

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A *Sclerotinia sclerotiorum* EN CUATRO GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) MICORRIZADOS

Guadalupe Arlene Mora-Romero, Melina López-Meyer, Claudia María Ramírez-Douriet, María del Carmen Martínez-Valenzuela, Cecilia de Los Ángeles Romero-Urías, Gabriel Herrera-Rodríguez y Rubén Félix-Gastélum

RESUMEN

El efecto de la colonización micorrízica en la susceptibilidad a *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal del moho blanco fue evaluada en cuatro genotipos de frijol: Azufrado Regional 87 (Az Reg 87), Azufrado Higuera (Az Hig), A-55 y BAT 93, mediante el método de la pajilla (straw test). La colonización con *Rhizophagus irregularis* (previamente conocido como *Glomus intraradices*) redujo la susceptibilidad a

S. sclerotiorum en Az Reg 87, A-55, y BAT 93, pero no en Az Hig. Estos resultados representan una evidencia adicional de la existencia de la reducción de susceptibilidad por micorrización contra patógenos foliares y su dependencia del genotipo de la planta, y sugiere que la colonización micorrízica debe ser considerada en los programas de mejoramiento de resistencia frente a *S. sclerotiorum*.

Introducción

La simbiosis micorriza arbuscular es una asociación que se establece entre las raíces de la mayoría de las especies de plantas y un grupo de hongos del suelo pertenecientes al filum Glomeromycota (Oldroyd *et al.*, 2009). En esta asociación, ambas partes se benefician. El hongo absorbe y transfiere nutrientes, principalmente fósforo, y la planta le proporciona carbono (Harrison, 2005). Las esporas del hongo germinan en el suelo generando hifas, las cuales al encontrarse con la raíz de una planta susceptible a ser colonizada, crecen en su superficie y finalmente penetran la epidermis. Las hifas son capaces de llegar y penetrar a células del córtex interno, en donde, sin romper la

membrana celular son invaginadas y sufren una intensa ramificación formando lo que se conoce como arbuscúlos. Estas son estructuras especializadas en donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre los simbiosiontes (Harrison, 2005). Además de los arbuscúlos, el hongo puede formar vesículas, en donde se almacenan nutrientes, principalmente lípidos. También, las hifas del hongo pueden crecer de manera extraradical, absorbiendo nutrientes del suelo, los que son translocados hasta los arbuscúlos, donde son transferidos a la célula vegetal mediante mecanismos de transporte finamente regulados por ambos simbiosiontes.

Además de los beneficios nutrimentales, se ha observado que la colonización micorrízica arbuscular reduce los

niveles de infección causada por patógenos que atacan la raíz. La colonización con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) reduce los efectos negativos causados por el hongo *Rhizoctonia solani* en frijol (Abdel-Fattah *et al.*, 2011). Tanto *Funneliformis mosseae* (sinónimo: *Glomus mosseae*) como *Rhizophagus irregularis* (sinónimo: *G. intraradices*), inducen bioprotección contra *Aphanomyces euteiches* en *Medicago truncatula* (Hilou *et al.*, 2013). Respecto a nematodos parásitos, *G. intraradices* induce resistencia sistémica en raíces de bananas contra *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae* (Elsen *et al.*, 2008), y contra *Xiphinema index* en plantas de uva (Hao *et al.*, 2012). Las lesiones causadas por el nematodo *Meloidogyne*

incognita fueron significativamente menores en raíces de plantas de tomate colonizadas con *G. mosseae* comparadas con las no colonizadas (Vos *et al.*, 2013). Así mismo, existen ejemplos en los que la colonización con HMA reduce la susceptibilidad a patógenos foliares; en *M. truncatula* la colonización con *G. intraradices* incrementa la resistencia a la bacteria patogénica *Xanthomonas campestris* (Liu *et al.* 2007), *G. fasciculatum* reduce la severidad de lesiones causadas por *Alternaria solani* en plantas de tomate (Noval *et al.*, 2007) y en plantas de chile contra *Phytophthora capsici* (Alejo-Iturvide *et al.*, 2008). *Botrytis cinerea* causa mayores lesiones necróticas en hojas de plantas de tomate no colonizadas, respecto a las

PALABRAS CLAVE / Frijol / Micorrización / *Phaseolus vulgaris* / *Rhizophagus irregularis* / *Sclerotinia sclerotiorum* / Resistencia Sistémica Inducida /

Recibido: 16/12/2014. Modificado: 26/01/2016. Aceptado: 27/01/2016.

Guadalupe Arlene Mora-Romero. Doctora en Ciencias en Biotecnología, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Instituto Politécnico Nacional (IPN), México. Profesora, Universidad de Occidente (UDEO), México. Dirección: Instituto de Investigación en Ambiente y Salud-Departamento

Biológica, UDEO. Los Mochis, Sinaloa CP 81200, México. e-mail: arlene.mora@udo.mx

Melina López-Meyer. Doctora en Ciencias en Biología Molecular de Plantas, University of Texas A&M, EEUU. Profesora Investigadora, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México.

Claudia María Ramírez-Douriet. Maestra en Recursos Naturales y Medio Ambiente, IPN, México.

Técnico Docente, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México.

María del Carmen Martínez-Valenzuela. Doctora en Ciencias en Genotoxicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Profesora Investigadora, UDEO, México.

Cecilia de Los Ángeles Romero-Urías. Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad

Autónoma de Sinaloa, México. Profesora Investigadora, UEDO, México.

Gabriel Herrera-Rodríguez. Maestro en Ciencias, IPN, México. Profesor Investigador, UDEO, México.

Rubén Félix-Gastélum. Doctor en Fitopatología, University of California, Davis, EEUU. Profesor Investigador, UDEO, México.

EVALUATION OF THE SUSCEPTIBILITY TO *Sclerotinia sclerotiorum* IN FOUR MICORRYZED BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) GENOTYPES

Guadalupe Arlene Mora-Romero, Melina López-Meyer, Claudia María Ramírez-Douriet, María del Carmen Martínez-Valenzuela, Cecilia de Los Angeles Romero-Urías, Gabriel Herrera-Rodríguez and Rubén Félix-Gastélum

SUMMARY

The effect of mycorrhizal colonization on reducing susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* was investigated in four common bean genotypes: Azufrado Regional 87 (Az Reg 87), Azufrado Higuera (Az Hig), A-55, and BAT 93 using the 'straw test' method. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungi *Rhizophagus irregularis* (formerly known as *Glomus intraradices*) reduced

susceptibility to *S. sclerotiorum* in A-55, Az Reg 87 and BAT 93 plants, but not in Az Hig. These results provide additional evidence of the existence of a mechanism that reduces susceptibility by mycorrhiza colonization against foliar pathogens, and suggest that mycorrhizal colonization should be considered in breeding programs for *S. sclerotiorum* resistance.

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A *Sclerotinia sclerotiorum* EM QUATRO GENÓTIPOS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) MICORRIZADOS

Guadalupe Arlene Mora-Romero, Melina López-Meyer, Claudia María Ramírez-Douriet, María del Carmen Martínez-Valenzuela, Cecilia de Los Angeles Romero-Urías, Gabriel Herrera-Rodríguez e Rubén Félix-Gastélum

RESUMO

O efeito da colonização micorrízica na susceptibilidade a *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco foi avaliada em quatro genótipos de feijão: Azufrado Regional 87 (Az Reg 87), Azufrado Higuera (Az Hig), A-55 e BAT 93, mediante o teste do canudo (straw test). A colonização com *Rhizophagus irregularis* (previamente conhecida como *Glomus intraradices*) reduziu a susceptibilidade a *S. sclerotio-*

rum em Az Reg 87, A-55, e BAT 93, mas não em Az Hig. Estes resultados representam uma evidência adicional da existência da redução de susceptibilidade por micorrização contra patógenos foliares e sua dependência do genótipo da planta, e sugere que a colonização micorrízica deve ser considerada nos programas de melhoramento de resistência frente a *S. sclerotiorum*.

colonizadas con *G. mosseae* (Pozo *et al.*, 2010; Fiorilli *et al.*, 2011), *Glomus* sp. induce resistencia a *P. infestans* en plántulas de papa (Gallou *et al.*, 2011) y *G. intraradices* a *Magnaporthe oryzae* en plantas de arroz (Campos-Soriano *et al.*, 2012). Todo esto indica que la colonización con hongos micorrizicos induce bioprotección en la planta, tanto de manera local como sistémica.

Sclerotinia sclerotiorum es un hongo importante a nivel mundial que infecta alrededor de 400 especies de plantas incluyendo a frijol (Schwartz y Singh, 2013). En el norte de México, este patógeno causa severas pérdidas económicas (Apodaca-Sánchez, 2009). Hasta ahora, una resistencia completa a *S. sclerotiorum* no ha sido descrito en frijol (Schwartz y Singh, 2013), y el empleo de fungicidas sintéticos es el principal medio de controlar la enfermedad en cultivos agrícolas comerciales, lo cual tiene efectos negativos en el ambiente y en la salud humana (Martínez-Valenzuela

y Gómez-Arroyo, 2007). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de estrategias más amigables con el medio ambiente para el manejo de enfermedades como las causadas por *S. sclerotiorum*. Estas estrategias deben estar alineadas con los programas de mejoramiento de resistencia con el fin de reducir las pérdidas económicas por patógenos en cultivos agrícolas. El uso de microorganismos que inducen la resistencia a enfermedades de plantas, tales como los HMA, es una alternativa adecuada.

Mora-Romero *et al.* (2015) evaluó la resistencia inducida por micorrización en tres variedades de frijol: A-55, Az Reg 87 (Azufrado Regional 87) y Az Hig (Azufrado Higuera) contra el patógeno foliar *S. sclerotiorum*, por el método de hoja desprendida (Steadman *et al.*, 1997). Este método consiste en la co-incubación de un foliolo escindido de una planta de frijol con micelio de *S. sclerotiorum* en una pequeña cámara húmeda. El nivel de daño se registra midiendo el diámetro

del halo de necrosis que se forma a partir del micelio colocado en el centro de la lámina del foliolo, a lo largo del tiempo. Mediante este método se detectó la reducción de susceptibilidad por micorrización en las variedades A-55 y Az Reg; sin embargo, Az Hig no presentó dicho comportamiento. El método de la hoja desprendida (en este caso foliolo) es un procedimiento sencillo y rápido; no obstante, involucra la escisión del órgano a ensayar, por lo que no permite evaluar la respuesta de la planta completa al ataque por el patógeno. El método de la pajilla o 'straw test', como se le conoce en inglés (Petzoldt y Dickson, 1996), ha sido utilizado para el monitoreo de resistencia fisiológica a *S. sclerotiorum* en plantas completas, principalmente en programas de mejoramiento; contempla una escala numérica para evaluar el avance del patógeno sobre el tallo de la planta y es una prueba estándar para seleccionar variedades resistentes a *S. sclerotiorum*.

El objetivo del presente trabajo fue utilizar el método de la pajilla para evaluar el efecto de la colonización con el HMA *R. irregularis* en la reducción de susceptibilidad a *S. sclerotiorum* en los genotipos de frijol A-55, Az Reg 87, Az Hig y BAT 93, a fin de confirmar los resultados obtenidos por el método de hoja desprendida, además de generar información sobre la respuesta inducida por micorrización ante *S. sclerotiorum* en el genotipo BAT93.

Descripción de los Genotipos de Frijol

A55

A55 es una línea de frijol negro de semilla pequeña, con hábito de crecimiento indeterminado tipo II, tallo erecto y con pocas ramificaciones. Esta variedad fue desarrollada en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. De acuerdo a Singh *et al.* (2003), A55 presenta una reducción en la incidencia y severidad del moho

blanco causado por *S. sclerotiorum* bajo presiones moderadas del patógeno, pero es susceptible a presiones altas de la enfermedad en campo e invernadero.

Azufrado Higuera (Az Hig)

Az Hig es un genotipo que produce semilla amarilla (Salinas-Pérez *et al.*, 1995). Es resistente a royas, tolerante a virus, pero susceptible al moho blanco causado por *S. sclerotiorum*; sin embargo, puede escapar a la enfermedad por su hábito de crecimiento de tipo determinado.

Azufrado Regional (Az Reg)

Az Reg presenta hábito de crecimiento arbustivo tipo I, de grano amarillo claro (azufrado). Es resistente a roya, tolerante a virosis, susceptible a la antracnosis, tizón común y al moho blanco aunque puede escapar a esta enfermedad debido a su hábito de crecimiento (Salinas-Pérez *et al.*, 1989). Las semillas fueron proporcionadas por Centro Experimental del Valle del Fuerte (CEVAF) del INIFAP, al igual que A55 y AZ Hig.

BAT 93

BAT 93 tiene un hábito de crecimiento tipo III y semillas color crema; es una línea altamente homocigota (McClean y Myers, 1990) extensamente utilizada en estudios genéticos (Porch *et al.*, 2009). Las semillas de BAT 93 fueron proporcionadas por Marta Santalla (Misión Biológica de Galicia-CSIC. Pontevedra, España).

Métodos

Producción de inóculo de Sclerotinia sclerotiorum

Sclerotinia sclerotiorum se obtuvo a partir de esclerocios recolectados en campos agrícolas del norte de Sinaloa, México. Los esclerocios fueron desinfectados con hipoclorito de sodio 0,5% y enjuagados dos veces durante 1min con agua destilada estéril, secados

con papel estéril y posteriormente sembrados en placas con medio PDA (Agar-Dextrosa-Papa) e incubados a 19°C durante tres días. El micelio activo del margen de la colonia se transfirió nuevamente en placas con PDA y se empleó en experimentos subsiguientes.

Todas las infecciones de *S. sclerotiorum* en tejido vegetal se establecieron utilizando micelio derivado de un sólo esclerocio. La identidad de *S. sclerotiorum* se determinó por secuenciación de un fragmento de amplificación de la región 5.8S ADNr (datos no mostrados), utilizando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990).

Inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares

El inóculo de HMA se obtuvo de cultivos de raíces transformadas (cultivo de raíces obtenidas mediante la transformación con *Agrobacterium rhizogenes*) de zanahoria (*Daucus carota* L.) colonizadas de manera axénica con *R. irregularis* y mantenidas en medio de cultivo en cajas Petri (Bécard y Fortin, 1988). La suspensión de esporas se obtuvo conforme a lo descrito por St-Arnaud *et al.* (1996).

Germinación y cultivo de las plantas

Las semillas de frijol de las variedades A-55, Az Reg 87 y Az Hig se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en etanol 96° durante 2min, seguido por 5min en hipoclorito de sodio 0,5%; enjuagadas cuatro veces con agua destilada estéril y germinadas en vermiculita:arena estéril 1:1 (v/v). Ocho días después de la siembra, cuatro plántulas de cada variedad se transfirieron a macetas de 0,5 litros previamente llenadas con el mismo tipo de sustrato, y se inocularon con 500 esporas de *R. irregularis* suspendidas en 1ml de agua destilada estéril por planta. Como control de inoculación, igual número de plantas fueron tratadas con 1ml de

agua obtenida del último lavado de las esporas (pero sin esporas de hongo).

En el caso de las semillas de BAT 93, éstas fueron desinfectadas de igual manera que las otras tres variedades, pero transferidas a conos plásticos de 150ml e inoculadas con 0,1g de macerado de raíces de zanahoria colonizadas con *R. irregularis*.

Todas las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento (Binder, model KBW 400) bajo condiciones controladas de luz y temperatura (8h luz, 25°C/18h oscuridad, 19°C) para promover el crecimiento de plantas y el establecimiento de la simbiosis. Las plantas se fertilizaron semanalmente con 50ml de solución nutritiva de Hoagland: 2,5mM Ca(NO₃)₂·4H₂O; 2,5mM KNO₃; 1mM MgSO₄·7H₂O; 0,05mM NaFe EDTA; 10µM H₃BO₃; 0,2µM Na₂MoO₄·2H₂O; 1µM ZnSO₄·7H₂O; 2,0µM MnCl₂·4H₂O; 0,5µM CuSO₄·5H₂O; 0,2µM CoCl₂·6H₂O; 25µM HCL; 0,5mM MES buffer; 200µM KH₂PO₄ (Hoagland y Arnon, 1950), en la que la concentración de KH₂PO₄ fue disminuida de 200 a 20µM (condición de bajo fosfato) tanto para plantas colonizadas como para las plantas control. Para las plantas BAT 93 se utilizaron 20µM como condición de bajo fosfatos y se incluyó una condición de alto fosfato (1mM).

El objetivo de fertilizar las plantas inoculadas con *R. irregularis* con bajo fosfato fue favorecer la colonización micorrizica, la cual es inhibida por altas concentraciones de este nutriente (Smith y Read, 1997). Por otro lado, ya que la colonización micorrizica favorece la nutrición fosfatada, el objetivo de utilizar controles no micorrizados fertilizados con alto fosfato en el caso de BAT 93 fue probar que las respuestas obtenidas no eran dependientes del estado nutricional de fosfatos, sino de la colonización micorrizica. La condición de alto fosfato para plantas de las variedades A-55, Az Reg 87 y Az Hig no fue incluida en

estos experimentos ya que ya ha sido demostrado que la reducción de susceptibilidad en estas variedades no está influenciada por la nutrición fosfatada sino por la micorrización, bajo las condiciones ensayadas (Mora-Romero *et al.*, 2015).

Infección con el patógeno S. sclerotiorum y evaluación de la severidad

Seis semanas después a la inoculación con el HMA, se procedió a la inoculación con *S. sclerotiorum* conforme al método de la pajilla (Petzoldt y Dickson, 1996). Para cada planta a infectar, se escindió la tercera hoja más joven dejando una porción del peciolo de ~1cm. Pajillas de plástico (6mm de diámetro) fueron cortadas en fragmentos de 3cm de largo y uno de sus extremos se selló utilizando calor. De esta manera el otro extremo pudo ser utilizado como un horador desechable para cortar discos de agar a partir de placas de medio PDA que contenían *S. sclerotiorum* en crecimiento activo. El extremo de la pajilla con el disco de agar fue insertado en la porción del peciolo de la hoja previamente escindida propiciando que el micelio del hongo entrara en contacto directo con la herida en el peciolo (Petzoldt y Dickson, 1996). Las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento y la invasión por *S. sclerotiorum* se estimó ocho días después de la inoculación, usando una escala del 1 al 9 de acuerdo a Petzoldt y Dickson (1996). En la misma, el valor de 1 equivale a la ausencia de síntomas de la enfermedad en el tallo cuando la pajilla fue removida para la evaluación del daño, 3 representa la infección hasta el primer nudo del tallo infectado, 5 la invasión pasa el primer nudo pero progresa lentamente, 7 invasión del segundo nudo pero no el tercero, y 9 colapso total de la planta (http://bean.ces.msu.edu/%5C/_pdf/White_Mold.pdf).

Determinación del porcentaje de colonización

Una vez concluido el procedimiento de infección las raíces fueron recolectadas y lavadas con agua para remover restos de sustrato. Posteriormente se fijaron en etanol 50% (v/v) por al menos por 1h, enjuagadas en agua destilada e incubadas durante dos días con KOH 20% (p/v) a temperatura ambiente (25°C) para clarificarlas. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se incubaron por 2h en HCl 1% (v/v); nuevamente se lavaron con agua destilada estéril y se tiñeron con solución de azul de tripano 0,05% (Phillips y Hayman, 1970) durante dos días. Las raíces fueron mantenidas en lactoglicerol 1:1:1 (agua: ácido láctico: glicerol) a temperatura ambiente.

El porcentaje de colonización se determinó para cada raíz por el método de intersección a la línea (Giovannetti y Mosse, 1980). Las raíces de plantas no inoculadas también fueron inspeccionadas en el microscopio.

Diseño experimental y análisis de datos

Se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) Plantas inoculadas con *R. irregularis* (micorrizadas) fertilizadas con solución nutritiva Hoagland con bajo fósforo (M; 20µM P), y 2) Plantas no-micorrizadas fertilizadas con solución nutritiva Hoagland con bajo fósforo (NM; 20µM P), para los genotipos A-55, Az Reg 87 y Az Hig; para BAT93 se aplicaron estos dos tratamientos además del tratamiento 3) Plantas no-micorrizadas fertilizadas con solución nutritiva Hoagland con alto fósforo (NM; 1mM P, BAT93).

Los tratamientos se distribuyeron en un arreglo completamente al azar. Los datos de severidad se sometieron a análisis estadístico mediante la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis en el paquete estadístico Minitab v17 considerando un nivel de significancia del 5%. Los porcentajes de colonización de cada variedad

se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante procedimiento de Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados

Porcentaje de colonización

Aunque el nivel de colonización de las raíces varió de 15 a 32% no se detectaron diferencias significativas ($P=0,05$) entre los tratamientos (Tabla I). En las raíces de plantas no inoculadas se confirmó la ausencia de estructuras fúngicas.

R. irregularis induce resistencia en A-55, Az Reg y BAT 93 pero no en Az Hig.

Se observó una reducción en la severidad ocasionada por *S. sclerotiorum* en los tratamientos con respecto al control no micorrizado (Tabla I, Figura 1). En el tratamiento con fertilización con alto fósforo (1mM) para BAT 93 no se observaron diferencias significativas en el nivel de severidad por *S. sclerotiorum* entre las plantas no-micorrizadas fertilizadas con 1mM de fósforo con respecto a las no-micorrizadas fertilizadas con bajo fósforo (20µM), sugiriendo que la bioprotección observada por colonización con *R. irregularis* es independiente del estado nutricional por fósforo pero sí es dependiente de su estado de micorrización. (Trotta *et al.*, 1996; Fritz *et al.*, 2006).

Discusión

Las interacciones entre plantas y microorganismos pueden inducir cambios a nivel local o sistémico. En cuanto a las asociaciones micorrízicas, se han descrito diversos ejemplos en los que se observó un aumento en la resistencia a patógenos del suelo (Whipps, 2004; Elsen *et al.*, 2008; Abdel-Fattah *et al.*, 2011; Gallou *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2012; Hilou *et al.*, 2013; Vos *et al.*, 2013). Los estudios que demuestran la inducción de resistencia a patógenos de parte aérea han emergido en la última década; sin embargo, son menos numerosos con respecto a los trabajos presentados para patógenos de raíz (Fritz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Noval *et al.*, 2007; Alejo-Iturvide *et al.*, 2008; Møller *et al.*, 2009; Pozo *et al.*, 2010; Battle *et al.*, 2011; Fiorilli *et al.*, 2011; Gallou *et al.*, 2011; Campos-Soriano *et al.*, 2012; Maffei *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos mediante la técnica de la pajilla para las variedades A-55, Az Reg 87 y Az Hig son similares a los observados por Mora-Romero *et al.* (2015) utilizando el método de hoja desprendida. Estos resultados representan un ejemplo adicional de la bioprotección conferida por micorrización contra patógenos foliares, y es el primer

reporte sobre reducción de susceptibilidad inducida por micorrización en el genotipo BAT 93 contra *S. sclerotiorum*.

Una posible explicación de la bioprotección frente a patógenos en plantas colonizadas con HMA podría ser que la colonización fúngica mejora el estado nutricional de la misma. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la reducción de susceptibilidad por micorrización contra *S. sclerotiorum* no está dada por

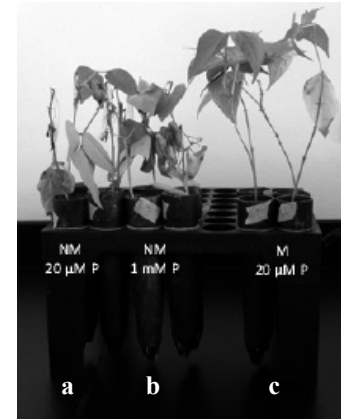


Figura 1. Severidad causada por *S. sclerotiorum* en la línea de frijol BAT 93, ocho días posteriores a la inoculación con el patógeno mediante el método de la pajilla (*straw test*). a: plantas no micorrizadas (NM) fertilizadas con bajo fósforo (20µM); b: plantas no micorrizadas fertilizadas con alto fósforo (1mM); c: plantas micorrizadas (M) con el HMA *R. irregularis* fertilizadas con bajo contenido de fósforo (20µM).

TABLA I
PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN MICORRÍZICA Y SEVERIDAD CAUSADA POR *S. sclerotiorum* EN PLANTAS DE DISTINTAS VARIETADES DE FRIJOL COLONIZADAS Y NO COLONIZADAS CON EL HMA *R. irregularis* EMPLEANDO EL MÉTODO DE LA PAJILLA DESCRITO POR PETZOLDT Y DICKSON (1996)

Varietades y tratamiento	Colonización (%)*	Nivel de daño ocasionado por el patógeno**
A-55 micorrizada (20µM P)	32 ±14 a	3,25 ±0,5 a
A-55 no micorrizada (20µM P)		4,25 ±0,5 b
Az Reg 87 micorrizada (20µM P)	17 ±8 a	2,75 ±0,5 a
Az Reg 87 no micorrizada (20µM P)		7,75 ±0,5 b
Az Hig micorrizada (20µM P)	15 ±7 a	5,00 ±1,2 a
Az Hig nomicorrizada (20µM P)		5,25 ±2,6 a
BAT 93 micorrizada(20µM P)	25 ±4 a	3,00 ±0,0 a
BAT 93 no micorrizada (20µM P)		9,00 ±0,0 b
BAT 93 no micorrizada (1mM P)		9,00 ±0,0 b

* Letras diferentes indican diferencia significativa ($p=0,05$) de acuerdo a Tukey ($n=4$).

** Letras diferentes indican diferencia significativa ($p=0,05$) de acuerdo a ANOVA de Kruskal-Wallis ($n=4$). ± indica desviación estándar.

el aumento en nutrición fosfatada, dado que un aumento (de 20 μ M a 1mM) en la concentración suministrada de este nutriente a plantas no colonizadas del genotipo BAT 93 no afectó la severidad de la enfermedad (Tabla 1, Figura 1). En contraste, las plantas micorrizadas aumentaron su resistencia al hongo, no obstante que tuvieron una nutrición baja en fósforo. Resultados similares se han observado en estudios previos en otros sistemas biológicos (Trotta *et al.*, 1996; Fritz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Mora-Romero *et al.*, 2015). De acuerdo a los resultados, la inducción de bioprotección se relaciona más con el genotipo de la planta hospedera que con el porcentaje de colonización; por ejemplo, aunque los genotipos Az Reg y Az Hig presentan niveles similares de colonización micorrizica, solo Az Reg manifiesta reducción de la susceptibilidad por micorrización.

Diferentes grupos de investigación han realizado esfuerzos para identificar resistencia a *S. sclerotiorum*, principalmente en soya (*Glycine max* L.) y frijol en condiciones de invernadero y campo (Steadman *et al.*, 1997; Schwartz y Singh, 2013); sin embargo, aún no se han logrado variedades con resistencia genética completa. En los casos en los que la selección de materiales en los programas de mejoramiento se realiza en invernadero, las plantas generalmente son crecidas en sustratos libres de HMA, lo cual no haría evidente el efecto de la micorrización en la inducción de bioprotección. Por lo tanto, asegurar que la evaluación de los materiales se realice en plantas micorrizadas permitiría seleccionar individuos capaces de poseer y utilizar este mecanismo adicional de protección contra enfermedades, lo que ha sido ignorado en los programas de mejoramiento genético.

En el presente trabajo se observa que la reducción en la susceptibilidad a *S. sclerotiorum* varió entre genotipos de frijol. Az Hig, la principal variedad cultivada actualmente

en Sinaloa, México, no mostró inducción de bioprotección al hongo cuando fue micorrizada. Az Hig presenta un hábito de crecimiento de tipo determinado que le permite escapar a la infección por *S. Sclerotiorum*, debido a que presenta una menor proporción de follaje en contacto con el suelo húmedo. Sin embargo, es posible que a lo largo del programa de mejoramiento para la obtención de esta variedad se haya perdido la capacidad de inducción de bioprotección como resultado de la micorrización.

La demostración de que el genotipo modelo de frijol BAT 93 responde a la inducción de resistencia por micorrización podría ser útil para la futura aplicación de marcadores moleculares asociados a esta característica, ya que este genotipo se ha utilizado ampliamente para el mapeo de genes y también para desentrañar los mecanismos que subyacen a la respuesta de la inducción de bioprotección por micorrizas.

Hasta el momento solo se ha identificado resistencia fisiológica parcial a *S. sclerotiorum* en frijol. Mecanismos generales de defensa, tales como la inducción de bioprotección por micorrización, pueden ser considerados en un programa de manejo integrado de la enfermedad del moho blanco del frijol causado por *S. sclerotiorum*.

Conclusiones

Los resultados demostraron que la inoculación con *R. irregularis* reduce la susceptibilidad a *S. sclerotiorum* en plantas de frijol de los genotipos A55, Az Reg y BAT 93, pero no en Az Hig, utilizando el método de la pajilla. Los resultados obtenidos por este método son consistentes con los del método de hoja desprendida reportado en un trabajo previo (Mora-Romero *et al.*, 2015), lo cual permite validar el método de la pajilla como herramienta para determinar la inducción de bioprotección en frijol contra el moho blanco. Finalmente, proponemos que la inducción de bioprotección conferida por

micorrización sea considerada en los programas de mejoramiento genético enfocados a la resistencia del frijol contra *S. sclerotiorum*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido de CONACyT (102237), SIP-IPN (proyecto 20090463) PRODEP (UDO-EXB-197; DSA/103.5/15/6838), y la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad de Occidente.

REFERENCIAS

- Abdel-Fattah GM, El-Haddad SA, Hafez EE, Rashad YM (2011) Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiol. Res.* 166: 268-281.
- Alejo-Iturvide F, Márquez-Lucio M, Morales-Ramírez I, Vázquez-Garcidueñas MS, Olalde-Portugal V (2008) Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. *Eur. J. Plant Pathol.* 120: 13-20.
- Apodaca-Sánchez MA (2009) Principales enfermedades infecciosas del frijol en Sinaloa y su manejo. Jornada de transferencia de tecnología del cultivo defrijol. Folleto técnico Fundación Produce Sinaloa. México. pp. 7-26.
- Battle A, Laviña A, Sabaté J, Camprubí A, Estaún V, Calvet C (2011) Tolerance increase to 'Candidatus phytoplasma prunorum' in mycorrhizal plums fruit trees. *Bull. Insectol.* 64: 125-126.
- Bécard G, Fortin JA (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Campos-Soriano L, Garcia-Martinez J, San Segundo B (2012) The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Mol. Plant Pathol.* 13: 579-592.
- Elsen A, Gervacio D, Swennen R, De Waele D (2008) AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa*

sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18: 251-256.

- Fiorilli V, Catoni M, Francia D, Cardinale F, Lanfranco L (2011) The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *J. Plant Pathol.* 93: 237-242.
- Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjær MF, Thordal-Christensen H, Pons-Kuhnemann J (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16: 413-419.
- Gallou A, Lucero Mosquera HP, Cranenbrouck S, Suárez JP, Declerck S (2011) Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 76: 20-26.
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Hao Z, Fayolle L, van Tuinen D, Chatagnier O, Li X, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2012) Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema maidex* involves priming of defence gene responses in grapevine. *J. Exp. Bot.* 63: 3657-3672.
- Harrison MJ (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 19-42.
- Hilou A, Zhang H, Franken P, Hause B (2013) Do jasmonates play a role in arbuscular mycorrhiza-induced local bioprotection of *Medicago truncatula* against root rot disease caused by *Aphanomyces euteiches*? *Mycorrhiza* 24:45-54.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.
- Liu J, Maldonado-Mendoza IE, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town C, Harrison M (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50: 529-544.
- Maffei G, Miozzi L, Fiorilli V, Novero M, Lanfranco L, Accotto GP (2013) The arbuscular mycorrhizal symbiosis

- attenuates symptom severity and reduces virus concentration in tomato infected by Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV). *Mycorrhiza* 24: 179-186.
- McClellan P, Myers J (1990) Pedigrees of dry bean cultivars, lines and PIs. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 33: 25-23.
- Martínez-Valenzuela, Gómez-Arroyo S (2007) Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Amb.* 23: 185-200.
- Møller K, Kristensen K, Yohalem D, Larsen J (2009) Biological management of gray mold in pot roses by co-inoculation of the biocontrol agent *Ulocladium atrum* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Biol. Control* 49: 120-125.
- Mora-Romero GA, Cervantes-Gómez RG, Galindo-Flores H, González-Ortiz MA, Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Salinas Pérez R, León-Félix J, Martínez-Valenzuela MV, López-Meyer M (2015) Mycorrhiza-induced protection against pathogens is both genotype-specific and graft-transmissible. *Symbiosis* 66(2): 55-64.
- Noval B, Pérez E, Martínez B, León O, Martínez-Gallardo N, Délano-Frier J (2007) Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza* 17: 449-460.
- Oldroyd GE, Harrison MJ, Paszkowski U (2009) Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324(5928): 753-754.
- Petzoldt R, Dickson MH (1996) Straw test for white mold in beans. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 39:142-143.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Porch TG, Blair MW, Lariguet P, Galeano C, Pankhurst CE, Broughton WJ (2009) Generation of a mutant population for TILLING common bean genotype BAT 93. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 134: 348-355.
- Pozo M, Jung S, López-Ráez J, Azcón-Aguilar C (2010) Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: The role of plant defence mechanisms. In Koltai H, Kapulnik Y (Eds.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer. Holanda. pp. 193-207.
- Schwartz HF, Singh SP (2013). Breeding common bean for resistance to white mold: A review. *Crop Sci.* 53: 1-13.
- Salinas-Pérez RA, Hernández-Fernández A, Navarro-Sandoval FJ, Rodríguez-Cota FG (1989) Azufrado peruano y azufrado regional 87 nuevas variedades de frijol para el estado de Sinaloa. Folleto Técnico N° 5. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. 18 pp.
- Salinas-Pérez RA, Navarro-Sandoval FJ, Rodríguez-Cota FG (1995) Azufrado Noroeste y Azufrado Higuera. Nuevas variedades de frijol para Sinaloa. Folleto Técnico N° 11. INIFAP-CIRNO-CEVAAF. México 18 pp.
- Singh SP, Gutiérrez A, Terán H (2003) Registration of indeterminate tall upright small black seeded common bean germplasm A-55. *Crop Sci.* 43: 1887-1888.
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. Londres, RU. 605 pp.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* 100: 328-332.
- Steadman JR, Powers K, Higgins B (1997) Screening common bean for white mold resistance using detached leaves. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 40: 140-141.
- Trotta A, Varese GC, Gnani E, Fusconi A, Sampò S, Berta G (1996) Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil* 185: 199-209.
- Vos C, Schouteden N, van Tuinen D, Chatagnier O, Elsen A, De Waele D, Gianinazzi-Pearson V (2013) Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. *Soil Biol. Biochem.* 60: 45-54.
- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82: 1198-1227.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Gelfand ND, Sninsky J, White T (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA, EEUU. pp. 315-322.