, Encinal, Matlalapa, Ocoatepec, Saucal, Zapotal	<u>34</u>
Figura 11. Filograma de máxima verosimilitud (ML) de 82 especies del género de <i>Phaseolus</i> de los acervos genéticos mesoamericano, andino y un acervo genético italiano, incluidos los morfotipos en estudio diferenciados por los colores amarillo (Acajete); azul (Ayahualuco); verde (Xico). La especie <i>Vigna unculata</i> se utilizó como grupo externo para enraizar el árbol. Los números a los lados del nodo indican los valores de robustez en porcentaje (1000 Bootstrap)	<u>35</u>
Figura 12. Plantas de frijol sembradas en cuarto de crecimiento controlado. Etiquetas azules pertenecían a las plantas de frijol de ayocote-Matlalapa, etiquetas naranjas a gordo-Ocoatepec y etiquetas moradas a enredador-Saucal	<u>37</u>
Figura 13. Observación al estereoscopio de estructuras fúngicas en raíces de frijoles criollos	<u>38</u>
Figura 14. Área de la lesión en foliolos de frijol, 40 h postinfección con <i>S. sclerotiorum</i> . A. Saucal, <i>P. vulgaris</i> . B. Ocoatepec, <i>P. dumosus</i> . C. Matlalapa, <i>P. coccineus</i> . Líneas en rojo indican el área de lesión medida en el programa ImageJ causada por <i>S. sclerotiorum</i> . A. 3.29 cm ² . B. 3.19 cm ² . C. 2.99 cm ² .	<u>39</u>
Figura 15. Área de la lesión en foliolos de frijol, 40 h postinfección con <i>S. sclerotiorum</i> . Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (ANOVA $P < 0.05$) n=5	<u>40</u>
Figura 16. Estructuras fúngicas de <i>R. irregularis</i> en la raíz de <i>P. coccineus</i> de la comunidad Ocoatepec. A. Estructuras fúngicas intra y extra radicales, He: hifa extra radical, A: arbúsculo, V: vesícula. B. Estructuras fúngicas intra radicales, Hi: hifas intra radicales, A: arbúsculo	<u>43</u>
Figura 17. Porcentaje de micorrización del sistema radical de tres especies de tres comunidades del Cofre de Perote Veracruz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes especies de las 7 comunidades. Kruskal- Wallis $P < 0.05$. n= 5	<u>44</u>
Figura 18. Peso seco de la parte aérea de tres especies de frijoles de tres comunidades del Cofre de Perote, NM: no micorrizado. MIC: micorrizado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los morfotipos de las comunidades. Prueba T de Student ($\alpha = 0.05$) n=5	<u>45</u>
Figura 19. Altura de la planta de tres especies de frijoles de tres comunidades del Cofre de Perote. NM: no micorrizado. MIC: micorrizado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los morfotipos de las comunidades. Prueba T de Student ($\alpha = 0.05$) n=5	<u>46</u>
Figura 20. Foliolos infectados por <i>S. sclerotiorum</i> a las 40 h postinfección en el tratamiento micorrizado y el control. A. Matlalapa, <i>P. coccineus</i> . B. Matlalapa, <i>P. vulgaris</i> . C. Matlalapa, <i>P. dumosus</i> . D. Ocoatepec, <i>P. coccineus</i> . E. Ocoatepec, <i>P. vulgaris</i> . F. Ocoatepec, <i>P. dumosus</i> . G. Encinal II, <i>P. vulgaris</i> . H. Encinal II, <i>P. dumosus</i> . Con * foliolos provienen de plantas micorrizado, sin * foliolos de plantas no micorrizadas	<u>48</u>

RESUMEN

Conocer y conservar la diversidad de los frijoles criollos, es de gran importancia para la cultura, economía, alimentación y salud de las familias mexicanas. La micorrización es una interacción benéfica planta-hongo, que mejora la absorción de nutrientes y agua, promoviendo el desarrollo de estas. También, esta asociación simbiótica induce la resistencia por micorrización en la planta, lo cual le confiere protección contra estreses bióticos como el causado por el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, que causa la enfermedad del moho blanco en los cultivos de frijol. Por otro lado, la identificación molecular de especies criollas de frijol y el efecto de la micorrización sobre su crecimiento y defensa contra patógenos, es limitado en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. Por lo tanto, en la presente tesis se caracterizó molecularmente a los frijoles gordo, ayocote y enredador de los tres municipios mencionados para asignarles su identidad taxonómica de manera precisa. También, se probó la resistencia y/o susceptibilidad de cada uno de estos morfotipos ante un fitopatógeno necrotrofo ubicuo que ataca comúnmente especies de frijol en otras zonas del país y del mundo y finalmente se investigó si estos frijoles son capaces de manifestar resistencia inducida por micorrización, característica que puede resultar beneficiosa no solamente contra un patógeno en particular, sino de manera más general, todo esto utilizando plantas obtenidas de semillas colectadas cada una de las localidades de los municipios de Acajete, Ayahualulco y Xico en el estado de Veracruz. Las semillas se colectaron en siete comunidades de tres municipios: Ayahualulco (Ocotepéc), Xico (Matlalapa, Xico Viejo) y Acajete (Coatitlán, Encinal II, El Saucal, El Zapotal). Se realizó un análisis filogenético multigen de los genes cloroplásticos *trnL* y *rbcL*, y la región ITS del ADNr. Los tres morfotipos de frijol se inocularon con *Rizhophagus irregularis* y se mantuvieron bajo condiciones controladas por 10 semanas, tiempo en el que se evaluó el crecimiento (altura y peso seco total de la parte aérea de la planta), porcentaje de micorrización y el área de lesión en folíolos en ensayos de hojas desprendidas en plantas micorrizadas y se compararon con las no micorrizadas. Como resultado se obtuvo que los diferentes morfotipos pertenecen a las especies *P. coccineus* (ayocote), *P. vulgaris* (enredador) y *P. dumosus* (gordo). Al comparar las variables morfométricas de cada frijol en condiciones de micorrización y no micorrización, solo se observó un aumento en biomasa bajo la condición de NO micorrización en el morfotipo enredador de la comunidad Encinal II. Las especies con mayor porcentaje de micorrización fueron *P. vulgaris* (74 %) y *P. dumosus* (72%) de la comunidad Ocotepéc. En cuanto a la inducción de defensa por micorrización, las especies *P. vulgaris* de la comunidad Encinal II, *P. coccineus* de la comunidad Ocotepéc y *P. dumosus* de la comunidad Matlalapa mostraron mayor tolerancia al patógeno en plantas micorrizadas, mientras que la especie *P. dumosus* de la comunidad Encinal II, no mostro tolerancia al patógeno en plantas micorrizadas.

I. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus* spp.) pertenece a la familia de las fabáceas, es originario de América y se ha cultivado durante millones de años. Hasta el día de hoy juega un papel importante en la alimentación de diversas culturas en el mundo, gracias a su contenido nutricional constituido por carbohidratos complejos, vitaminas como el complejo B, tiamina, riboflavina, ácido fólico y minerales como hierro, magnesio, zinc, calcio y fósforo (Singh *et al.*, 1991). Lo frijoles han sido adaptados y cultivados a las condiciones locales de varias regiones del mundo dando como resultado genotipos con diferencias fenológicas, morfológicas, genéticas, entre otras. Se conocen dos acervos genéticos que se encuentran ampliamente distribuidos: Andino (Bolivia, Sur de Perú y Noroeste de Argentina) y Mesoamericano (desde Colombia al Norte de México) (Mex-Álvarez *et al.*, 2021).

México es considerado centro de origen del frijol por contar con una amplia diversidad de variedades criollas y especies silvestres, cada una adaptadas a sus zonas de cultivo, que oscilan entre los 10 y 3000 msnm (Mex-Álvarez *et al.*, 2021). En 1943, en diferentes regiones del país, se hizo la primera colecta de germoplasma nativo como: *P. vulgaris* var. *mexicanus*, *P. coccineus* subsp. *coccineus*, *P. aculifolius* var. *latifolius*, *P. lunatus* var. *silvester* y *P. polyanthus* var. *polyanthus*, para hacer mejoramientos genéticos aprovechando sus características morfoagronómicas, fisiológicas y fitopatológicas, de las cuales se obtuvieron las primeras variedades mejoradas del país como: Rocarnex I, Mex-38-1, Azufrado 100, Bayo Durango, Canario 78, entre otras (Cárdenas *et al.*, 1996).

En México, el programa de mejoramiento genético de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ha liberado las variedades de frijol con mayor demanda en el país como lo son los Azufrados (Azufrado higuera), Blanco (Aluyori), Rositas (Flor de mayo Eugenia), Negros (Negro altiplano), Pintos (Pinto centenario), Rojos (Rojo INIFAP), cada uno de ellos se adaptan a diferentes alturas que van desde los 10 msnm hasta los 2600 msnm (Ayala, 2021). Los esfuerzos por obtener variedades mejoradas que sean tolerantes a plagas, enfermedades y cambio climático, se ven reflejados en la producción nacional de frijol; la secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) estableció que para el año 2021 los principales estados

de producción de frijol comercial se encuentran en tres grandes regiones, que incluyen 22 entidades federativas y concentran el 96% de la producción del frijol en México: la región del Altiplano semiárido- Bajío-Valles Altos, la región costera del Golfo, y la región costera del Pacífico. Más del 61% de la producción nacional se concentra en la región del Altiplano semiárido y El Bajío. Los estados con mayor producción de frijol en el país son Zacatecas (670 mil 668 ton), Sinaloa (87 mil 683 ton), Nayarit (73 mil 709 ton) Chiapas (67 mil 600 ton), Durango (50 mil 869 ton) y por último Veracruz (34 mil 591) (SIAP, 2021).

Los programas de fitomejoramiento iniciaron hace aproximadamente 80 años en el mundo, los cuales sin duda han llevado al aumento en la productividad de los cultivos de manera dramática, sin embargo, al cabo de los años ha quedado claro que el uso de variedades mejoradas ha llevado a disminuir la riqueza genética y específica, gracias a la transformación de una agricultura tradicional a una agricultura intensiva. Variedades comerciales mejoradas son impuestas para sembrar en monocultivos perdiendo cada ciclo de siembra la tolerancia natural a plagas, enfermedades, cambios en temperaturas y adaptación a diferentes tipos de suelos (Saburido y Herrera, 2015).

Para conservar la diversidad del frijol criollo se debe mantener una agricultura tradicional en los campos de pequeños agricultores, una conservación *in-situ*, manteniendo los hábitos de crecimiento característicos de cada variedad, las condiciones agroambientales en las que se desarrollan, los sistemas de producción con los que se cultivan (milpa) y respetando el manejo sustentable de los campesinos (León *et al.*, 2020).

Los estados con menor producción de frijol en el país en el año 2021 se encuentran por debajo de las 57 mil toneladas, siendo los estados de Ciudad de México, Baja California Sur, Quintana Roo, entre otros (SIAP, 2021). A pesar de sus bajas producciones, la conformación de los acervos genéticos de las poblaciones silvestres de frijol, así como de otros parientes silvestres del género *Phaseolus* en estas zonas, son de gran importancia ya que albergan genes de tolerancia a factores bióticos como plagas y enfermedades, y factores abióticos como los cambios de temperaturas, sequías, exceso de agua, que pueden ser sometidos a programas de fitomejoramiento para ampliar la base genética del cultivo de frijol (Bellón *et al.*, 2009).

El estado de Veracruz de Ignacio de la Llave no está actualmente entre los estados con mayor producción de frijol a nivel nacional, a pesar de que en los años 2012 al 2018 sí se ubicaba en la lista de los 15 estados de mayor producción de frijol del país. Esta disminución en la producción ha sido resultado del cambio climático y la susceptibilidad a plagas y enfermedades que han afectado a las variedades sembradas en esta región (SIAP, 2018). Sin embargo, en la zona alta del eje Neovolcánico, algunos municipios del estado de Veracruz guardan una alta diversidad de frijoles criollos, que es de importancia estudiar y conservar.

El estado de Veracruz es una de las 32 entidades federativas de los Estados Unidos Mexicanos, ubicado en la zona centro-este del país; colinda al este con el Golfo de México, al noreste con la Sierra Madre Oriental, al norte con el eje Neovolcánico y abarca una superficie de 72,410 km². La división política se compone de 212 municipios, caracterizados por la abundancia de recursos naturales y donde se inició la historia de la investigación agrícola del país en los cultivos de maíz, frijol, frutales, arroz, entre otros (SEGOB, 2018).

De los 212 municipios, Acajete, Ayahualulco y Xico, pertenecen al eje Neovolcánico en la zona conocida como el Cofre de Perote, que se ubica en la zona centro-oeste del estado de Veracruz. La parte más elevada de la montaña Cofre de Perote o Naucampatepetl (Cerro de cuatro lados, en náhuatl) se ubica a 3000 msnm.

Acajete se encuentra ubicado hacia la vertiente nor-oriental del Cofre de Perote, sus coordenadas son 19° 35' latitud norte y 97° 01' longitud oeste, con una altura de 2,020 msnm. Su vocación económica es industrial y de comercio de productos alimenticios y de confección, en la ruta Ciudad de México-Xalapa-Puerto de Veracruz. En producción agrícola destaca la siembra de cebada, maíz, frijol y diferentes frutales, como manzanas, peras, ciruelas y duraznos, así como los derivados de la planta del maguey, sin embargo, la mayoría de sus pobladores aún subsisten de lo que cosechan de su propio campo, conservando la siembra de milpa como principal fuente de alimento (PMD Acajete, 2022) (**Fig. 1**).

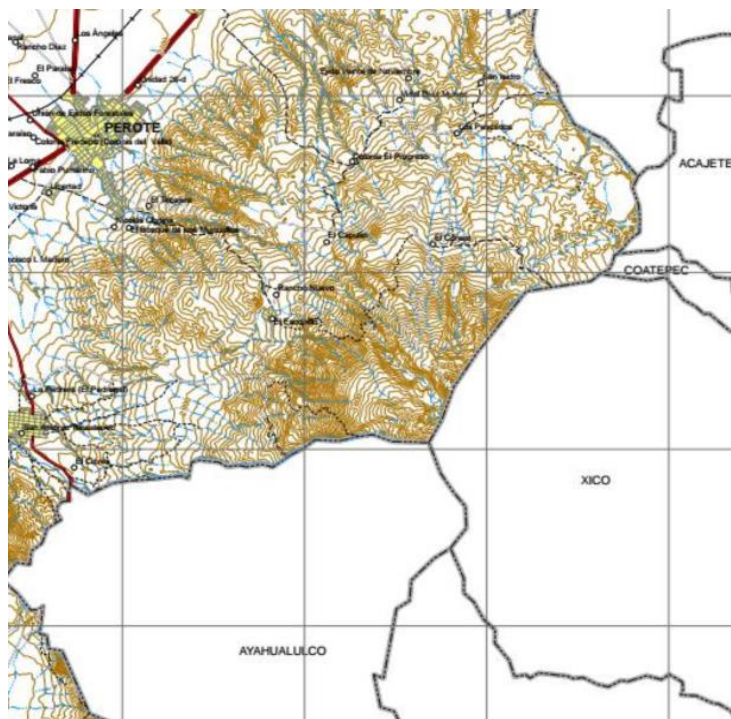


Figura 1. Mapa de localización geográfica de los municipios Ayahualulco, Xico y Acajete.

El municipio de Ayahualulco está ubicado en la zona centro montañosa, sus coordenadas son: 19°21' latitud norte y 97°09' longitud oeste, y se encuentra a una altura de 2060 msnm. La economía del municipio se basa en la agricultura, el 73.3% de la superficie es dedicada a esta actividad, entre ellos se encuentran el cultivo de papa, maíz, haba, frijol y chícharo. A pesar de que más de la mitad del territorio se encuentra sembrado, la comercialización de los productos es baja, siendo preferentemente utilizados para autoconsumo, lo que limita la generación de recursos económicos y trae como consecuencia que más del 65% de la población sea económicamente inactiva, dedicándose solo a los quehaceres del hogar y al trabajo de la milpa para la obtención de sus alimentos (PDM Ayahualulco, 2022).

El municipio de Xico, Veracruz se ubica entre los paralelos 19° 22' y 19° 33' de latitud norte; los meridianos 96° 54' y 97° 09' de longitud oeste; con una altura de 1320 m. En el año 2020, el principal sector productivo fue el terciario donde el 50% de sus pobladores se encontraron en una economía activa. El sector secundario se encuentra en el segundo lugar con un 29%

de la población activa integrada por la industria de la transformación de la materia prima, el petróleo y la minería. El sector primario se encuentra en tercer lugar en actividades como la pesca, ganadería y agricultura. En este municipio los principales cultivos son el café cereza y la caña, sin embargo, al igual que los pobladores de los anteriores municipios, en Xico siguen resguardando la siembra de la milpa para contribuir con la seguridad alimentaria y nutricional de las comunidades y conservar la diversidad genética de los cultivos, entre ellos los más importantes y básicos que se siembran en co-cultivo maíz y frijol (PMD Xico, 2022).

En la zona de Ayahualulco, Xico y Acajete, en el estado de Veracruz existe una diversidad de frijoles que son sembrados como componentes de la milpa o colectados para su consumo, entre ellos se encuentran los frijoles denominados comúnmente como enredador, gordo y ayocote, que son con frecuencia los más utilizados por los habitantes en su alimentación. Aunque estos frijoles son reconocidos por los pobladores de estas zonas del país y han sido identificados por su morfología, su identificación taxonómica inequívoca a nivel molecular no ha sido aun llevada a cabo.

Estos frijoles, como otras especies vegetales, son capaces de establecer interacciones con microorganismos de la rizosfera. Con respecto a microorganismos benéficos, estos frijoles en condiciones naturales se asocian con hongos micorrízicos arbusculares (Martínez-Camacho *et al.*, 2022), y ya que son especies leguminosas, también con bacterias endosimbiontes fijadoras de nitrógeno (López-López, 2013). Aunque estas interacciones pueden resultar relevantes para que estas plantas prosperen en el campo, existe poca información sobre dichas relaciones.

La simbiosis micorrízica arbuscular provee tanto ventajas para la planta como para el hongo simbiote. Mientras la planta adquiere nutrientes minerales del suelo como fósforo (P), nitrógeno (N), agua, entre otros, a través del hongo, la planta abastece al hongo con compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis en forma de carbohidratos y lípidos (Parniske, 2008a). Para el establecimiento de esta interacción mutualista se requiere de una cascada de señalización molecular que inicia con la secreción de metabolitos especializados por parte de la planta como las estrigolactonas, las cuales son reconocidas por el hongo y favorecen la síntesis y secreción de los factores de micorrización (Factor Myc). Los Factores

Myc son reconocidos por receptores tipo cinasas (RLKs), ubicados en la superficie celular de las plantas, con lo que se estimula el desarrollo y ramificación de las hifas del hongo. Posteriormente, las hifas de los hongos forman una estructura de adhesión en la epidermis de la raíz denominada hifopodio o apresorio. Por otro lado, las células epidérmicas de la raíz sufren una reestructuración subcelular formando el aparato de pre-penetración (APP), el cual se extiende hacia las células del córtex interno para posteriormente formar los arbusculos y vesículas, que a partir de estas estructuras especializadas comienza el intercambio de nutrientes, agua y minerales (Parniske, 2008b; Silipo *et al.*, 2009; Oldroyd, 2013; Sarmiento *et al.*, 2020).

Aunado al beneficio nutricional, la asociación micorrízica confiere a la planta tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico, tales como salino e hídrico, y ante estrés biótico como resistencia a patógenos (Pozo y Azcón -Aguilar, 2007). A este respecto, se ha reportado que esta asociación simbiótica desarrolla en las plantas un mecanismo conocido como resistencia inducida por micorrización (MIR), el cual es un estado fisiológico y bioquímico que aumenta la capacidad de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos y ante otros tipos de estrés abióticos. Se sabe que MIR es un proceso efectivo ante un amplio rango de estrés bióticos y abióticos, y se ha propuesto como una estrategia potencialmente útil para la protección de cultivos agrícolas ante los nuevos retos asociados al cambio climático (Usman *et al.*, 2021). En algunas especies vegetales, la inducción de la resistencia conduce a una activación más rápida e intensa, de su respuesta de defensa tras la detección de condiciones adversas, un fenómeno llamado “priming” (preacondicionamiento).

La MIR, al ser una respuesta no específica del sistema de defensa de las plantas, puede estudiarse empleando fitopatógenos de importancia o modelos, en el cultivo de interés. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es un hongo fitopatógeno, causante del moho blanco en frijol, presente en todo el mundo. Aunque es más importante en las zonas templadas de los hemisferios norte y sur, también puede ser un problema en zonas de clima tropical o árido, especialmente durante las estaciones frescas o en condiciones microclimáticas favorables como se presenta en el estado de Sinaloa, causando pérdidas de hasta el 70% en su producción (Apodaca-Sánchez, 2006).

S. sclerotiorum al infectar a la planta hospedante, produce hifas que son de color blanco en su estado inicial, después el micelio se compacta formando estructuras que se tornan color gris oscuro conformando así los esclerocios. Estos esclerocios desarrollan una superficie endurecida y melanizada, son de forma irregular, aplanados y el tamaño de su diámetro varía de 2 a 10 mm (Schwartz *et al.*, 1988). Estas estructuras permanecen viables en el suelo por períodos de hasta 10 años, lo que hace a este patógeno muy difícil de erradicar (Agrios, 2005) (Fig. 2).



Figura 2. Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*. **1.** Etapa asexual: los esclerocios germinan bajo condiciones de alta humedad y temperatura moderada, produciendo un micelio con apariencia algodonosa. Este penetra en las plantas a nivel del suelo a través de aberturas naturales o mecánicas. El hongo crece en la planta infectada y forma nuevos esclerocios que caen al suelo, reiniciando el ciclo. **2.** Etapa sexual, los esclerocios también son de gran importancia. En ellos se desarrollan apotecios, que contienen ascas con ascosporas. Estas se dispersan con el viento y se depositan en distintos órganos de la planta. Las ascosporas germinan de manera rápida y causan infecciones, siendo las partes senescentes, como flores marchitas, especialmente vulnerables. A partir de aquí, el hongo se propaga a otros órganos de la planta, desarrollando micelio blanco y algodonoso. Sobre este micelio se forman esclerocios que caen al suelo, reiniciando el ciclo. Modificado de Negrillo *et al.* (2009).

Cabe destacar que esta enfermedad no ha sido reportada para frijol criollo en el estado de Veracruz en la zona del Cofre de Perote, sin embargo, es un patógeno modelo con el cual investigar si plantas de frijol criollo de los morfotipos gordo, ayocote y enredador son capaces de inducir resistencia por micorrización ante patógenos en los frijoles estudiados. Esta característica puede ser beneficiosa para este tipo de frijoles que se cultivan en ambientes como la milpa, en el cual la interacción con múltiples especies vegetales y la interacción con una gran diversidad de microorganismos del suelo puede resultar benéfica. Desde un punto de vista agronómico, la capacidad de manifestar MIR puede resultar una alternativa de manejo de enfermedades fúngicas (con necrotrofo) en conjunto con otras dentro de un manejo integrado de plagas y enfermedades (Trejo *et al.*, 2022).

II. ANTECEDENTES

El género *Phaseolus* cuenta con 65 especies reconocidas actualmente, de las cuales 52 se encuentran presentes en México y se considera que 31 de ellas son endémicas del país (Delgado-Salinas y Gama-López, 2015). Solo cinco especies del género se han domesticado y son cultivadas principalmente en sistemas tradicionales, de baja tecnificación y superficie.

Los primeros estudios de diversidad de especies del género *Phaseolus* presentes en México datan de los años 80's y 90's, en los que se utilizaron principalmente técnicas morfológicas. La introducción de marcadores moleculares en los estudios de *Phaseolus*, permitió una comprensión más profunda de la diversidad de especies en México. Delgado *et al.* (1999 ;2006), realizaron estudios filogenéticos utilizando marcadores cloroplásticos (como *trnK* y *trnL*) y nucleares (como ITS), que han sido cruciales para conocer las relaciones evolutivas dentro del género *Phaseolus*. Estos estudios revelaron que el género comprende varias especies agrupadas en dos grandes clados y grupos de especies: **clado (a): Grupo Pauciflorus** (*Phaseolus amblyosepalus*, *P. anisophyllus*, *P. leptophyllus*, *P. nelsonii*, *P. parvulus*, *P. pauciflorus*, *Phaseolus perplexus*, *P. plagiocylis*, *P. pluriflorus* y *P. tenellus*). **Grupo Pedicellatus** (*Phaseolus albiflorus*, *P. altimontanus*, *P. dasycarpus*, *P. esperanzae*, *P. grayanus*, *P. pyramidalis*, *P. palmeri* Piper, *P. telulensis*, *P. laxiflorus*, *P. neglectus*, *P. albiviolaceus*, *P. trifidus*, *P. pedicellatus*, *P. purpusii*, *P. scabrellus* y *P. polymorphus*). **Grupo Tuerckheimii** (*P. campanulatus*, *P. chiapasanus*, *P. esquincensis*, *P. gladiolatus*, *P. hintonii*, *P. oligospermus*, *P. tuerckheimii*, *P. xanthotrichus* y *P. zimapanensis*) y **clado (b): Grupo Lunatus** (*Phaseolus augusti*, *P. bolivianus*, and *P. pachyrrhizoides*, *P. lignosus*, *P. mollis*, *P. bolivianus*, *P. lignosus*, *P. lunatus*, *P. mollis*, *P. pachyrrhizoides* y *P. viridis*). **Grupo Filiformis** (*Phaseolus macvaughii* and *P. microcarpus*, *Phaseolus angustissimus*, *P. carterae* y *P. filiformis*). **Grupo Vulgaris** (*P. acutifolius* y *P. parvifolius*, *Phaseolus parvifolius*, *P. acutifolius*, *P. albescens*, *P. coccineus*, *P. costaricensis*, *P. dumosus*, *P. parvifolius*, *P. persistentus* y *P. vulgaris*). **Grupo Leptostachyus** (*P. leptostachyus*, *P. macvaughii* y *P. micranthus*). **Grupo Polystachios** (*P. albinervus*, *P. jaliscanus*, *P. juquilensis*, *P. maculatifolius*, *P. maculatus*, *P. marechalii*, *P. nodosus*, *P. novoleonensis*, *P. polystachios*, *P. reticulatus*, *P. ritensis*, *P. rotundatus*, *P. salicifolius*, *P. sinuatus*, *P. smilacifolius*, *P. sonorensis* y *P. xolocotzii*).

De acuerdo con Delgado-Salinas y Gama-López (2015), en el occidente de México se registra el mayor número especies del género *Phaseolus*, siendo los estados de Durango, Jalisco y Oaxaca los que albergan una mayor diversidad de especies y, por el contrario, la Península de Yucatán, Tabasco y Tlaxcala, registran el menor número de especies. Se estima que en el estado de Veracruz se encuentran de 8 a 13 especies de *Phaseolus*, entre las que podemos mencionar a *P. chiapasanus*, *P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. glabellus*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. pedicellatus*, *P. scabrellus* y *P. vulgaris*. Estos materiales predominan en los bosques húmedos de montaña en el estado.

Se desconoce en gran medida sobre las enfermedades que afectan a los frijoles criollos, puesto que este tipo de estudios se ha enfocado principalmente a las variedades mejoradas, con alto valor económico. En el estado de Durango, Santana *et al.* (2022) estudiaron la susceptibilidad de 26 variedades criollas de frijol a la antracnosis, roya y bacteriosis común. Observaron una mayor incidencia y susceptibilidad a la antracnosis y bacteriosis común, así como ausencia de síntomas de roya en todas las variedades estudiadas. Los autores atribuyen estos resultados a las condiciones climáticas y a la genética de los materiales, que favorecen el desarrollo de ciertas enfermedades en la región.

Pocos estudios se han realizado sobre el uso de organismos benéficos para el crecimiento y la defensa contra patógenos en frijoles criollos, y los esfuerzos se han enfocado a las variedades comerciales. El trabajo con hongos micorrízicos arbusculares han demostrado tener un efecto positivo en cuanto a la resistencia de la planta contra patógenos (Pozo y Azcón, 2007).

Mora-Romero *et al.* (2015), estudiaron cómo la respuesta de defensa en los cultivos de frijol y tomate es inducida por la simbiosis el hongo micorrízicos arbuscular *R. irregularis*. Para esto se utilizaron tres genotipos diferentes de frijol y dos genotipos de tomate, estos fueron inoculados con *S. sclerotiorum* y con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* respectivamente, en ensayos de hoja desprendida, después de haber sido micorrizada la planta. Encontraron que un genotipo de tomate y dos de frijol mostraron inducción de defensa por micorrización, aunque esta respuesta no se observó en la variedad de frijol Azufrado

Higuera, ni en la variedad MicroTom de tomate, mostrando que la inducción de defensa por micorrización es dependiente del genotipo del simbionte vegetal.

Los mecanismos de inducción de defensa contra fitopatógenos dados por el proceso de micorrización son atribuidos a diferentes factores tales como el estado nutricional de la planta, el ambiente en donde se desarrollan, los cambios estructurales de las raíces por la regulación bioquímica y molecular que se da por el intercambio de señales químicas entre la planta y el hongo y la expresión génica que induce la defensa de plantas micorrizadas como se demuestra en el estudio realizado por López-Meyer *et al.* (2021). En este trabajo se tuvo como objetivo evaluar el efecto de la colonización con *R. irregularis* y la aplicación exógena de metil jasmónico (MeJA) en la susceptibilidad a *S. sclerotiorum* y en la expresión de los genes *PvLOX2* y *PvLOX6* en respuesta a la infección con el patógeno en frijol variedad Azufrasin (Mora-Romero *et al.*, 2015). Los resultados sugirieron que la colonización micorrízica y la aplicación exógena de MeJA tuvieron un efecto aditivo en la defensa contra el patógeno.

Otros autores han demostrado que la colonización micorrízica arbuscular induce defensa contra patógenos, no solo de tallos y hojas como en Mora-Romero *et al.* (2015), sino también de raíz (Abdel-Fattah *et al.*, 2011; Eke *et al.*, 2016). También se ha reportado que genes relacionados con defensa son diferencialmente expresados en plantas micorrizadas con respecto a no colonizadas (Nanjareddy *et al.*, 2017; Hafez *et al.*, 2013).

III. JUSTIFICACIÓN

La región del Cofre de Perote, Veracruz, se distingue por albergar una biodiversidad única de especies criollas y nativas de frijol, las cuales juegan un papel importante en las prácticas agrícolas, la cultura, la seguridad alimentaria y nutricional de las personas que habitan las milpas, y en la economía local. Esta diversidad genética no solo contribuye a la preservación de cultivos tradicionales, sino que también, representa un reservorio valioso de genes que pueden conferir tolerancia a condiciones ambientales adversas, plagas y enfermedades.

Tres de los morfotipos más comunes de frijol en la región de los municipios de Acajete, Ayahualulco y Xico en Veracruz, son los denominados comúnmente como gordo, ayocote y enredador. Sin embargo, su caracterización molecular e identificación taxonómica inequívoca no ha sido llevada a cabo.

Actualmente se desconoce si los frijoles criollos del estado de Veracruz poseen la capacidad de mostrar MIR ante un estrés biótico, particularmente ante la presencia de un patógeno. El estudio de los frijoles criollos de la zona del Cofre de Perote, Veracruz, permitirá ampliar el incipiente conocimiento que existe sobre estos valiosos recursos genéticos para enfatizar la importancia de la conservación de la biodiversidad de estos frijoles criollos, y fomentar un uso más eficiente de los recursos naturales. Además, la identificación de genotipos capaces de responder a la interacción con microorganismos benéficos tales como los hongos micorrízicos arbusculares, proporcionará conocimientos clave para su potencial utilización en el desarrollo de estrategias de manejo integrado de enfermedades en estos y otros cultivos de importancia económica.

IV. HIPÓTESIS

1. Los morfotipos de frijoles criollos del Cofre de Perote pertenecen a distintas especies de *Phaseolus* y presentan susceptibilidad a *S. sclerotiorum*.
2. La micorrización arbuscular no promueve un aumento en el crecimiento de frijoles criollos del Cofre de Perote.
3. La micorrización arbuscular induce la defensa a la infección por *S. sclerotiorum* en cada uno de los morfotipos ayocote, enredador y gordo de tres comunidades.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar molecularmente tres morfotipos de frijoles criollos utilizados en milpas en comunidades del Cofre de Perote, Veracruz, y evaluar su susceptibilidad a *S. sclerotiorum* en condiciones de micorrización arbuscular.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Identificar molecularmente frijoles criollos del Cofre de Perote, Veracruz, empleando un análisis filogenético multigen.

5.2.2. Evaluar la susceptibilidad de cada morfotipo de frijol a la infección por *S. Sclerotiorum* en condiciones controladas.

5.2.3. Evaluar el efecto de la micorrización arbuscular en el porcentaje de micorrización, el crecimiento y en la inducción de defensa de cada morfotipo de frijol de tres comunidades de la zona del Cofre de Perote, Veracruz a *S. sclerotiorum*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Lugar de estudio y colecta del material vegetal.

Se colectaron semillas de tres morfotipos de frijol (gordo, ayocote y enredador), en siete comunidades de la zona del Cofre de Perote, distribuidas en tres municipios del estado de Veracruz: Acajete (Encinal, Saucal, Zapotal), Ayahualulco (Ocotepéc) y Xico (Coatitlan, Matlalapa y Xico Viejo). Los productores de cada comunidad donaron las semillas de las variedades que tenían en existencia y la cantidad que les fue posible de acuerdo con su reserva para autoconsumo y siembra del siguiente ciclo.

6.2. Propagación de plántulas de frijol criollo para la identificación molecular

Por cada comunidad, se utilizaron dos semillas de cada una de las variedades de frijol criollo colectado. Las semillas se lavaron en una solución de etanol al 50% con agitación constante por un minuto. Se descartó el etanol y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 0.3%, agitando suavemente durante 5 minutos. La solución de hipoclorito se decantó y las semillas se lavaron cinco veces con abundante agua destilada estéril por un minuto o hasta eliminar el cloro residual. En una toalla sanitaria estéril se colocaron las semillas por 5 minutos para su secado. Por último, las semillas se colocaron en una cámara húmeda para su germinación, incubándose a 25°C en total oscuridad por 5 días o hasta su germinación. Las semillas germinadas se trasplantaron a macetas de 750 mL que contenían sustrato PROMIX FLX (turba de sphagnum), y se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad, hasta obtener sus primeras hojas verdaderas (**Fig. 3**). Las plantas se regaron día de por medio con 200 mL de agua.

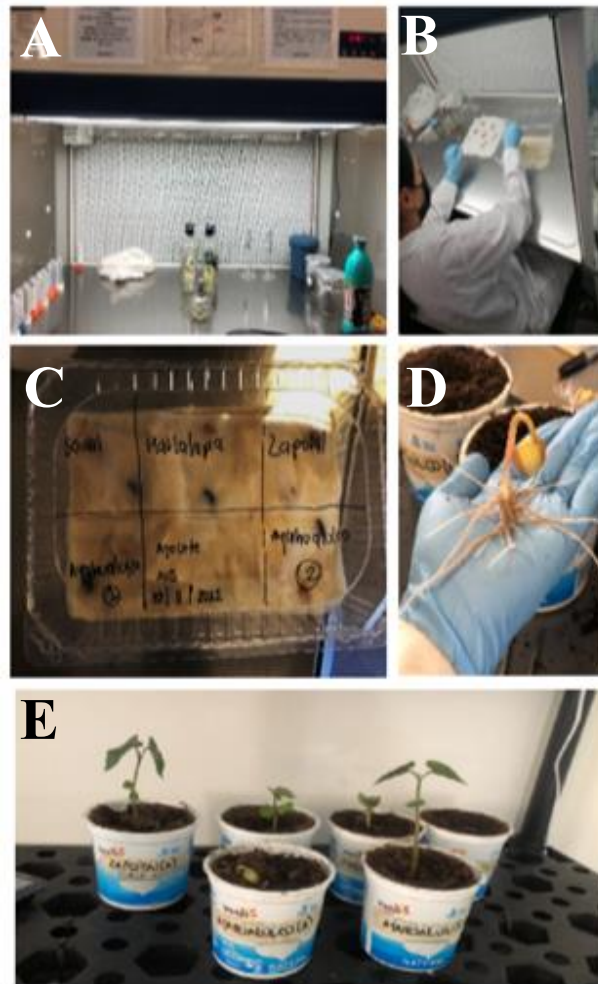


Figura. 3. Procedimiento para obtención de plántulas para extracción de ADN. A-B. desinfección superficial de la semilla C-D. Germinación de semillas de frijol en cámara húmeda por de 5 días. E. Trasplante de semillas germinadas a macetas de 750 mL y obtención de plántulas.

6.3 Identificación molecular de frijoles criollos

6.3.1. Extracción de ADN, PCR y secuenciación

El ADN genómico se extrajo de las primeras hojas verdaderas con el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, aplicando un voltaje constante de 80 V por 20 minutos. El gel se visualizó en un fotodocumentador Chemidoc (BIO-RAD, Hércules, California, United States of America).

Para la identificación de especies, se amplificaron la región ITS del ADN ribosomal, el intrón *trnL* y el espaciador intergénico *rbcl* del ADN cloroplástico, empleando los oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos empleados para la identificación molecular de los frijoles criollos.

Marcador	Cebador	Secuencia del oligo (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Referencia
Intrón <i>trnL</i>	<i>trnL_F</i>	GGATAGGTGCAGAGACTCRATG GAAG	56	357	Nicolé <i>et al.</i> 2011a
	<i>trnL_R</i>	TGACATGTAGAATGGGACTCTAT CTTTAT			
ITS	ITS1	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	55	401	White <i>et al.</i> 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
rbcl	<i>rbcl_F</i>	GCAGCATTYCGAGTAASTCCYCA	56	543	Nicolé <i>et al.</i> unpublished
	<i>rbcl_R</i>	GAAACGYTCTCTCCAWCGCATAAA			

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 mL, los cuales contenían 17.65 mL de agua ultrapura (H₂OUP), 2.5 mL de Buffer MgCl, 0.75 mL de MgCl₂ (1.5 mM), 0,5 mL de cada dNTP (desoxirribonucleótido;0.5 mM), 1.25 mL de cada oligonucleótido (0.4 mM) (ITS1-ITS4, *trnL* F-*trnL* R y *rbcL* F-*rbcL* R), 0.1 mL de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil, Cat. No. 11615–050) y 1 mL de ADN. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de una desnaturalización a 95 °C por 40 s, hibridación a 55 °C (ITS) / 56 °C (*trnL* y *rbcL*) por 40 s/45 s, una extensión a 72 °C por 40 s, y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Se utilizó un termociclador modelo TC1000-G (DLAB Scientific Inc, Los Angeles, United States of America).

Para confirmar la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, aplicando un voltaje constante de 80 V por 20 min. El gel se visualizó en un fotodocumentador Chemidoc (BIO-RAD, Hércules, California, United States of America).

Los productos de PCR se purificaron con el kit Qiaquick PCR purification (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se cuantificaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000C, con 1 mL de ADN por muestra. Los fragmentos se secuenciaron unidireccionalmente con los oligonucleótidos ITS1, *trnL* F y *rbcL* F.

6.3.2. Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas con cada marcador o región fueron editadas con el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y comparadas en la base de datos GenBank utilizando la herramienta BLAST y el algoritmo Megablast. Las relaciones filogenéticas se reconstruyeron de manera independiente con cada marcador molecular y concatenando las secuencias de los tres marcadores.

Los alineamientos se realizaron con secuencias de referencia de distintas especies del género *Phaseolus* (**Tabla 2**) (Delgado *et al.*, 1999c; Delgado *et al.*, 2006b; Nicolé *et al.*, 2011b), utilizando el alineador MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Para cada alineamiento se estimó el mejor esquema de partición y

modelo de sustitución nucleotídica utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC) en PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012). La inferencia filogenética se realizó utilizando el método de Máxima Verosimilitud (ML) en el programa RAXML v 8 (Stamatakis 2014), empleando el mejor modelo de sustitución nucleotídica y particiones, así como 1000 réplicas Bootstrap.

Tabla 2. Secuencias de referencia para la identificación de frijoles criollos.

Especie	No. de acceso en GeneBank		
	ITS	<i>trnL</i>	<i>rbcL</i>
<i>Phaseolus coccineus</i> (México)	GQ411782	GQ411558	GQ411886
<i>Phaseolus coccineus</i> (Italia)	GQ411783	GQ411559	GQ411885
<i>Phaseolus coccineus</i> (Italia)	GQ411781	GQ411557	GQ411884
<i>Phaseolus lunatus</i> (Guatemala)	GQ411780	GQ411556	GQ411888
<i>Phaseolus lunatus</i> (Italia)	GQ411779	GQ411555	GQ411887
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411798	GQ411576	GQ411617
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Argentina)	GQ411811	GQ411613	GQ411882
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Argentina)	GQ411817	GQ411612	GQ411881
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Argentina)	GQ411813	GQ411582	GQ411880
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Argentina)	GQ411814	GQ411611	GQ411879
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411593	GQ411796	GQ411878
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411785	GQ411614	GQ411877
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411798	GQ411576	GQ411876
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Italia)	GQ411819	GQ411615	GQ411875
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Italia)	GQ411831	GQ411616	GQ411874
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Italia)	GQ411820	GQ411610	GQ411873
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Bolivia)	GQ411805	GQ411595	GQ411871
<i>Phaseolus vulgaris</i> (El Salvador)	GQ411807	GQ411579	GQ411870
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411800	GQ411583	GQ411860
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411788	GQ411581	GQ411862
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411799	GQ411584	GQ411861
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411787	GQ411592	GQ411864
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411789	GQ411587	GQ411857
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Colombia)	GQ411836	GQ411573	GQ411854
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411784	GQ411602	GQ411853
<i>Phaseolus vulgaris</i> (México)	GQ411839	GQ411588	GQ411852
<i>Vigna unguiculata</i>	GQ411778	GQ411554	GQ411841

6.4 Ensayo uno. Susceptibilidad a *S. sclerotiorum* y tiempo de micorrización en tres morfotipos de frijol de tres comunidades del Cofre de Perote, Veracruz

6.4.1. Condiciones de crecimiento de las plantas de frijoles criollos

Para evaluar el desarrollo de las variedades de frijol criollo del Cofre de Perote y conocer el tiempo de colonización del hongo micorrízico arbuscular *R. irregularis*, se realizó un primer ensayo en un cuarto de crecimiento ubicado en BIOTEC SIN del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Guasave, Sinaloa. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas; T° de 23 °C, con una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 18 h luz y 6 h oscuridad.

Las comunidades y morfotipos que se eligieron para este ensayo fueron: Ocotepc del municipio de Ayahualulco, morfotipo gordo; Saucal del municipio de Acajete, morfotipo enredador; y Matlalapa del municipio de Xico, morfotipo ayocote. Cada uno de los morfotipos se evaluó bajo la condición no micorrizado (NO MIC) y micorrizado (MIC), con cinco réplicas para un total de 30 plantas. Estas fueron mantenidas por seis semanas bajo las condiciones controladas antes mencionadas.

6.4.2. Propagación de plantas de frijoles criollos y preparación del inóculo de HMA

Las semillas se desinfectaron en una solución de etanol al 50% por un minuto. Se decantó el etanol y seguido las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.3% agitando suavemente durante 5 minutos. Se decantó el hipoclorito y las semillas se lavaron cinco veces con abundante agua destilada estéril por un minuto. Una vez desinfectadas, las semillas se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 25°C en completa oscuridad, por cinco días para promover la germinación.

Antes de ser trasplantadas las semillas, se preparó el inóculo del HMA *R. irregularis* que fue donado por el laboratorio Interacción Microorganismo-Planta del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Guasave, Sinaloa. Las esporas para el inóculo se obtuvieron de la siguiente manera: Se tomó el medio sólido de

una placa con raíces inoculadas con *R. irregularis*, y se colocó en un vaso de precipitado, posteriormente se agregó citrato de sodio (10 mM pH 6.0) hasta cubrir el medio y raíces, seguido se molió el contenido con ayuda de un homogeneizador manual para romper la red de hifas y lograr obtener fragmentos pequeños de raíces (Fierro-Coronado *et al.*, 2013). El licuado se pasó a través de una malla de 250 μm de diámetro de poro con ayuda de un embudo y un vaso de precipitado. Los restos detenidos en la malla (raíces e hifas) se observaron al estereoscópico para confirmar que estos no contenían esporas. El contenido del vaso de precipitado se pasó a través de otra malla de 50 μm de diámetro de poro. El material retenido en esta malla contenía las esporas, misma que se lavaron tres veces con agua destilada, el último lavado que se hizo se utilizó para inocular las plantas control sin esporas y este tratamiento correspondió a las plantas no micorrizadas (NO MIC). Las suspensión de esporas y la solución control sin esporas se dispusieron en tubos de 50 mL de polipropileno. Posteriormente se determinó la concentración de esporas de la siguiente manera: se tomaron 4 alícuotas de la suspensión de esporas de 50 μL , se observaron al microscopio estereoscópico y se contó el número de esporas por alícuota, se sumaron la cantidad de esporas de las 4 alícuotas y se sacó el promedio, este promedio se multiplicó por 1000 mL y este resultado se dividió por 50 μL que correspondía al volumen de cada alícuota, después se multiplica por los mL totales de la suspensión (Fierro-Coronado *et al.*, 2013). El total de esporas se dividió entre el número de plantas del experimento para utilizar el mayor número de esporas posible, que en este caso fue de 323 por un mL de agua destilada.

Después de obtener el inóculo de *R. irregularis*, las semillas germinadas se trasplantaron a macetas de 3 L (20 cm: 16 cm de alto por 20 cm diámetro) debidamente etiquetadas. Las macetas se llenaron con 1.5 L del sustrato estéril (3:1 V/V de vermiculita/arena de río), la arena y la vermiculita se lavaron previamente y la mezcla de sustrato se esterilizó en autoclave a 121° C por 30 minutos, encima del sustrato se colocó una capa de arena estéril, sobre esta capa se colocó la suspensión de esporas y la suspensión sin esporas (testigo), según sea el tratamiento, seguido se puso la semilla germinada, según corresponda la maceta rotulada y por último, las semillas se cubrieron con una última capa de $\frac{1}{2}$ L de sustrato (Fierro-Coronado *et al.*, 2013). Al día siguiente de la siembra, se regaron las plantas con 100 mL de agua destilada y se continuaron regando cada dos días con 100 mL de agua destilada

durante seis semanas. A las seis semanas, el riego se realizó cada tercer día con 50 mL de agua destilada.

La fertilización se inició una semana después de la siembra y se realizó una vez por semana con 100 mL por maceta, con solución nutritiva Long Ashton modificada (**Tabla 3**); esta modificación se realizó debido a que el agua utilizada presentó elevado pH y conductividad eléctrica (8.0 y 0.78, respectivamente). La solución nutritiva se ajustó a un pH de 6.0 y una CE de 1.68.

Tabla 3. Composición de la solución Long Ashton.

Reactivo	Stock (g·L ⁻¹)	Solución final (mL·L ⁻¹)
KNO ₃	80.8	5.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	73.6	5.5
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	188.8	3.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	36.8	0.6 (5 ppm de P)
Elementos trazas	-	1
Solución de citratos	-	5

ppm - Parte por millón.

P – Fósforo.

6.4.3. Observación de estructuras fúngicas a las 6 semanas de inoculación

Para comprobar que las raíces de los tres morfotipos de frijol (ayocote, gordo, enredador) estaban colonizadas a las seis semanas de la cosecha, se tiñeron con una solución de azul de tripano al 0.05 % durante dos días (Phillips y Hayman, 1970). Las raíces se mantuvieron en lactoglicerol 1:1:1 (agua: ácido láctico: glicerol) a temperatura ambiente. Las raíces más delgadas se dispusieron en una caja Petri y se observaron al microscopio estereoscópico con el objetivo de 20x.

6.5. Ensayo de susceptibilidad de especies

6.5.1. Preparación del inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Se utilizaron esclerocios del hongo *S. sclerotiorum* colectados en campos de cultivo de frijol en el municipio de Guasave, Sinaloa, mismos que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.3 % durante un minuto, seguido de tres lavados con agua destilada estéril por un minuto, se secaron con papel absorbente estéril durante 5 segundos, y después se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA) y por último se incubaron por tres días a 19 °C. Discos de agar de 0.5 mm de diámetro con micelio en activo fueron utilizados para transferir el hongo a placas nuevas con PDA, las cuales fueron usadas como inóculo para el ensayo de susceptibilidad de cada uno de los morfotipos identificados (López *et al.*, 2021b).

6.5.2. Ensayo de susceptibilidad de tres morfotipos de frijol en hoja desprendida

Para el ensayo de susceptibilidad se tomó el primer foliolo del cuarto trifolio más joven de cada morfotipo de frijol NO MIC (ayocote, enredador y gordo), de seis semanas de crecimiento y cada foliolo se dispuso en una cámara húmeda construida de la siguiente manera: en el fondo de una caja de Petri se puso papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril, sobre el cual se ubicaron dos portaobjetos en cruz, para posicionar sobre éstos el foliolo sin que entrara en contacto con el papel filtro humedecido, cuya función, era mantener una alta humedad relativa dentro de la caja. Los foliolos se inocularon en el haz con un disco de medio PDA conteniendo micelio de *S. sclerotiorum* en activo crecimiento. Por último, las cajas de Petri se sellaron con Parafilm y se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con 5 réplicas por tratamiento en una incubadora a 19 °C en completa oscuridad (**Fig. 4**).

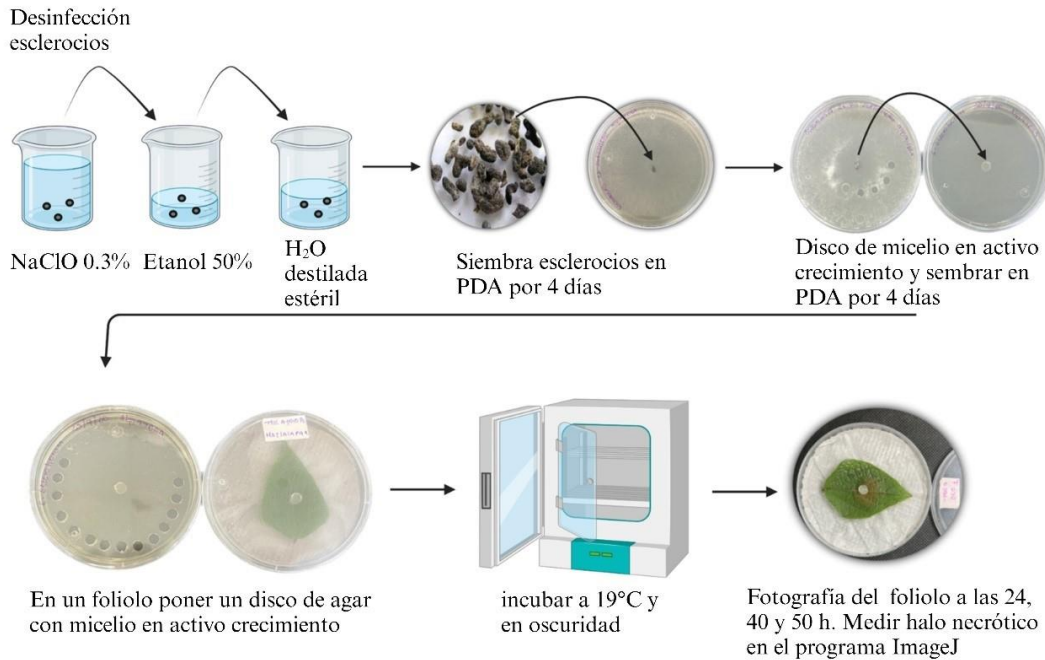


Figura 4. Ensayo de hoja desprendida para susceptibilidad y defensa por micorrización contra *S. sclerotiorum*.

El diámetro del halo necrótico ocasionado por *S. sclerotiorum* al infectar el tejido vegetal fue registrado a las 24, 40 y 50 h posteriores de la inoculación. Para la medición del área del halo necrótico y área total del foliolo, se analizaron fotografías de cada tratamiento en el programa ImageJ (Sarmiento *et al.*, 2023). Se calculó el porcentaje de área foliar afectada (%AFA) en el programa Microsoft Excel, a las 40 horas de la inoculación (cuando el halo necrótico llegó al borde la hoja en una de las réplicas por tratamiento (**Fig. 5**)), de la siguiente manera:

$$\% \text{ AFA} = \frac{\text{diámetro del área de lesión del halo necrótico en el foliolo}}{\text{diámetro del área total del foliolo}}$$

Cada medición se hizo en el programa ImageJ y los datos se registraron en una base de datos del programa Microsoft Excel y enseguida se hizo el análisis estadístico.



Figura 5. Foliolos infectados con un disco de PDA con micelio de *S. sclerotiorum*. Los foliolos marcados con el color morado, indica que a las 40 horas la infección por el hongo llegó al borde de la hoja, esta hora se tuvo en cuenta para el análisis estadístico.

6.5.3. Análisis estadístico

Los datos del área afectada (%AFA) de cada tratamiento fueron transformados en el programa Microsoft Excel con la fórmula del arcoseno: $=\text{ASENO}(\text{RAÍZ}(X/100)) * (180/3.1416)$, estos se analizaron para determinar si cumplían con los supuestos de la estadística paramétrica: Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y prueba de Levene para corroborar la homogeneidad de las varianzas. Al comprobar que los datos tuvieron una distribución normal, se realizó un ANOVA $P > 0.05$ en el programa GraphPad Prism versión seis (Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com).

6.6. Ensayo dos. Efecto de la micorrización sobre la infección por *S. sclerotiorum*

6.6.1. Condiciones de crecimiento de plantas

En el ensayo uno se confirmó el buen desarrollo de las plantas de frijol en el cuarto de crecimiento controlado, por lo tanto, el ensayo dos se sembró en este mismo cuarto y se aumentaron las variedades por comunidad. Se tuvieron en cuenta tres variedades de tres comunidades de los diferentes municipios en estudio: Encinal II: *P. dumosus*, *P. vulgaris*, para esta comunidad no se contó con la variedad *P. coccineus* por la disponibilidad de semilla de los productores de la zona; Ocoatepec: *P. dumosus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus* Matlalapa: *P. dumosus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*. El fin del periodo experimental fue a las 10 semanas de crecimiento.

Cada uno de los morfotipos se evaluó bajo la condición NO MIC y MIC, con cinco réplicas para un total de 80 plantas en un diseño completamente al azar (Fig. 6).



Figura 6. Plantas de frijol sembradas en cuarto de crecimiento controlado. Las etiquetas azules son plantas de frijol de Matlalapa; etiquetas naranjas de Ocoatepec; y etiquetas moradas de Encinal II.

6.6.2. Porcentaje de colonización de HMA.

A las 10 semanas de crecimiento de las plantas, las raíces se colectaron separando la parte aérea de la planta, y se lavaron con agua corriente para remover restos de sustrato, se fijaron en etanol al 50 % (v/v) durante un día. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada e incubaron dos días con KOH al 20 % (p/v) a temperatura ambiente para clarificarlas. Seguido, las raíces se lavaron con agua destilada estéril e incubaron por 2 h en HCl al 1 % (v/v), nuevamente se lavaron con agua destilada estéril y se tiñeron con solución de azul de tripano al 0.05 % durante dos días (Phillips y Hayman, 1970). Las raíces se mantuvieron en lactoglicerol 1:1:1 (agua: ácido láctico: glicerol) a temperatura ambiente. El porcentaje de colonización se determinó por el método de intersección a la línea trazando líneas de manera horizontal y vertical a manera de cuadrícula (de 1 a 2 cm) sobre una caja de Petri, en ella se colocaron las raíces previamente teñidas, posteriormente fueron visualizadas en estereoscopio (**Fig. 7**). La visualización y evaluación del porcentaje de micorrización se realizó de acuerdo con lo siguiente: la evaluación inició sobre las líneas verticales de arriba hacia abajo y posteriormente sobre las horizontales de izquierda a derecha hasta cubrir todas las intersecciones de la caja (registrando el número de intersecciones colonizadas y no colonizadas por HMAs) (Giovannetti y Mosse, 1980). Las plantas no inoculadas se inspeccionaron bajo el estereoscopio para descartar la existencia de estructuras de colonización micorrízica.

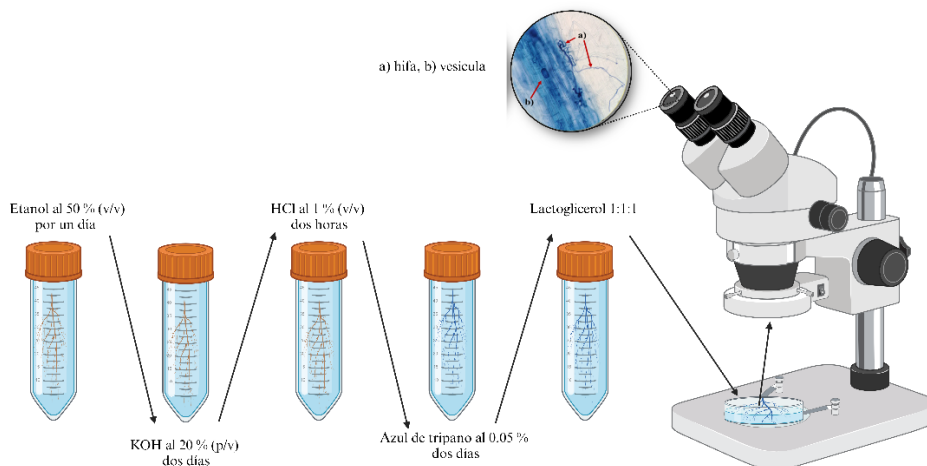


Figura 7. Tinción de raíces para observación de estructuras fúngicas

Para el cálculo del porcentaje de colonización total por HMA se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Sieverdin (1983):

$$\% \text{ de colonización por HMAs} = (C/T) \times 100$$

C= número de intersecciones colonizadas por cualquier estructura fúngica

T= Número total de campos observados

Tinción de raíces con WGA-Alexa Fluor 488

Se cosecharon raíces de plantas de frijoles a las 10 semanas, estas se lavaron suavemente con agua destilada para eliminar la capa de sustrato. Se dispusieron las raíces en etanol al 50% (o PME para una mejor estructura) y se dejaron en reposo durante 4 horas. Pasadas las 4 horas se retiró el etanol y se agregó 20 % KOH (suficiente para cubrir las raíces) y dejar actuar durante 3 días a temperatura ambiente. Se Retiró el KOH y se enjuagaron con agua destilada. Se Agregó HCl 0,1 M (suficiente para cubrir las raíces) y se dejaron durante 2 horas. Seguido se retiró el HCl y se enjuago con agua destilada y después con PBS. Se retiró el PBS y se sumergieron en una solución de tinción de PBS-WGA (la concentración final de WGA es 0,2 ug/ml) y se envolvieron en papel aluminio. Se dejaron 6 horas en la solución colorante y mantenidas a 4°C para un almacenamiento más prolongado.

* Generalmente la raíz teñida con WGA puede contaminarse, por lo que es mejor tomar las fotografías inmediatamente.

Las fotografías se tomaron ven el microscopio confocal (Nikon A1R+ STORM) del laboratorio de Biología Molecular de plantas dirigido por el Dr. Luis Cárdenas Torres del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

6.6.3. Cálculo de peso seco total de la planta

Las muestras de parte aérea y raíz para el cálculo de peso seco total de la planta se colectaron a las 10 semanas finalizado el ensayo dos. Para el peso fresco aéreo de la planta, se cortó la parte basal del tallo y se pesó en una balanza (UNLINE. MEX H-9885) cada muestra de cada morfotipo de cada comunidad, de igual manera, para el peso fresco de la raíz, primero se pesó el total de la raíz separándola del tallo, y después se dividió en dos, una parte se utilizó para la tinción con azul de tripano y la otra mitad del corte de la raíz fresca se pesó. Las muestras se pusieron en un horno de secado a 70 °C y se retiraron a los 3 días, cuando el peso seco era constante y así las muestras secas de la parte aérea de la planta y el peso seco de la mitad de la raíz se pesaron. Para el cálculo del peso seco total de la planta, primero se hizo el cálculo del peso total de raíz, se utilizaron las siguientes formulas propuesta por Sieverdin (1983):

$$\text{Peso seco total de la raíz} = \frac{(\text{peso fresco de la raíz total} \times \text{Peso seco mitad de la raíz})}{\text{Peso fresco de la mitad de la raíz}}$$

$$\text{Peso seco total de la planta} = \text{peso seco de la parte aérea de la planta} + \text{peso seco total de la raíz}$$

6.6.4. Ensayo de defensa contra *S. sclerotiorum* por micorrización en hoja desprendida

Para la realización de este ensayo, se tomó un foliolo de hoja de plantas de frijol (primer foliolo del trifolio más joven y en mejor estado de arriba hacia abajo) con 10 semanas de crecimiento bajo condiciones controladas y se utilizó la misma metodología antes mencionada para la desinfección de los esclerocios y el ensayo de hoja desprendida (**sección 6.5. ensayo de susceptibilidad en hoja desprendida**).

6.6.5. Análisis estadístico

Este segundo ensayo corresponde a un diseño completamente al azar. Los datos de las variables área foliar afectada, altura de la planta y peso seco total de la planta se analizaron para determinar si cumplían con los supuestos de la estadística paramétrica; Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y prueba de Levene para corroborar la homocedasticidad. Después de comprobar que los datos tuvieron una distribución normal y las varianzas fueron homocedásticas, se hizo una T de Student con un $\alpha=0.05$, para determinar si los tratamientos

MIC y NO MIC de cada morfotipo, de cada comunidad, tenían diferencias significativas. Los datos de la variable porcentaje de micorrización se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn's con un $\alpha=0.05$ en el programa estadístico GraphPad Prism versión seis (Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Colecta de material vegetal

Las colectas de las semillas de frijol de los morfotipos gordo, ayocote y enredador (**Fig. 8**) se llevaron a cabo en siete comunidades de la zona del Cofre de Perote (Encinal II, Saucal, Zapotal, Coatitlan, Matlalapa, Xico viejo, Ocotepec), distribuidas en tres municipios (Acajete, Ayahualulco y Xico) del estado de Veracruz en el mes de febrero del 2022. Los productores de cada comunidad donaron las semillas de los morfotipos que tenían en existencia y la cantidad que consideraron de acuerdo con su reserva.



Figura 8. Características morfológicas de tres morfotipos de frijol de la zona Cofre de Perote. **Ayocote**, flor característica color naranja a rojo, semillas de colores mantequilla, negro, pintos, violeta. **Enredador**, flor color lila a rosa, semillas pequeñas de colores azules, rosas, rojas. **Gordo**, flor color blanca, semillas ovaladas, grandes color mantequilla.

7.2. identificación molecular

7.2.1. Extracción de ADN y PCR

La electroforesis en gel de agarosa al 1% muestra una banda definida de alto peso molecular para cada una de las muestras, indicando la integridad del DNA genómico extraído (**Fig. 9**).

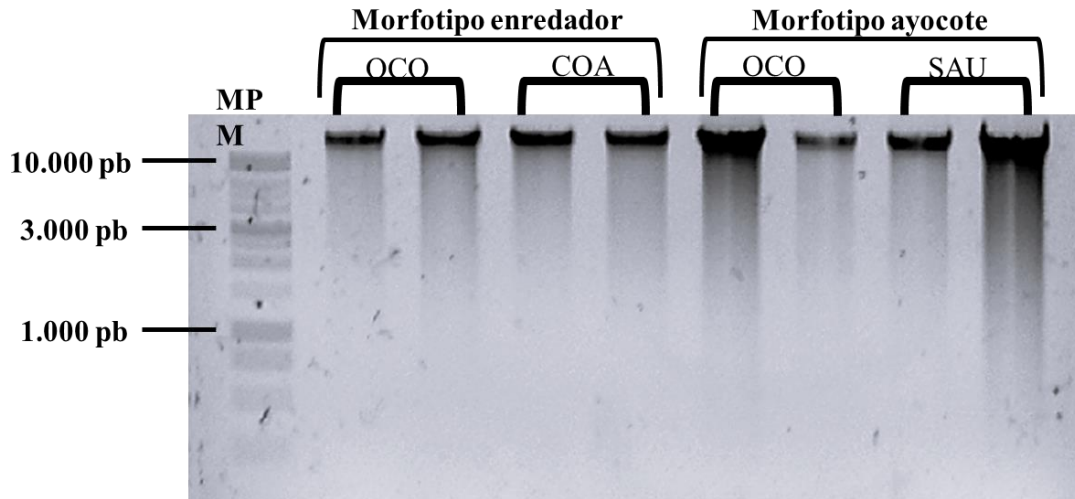


Figura 9. Electroforesis en gel 1% con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV, de las extracciones de ADN genómico de plantas de frijol. MPM (marcador de peso molecular PROMEGA 1KB). Oco, Ocoatepec; Coa, Coatitilan; Sau, Saucal.

Para la identificación molecular de los morfotipos de frijol, se prepararon reacciones de PCR utilizando los marcadores moleculares ITS1/ITS4 correspondientes a la región del ADN ribosomal, el marcador molecular de la región intergénica (*trnL*) cloroplástico y el marcador molecular espaciador intergénico *rbcL* cloroplástico. Las bandas de los productos de PCR fueron separadas en gel de agarosa al 1% y se muestran en la **Figura 10**. Para el marcador molecular ITS en las siete comunidades el tamaño del fragmento amplificado fue el esperado (401 pb) (**Fig. 10 A, D, G**). Para el intrón *trnL* de la región intergénica del ADN cloroplástico, en las siete comunidades, el tamaño del fragmento amplificado fue de 357 pb, tal como se esperaba (**Fig. 10 B, E, H**). y para el intrón *rbcL*, el fragmento amplificado fue de 543 pb (**Fig. 10 C, F I**).

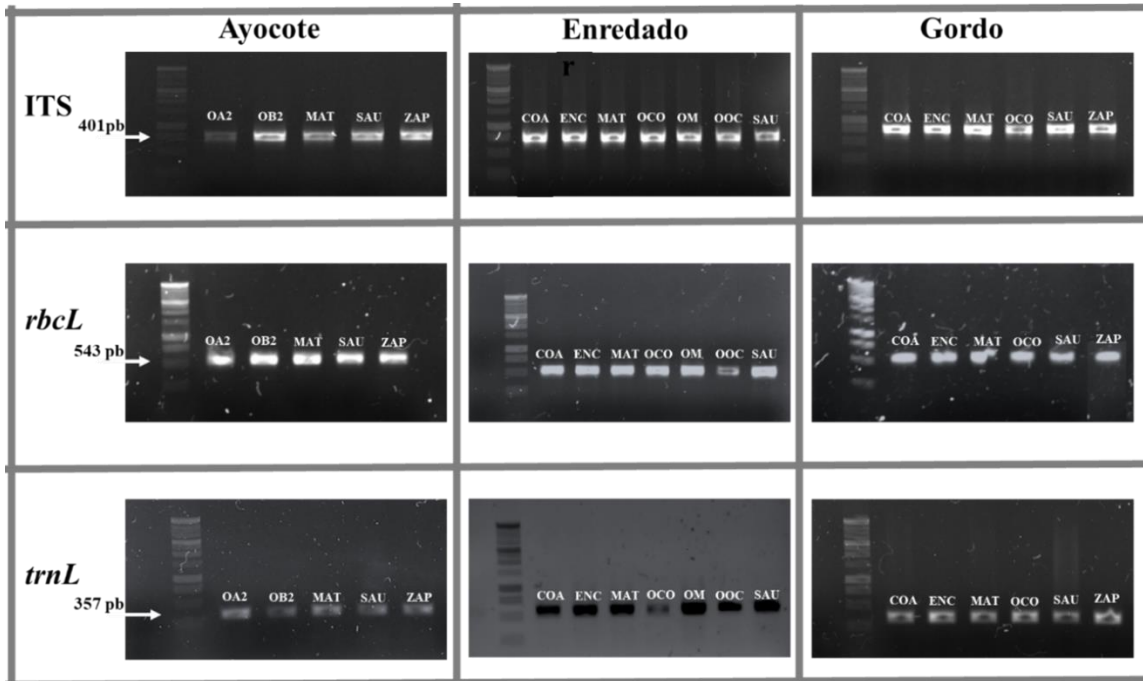


Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR. ITS, (*trnL*) cloroplástico y el espaciador intergénico *rbcL* cloroplástico. 1. Control negativo. 2. MPM (Invitrogen). **A-B-C.** Morfotipo Ayocote, Ocotepc planta PA2, Ocotepc planta PB2, Matlalapa, Saucal, Zapotal. **D-E-F.** Morfotipo Enredador, Coatitilan, Encinal, Matlalapa, Ocotepc, Ocotepc mantequilla, Ocotepc ojo de cabra, Saucal. **G-H-I.** Morfotipo Gordo, Coatitilan, Encinal, Matlalapa, Ocotepc, Saucal, Zapotal.

7.2.2. Análisis filogenético

El filograma inferido a partir del alineamiento concatenado de los marcadores moleculares ITS, *trnL* y *rbcL*, confirma que los tres morfotipos ayocote, enredador y gordo, pertenecen al grupo Vulgaris del género *Phaseolus*. Dentro de este grupo se encuentran ocho especies: *P. acutifolius*, *P. albescens*, *P. coccineus*, *P. costaricensis*, *P. dumosus*, *P. parvifolius*, *P. persistentus*, y *P. vulgaris*. Las especies en estudio se agruparon dentro de tres especies de la siguiente manera: el frijol ayocote se agrupa en un mismo clado con tres secuencias de referencia de la especie *P. coccineus* con un soporte bootstrap del 84 % por otro lado, el frijol enredador se agrupa en un mismo clado con veintidós secuencias de referencia de la especie *P. vulgaris* con un soporte bootstrap del 57%. Para el caso de este material, se analizaron tres tipos (enredador, enredador ojo de cabra y enredador mantequilla), de los cuales el material identificado como “mantequilla” muestra claras diferencias con el resto de los materiales de la región, al agruparse en un clado muy distante, junto con accesiones de México y El

Salvador, con un soporte bootstrap del 55%; por último, el frijol gordo se agrupa en un mismo clado con 4 secuencias de referencia de la especie *P. dumosus* con un soporte bootstrap del 99% (**Fig. 11**). Las secuencias de referencia de cada especie se encuentran en la **Tabla 2** en el apartado de identificación molecular.

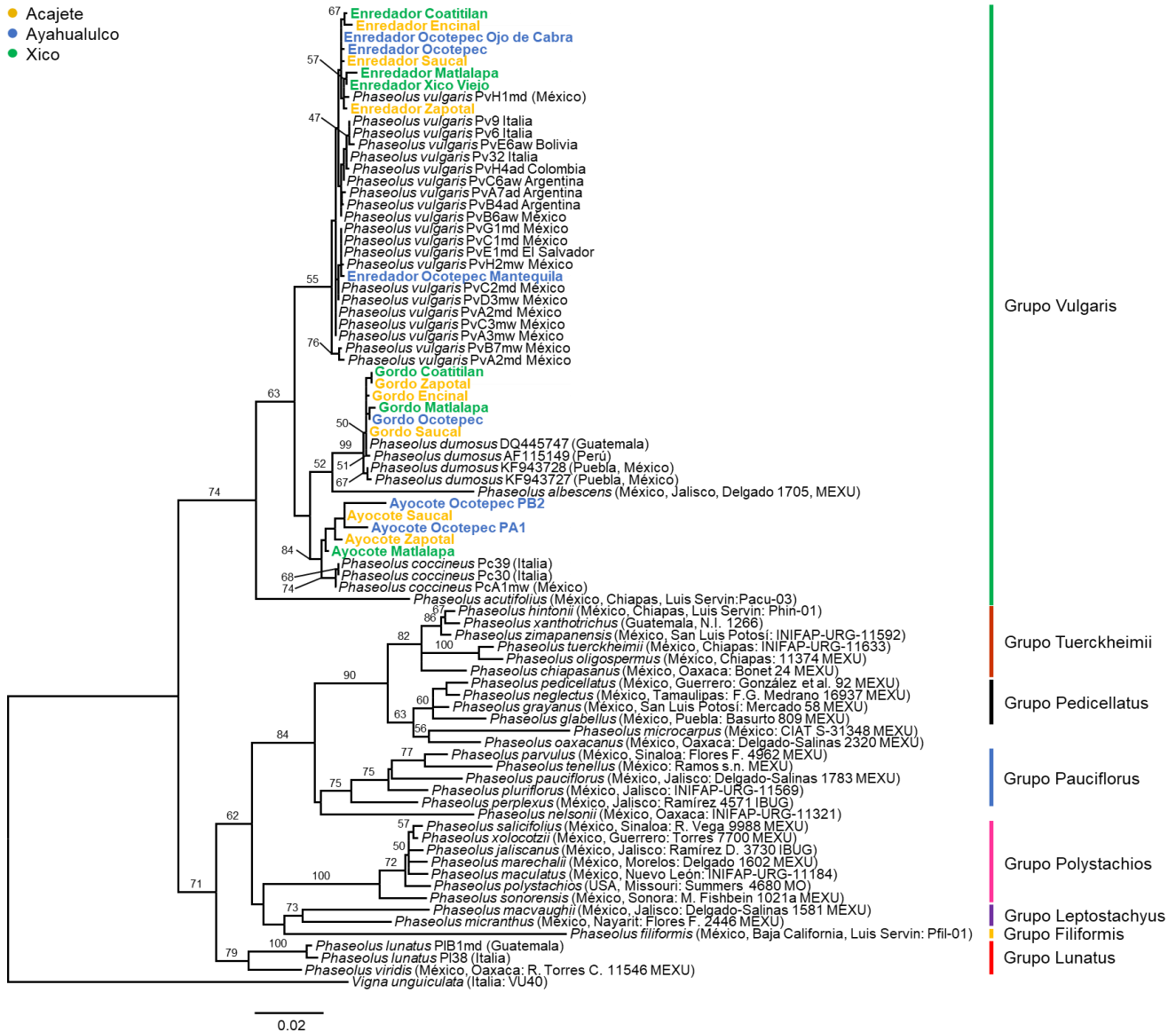


Figura 11. Filograma de máxima verosimilitud (ML) de 82 especies del género de *Phaseolus* de los acervos genéticos mesoamericano, andino y un acervo genético italiano, incluidos los morfotipos en estudio diferenciados por los colores amarillo (Acajete); azul (Ayahualuco); verde (Xico). La especie *Vigna unguiculata* se utilizó como grupo externo para enraizar el árbol. Los números a los lados del nodo indican los valores de robustez en porcentaje (1000 Bootstrap).

El uso de la técnica de código de barras de ADN y el uso de marcadores moleculares cloroplásticos en estudios de identificación molecular de especies del género *Phaseolus*, proporciona una visión ampliada de la diversidad de estas leguminosas en el país. Además, propicia la identificación de nuevas especies o bien, amplía el conocimiento sobre la distribución geográfica de las distintas especies, al confirmar su presencia en zonas donde no se habían reportado anteriormente.

Nicolè *et al.* (2011) evaluaron la pertinencia del uso de marcadores moleculares cloroplásticos (*trnH-psbAIGS*, *trnL* y *rbcL*) y nucleares (ITS) para la resolución filogenética dentro del grupo *Vulgaris*. Analizaron 55 materiales obtenidos de los bancos de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA; por sus siglas en inglés) y del Consejo de Investigación Agrícola de Italia (CRA). Dentro de este estudio, se logró identificar a nueve materiales de México, de los cuales ocho fueron identificados a nivel especie como *P. vulgaris* y solo un material se identificó como *P. coccineus*. Estos hallazgos son consistentes con los estudiados en la presente tesis, ya que los marcadores moleculares utilizados (ITS, *trnL* y *rbcL*), proporcionaron una identificación precisa de los morfotipos ayocote (*P. coccineus*), enredador (*P. vulgaris*) y gordo (*P. dumosus*). Si bien las tres especies ya habían sido reportadas previamente en el estado de Veracruz, su presencia no había sido confirmada molecularmente en las milpas de las comunidades de Cofre de Perote, por lo que estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre la distribución geográfica de estas especies. Sin embargo, los materiales analizados en la presente tesis no son representativos de la zona, puesto que se estudiaron los materiales más abundantes o preferidos para el consumo por los habitantes de las distintas comunidades. Por lo que se sugiere la realización de nuevas investigaciones para identificar a las otras especies de *Phaseolus* presentes en la región, que puedan ser de interés genético, evolutivo y nutricional, y cuya preservación es de suma importancia.

7.3. Ensayo uno. Susceptibilidad a *S. sclerotiorum* y tiempo de micorrización en tres morfotipos de frijol de tres comunidades del Cofre de Perote

7.3.1. Condiciones de crecimiento de frijoles criollos

Los frijoles criollos del Cofre de Perote, Veracruz, se adaptaron a las condiciones controladas del cuarto de crecimiento; T° 23 °C; HR 70%; 18 horas luz- 6 horas oscuridad. Las plantas fueron cosechadas a las 6 semanas, donde el riego total con agua destilada para cada planta fue de 750 mL y la fertilización con solución Long Ashton preparada con agua corriente fue de 350 mL para cada planta (Fig. 12).



Figura 12. Plantas de frijol sembradas en cuarto de crecimiento controlado.

Etiquetas azules pertenecían a las plantas de frijol de ayocote-Matlalapa, etiquetas naranjas a gordo-Ocotepc y etiquetas moradas a enredador-Saucal.

7.3.2. Observación de estructuras fúngicas a las 6 semanas de inoculación

En el ensayo uno, se quería observar si los frijoles criollos de Cofre de Perote se colonizaban a las seis semanas de ser inoculados con el hongo micorrízico *R. irregularis*. Al observar al estereoscopio las raíces conservadas en lactoglicerol 1:1:1, no fue posible observar estructuras fúngicas del hongo micorrízico arbuscular (**Fig. 13**), lo que nos sugirió que para el ensayo dos, las plantas se debían dejar más tiempo para lograr la colonización por parte del hongo micorrízico *R. irregularis*.

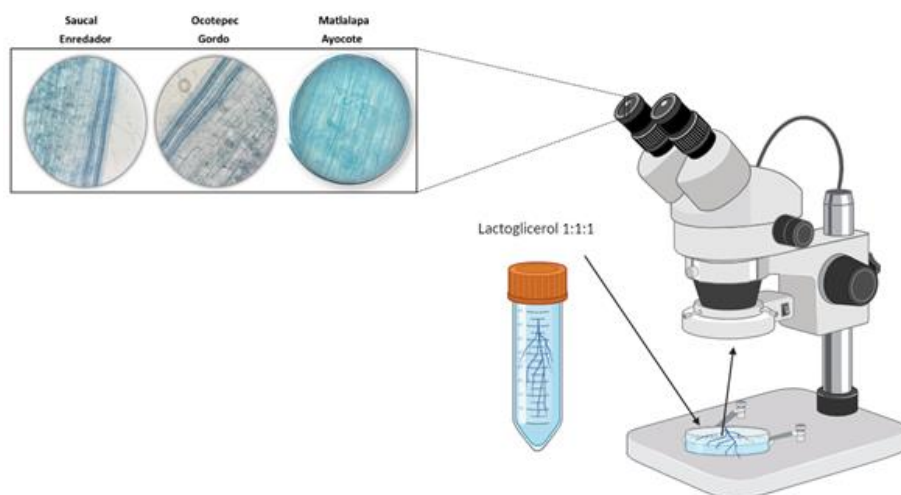


Figura 13. Observación al estereoscopio de estructuras fúngicas en raíces de frijoles criollos.

Cabe destacar que estos son los primeros estudios de micorrización con *R. irregularis* que se hacen con frijoles criollos de la zona de Cofre de Perote. Trabajos simultáneos al presente en otro grupo de investigación sugirieron que, bajo las condiciones del experimento, seis semanas posiblemente no fue tiempo suficiente para que la colonización micorrízica se estableciera (Susana Echauri Peña, comunicación personal). En cuanto a la inoculación con HMA en variedades de frijoles comerciales, Reyes *et al.* (2015) reportaron que la colonización con el HMA *R. irregulares* se dio a las 6 semanas, lo que sugiere que el tiempo de colonización depende tanto de la especie de planta, como de la especie del HMA con el que se esté inoculando. Mora-Romero *et al.* (2015) reportó que al inocular tres variedades de frijoles comerciales de la especie *P. vulgaris* A-55, Az Reg87 y Az Hig, la variedad Az Hig tardó una semana más en colonizarse que las otras dos.

7.3.3. Ensayo de susceptibilidad de tres morfotipos de frijol en hoja desprendida

Los resultados obtenidos del ensayo de infección con *S. sclerotiorum* en hoja desprendida (40 h postinfección) indicaron que no existen diferencias estadísticas en el %AFA (19.37% ayocote-Matlalapa, 15.86% enredador-Saucal y 20.47% gordo-Ocotepec), lo que comprueba que las tres especies (*P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. vulgaris*) son igualmente susceptibles a la infección por *S. sclerotiorum* (Fig. 14).

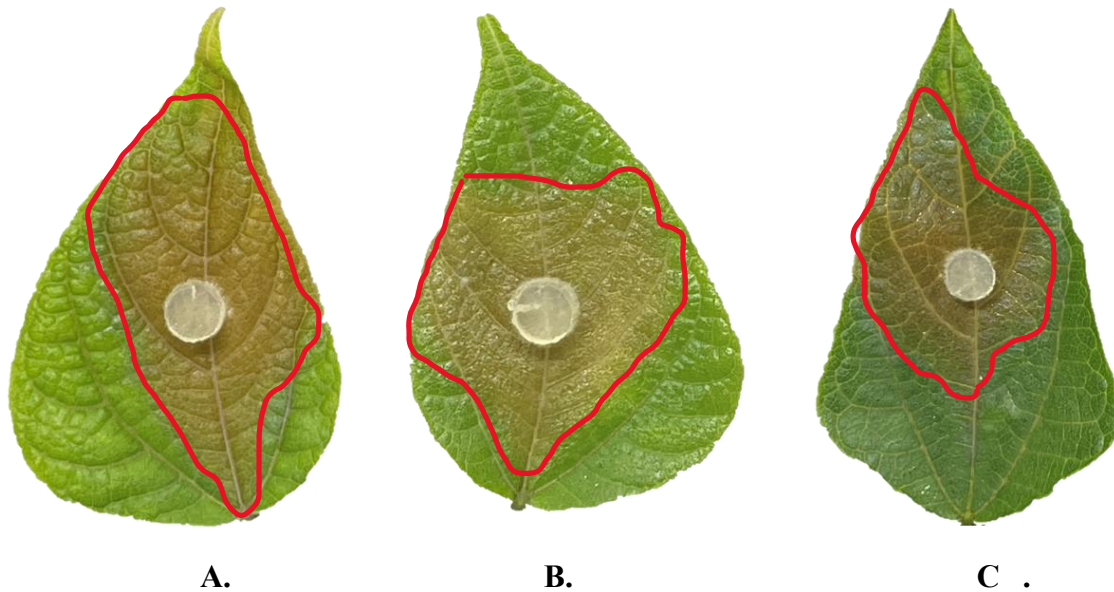


Figura 14. Área de la lesión en folíolos de frijol, 40 h postinfección con *S. sclerotiorum*. **A.** Saucal, *P. vulgaris*. **B.** Ocotepec, *P. dumosus*. **C.** Matlalapa, *P. coccineus*. Líneas en rojo indican el área de lesión medida en el programa ImageJ causada por *S. sclerotiorum*. **A.** 3.29 cm². **B.** 3.19 cm². **C.** 2.99 cm².

Aunque los datos fueron analizados a las 40 h postinfección, se observó que, a las 24 h, las primeras especies en infectarse fueron *P. coccineus* del municipio de Matlalapa (0.54 cm²) y *P. dumosus* del municipio de Ocotepec (0.53 cm²), sin embargo, en el transcurso de las horas, el área de lesión causada por la infección de *S. sclerotiorum* en cada uno de los materiales de las tres comunidades se igualó (Fig. 15).

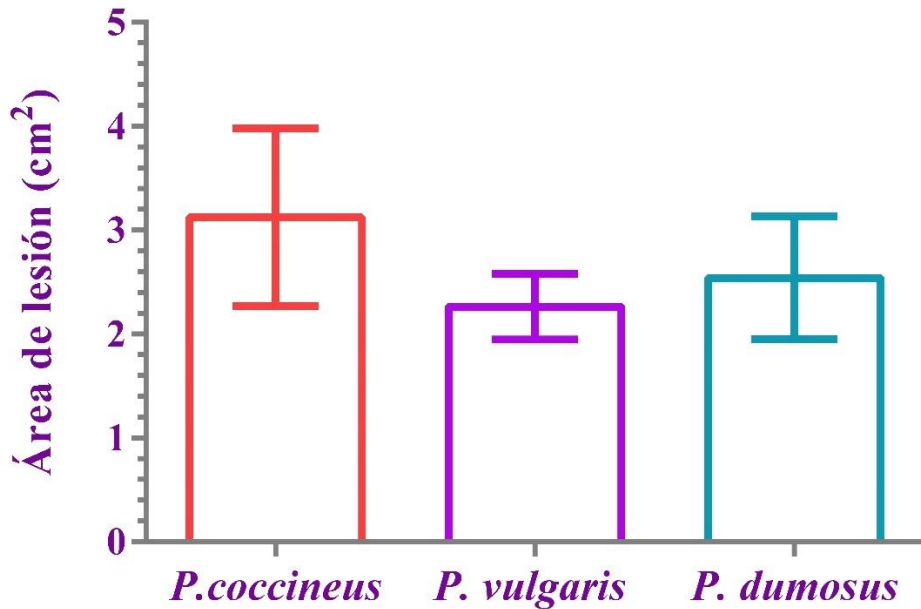


Figura 15. Área de la lesión en folíolos de frijol, 40 h postinfección con *S. sclerotiorum*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (ANOVA $P < 0.05$) $n=5$.

S. sclerotiorum es uno de los fitopatógenos más destructivos y cosmopolita con un amplio rango de hospedantes de gran importancia económica para la agricultura del mundo, así mismo, en México afecta un gran número de cultivos, entre ellos los más significativos en producción: las hortalizas incluidos los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y varias cucurbitáceas, también, cultivos que hacen parte de la seguridad alimentaria y nutricional como los pertenecientes a la familia de las fabáceas más conocidas como leguminosas, por nombrar algunas de mayor consumo: el garbanzo (*Cicer arietinum*), haba (*Vicia faba*), arveja (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens culinaris*), soya (*Glycine max*), maní (*Arachis hypogaea*) y cuenta con uno de los géneros más amplios como es el género *Phaseolus*, que alberga especies de importancia tanto económica y de alimentación para las familias que aún subsisten de la milpa. Las pérdidas que causa este fitopatógeno en los cultivos van desde el 10 % al 50 % en el rendimiento y en cuestión económica, causa pérdidas de hasta 200 millones de pesos anuales (Agrios, 2005; Njambere *et al.*, 2014; Alkooranee *et al.*, 2017; Smolinska y Kowalska, 2018, O'Sullivan *et al.*, 2021).

A nivel mundial, se han hecho estudios en *Phaseolus* spp. para determinar su susceptibilidad a *S. sclerotiorum* y así tomar medidas para mitigar el impacto. Ali y Athala (2019) hicieron pruebas de susceptibilidad contra *S. sclerotiorum* en hoja desprendida en 8 cultivares (Giza 6, Bronco, Paulista, Pinto, White kidney bean, Cranberry bean, Black bean y Large white lima bean) provenientes de la especie *P. vulgaris* en la India. Como resultado obtuvieron que el área de lesión necrótica fue mayor en los cultivares Cranberry bean (6.93 cm²), Giza 6 (5.70 cm²), Pinto bean (5.30 cm²), Paulista (4.77 cm²) y White kidney bean (4.67 cm²), en comparación con los cultivares Black bean (3.47 cm), Large white lima bean (2.33 cm) y Bronco (2.27 cm) quienes mostraron menor área de lesión en los folíolos. Estos últimos tres cultivares se asemejan a la susceptibilidad de las tres especies aquí estudiadas con un área de lesión del halo necrótico para *P. coccineus* (3.12 cm²), *P. dumosus* (2.54 cm²) y *P. vulgaris* (2.27 cm). De igual manera, en Argentina Abán *et al.*, (2020) evaluaron la resistencia fisiológica de 20 accesiones de frijol común utilizando la prueba de paja de invernadero (Leales B30 INTA, Leales CR5 INTA, NAG 12 INTA, Perla INTA, Cachucheño, MSZ, PF1. PP, A 195 como testigo resistente, Leales 24 INTA como testigo susceptible, Vax 1,3 y 6, otto 45-69, otto 50-2, Sea 5, Lines y de crecimiento determinado e indeterminado tipo II) a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación y fueron evaluados cada uno con 5 aislados diferentes de *S. sclerotiorum*, como resultados obtuvieron que al final del periodo, todos los materiales fueron igual de susceptibles a los 5 aislados, en cada uno de los días, según la escala de severidad ubicados en siete plantas mostrando alta severidad de enfermedad. Aunque en el presente trabajo se hizo el ensayo de susceptibilidad en hoja desprendida, los datos se midieron por el porcentaje del área foliar afectada y sólo se utilizó un aislado de *S. sclerotiorum*. Las tres especies estudiadas, fueron igual de susceptibles sin mostrar diferencias entre ellas, al igual que las 19 accesiones del estudio mencionado, sin embargo, ellos probaron un material resistente como testigo que fue el A 195 y corroboraron que, en los tres tiempos de evaluación, sigue siendo resistente al patógeno. En Sinaloa, México se encuentra la mayor producción de frijol en el país y Mora-Romero *et al.*, (2015), estudiaron la susceptibilidad de las variedades comerciales de frijoles utilizadas en ese año (A-55, Azufrado Higuera y Azufrado regional 87) contra *S. sclerotiorum* en un ensayo de hoja desprendida por medio de cinética del desarrollo de las lesiones a las 24, 36, 48 y 60 horas,

como resultados obtuvieron que las tres variedades estudiadas muestran la misma susceptibilidad ante el patógeno en cada uno de los tiempos.

Todas las investigaciones se basan en estudios de susceptibilidad de variedades mejoradas, sin embargo, es importante evaluar las especies criollas de frijoles que pueden tener características importantes como tolerancia a estreses bióticos o abióticos y de rendimiento y aunque las tres especies criollas acá estudiadas mostraron susceptibilidad a *S. sclerotiorum* se sugiere seguir con estudios más profundos para conocer esta interacción del género *Phaseolus* con *S. sclerotiorum*.

7.4. Ensayo dos. Efecto de la micorrización sobre la infección por *S. sclerotiorum*

7.4.1. Porcentaje de colonización de HMA.

En este experimento, plantas de las tres especies analizadas (*P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. vulgaris*) de diferentes comunidades de los tres municipios de Veracruz estudiados: Acajete (Encinal, Saucal, Zapotal), Ayahualulco (Ocotepéc) y Xico (Coatitlan, Matlalapa y Xico Viejo) fueron mantenidas en condiciones controladas en un cuarto de crecimiento. La mitad de las plantas (cinco por morfotipo-comunidad) fueron inoculadas con el HMA *R. irregularis* y la otra mitad con solución control libre de esporas (último lavado de las esporas) por 10 semanas.

Fotografías tomadas de una raíz colonizada con *R. irregularis* de la especie *P. coccineus* de la comunidad Ocotepéc, en un microscopio confocal teñidas con WGA-Alexa. (Fig. 16).

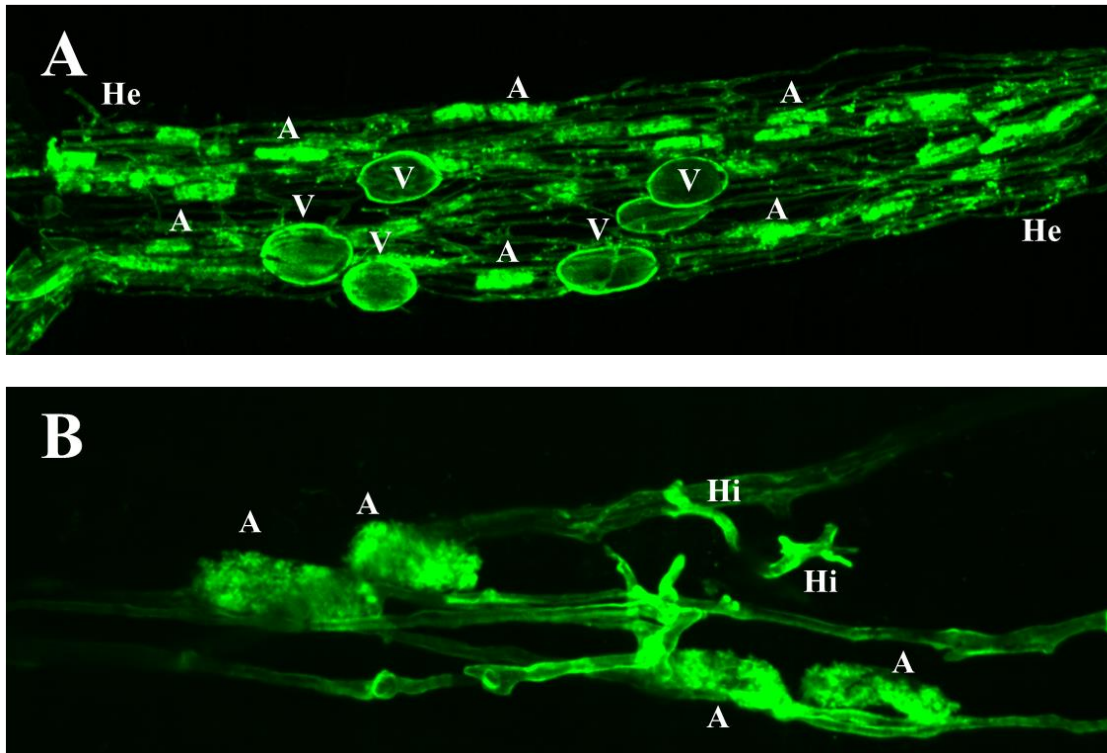


Figura 16. Estructuras fúngicas de *R. irregularis* en la raíz de *P. coccineus* de la comunidad Ocotepéc. A. Estructuras fúngicas intra y extra radicales, He: hifa extra radical, A: arbúsculo, V: vesícula. B. Estructuras fúngicas intra radicales, Hi: hifas intra radicales, A: arbúsculo.

En la **Figura 17** se presentan los porcentajes de micorrización de las plantas inoculadas con el HMA *R. irregularis*. Para este análisis se tomaron en cuenta solo las plantas micorrizadas. No se observaron estructuras fúngicas en ninguna de las plantas testigo (inoculadas con solución sin esporas).

Las especies *P. vulgaris* y *P. dumosus* de la comunidad Ocotepéc, presentaron los porcentajes más altos de micorrización; 74 y 72%, respectivamente, mientras que los morfotipos *P. dumosus* de la comunidad Encinal II y *P. dumosus* de la comunidad Matlalapa presentaron los menores porcentajes 49 y 46%, respectivamente. Los resultados estadísticos sugieren que las especies *P. vulgaris* y *P. dumosus* de la comunidad Ocotepéc presentan diferencias significativas con respecto a la especie *P. dumosus* de la comunidad Matlalapa quien obtuvo el menor porcentaje de micorrización. Con respecto a las especies *P. vulgaris* y *P. dumosus* de Encinal II, *P. coccineus* y *P. vulgaris* de Matlalapa y *P. coccineus* de Ocotepéc, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de micorrización.

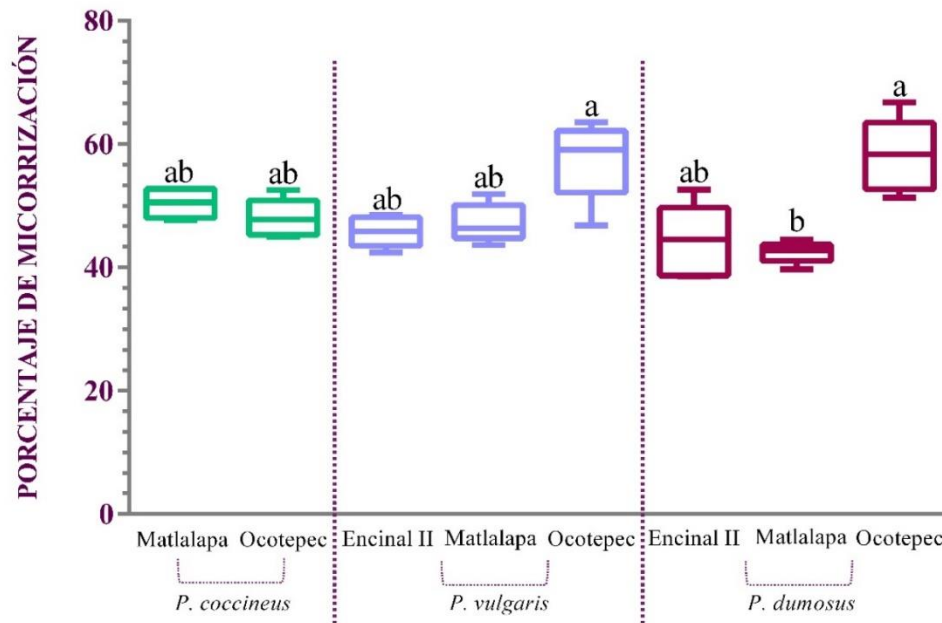


Figura 17. Porcentaje de micorrización del sistema radical de tres especies de tres comunidades del Cofre de Perote Veracruz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes especies de las 7 comunidades. Kruskal- Wallis $P < 0.05$. $n = 5$.

Ya que este experimento fue realizado en sustrato inerte y con *R. irregularis* en cultivo mono axénico, los factores edáficos particulares de la zona de Ocoatepec no tendrían nada que ver con esta observación, por lo que ese elevado porcentaje de colonización debe obedecer al material vegetal *per se*. Las bases de las diferencias en los porcentajes de colonización deben ser estudiadas con mayor detalle.

7.4.2. Peso seco de la parte aérea de la planta y altura de la planta

El análisis estadístico no detectó diferencias significativas en el peso seco de plantas MIC y NO MIC, lo que indica que la condición de micorrización no tuvo efecto en la producción de biomasa de los frijoles de las distintas comunidades, a excepción de la especie *P. vulgaris* de la comunidad Encinal II (**Fig. 18.**). En este particular caso, la biomasa de la planta no micorrizada se vio disminuida en un 58% con respecto a la condición micorrizada (**Fig. 18** inciso G). Los resultados para la variable morfológica altura de la planta (**Fig. 19**) indicaron que no hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos MIC y NO MIC de cada uno de los morfotipos de las comunidades.

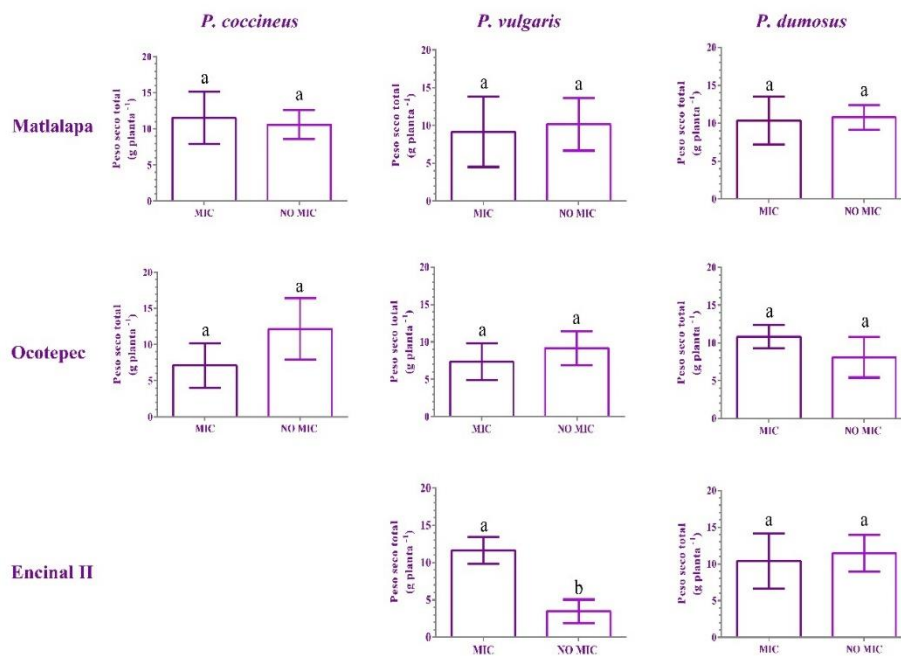


Figura 18. Peso seco de la parte aérea de tres especies de frijoles de tres comunidades del Cofre de Perote, NM: no micorrizado. MIC: micorrizado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los morfotipos de las comunidades. Prueba T de Student ($\alpha= 0.05$) $n=5$.

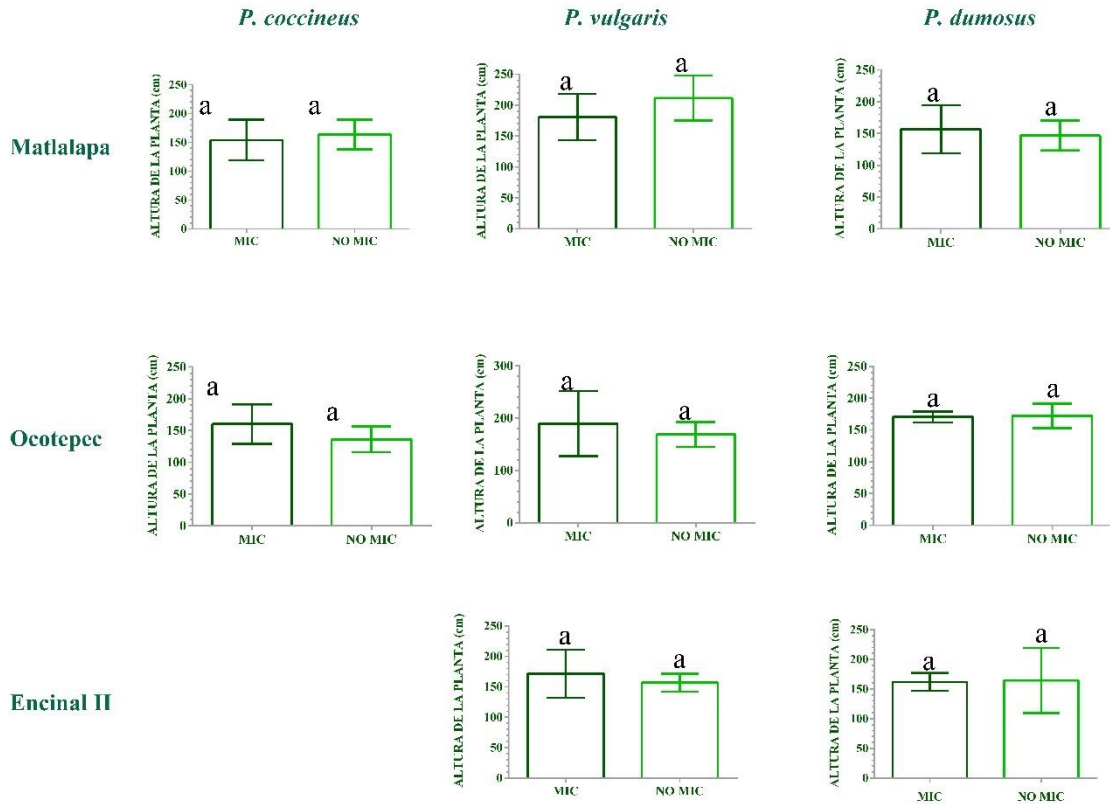


Figura 19. Altura de la planta de tres especies de frijoles de tres comunidades del Cofre de Perote. NM: no micorrizado. MIC: micorrizado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los morfotipos de las comunidades. Prueba T de Student ($\alpha= 0.05$) $n=5$.

Algunas especies vegetales son capaces de aumentar su crecimiento en respuesta a la micorrización; sin embargo, esto no es una generalidad, es decir, existe una gradación en la respuesta de crecimiento a la micorrización. Klironomos (2003) reportó 64 especies silvestres cuyas respuestas de crecimiento a la micorrización fluctuaban entre -46% a 48%, es decir, plantas en los que la micorrización causaba una disminución en el crecimiento (46%) así como un aumento en el mismo (48%). La regulación del crecimiento como consecuencia de la micorrización es un fenómeno complejo, que no depende únicamente del genotipo de la especie vegetal, sino también de otros factores como la especie de el/los HMAs involucrados, así como las condiciones ambientales bajo las que se desarrollan las plantas micorrizada (Smith y Read, 2008). Con respecto a frijol, estudios en variedades cultivadas de esta

leguminosa, reportan resultados variables en cuanto a su respuesta de crecimiento por micorrización. Por un lado, Chauhan *et al.*, (2012) reportaron que la especie de HMA utilizado determina la respuesta de crecimiento arbuscular en frijol (french) encontrando que *Glomus mosseae* es el HMA que causa una mayor respuesta de crecimiento en esta variedad de frijol. Por otro lado, Hacioslihoglu *et al.* (2005) probaron siete genotipos de frijol común colonizados con *G. intraradices* encontrando que tres de los genotipos mostraron una alta respuesta de crecimiento a la micorrización, en dos de estos la respuesta fue positiva pero discreta, y en uno de estos fue negativa. Resultados similares fueron obtenidos en tres variedades de *P. vulgaris* sembradas en el norte de Sinaloa, México, en donde frijol azufrado regional 87 y azufrado higuera no mostraron aumento en el crecimiento por micorrización, pero la variedad A-55 si la mostró (Mora-Romero *et al.*, 2015). Toda esta información refuerza la idea de que la respuesta positiva (aumento), negativa (disminución) o neutra (sin cambio) del crecimiento de una especie vegetal a la micorrización arbuscular, es un fenómeno complejo y multifactorial.

7.4.3. Ensayo de defensa contra *S. sclerotiorum* por micorrización en hoja desprendida

En la **Figura 20** se muestran algunos foliolos de plantas micorrizadas y no micorrizadas provenientes de semillas colectadas en cada una de las tres comunidades estudiadas (Encinal II, Matlalapa y Ocotepc) infectados con el patógeno foliar *S. sclerotiorum*. Los resultados de infección indican que las especies de frijoles analizados se comportan de manera diferencial con respecto a la inducción de defensa por micorrización contra *S. sclerotiorum* (**Tabla 4**). *P. vulgaris* mostró menor daño por el patógeno en hojas de plantas MIC que las NO MIC en plantas de semillas colectadas en el Encinal II, lo cual indica la inducción de resistencia por micorrización. Este comportamiento, sin embargo, no se observó en hojas de plantas de esta especie cuya semilla fue colectada en las comunidades Matlalapa (municipio de Xico) y Ocotepc (municipio de Ayahualulco). Con respecto a *P. coccineus*, las hojas de plantas analizadas provenientes de semillas colectadas de Ocotepc mostraron inducción de defensa por micorrización, aunque no fue el caso para las plantas de Matlalapa (municipio de Xico). Por otro lado, con respecto a *P. dumosus* plantas colectadas en Matlalapa sí mostraron defensa por micorrización, mientras que las de Ocotepc y las de Encinal II no, de manera inversa a lo registrado para *P. coccineus*. De manera atípica, hojas de plantas de *P.*

dumosus provenientes de semilla colectada en El Encinal II, resultaron más susceptibles a *S. sclerotiorum* cuando las plantas fueron micorrizadas.

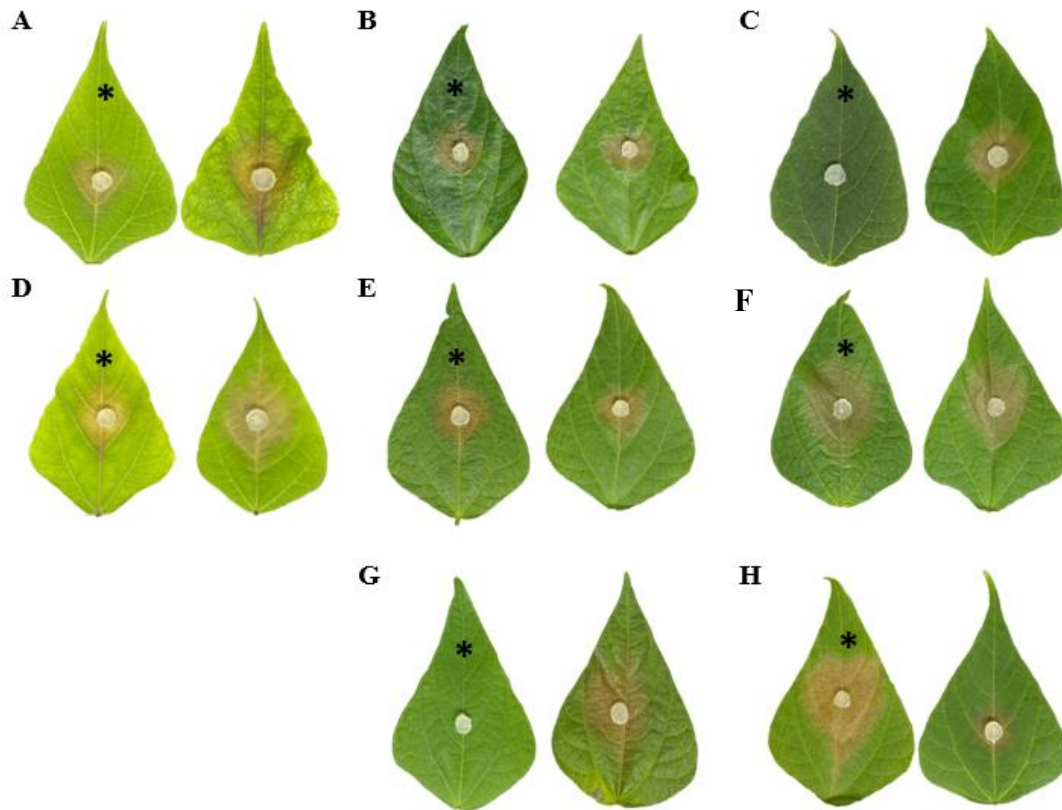


Figura 20. Foliolos infectados por *S. sclerotiorum* a las 40 h postinfección en el tratamiento micorrizado y el control. A. Matlalapa, *P. coccineus*. B. Matlalapa, *P. vulgaris*. C. Matlalapa, *P. dumosus*. D. Ocoatepec, *P. coccineus*. E. Ocoatepec, *P. vulgaris*. F. Ocoatepec, *P. dumosus*. G. Encinal II, *P. vulgaris*. H. Encinal II, *P. dumosus*. ¿con? * foliolos provienen de plantas micorrizado, sin * foliolos de plantas no micorrizadas.

Tabla 4. Medias del área de lesión a las 40 horas de infección en hoja desprendida de tres especies de frijol en tres comunidades de Cofre de Perote.

COMUNIDAD	MICORRIZADO	NO MICORRIZADO	ESPECIE
	DS*	DS*	
MATLALAPA	3.09 ± 0.88	3.34 ± 0.99	<i>P. coccineus</i>
OCOTEPEC	2.31 ± 0.29	4.51 ± 0.43	
ENCINAL II	0.27 ± 0.27	2.53 ± 0.53	<i>P. vulgaris</i>
MATLALAPA	3.43 ± 0.86	4.08 ± 0.27	
OCOTEPEC	2.88 ± 0.19	3.28 ± 0.33	<i>P. dumosus</i>
ENCINAL II	3.58 ± 0.29	1.8 ± 0.26	
MATLALAPA	0.27 ± 0.27	2.53 ± 0.53	<i>P. dumosus</i>
OCOTEPEC	2.76 ± 0.54	3.18 ± 0.36	

Una de las hipótesis de la presente tesis es que plantas de frijoles criollos colonizados con *R. irregularis* inducirá defensa por micorrización con respecto a plantas no micorrizadas, tal como ha sido reportado para diferentes especies vegetales, así como para variedades de frijol comercial (Mora-Romero *et al.*, 2015). Aunque hay reportes que indican que no todas las variedades de especies vegetales responden a la micorrización aumentando la defensa, resultó inesperado que las diferentes especies de frijoles cuya semilla fue obtenida en diferentes localidades presentaran comportamientos distintos y hasta contrastantes (Figura 21) cuando fueron colonizadas con el hongo micorrízico *R. irregularis* frente al patógeno foliar *S. sclerotiorum*. Plantas de la misma especie no mostraron un comportamiento consistente con respecto a la inducción de defensa por micorrización en plantas provenientes de semillas colectadas en las diferentes localidades, contrario a lo esperado. Una posible explicación al respecto podría ser que las plantas de cada una de las especies identificadas no sean genéticamente iguales entre las poblaciones en las diferentes localidades. Sin embargo, es claro que análisis adicionales de variabilidad genética serían necesario para definir con total certeza si los frijoles de las mismas especies cuyas semillas fueron colectadas en distintas localidades son poblaciones iguales o diferentes genéticamente. Otra posible explicación a

las diferencias en las respuestas de las plantas provenientes de semillas colectadas en diferentes localidades con respecto a su respuesta de defensa por micorrización es que estas semillas no fueran axénicas y pudieran estar acarreando diferentes microorganismos propios de los suelos de cada localidad donde fueron colectados, de tal manera que estos microorganismos puedan tener algún efecto inadvertido en los ensayos posteriores de defensa. De hecho, al procesar los tejidos radiculares para determinar el porcentaje de colonización micorrízica, se observó que las raíces de frijoles de las tres especies desarrollaron nódulos fijadores de nitrógeno (**Anexo 1**). La simbiosis de fijación de nitrógeno es una interacción de bacterias del género *Rhizobium* con plantas leguminosas como el frijol en las que estas bacterias son capaces de interaccionar con las raíces de las plantas para formar nódulos en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico. La asociación de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) en *P. vulgaris* ya ha sido extensamente estudiada, siendo *Rhizobium etli* la especie bacteriana más comúnmente asociada a esta especie, al menos en América, aunque también *R. gallicum* junto con *R. etli* ha sido reportado en milpas del centro de México (Silva *et al.*, 2003). La colonización de los sistemas radiculares de las diferentes especies de frijol estudiados por bacterias fijadoras de nitrógeno acarreadas en las semillas pudo haber afectado el resultado en los ensayos de defensa contra el patógeno foliar. Ya ha sido reportado que semillas de frijoles criollos pueden acarrear bacterias de *Rhizobium* en sus testas (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998). En dicho trabajo, 13 cultivares de frijoles de *P. vulgaris* provenientes de diferentes parcelas, mostraron nodulación a pesar de que las semillas fueron desinfectadas por superficie (al igual que en la presente tesis). La conclusión de estos autores fue que los rizobios acarreados en las semillas fueron adquiridos del suelo durante el proceso de cosecha. Trejo *et al.* (2022) también reportaron que semillas de seis leguminosas coberteras transportaban rizobacterias en su testa capaces de desarrollar nódulos, a pesar del proceso de desinfección a la que fueron sometidas. Este fenómeno de acarreo de bacterias fijadoras de nitrógeno por la semilla ha sido propuesto como un mecanismo de dispersión de estas especies bacterianas al ser acarreadas en las semillas que son movilizadas a otros lugares (Martínez *et al.*, 2001). Por otro lado, recientemente se ha reportado que la interacción simbiótica con bacterias fijadoras de N también induce un mecanismo del tipo resistencia sistémica inducida (o ISR) lo cual trae como resultado el

aumento de defensa más generalizado contra patógenos (Díaz-valle *et al.*, 2019; Tonelli *et al.*, 2020), algo similar a la MIR (o resistencia inducida por micorrización).

La manifestación de resistencia inducida por micorrización (o defensa inducida por micorrización), de manera similar con la respuesta de crecimiento por micorrización, puede variar con el genotipo, así como con el tipo de patógeno como se demuestra en frijoles comerciales de las variedades AZUFRADO REGIONAL 87 y A-55 que manifestaron defensa por micorrización contra *S. sclerotiorum*, mientras que la variedad AZUFRADO HIGUERA no la mostró (Mora-romero *et al.*, 2015; Mora-romero *et al.*, 2016). De manera similar, tomate micorrizado con *R. irregularis* manifestó defensa por micorrización ante *S. sclerotiorum* en la variedad Missouri, pero no en la variedad Microtom (Mora-Romero *et al.*, 2015).

Las tres especies de frijol (*P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. vulgaris*) analizadas en esta tesis mostraron inducción de defensa por micorrización, pero solo en plantas cuyas semillas fueron colectadas en una de las tres comunidades, pero no en las tres (**Tabla 4**). Es posible que la colonización simultánea de las raíces de estas plantas con bacterias formadoras de nódulos fijadores de nitrógeno puedan haber comprometido la respuesta de defensa global contra el patógeno. Existen reportes en la literatura en donde se prueban tanto la aplicación de HMA y de BFN en cultivos de interés comercial con resultados variables. En muchos de estos trabajos los resultados son positivos en cuanto a la protección que estos microorganismo benéficos confieren a las plantas en cuanto a la defensa contra patógenos. En algunos casos, el uso simultáneo de los dos microorganismos benéficos (HMA y rizobias) pueden actuar de manera aditiva o sinérgica en cuanto a los beneficios observados, por lo que la estrategia de combinar ambos microorganismos es vista como promisoría por algunos autores (Sayeed *et al.*, 2010). En otros casos, ya se ha observado que la respuesta no favorece a la aplicación simultánea del HMA y de *Rhizobium*, sino solo a uno de los dos. Por ejemplo, ensayos de defensa en la planta *Vigna mungo* (black gram) mostraron que las plantas micorrizadas con *G. intrarradices* se defendieron mejor contra el insecto herbívoro *Spodoptera litura* que cuando las plantas se colonizaron con el HMA y con *Rhizobium* de manera simultaneo (Selvaraj *et al.*, 2020). Finalmente, la respuesta de defensa dependerá de las especies de HMA y *Rhizobium* utilizados, así como el genotipo de la planta.

En Japón, Asai *et al.*, (1944) estudiaron diferentes leguminosas en suelos con una baja microbiota y demostraron que en estas condiciones las plantas tenían dificultad para crecer y para nodular, pero cuando hicieron la aplicación del HMA *Glomus elunicatum*, las plantas empezaron un proceso de recuperación a parte las BFN, empezaron el proceso de nodulación. Esta puede ser otra forma de explicar lo que sucedió en nuestros experimentos, al inocular las plantas con el HMA *R. irregularis* contribuyó al proceso de nodulación, sin embargo, no podemos deducir que los nódulos estaban en un proceso de fijación de nitrógeno y cumpliendo una actividad dentro de la planta. Esta relación entre la fijación de nitrógeno y los HMA sugieren un mayor crecimiento en las diferentes especies de plantas, pero, es de saberse que, desde hace muchos años se ha estudiado que este crecimiento depende de la especie de la planta, el tipo de la raíz de la planta y de la especie simbiótica con la que se relacione la planta, esto concuerda con los resultados de la variable altura evaluada en este trabajo, donde el tratamiento como el control no tuvieron diferencias significativas en las tres especies de las tres comunidades (Encinal II: *P. dumosus*, *P. vulgaris*; Ocotepc: *P. dumosus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus* Matlalapa: *P. dumosus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*).

Alaya *et al.*, (2021), investigaron el efecto de diferentes cantidades de inóculos *R. irregularis* sobre el crecimiento y porcentaje de micorrización en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.), como resultados para el caso del crecimiento de la planta tomando en cuenta la variable altura, difieren con los resultados del presente trabajo porque no se obtuvieron diferencias significativas en la variable altura, no obstante, ellos encontraron diferencias significativas en el crecimiento de la planta respecto al testigo, aplicando 2 g de inóculo de *R. irregularis* por planta, con 42 días de exposición, la altura mayor fue de 140 cm, así como se encontró el valor más bajo que fue de 71.3 cm, a 28 días de exposición y 0 gramos (testigo). Para el caso del porcentaje de micorrización, si se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control, para el caso del cultivo de maíz, el porcentaje más alto (44.6%) se obtuvo a los 28 días con 5 g de inóculo, para el caso del cultivo del frijol (tres especies estudiadas) del presente trabajo, también se trabajó con el HMA *R. irregularis*, los porcentaje de micorrización más altos se obtuvieron a los 70 días de inoculadas las plantas, las especies *P. vulgaris* y *P. dumosus* de la comunidad Ocotepc, tuvieron 74% y 72% de micorrización mientras que las especies *P. dumosus* de la comunidad Encinal II y *P. dumosus* de la comunidad Matlalapa presentaron los porcentajes más bajos de micorrización 49 y 46%.

Según lo establecido en párrafos preliminares por Oldroyd, (2013), los HMA no solo ayudan a la absorción de nutrientes, y dependiendo de la planta y del HMA que se utilice, el aumento de la biomasa, también, las ayudan a la protección durante el ataque de fitopatógenos y plagas, esto gracias a la respuesta sistémica y de acondicionamiento de la planta ante estos eventos.

Todos los casos hipotéticos aquí planteados, serían necesarios ratificarse con ensayos donde de manera específica se haga un porcentaje de micorrización de cada estructura y así saber con exactitud qué pasa en cada paso de la interacción mutualista, eso acompañado de ensayos de cinética, para saber en qué día, la actividad del HMA está en su máxima expresión, además de esto, aunque se conocen varios genes que se activan para la defensa de las plantas, es interesante seguir estudiando en el caso de los frijoles criollos, cómo interactúan con la micorrización, además de esto, no podemos olvidar el hecho que los frijoles acarreaban rizobacterias en las semillas, otro factor importante para investigar esta interacción tripartita, porque ya hay estudios donde demuestran que los dos microorganismos comparten genes similares llamados SYM (simbiosis) para crear este vínculo con la planta y no podemos olvidar que la resistencia inducida no es específica contra un patógeno (Zuñiga *et al.*, 2022)

De manera evidente, no es posible llegar a conclusiones definitivas sobre la respuesta de defensa inducida por micorrización en las especies estudiadas ya que las semillas utilizadas acarreaban inóculo bacteriano desconocido, los cuales pudieron alterar los resultados de defensa observados. Aun así, este experimento nos permitió saber que los frijoles criollos estudiados (especies: *P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. vulgaris*) poseen la capacidad de mostrar que el establecimiento de la micorrización arbuscular con *R. irregularis*, indujo defensa contra un patógeno foliar necrotrofo como *S. sclerotiorum*. También, la presencia de nódulos en las raíces de las plantas de frijol sugiere la presencia inadvertida de bacterias fijadoras de nitrógeno que están siendo acarreadas en la testa de las semillas, y que esta asociación simbiótica afecta la respuesta de defensa contra patógenos. Finalmente, la diversidad de respuestas observadas en los diferentes frijoles y sus procedencias sugiere que las poblaciones de rizobia en las distintas localidades no son iguales.

VII. CONCLUSIONES

- Los tres morfotipos de frijoles pertenecen a tres especies diferentes: ayocote como *P. coccineus*, gordo como *P. dumosus*, enredador como *P. vulgaris*.
- Las especies identificadas son igual de susceptibles a *S. sclerotiorum*.
- En general, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos micorrizados y NO micorrizados en crecimiento (peso seco y altura de planta), en los frijoles de cada una de las comunidades Encinal II, Matlalapa y Ocotepéc.
- Los tres morfotipos estudiados mostraron inducción de defensa por micorrización en plantas obtenidas de semillas de al menos una de las comunidades seleccionadas.

VIII. Bibliografía

1. Abdel-Fattah, G. M., El-Haddad, S. A., Hafez, E. E., & Rashad, Y. M. (2011). Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiological Research*, 166(4), 268-281. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.04.004>
2. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
3. Alaya, B. S. L., Hidalgo Rodríguez, J. E. M., Otiniano, C. C. R., Vera Vega, M. A., Huamán, J. J. P., Lujan Rojas, J. M., & Chaman Medina, M. E. (2021). Efecto de diferentes cantidades de inóculos *Rhizophagus irregularis*. *Arnaldoa*, 28(3), 311-323. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.283.28311>
4. Ali, M., & Atallah, O. (2020). Controlling common bean white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 47(1), 101-117. <https://doi.org/10.21608/zjar.2020.70125>
5. Alkooranee, J. T., Aledan, T. R., Ali, A. K., Lu, G., Zhang, X., Wu, J., et al. (2017). Detecting the hormonal pathways in oilseed rape behind induced systemic resistance by *Trichoderma harzianum* TH12 to *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS ONE*, 12(1), e0168850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168850>
6. Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*, 61, 84-90. ISSN 1405-6550.
7. Apodaca-Sánchez, M. A. (2006). Enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). En *Memorias del Curso de Enfermedades de Hortalizas*.
8. Asai, T. (1944). Über die Mykorrhizenbildung der Leguminosen-Pflanzen. *Japanese Journal of Botany*. 12, 359-408.
9. Ayala-Garay, A.V., Acosta-Gallegos, J.A., & Reyes-Muro, Luis. (2021). *El Cultivo del Frijol Presente y Futuro para México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Centro. Campo Experimental Bajío. Celaya Gto. México, Libro Técnico No. 1. 232 p.
10. Ayuntamiento de Acajete. (2022). Plan de Desarrollo Municipal de Acajete. <https://www.veracruz.gob.mx/finanzas/planeacion/planes-de-desarrollo-municipales-2022-2025/>
11. Ayuntamiento de Ayahualulco. (2022). Plan de Desarrollo Municipal de Ayahualulco. <https://www.veracruz.gob.mx/finanzas/wp-content/uploads/sites/2/2022/PMD/PMD%20Ayahualulco.Veracruz.2022-2025.pdf>
12. Ayuntamiento de Xico. (2022). Plan de Desarrollo Municipal de Xico. <https://www.veracruz.gob.mx/finanzas/planeacion/planes-de-desarrollo-municipales-2022-2025/>
13. Bellón, M. R., Barrientos, P. A. F., Colunga, G. M. P., Perales, H. R., Rosales, S. R., & Zizumbo, V. (2009). *Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas*

- cultivadas: Estado de conservación y tendencias de cambio* (Vol. II, pp. 355-382). México: CONABIO.
14. Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., et al. (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist*, 197, 300–313. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>
 15. Cárdenas, L., Alemán, E., Nava, N., et al. (2006). Early responses to Nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant. *Planta*, 223(4), 746-754. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0132-9>
 16. Cárdenas, R. F. A., Muruaga, M. J. S., & Acosta, G. J. A. (1996). Catálogo Banco de Germoplasma de *Phaseolus* spp. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. *Agricultura Técnica en México*, 22, 163-178.
 17. Castillo, M. M., Ramírez, V. P., Castillo, G. F., & Miranda, C. S. (2006). Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del oriente del Estado de México.
 18. Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Thilagar, G., & Ravi, J. E. (2012). Plant growth response of French bean to arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Soil Biology and Ecology*, 32(1-2), 50-56.
 19. Choi, J., Summers, W., & Paszkowski, U. (2018). Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521>
 20. Debouck, D. (2021). *Phaseolus* beans (Leguminosae, Phaseoleae): A checklist and notes on their taxonomy and ecology. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 15(1), 73-111. <https://doi.org/10.17348/jbrit.v15.i1.1052>
 21. Debouck, D. G., & Freytag, G. F. (2002). *Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America*. Botanical Research Institute of Texas (BRIT). 298 p. (Sida, botanical miscellany no. 23).
 22. Delgado, S. A. (1988). Variation, taxonomy, domestication, and germplasm potentialities in *Phaseolus coccineus*. In P. Gepts (Ed.), *Genetic resources of Phaseolus beans (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 6, pp. 441–463)*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2786-5_18
 23. Delgado, S. A., Turley, T., Richman, A., & Lavin, M. (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 17, 438-460. <https://doi.org/10.2307/2419699>
 24. Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
 25. Fierro, C. R. A., Castro, M. M. G., Ruelas, A. R. D., Apodaca, S. M. Á., & Maldonado, M. I. E. (2013). Induced protection by Rhizophagus intraradices against Fusarium wilt of tomato. 38, (1).

26. Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489-500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
27. Hacisalihoglu, G., Duke, E. R., & Longo, L. M. (2005, December). Differential response of common bean genotypes to mycorrhizal colonization. *In Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 118, 150-152
28. Hafez, E.E., Abdel-Fattah, G.M., El-Haddad, S.A., et al. (2013). Molecular defense response of mycorrhizal bean plants infected with *Rhizoctonia solani*. *Annals of Microbiology*, 63, 1195–1203. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0578-5>
29. Hall, T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
30. Klironomos, J. N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(8), 2292-2301. <https://doi.org/10.1890/02-0413>
31. Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695-1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
32. León-Rojas, G. I., Rodríguez-Soto, C., & Padilla-Loredo, S. (2020). La conservación in situ del frijol criollo: construyendo soberanía alimentaria en el sureste del Estado de México. *Revista CoPaLa. Construyendo Paz Latinoamericana*, (9), 125-141. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=668170996011>
33. López, M.M., Martínez, E.O., Verdugo, C.X.E., Ramírez, D.C.M., Ibarra, S.C.R., Martínez, V.C., & Mora, R.G.A. (2021). La aplicación exógena de metil jasmónico aumenta la defensa inducida por micorrización arbuscular contra *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol. *Scientia Fungorum*, 51, e1336. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1336>
34. López-López, A., Negrete-Yankelevich, S., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez, J., & Martínez-Romero, E. (2013). Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). *Systematic and Applied Microbiology*, 36(1), 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.006>
35. Martínez-Camacho, Y., Negrete-Yankelevich, S., Maldonado-Mendoza, I., Nuñez-de la Mora, A., & Amescua-Villela, G. (2021). Agroecological management with intra- and interspecific diversification as an alternative to conventional soil nutrient management in family maize farming. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 46, 1-28. <https://doi.org/10.1080/21683565.2021.2015736>
36. Martínez-Romero, E. (2001). Poblaciones de rhizobia nativas de México. *Acta Zoológica Mexicana, Número Especial* 1, 29-38.
37. Mex-Álvarez, R. M. de J., Garma-Quen, P. M., Yanez-Nava, D., Guillen-Morales, M. M., & Novelo-Pérez, M. I. (2021). Caracterización morfométrica de *Phaseolus vulgaris* en Campeche, México. *CENIC Ciencias Biológicas*, 52(1), 32-38. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000100032&lng=es&tlng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000100032&lng=es&tlng=es)

38. Mora, R. G. A., Cervantes, G. R. G., Galindo, F. H., et al. (2015). Mycorrhiza-induced protection against pathogens is both genotype-specific and graft-transmissible. *Symbiosis*, 66, 55–64. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0334-2>
39. Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Gómez, B.-M., Blanco, L., & Lara, M. (2017). Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PLoS ONE*, 12(8), e0182328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182328>
40. Negrillo, A. M. C., González, A. P., & Fernández, J. J. F. (2009). El moho blanco: una enfermedad común en el cultivo de Faba Granja Asturiana. *Tecnología Agroalimentaria: Boletín Informativo del SERIDA*, (6), 7-9. https://www.researchgate.net/publication/40533480_El_moho_blanco_una_enfermedad_comun_en_el_cultivo_de_Faba_Granja_Asturiana
41. Nicolè, S., Erickson, D. L., Ambrosi, D., Bellucci, E., Lucchin, M., Papa, R., & Barcaccia, G. (2011). Biodiversity studies in *Phaseolus* species by DNA barcoding. *Genome*, 54(7), 529-545. <https://doi.org/10.1139/g11-018>
42. Njambere, E. N., Peever, T. L., Vandemark, G., & Chen, W. (2014). Genotypic variation and population structure of *Sclerotinia trifoliorum* infecting chickpea in California. *Plant Pathology*, 63(5), 994-1004. <https://doi.org/10.1111/ppa.12176>
43. Oldroyd, G. (2013). Speak, friend, and enter: Signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 252-263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
44. O'Sullivan, C. A., Belt, K., & Thatcher, L. F. (2021). Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 707509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.707509>
45. Parniske, M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 414-421. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.011>
46. Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
47. Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-160.
48. Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>
49. Santana-Espinoza, S., Sierra-Zurita, D., Rosales-Serna, R., & Ríos-Saucedo, J. C. (2022). Caracterización genética y productiva de variedades criollas de frijol cultivadas en Durango, México. *Agrofaz: Publicación Semestral de Investigación Científica*, 4(1), 12-19. [ISSN 1665-8892](https://doi.org/10.1665-8892)
50. Sarmiento, L. L. G., López, M. M., Sepúlveda, J. G., & Rodríguez, M. M. (2020). Photosynthetic performance and stevioside concentration are improved by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* under different phosphate concentrations. *PeerJ*, 8, e10173. <https://doi.org/10.7717/peerj.10173>

51. Sarmiento-López, L. G., López-Espinoza, M. Y., Juárez-Verdayes, M. A., & López-Meyer, M. (2023). Genome-wide characterization of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family in *Solanum lycopersicum* L. and gene expression analysis in response to arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PeerJ*, 11, e15257. <https://doi.org/10.7717/peerj.15257>
52. Schwartz, H. F., & Steadman, J. R. (1978). Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 68, 383-388.
53. Selvaraj, A., Thangavel, K., Uthandi, S., (Year, Month Date Published). Arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) and diazotrophic bacterium (*Rhizobium BMBS*) primed defense in blackgram against herbivorous insect (*Spodoptera litura*) infestation. *Microbiological Research*, 231, 126355. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126355>
54. SIAP-SADER. (2021). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
55. Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. <https://cgspace.cgiar.org/items/f2759384-4a19-4df5-b2fa-11016fa11002>
56. Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T. M. D., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., & Newman, M. A. M. (2009). Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*, 20(4), 406-419. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp201>
57. Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E., & Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 884-893. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.884-893.2003>
58. Singh, S. P., Gutiérrez, J. A., Molina, A., Urrea, C., & Gepts, P. (1991). Genetic diversity in cultivated common bean: II. *Marker-based analysis of morphological and agronomic traits*. *Crop Science*, 31(1), 23-29. <https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100010005>
59. Smolińska, U., & Kowalska, B. (2018). Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – a review. *Journal of Plant Pathology*, 100, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>
60. Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., ... Varshney, R. K. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>
61. Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
62. Subramanian, K., Vivek, P., Balakrishnan, N., Belliraj, N., & Rajkishore, S. K. (2019). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizoglyphus intraradices* on active and passive pools of carbon in long-term soil fertility gradients of maize based

- cropping system. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(4), 549-565. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1512100>
63. Tonelli, M. L., Figueredo, M. S., Rodríguez, J., Fabra, A., & Ibañez, F. (2020). Induced systemic resistance-like responses elicited by rhizobia. *Plant and Soil*, 448(1-14). <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04423-5>
64. Trejo, D., Hernández, A. E., Baeza, G., Pérez-T. G., Morgado, V. E., & Bañuelos, J. (2021). Efectividad de los hongos micorrízicos arbusculares introducidos y nativos en seis leguminosas coberteras. *Scientia Fungorum*, 51, e1320. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1320>
65. Usman, M., Ho, P. T., Frank, H. E. R., Calvo Polanco, M. G. I., & Garcia, K. Z. S. D. (2021). Mycorrhizal symbiosis for better adaptation of trees to abiotic stress caused by climate change in temperate and boreal forests. *Frontiers in Forests and Global Change*. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.742392>
66. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press, Inc.
67. Zuñiga, O. A., Gonzalez, A., & Solís, R. L. (2021). Micorrizas y rhizobios: un diálogo molecular con el huésped vegetal. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25118.25921>

ANEXO UNO

Nódulos en raíces de plantas de la especie *P. dumosus* de la comunidad Encinal II del Cofre de Perote, Veracruz. Esta es sólo una muestra de una sola especie de las tres especies aquí estudiadas, las cuales se nodularon de igual manera.

