



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES

UNIDAD LEÓN

Evaluación del impacto de la simbiosis con *Rhizobium tropici* en el desarrollo de *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa en comparativa con la variedad silvestre Mesoamericana bajo estrés hídrico

TESIS Y EXÁMEN PROFESIONAL

Que para obtener el título de
Licenciada en Ciencias Agrogenómicas

P R E S E N T A

Laura Lizeth Tovar Rosales

Tutor

Dr. Manojkumar Arthikala

Asesora

Dra. Kalpana Nanjareddy



ENES UNAM
UNIDAD LEÓN

León, Guanajuato. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Para el pequeño Leo, has sido mi gran motor inmóvil

A Rosita Nieves, siempre estás en mis pensamientos

Salmos 42:5

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, principalmente a mis padres, quienes han estado a mi lado en cada paso que he dado. Gracias por su amor incondicional, por todo su apoyo y consejos. No encuentro formas de agradecer lo suficiente por cada desvelada que pasaron, por cada ida al hospital, por todas esas horas de juegos, risas y cariños, gracias por cada lección que me han enseñado, por su perdón cuando me he equivocado y por sus brazos cuando me he caído. Son ustedes los responsables de que hoy me encuentre aquí, con este logro en las manos y el corazón lleno de gozo. Gracias por todo, porque sin ustedes no podría ser la profesionista, o la madre ni mucho menos la mujer que ahora soy. Los amo infinitamente y les agradeceré siempre.

Gracias a Ale, porque a pesar de ser mi hermano chiquito siempre ha cuidado de mí y me ha protegido, además de ayudarme con todas esas tareas de física o matemáticas que no podía entender. Estoy orgullosa de quién eres y espero algún día ser tan buena, capaz e inteligente como tú. Te quiero.

Por otro lado, quiero agradecer a mis profesores, cada uno ha impactado en mí de maneras tan diferentes. Gracias especialmente a Lima, Chepe, al Cholo, Robelo y Carris porque con ustedes adquirí el gusto por las ciencias y el laboratorio. Gracias al Dr. Manoj y a la Dra. Kalpana por ser mis guías en este proyecto y por su apoyo y comprensión cuando tuve dificultades y pensé en rendirme.

Les agradezco a mis amigos y compañeros de la licenciatura; a Ceci y Felipe, que iban a despertarme para ir a clases, fueron un hombro para llorar y excelentes rommies para tomar. Gracias a Carlos y a mi Rapport, simplemente por ser los “oldtacos” y hacerme sentir tan bienvenida en LA generación. Gracias a Uri, por acompañarme en mis momentos de crisis y estrés. También le agradezco a mi equipo bonobo, que me brindaron su ayuda siempre que la necesité.

Y no menos importante a mi compañero de vida, gracias Mau, porque me ayudaste a crecer y creer en mí, por acompañarme en esas noches en que no podía dormir o escribir, por darme tu confianza y seguridad cuando a mí me faltaba, por nunca dejarme caer, por todo tu amor.

Finalmente agradezco a la UNAM, a la ENES León, a SGC-LII, a DGAPA-PAPIIT (Clave. IN213221 a Manojkumar Arthikala e IN216321 a Kalpana Nanjareddy) por financiar parcialmente este proyecto y las becas otorgadas.

Un agradecimiento especial al CONACyT CF-316538 por la beca brindada por un periodo de 6 meses.

CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
CONTENIDO	4
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> : el frijol común	7
1.1.1 Importancia del cultivo	7
1.1.2 Centro de origen y domesticación	8
1.2 La simbiosis	10
1.3. La sequía	12
1.3.1 La sequía en los cultivos	12
II. ANTECEDENTES	15
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
VI. MÉTODOS Y MATERIALES	18
6.1 Diseño experimental	18
6.2 Esterilización de semillas	18
6.3 Condiciones de crecimiento	19
6.4 Preparación del inóculo	19
6.5 Inoculación e imposición de sequía	20
6.6 Evaluación del impacto del estrés y la simbiosis en las plantas	20
6.7 Parámetros del tallo	20
6.8 Análisis de la hoja	20

6.9 Parámetros de la raíz	22
6.10 Análisis bioquímicos	22
6.11 Análisis estadísticos	24
VII. RESULTADOS	25
7.1 Análisis de la simbiosis en la mortalidad de plantas por sequía	25
7.2 Análisis de la simbiosis en la producción de biomasa apical bajo estrés hídrico	28
7.3 Análisis de la simbiosis en la longitud internodal bajo estrés hídrico	30
7.4 Análisis de la simbiosis en la producción de trifolios bajo estrés hídrico	31
7.5 Análisis de la simbiosis en la integridad membranal bajo estrés hídrico	31
7.6 Análisis de la simbiosis en el largo del pecíolo bajo estrés hídrico	32
7.7 Análisis de la simbiosis en el LRWC bajo estrés hídrico	33
7.8 Análisis de la simbiosis en el área foliar bajo estrés hídrico	33
7.9 Análisis de la simbiosis en el contenido de clorofila bajo estrés hídrico	34
7.10 Análisis de la simbiosis en la biomasa radicular	35
7.11 Análisis de la simbiosis en la longitud de raíz bajo estrés hídrico	36
7.12 Análisis de la simbiosis en la densidad de raíces laterales bajo estrés hídrico	37
7.13 Análisis de la sequía en la nodulación	38
7.14 Análisis de la simbiosis en el contenido de azúcares totales bajo estrés hídrico	41
VIII. DISCUSIÓN	43
8.1 La simbiosis reduce la mortalidad por sequía en plantas de MA	43
8.2 La producción de biomasa total aumenta con la inoculación de <i>Rt</i>	44
8.3 La inoculación con <i>Rt</i> mantiene la integridad membranal en MA expuesto a sequía	45
8.4 La retención de agua en la planta aumenta con <i>Rt</i> incluso bajo sequía	46
8.5 La interacción simbiótica retrasa la senescencia foliar durante el estrés por sequía	47
8.6 La sequía impacta con menor severidad la nodulación en MA	48
8.7 La simbiosis favorece el incremento de azúcares en MA bajo sequía y buen riego	49
IX. CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	62

RESUMEN

El proceso de domesticación de *Phaseolus vulgaris* ha generado cambios fenotípicos entre las variedades silvestres y domésticas. A pesar de las mejoras sobre la producción de los cultivares modernos, se han perdido cualidades aún conservadas en las variedades silvestres, como lo es la tolerancia al estrés abiótico, incluida la sequía. Debido a la limitada información encontrada sobre los efectos de la simbiosis en el fenotipo de resistencia al estrés hídrico en las líneas ancestrales del frijol, este trabajo tiene como objetivo evaluar el impacto de la simbiosis con *Rhizobium tropici* en la nodulación y desarrollo del frijol silvestre Mesoamericano en comparativa con el cultivar Negro Jamapa bajo estrés por sequía. Las plantas silvestres y domésticas se cultivaron en un invernadero bajo diferentes capacidades de campo (CC) y estados de inoculación (positivo y negativo) durante cinco semanas. Se obtuvo material biológico con el que se realizaron diversos análisis fenotípicos y bioquímicos. Nuestros resultados muestran que durante la simbiosis hay una reducción en la mortalidad de las plantas y una disminución en el daño a las membranas celulares ocasionado por la sequía en la variedad silvestre. También se observó un índice superior en los valores de la biomasa vegetal total de la línea Mesoamericana en comparativa con el cultivar moderno. Además, existe una disminución mínima en el número de nódulos presentes en el frijol silvestre, en contraste con el número de nódulos en el cultivar comercial, cuando se restringe la disponibilidad de agua hasta en un 40 %. Con relación al fenotipo nodular, bajo las mismas condiciones, se aprecia que en el frijol mesoamericano la cantidad de nódulos primordiales y maduros aumenta, mientras que la cantidad de nódulos senescentes permanece estable. Con base en estas observaciones, concluimos que la simbiosis incrementa la tolerancia al estrés por sequía reduciendo su impacto negativo con mayor eficacia en la variedad silvestre Mesoamericana en comparación al cultivar comercial Negro Jamapa.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 *Phaseolus vulgaris*: el frijol común

En México, el término frijol es utilizado comúnmente para referirse a las leguminosas de grano comestibles que forman parte de la familia Fabaceae (Kaplan, 2003) y que pertenecen al género *Phaseolus* y a la especie *vulgaris*. Dentro de este género se han encontrado alrededor de 75 taxas con caracteres genéticos y fenotípicos altamente variables y que han dado lugar al reconocimiento de tan sólo seis especies domesticadas, siendo el resto de vida silvestre. Entre las especies descritas en el género se ha considerado a “*vulgaris*” como la de mayor importancia agroeconómica debido a su alta producción en el mundo (Salcedo et al., 2006; Acosta-Díaz et al., 2015; Petry et al., 2015).

Phaseolus vulgaris es una planta autógrama de vida corta anual del tipo arbustiva y trepadora que alcanza desde los 40 cm de alto hasta los tres metros de altura en algunas variedades. Esta especie tiene hojas alternas, pecioladas, compuestas de tres folíolos ovados o rómbicos y de ápice agudo. Presenta pocas flores en pedúnculos axilares. El cáliz es un tubo en forma de campana que en la punta se divide en cinco lóbulos. La corola presenta una coloración casi blanca mezclada con tonos rosa-púrpura con cinco pétalos desiguales. El fruto o vaina tiene forma semi lineal y alargada y cuelga de las ramificaciones axilares. Puede llegar a tener una longitud de hasta 20 cm y en ocasiones está cubierto de tricomas. Sus semillas son muy variables y dependiendo de la especie pueden cambiar en el tamaño, número, color y forma (IPGRI, 2001; Vibrans, 2021).

Como cultivo, el frijol común es altamente susceptible a las temperaturas extremas, desarrollándose óptimamente entre los 10 °C y los 27 °C. Para tener un rendimiento óptimo, la semilla debe sembrarse en suelos arenosos de textura ligera y bien drenados. El pH adecuado del suelo puede fluctuar de los 6.5 a 7.5, incluso se puede desarrollar en ambientes con una acidez desde 4.5 a 5.5, sin embargo, se recomienda evitar pH más básicos debido a su baja tolerancia a la alcalinidad del suelo. En cuanto al manejo del riego es esencial conservar controlado el nivel de humedad en el suelo en cada etapa del desarrollo de la planta, pues el frijol es muy sensible a la falta y exceso de agua (SAGARPA, 2017).

1.1.1 Importancia del cultivo

El frijol es la leguminosa de grano más relevante para el consumo humano en el mundo y representa la principal fuente de proteína para algunos países en desarrollo dentro de África y Latinoamérica. Las formas de consumo principales se basan en sus granos maduros y secos, los frijoles con cáscara (semillas en madurez fisiológica) y las vainas inmaduras. La producción anual de frijoles

secos en años anteriores alcanzó aproximadamente los 20 millones de toneladas y teniendo un rendimiento promedio de 700 kg/ha, aunque en ciertos países como son India, Brasil, China, Estados Unidos y México, considerados los mayores productores, se tuvo un rendimiento de hasta 3000 kg/ha. Además, la producción de vaina fresca fue de 16 millones de toneladas para su consumo y para el frijol verde se tuvo una producción estimada de 4.5 millones de toneladas (de Ron & Santalla, 2013)

Cuando se consumen como granos, los frijoles constituyen una fuente importante de proteína (22 % del peso de la semilla) que complementa la dieta de muchos grupos sociales, principalmente en zonas marginadas. El frijol es considerado uno de los cultivos más importantes para el desarrollo del sector agroalimentario gracias a su alto contenido nutricional en proteínas, vitaminas, minerales y fibra (FAO, 2018; CIAD, 2020). Aunque su composición nutrimental puede variar según el cultivar de frijol y la forma en la que se consume, en general es un alimento rico en aminoácidos y libre de ácidos grasos insaturados que en combinación con otros cereales puede asemejar a las proteínas animales y asegurar una dieta balanceada (Hnatuszko-Konka et al., 2014).

1.1.2 Centro de origen y domesticación

La domesticación es un evento evolutivo artificial que se ha manejado por el hombre para producir organismos con características específicas en pro de su beneficio (Casas et al., 2007). La selección humana de plantas y animales domesticados sirvió para sentar las bases de la Teoría de la evolución de Darwin y ha sido utilizada como el principal ejemplo ilustrativo de los efectos radicales que la selección puede ocasionar en la morfología, la arquitectura y el comportamiento de los organismos (Brónnvik & von Wettberg, 2019). Las investigaciones enfocadas al estudio de la domesticación son de gran relevancia para el desarrollo científico y agrícola, las plantas son organismos modelo para el entendimiento de la evolución, por lo que no sorprende que la domesticación de cultivos sea un tema de interés actual (Fuller, 2007; Denham et al., 2020). Dada la naturaleza sésil de las plantas, estas se enfrentan directamente a las amenazas bióticas y abióticas que les rodean y deben ser capaces de adaptarse a las condiciones locales que experimentan. Además de estas adaptaciones naturales, algunas plantas se han desempeñado como indispensables para la subsistencia del hombre que, bajo fuertes presiones selectivas, las ha modificado considerablemente en rasgos de importancia agrícola (Flood & Hancock, 2017). Entonces, la domesticación es un proceso dinámico y continuo impulsado por el ser humano para remover o mejorar ciertos caracteres del fenotipo de los progenitores ancestrales, generando diferencias genotípicas entre una línea domesticada y su antecesor silvestre (Chacón et al., 2005; Parker & Gepts, 2021). Son estas diferencias

las que conforman el síndrome de domesticación, cuyo principal efecto es la disminución en la variabilidad genética de los cultivos. La reducción en el tamaño de una población, y por lo tanto de la variabilidad genética de la misma a través de un efecto de cuello de botella, fija características específicas que, por medio de selección artificial, a pesar de ser favorables a nivel agrícola tienen un impacto significativo en la ecología de los organismos ya que se pueden observar efectos como la pérdida de dispersión, la disminución en la latencia o dormancia y la reducción de mecanismos de protección química y mecánica contra depredadores (Pickersgill, 2007; Bitocchi et al., 2013; González et al., 2014; Schmutz et al., 2014)

Debido a su importancia económica, el género *Phaseolus* ha sido objeto de múltiples estudios agronómicos, moleculares, genéticos y sistemáticos entre los que se ha destacado la descripción de las diferentes especies, subespecies y variedades tanto silvestres como domésticas. Dentro del género se encuentran aproximadamente 70 especies, de las cuales seis han sido domesticadas: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *P. lunatus* L. (frijol lima), *P. coccineus* L. (frijol escarlata), *P. acutifolius* A. (frijol gris), *P. polyanthus* (frijol anual) y *P. novoleonense* (Bitocchi et al., 2017; Baez-González et al., 2019).

Para todos los cultivares actuales de *P. vulgaris* se reconocen dos grandes eventos de domesticación que corresponden a diferentes acervos genéticos provenientes de las regiones Mesoamericana y Andina del continente, teniendo un ancestro común originario de Ecuador y el norte de Perú (Kaplan, 1981). Gracias a estos eventos, a las actividades y el manejo agronómico, así como al contexto ecológico y a una amplia distribución del género se dio lugar a nuevas divisiones en siete razas (Durango, Guatemala, Jalisco y Mesoamérica originadas en Mesoamérica, Nueva Granada y Perú provenientes de los Andes) (Singh et al., 1991; Beebe et al., 2001; Chacón et al., 2005) que se caracterizan por una gran diversidad fenotípica y genotípica pero que aun así comparten una adaptación agroecológica similar y algunas características agronómicas como el hábito de crecimiento y el tipo de semilla. A pesar de los esfuerzos por identificar y agrupar las diferentes variedades aún existen fenotipos intermedios que no pueden clasificarse correctamente en ninguna de las seis razas o dentro de los dos acervos genéticos. Por eso se ha considerado que el intercambio de germoplasma, el flujo de genes y los programas de cruzamiento entre y dentro de los dos acervos genéticos han dado lugar a la introgresión o hibridación de ambos centros de origen en diversas ocasiones (Blair et al., 2007; Bitocchi et al., 2012)

1.2 La simbiosis

La asociación simbiótica entre las raíces de las fabáceas y las bacterias rizobiales que habitan el suelo promueve el desarrollo de órganos especializados denominados nódulos, cuya función principal es la de fijar el nitrógeno atmosférico al suelo en forma molecularmente metabolizable. Los productos de este proceso (amidas en fabáceas de clima templado y ureidos en fabáceas tropicales) se exportan de los nódulos al resto de la planta incorporándose a su proceso de desarrollo (Roy et al., 2020).

Además de las ventajas nutricionales que las plantas obtienen de la fijación de nitrógeno (N), también se incrementa el contenido de N del suelo de manera general, teniendo grandes implicaciones en la incorporación de prácticas agrícolas sustentables. En el caso de las bacterias, estas reciben energía y esqueletos de carbono en forma de ácidos dicarboxílicos durante el proceso de fijación. Se considera que las bacterias y las células vegetales mantienen el intercambio de aminoácidos, como el suministro de glutamato de las plantas a las bacterias, permitiéndoles a las segundas limitar la asimilación de amonio y la producción de aspartato y alanina para beneficio de la planta. Esta dinámica permite que el amonio se transporte de las bacterias a la planta, favoreciendo el beneficio mutuo de la simbiosis (Lodwig et al., 2003). Al sistema que envuelve la membrana vegetal, incluyendo a las bacterias diferenciadas en bacteroides, se les denomina simbiosoma (Oldroyd et al., 2011). El intercambio de nutrientes se produce posterior a la formación de estas estructuras y por medio de reguladores moleculares como SYMRKs, componentes del poro nuclear, canales de cationes y quinasas de tipo receptor (Mark Sutton et al., 1994; Gherbi et al., 2008; Laffont et al., 2018).

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico se conoce como diazotrofia, la cual es un proceso evolutivamente muy antiguo, originándose probablemente en el Eon arqueano, cuando la atmósfera terrestre presentaba condiciones anoxigénicas, existiendo exclusivamente en organismos procariontes, específicamente en Euryarchaeota y en seis de los más de 50 phyla de Bacteria. Algunas de estas bacterias coevolucionaron con las angiospermas estableciendo las bases moleculares de la relación simbiótica mutualista. En el caso de las bacterias rizobiales el nitrógeno es fijado dentro de órganos específicos (los nódulos) que se desarrollan en la raíz o raramente en el tallo de las fabáceas. La organogénesis nodular da inicio con los factores de nodulación codificados en el genoma bacteriano dentro de plásmidos de gran tamaño, dichos genes son mucho más recientes que los anotados para la

fijación de nitrógeno, asociándose su origen con la aparición de sus hospederos específicos, las fabáceas (Lloret & Martínez-Romero, 2005).

A causa de la naturaleza sésil de las plantas, el contacto inicial de la interacción lo lleva a cabo la bacteria al aproximarse a la raíz del posible hospedero. Lorenz Hiltner demostró, a inicios del siglo XX, que un compuesto obtenido de un filtrado de nódulo inducía la deformación de los pelos radiculares libres de bacterias en *Pisum sativum* (Waksman & Starkey, 1924). La inducción de la formación de los nódulos se da por oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados (factores NOD) producidos por las bacterias rizobiales (Lerouge et al., 1990). El arreglo químico de estos compuestos fue descrito por primera vez en *Rhizobium meliloti* (actualmente *Sinorhizobium meliloti*). Los factores NOD están conformados por una estructura básica sintetizada por los genes nodABC diferenciándose por modificaciones en los extremos reductor y no reductor (metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glicosilaciones). El intercambio metabólico entre el nódulo y el resto de los órganos vegetales se da a través de haces vasculares que están localizados dentro del parénquima del nódulo y que se conectan al sistema vascular radicular. El proceso de nodulación da inicio con el intercambio de señales bioquímicas de ambos participantes de la interacción, manteniéndose durante la vida útil del nódulo (Stougaard, 2000), este proceso es controlado de manera específica por la planta a partir de la estructura de los factores NOD. Se ha observado que mutantes no nodulantes no responden a los factores NOD bacterianos (Mitra et al., 2004). Particularmente la exposición al etileno y la aplicación de ácido abscísico (ABA) inhibe el número de nódulos (Penmetza & Cook, 1997), debido a que ABA previene la formación del sistema radicular lateral (Signora et al., 2001) y el etileno inhibe las respuestas tempranas de la planta (Oldroyd, 2001).

La liberación de los factores Nod se da en respuesta a moléculas flavonoides, estaquidrina y ácido aldónico de origen vegetal en el suelo (Stougaard, 2000). Cuando la penetración es producida por la unión de las bacterias rizobiales a los pelos radiculares, la invasión del tejido cortical se genera por una estructura denominada “hilo de infección”, la cual es acompañada por el inicio de la actividad del meristemo cortical y periciclo de la raíz. Los factores NOD modifican el equilibrio hormonal de la planta estimulando la división celular y promoviendo el desarrollo del simbiosoma (Ferguson & Mathesius, 2003), implicando la liberación de las bacterias en las células corticales individuales por endocitosis y provocando la aparición del “peribacterioide”. El intercambio de señales bioquímicas permite la regulación metabólica bacteriana gracias al control del uso de dicarboxilato mediante la modulación del suministro de aminoácidos (Lodwig et al., 2003), lo que asegura la supervivencia de las bacterias dentro del ambiente interno de la planta. Al momento de la interacción la planta reduce

las defensas endógenas inherentes de modo que la interacción se vuelva exitosa permitiendo el crecimiento bacteriano cerca del citoplasma de la célula vegetal (Colebatch et al., 2004). La planta otorga un entorno de reducción de oxígeno para las bacterias lo que controla la expresión de genes específicos para la fijación de N, así como la función de los citocromos, proteínas membranales que participan en el transporte de electrones (Long, 2001).

1.3 La sequía

El desafío de generar alimentos para una población en continuo crecimiento es cada vez más urgente, para el año 2050 será necesario aumentar al menos un 87 % la producción en los cultivos, especialmente de cereales y leguminosas (Kromdijk & Long, 2016). Este reto se vuelve aún más complicado de superar debido a las limitaciones abióticas que enfrentan las plantas, las cuales se potencializan por el cambio climático; factores como la sequía, las bajas temperaturas y la salinidad, entre otras, amenazan la productividad y reducen drásticamente el rendimiento de un cultivo (Pareek et al., 2010).

La sequía puede ser definida de diversas formas, a grandes rasgos, se puede considerar a este fenómeno como la ausencia clara y prolongada de precipitación que conduce a la escasez de agua para alguna actividad y llega a causar un desequilibrio hidrológico grave (IPCC, 2007). Específicamente en agricultura, se le denomina sequía al déficit de agua o humedad en el primer metro de suelo donde se desarrolla el sistema radical de la planta (Trenberth et al., 2014). Las predicciones de los escenarios climáticos futuros muestran una mayor variabilidad y baja predictibilidad de la dinámica hídrica del planeta ocasionando un aumento en la frecuencia, duración e intensidad de las sequías, volviendo a este fenómeno aún más extremo (Staudinger et al., 2016).

1.3.1 La sequía en los cultivos

Los factores ambientales que causan estrés en las plantas amenazan fuertemente el desarrollo de un cultivo, lo que genera grandes pérdidas de productividad y rendimiento alrededor del mundo (Staudinger et al., 2016). El estrés hídrico se caracteriza por deteriorar el estado físico de la planta, donde se afecta tanto la parte aérea como radical. Se sabe que la proliferación de raíces se reduce, impactando negativamente en la eficiencia del uso del agua y la nutrición vegetal. En cuanto a la parte aérea, el tamaño de las hojas y la extensión del tallo se ven reducidos (Defez et al., 2017), la presencia de senescencia en las hojas se adelanta (Gregersen et al., 2013; Thomas & Ougham, 2014) y el contenido de clorofila disminuye (Vurukonda et al., 2016) además, la asimilación de CO₂ por las hojas

se dificulta debido al cierre estomático, al daño que sufre la membrana celular y a la alteración del funcionamiento de las enzimas involucradas en este proceso (Flexas & Medrano, 2002). De igual forma, la escasez de agua en el suelo influye positiva o negativamente en las relaciones ecológicas de las plantas, afectando su interacción con microorganismos del suelo (Ramegowda & Senthil-Kumar, 2015).

En este sentido las plantas necesitan equilibrar continuamente los procesos entre su desarrollo y la defensa o las respuestas adaptativas determinadas por la severidad, la duración y el momento en el que se produce algún tipo de estrés (Skalak et al., 2021). Por esta razón, han desarrollado diversos mecanismos evolutivos que les permiten percibir señales específicas de estrés e iniciar una respuesta adaptativa o de resistencia que les permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas. La exposición a estrés biótico o abiótico da inicio a un proceso de señalización que involucra una red reguladora de interacciones donde existen intercambios frecuentes entre vías individuales y las moléculas o cofactores de señalización (Tuteja & Sopory, 2008; Zhu, 2016).

La respuesta al estrés por sequía en las plantas implica la intervención de varios reguladores, fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y los jasmonatos son de gran importancia para este proceso (Zhou et al., 2019). Se sabe que las respuestas adaptativas se desencadenan principalmente por el ABA, dentro de las respuestas a corto plazo se encuentra el cierre de estomático, también se han observado respuestas a largo plazo que permiten mantener el crecimiento de las raíces, optimizando la absorción de agua (Sah et al., 2016). Otra fitohormona de gran importancia para la adaptación de las plantas al estrés hídrico es la auxina indol-3-ácido acético (IAA). Algunos estudios han demostrado que la presencia de altos niveles de IAA se relaciona con la tolerancia a la sequía gracias a la reducción de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la senescencia foliar retrasada (Ke et al., 2015). Otras moléculas señalizadoras que participan en la respuesta a estrés hídrico pueden ser el Ca^{2+} , ROS, NO_2 , la sistemina y los inositoles fosfatos (Lata et al., 2018).

Dentro del sector agrícola la cuantificación del daño ocasionado por los déficits de agua se basa en el rendimiento del cultivo de interés, sin embargo, este tipo de estrés abiótico no solo limita la productividad de las plantas, sino que también afecta su desarrollo y los procesos fisiológicos y bioquímicos que llevan a cabo. Parte de los efectos perjudiciales de la sequía son causados por la interrupción en el estado hídrico de la planta (Verslues et al., 2006). Por lo tanto, la cuantificación de iones liberados, el contenido de clorofila, agua y azúcares, la producción de biomasa total y otras variables son fundamentales para entender los daños relacionados con el estrés hídrico observándose

fácilmente a través de características como el marchitamiento, el crecimiento celular, la turgencia y la fotosíntesis (Ahanger et al., 2021). Para determinar el nivel o la gravedad de la sequía se suele tomar como indicador la capacidad de campo (CC), que hace referencia a la cantidad de humedad presente en el suelo al alcanzar su punto de saturación y después de que se ha drenado el exceso de agua contenida en los macroporos por acción gravitacional (Rai et al., 2017).

II. ANTECEDENTES

La aplicación de inóculos bacterianos como biofertilizantes es una estrategia valiosa para la producción agrícola ya que permite aumentar la efectividad de la fitorremediación de los suelos. Además, se sabe que la inoculación de plantas con bacterias no patógenas puede proporcionar protección contra el estrés biótico, y algunas bacterias colonizadoras de raíces aumentan la tolerancia contra el estrés abiótico, como la sequía, la salinidad y la toxicidad de los metales (Dimkpa et al., 2009). Específicamente, algunas investigaciones recientes han proporcionado evidencia de que el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR, por sus siglas en inglés, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) mejoran la tolerancia de las plantas a la sequía al estimular la formación de raíces laterales y aumentar el crecimiento de los brotes (Rolli et al., 2015) gracias a la estimulación causada por compuestos orgánicos de origen bacteriano, como los lipoquitooligosacáridos, la acetoina y el disulfuro de dimetilo (Wintermans et al., 2016).

Los efectos de la simbiosis con bacterias endófitas de raíz bajo condiciones de estrés abiótico han sido estudiados en diversos cultivos. Algunos estudios demuestran que los efectos de respuesta al estrés por salinidad y heladas han sido mitigados en plantas de *Medicago truncatula* bajo inoculación con *Sinorhizobium* spp y otros simbioses, mejorando significativamente la actividad de las raíces y la producción de biomasa vegetal (Staudinger et al., 2016; Irshad et al., 2021). También se ha observado que en *Medicago sativa* la sobreproducción de IAA rizobiano dentro de los nódulos de la raíz afectó positivamente su respuesta al estrés por sequía (Defez et al., 2017). Otros trabajos han demostrado que el tratamiento con *Bradirhizobium japonicum* o *Rhizobium* spp. en conjunto con otros simbioses de la rizosfera como el hongo de micorriza arbuscular (AMF), tuvo un impacto positivo al mitigar los efectos del estrés hídrico en *Glycine max*. Además, se observaron mejoras en el contenido relativo de agua, la fuga de electrolitos de la hoja, el crecimiento, el rendimiento y el tamaño de semilla, tanto en condiciones de sequía como de riego adecuado en comparación con las plantas no inoculadas (Igiehon et al., 2021; Sheteiwy et al., 2021). Un estudio menciona que para el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo estrés hídrico la coinoculación con *Rhizobium tropici* y dos cepas de *Paenibacillus polymyxa* resulta en un aumento de la altura de la planta, el peso seco de los brotes y el número de nódulos (Figueiredo et al., 2008). A pesar de su importancia agrícola, poco se ha descrito de este fenómeno en el cultivo de frijol común, además la información y evidencia encontradas se limita mayormente a los cultivares, reduciéndose aún más cuando se trata de las variedades silvestres. En este contexto, hemos generado una serie de preguntas biológicas para poder entender ¿Cómo la

variedad silvestre Mesoamericana (MA) combate el estrés por sequía con y sin *Rhizobium tropici* (*Rt*)? ¿Qué efectos adversos tendrá sobre el crecimiento y desarrollo del cultivar moderno Negro Jamapa (NJ) bajo estrés hídrico? ¿Cuál línea tiene una mejor tolerancia a la sequía bajo simbiosis? Por estas razones, durante el desarrollo de este proyecto se pretendió abordar el estudio de los efectos de la colonización con *Rt* bajo estrés por sequía en plantas silvestres y domésticas, para la identificación y comparación de sus características fenotípicas, fisiológicas y bioquímicas.

III. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la población humana exige un mayor rendimiento de los cultivos para lograr alcanzar un estado de seguridad alimentaria, sin embargo, actualmente la producción de cultivos se ve afectada negativamente por factores abióticos como la sequía, la salinidad y las altas temperaturas ocasionadas por la crisis climática. Además, la reducción en la variabilidad genética de las líneas domésticas de *P. vulgaris* provoca mayor susceptibilidad a las condiciones adversas. La tolerancia al estrés por sequía en las plantas es una estrategia adaptativa que les permite hacer frente a los efectos negativos de las condiciones ambientales adversas. Los organismos simbióticos de raíz son bien reconocidos por la promoción del crecimiento de las plantas y la producción de compuestos naturales que la benefician. La propiedad de los simbiotes, como *Rhizobium*, para promover la tolerancia al estrés en las plantas es una herramienta de gran potencial agrícola que permitiría aumentar el rendimiento de los cultivos. Con este trabajo se espera promover la aplicación de inoculaciones como método para el desarrollo de plantas tolerantes al estrés, además de que la información aquí generada de lugar a futuros programas de mejoramiento genético a través de la introgresión de mecanismos naturales de respuesta a estrés que se mantienen en las líneas ancestrales hasta nuestros días.

IV. HIPÓTESIS

En la naturaleza, las variedades silvestres muestran características de resistencia a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, mismas que se reducen u omiten en la totalidad de especies domésticas, incluyendo al frijol. Estudios previos han demostrado que el centro de origen de todos los cultivares modernos de *Phaseolus vulgaris* está en Mesoamérica. Desde la aparición de la especie hasta la actualidad, las líneas ancestrales mesoamericanas permanecen genéticamente conservadas en los bosques del centro de México. Dentro del estrés abiótico, la sequía es de gran preocupación ya que provoca grandes pérdidas en el rendimiento de los cultivos. A pesar de esto, se ha observado que las relaciones simbióticas de las plantas con los microorganismos de la rizosfera pueden reducir el

impacto de la sequía en los cultivos. Por lo tanto, planteamos como hipótesis que la combinación de estudios sobre simbiosis y sequía permitirá obtener datos sobre el comportamiento de la variedad silvestre y el cultivar doméstico del frijol expuestos a condiciones de baja disponibilidad hídrica.

Con el desarrollo de este proyecto se pretende comprender cómo la simbiosis con *Rhizobium* minimiza los efectos de la sequía en el fenotipo del frijol silvestre mesoamericano y el cultivar Negro Jamapa, además de comparar las respuestas fisiológicas que se desencadenan durante la simbiosis para combatir el estrés hídrico entre ambas variedades. Cabe resaltar que esta área de investigación no se ha desarrollado adecuadamente hasta el momento. El presente proyecto podría vislumbrar los mecanismos conservados del frijol silvestre mesoamericano que le permiten adaptarse más fácilmente a la sequía, brindándole una alta tolerancia a los efectos de estos fenómenos, además de mantener una mejor eficiencia simbiótica con *Rhizobium tropici*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las características cualitativas y cuantitativas de las respuestas morfológicas y fisiológicas de plantas de *Phaseolus vulgaris* de la variedad silvestre Mesoamericana (MA) en comparativa con el cultivar Negro Jamapa (NJ) bajo exposición simultánea a estrés por sequía y simbiosis con *Rhizobium tropici* (*Rt*).

5.2 Objetivos específicos

1. Establecer en *P. vulgaris* silvestre y cultivar los grupos experimentales correspondientes a diferentes capacidades de campo y condiciones de inoculación con *Rt*.
2. Analizar el impacto por el estrés hídrico en el crecimiento y desarrollo de MA y NJ.
3. Analizar el fenotipo aéreo y radicular de MA y NJ bajo la exposición a diferentes condiciones de estrés hídrico y simbiosis con *Rt*.
4. Analizar el fenotipo nodular de MA y NJ expuestas a estrés hídrico.
5. Llevar a cabo análisis fisiológicos en MA y NJ expuestas a diferentes condiciones de estrés por sequía y simbiosis con *Rt*.
6. Cuantificar el contenido de azúcares totales en *P. vulgaris* silvestre y cultivar, expuestos a estrés hídrico y simbiosis con *Rt*.
7. Comparar las diferencias fenotípicas y las respuestas fisiológicas al estrés hídrico en la variedad doméstica y silvestre bajo diferentes condiciones de inoculación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Para llevar a cabo este proyecto se cultivaron plantas de frijol de la variedad silvestre Mesoamericana y del cultivar Negro Jamapa. Ambas fueron germinadas directamente en macetas, manteniendo su capacidad de campo (CC) al 100 % durante dos semanas. Una vez transcurrido este periodo las plantas se expusieron a dos estados de inoculación, positiva o negativa con *Rhizobium tropici* (*Rt*). Algunas plantas con inoculación positiva (+ *Rt*) se mantuvieron a la misma capacidad de campo mientras que otras se mantuvieron a distintos porcentajes (80 %, 60 %, 40 %, 20 %) de CC. El total de plantas se expuso a diferentes capacidades de campo en grupos proporcionales respectivamente. Las plantas con inoculación negativa (– *Rt*) también fueron expuestas a los mismos niveles de porcentaje en la CC. Los cambios en la CC se lograron añadiendo sólo la cantidad de agua requerida que se calculó midiendo la pérdida de peso en la maceta al 100 % de CC después de varios días. Después de cinco semanas a partir de la inoculación, se realizaron diversas medidas cuantitativas y cualitativas del fenotipo de las plantas. El experimento se diseñó en bloques, separando las plantas inoculadas de las no inoculadas para evitar contaminación. En la primera replicación biológica se realizaron seis repeticiones técnicas por tratamiento y se tuvo un total de 120 individuos. La segunda repetición biológica se hizo con tres repeticiones técnicas para el 100 %, 80 % y 60 % CC.

6.2 Esterilización de semillas

Se procedió a esterilizar 180 semillas; de las cuales 90 pertenecían a MA y 90 NJ. En base al protocolo de Nanjareddy et al. (2017) se realizaron los siguientes pasos dentro de una campana de flujo laminar y para cada 20 semillas:

1. Sumergir las semillas en 50 ml de etanol a una concentración de 96 % durante 1 minuto y después desechar cuidadosamente el etanol.
2. Añadir 50 ml de una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 20 % durante 10 min y mezclar continuamente.
3. Descartar el cloro y lavar las semillas con exceso de agua estéril 3 veces.

Para la siembra se utilizaron 60 semillas de cada variedad, que mantuvieron la testa íntegra después de la esterilización.

6.3 Condiciones de crecimiento

El experimento se realizó en un invernadero dentro de las instalaciones de la ENES UNAM León en la ciudad de León, Guanajuato con coordenadas 21°02'44.4"N 101°40'17.3"W. Las plantas crecieron bajo condiciones de temperatura máxima y mínima diurna/nocturna durante los meses de septiembre y octubre de 29 °C /11°C ±1 °C con un fotoperiodo de 12 horas. En este estudio se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa y la variedad silvestre mesoamericana provenientes del Instituto de Biotecnología de la UNAM recolectadas en 2019. Las semillas se esterilizaron utilizando el protocolo de Nanjareddy et al. (2017) previamente descrito y se crecieron en condiciones de invernadero en macetas individuales (10.5 cm de altura, 11.5 cm de diámetro) con 8 agujeros de 1 cm de diámetro en el fondo. Cada recipiente se llenó con cantidades iguales de sustrato estéril (peat moss:vermiculita 3:1 v/v). Después de anotar el peso inicial de la maceta con la mezcla completamente seca (peso seco, PS), se agregó agua hasta sobresaturar el sustrato. Las macetas se dejaron reposar durante 24 h para drenar el exceso de agua y estabilizar el potencial hídrico del sustrato y se volvieron a pesar (peso saturado, PST). Las semillas fueron sembradas directamente en la maceta y se crecieron en condiciones de invernadero (Choudhary & Senthil-Kumar, 2020). Las macetas fueron regadas alternadamente con agua y solución nutritiva B & D (Broughton & Dilworth, 1971) adicionada con KNO₃ 0.2 mM tres veces por semana durante las dos primeras semanas después de la siembra (sds). Al finalizar las 2 semanas se iniciaron los tratamientos de inoculación y estrés por sequía durante 5 semanas. Los niveles de porcentaje de capacidad de campo (CC) se mantuvieron agregando sólo la cantidad requerida de agua para riego que se calcula a partir de la pérdida de peso en el suelo a 100 % CC después de pasar los días.

6.4 Preparación del inóculo

Para la inducción de los nódulos de raíz, se utilizó la bacteria *Rhizobium tropici* cepa CIAT899 etiquetada con proteína de fluorescencia roja (RFP, por sus siglas en inglés, Red Fluorescent Protein). Siguiendo el protocolo adaptado de Nanjareddy et al. (2017) las bacterias fueron cultivadas en medio Peptone-Yeast (PY) adicionado con cloruro de calcio 1 M, ácido nalidíxico 20 mg/ml, rifampicina 10 mg/ml y kanamicina 50 mg/ml y se incubó a 28 °C en agitación constante a 300 rpm durante 48 h. Después del periodo de incubación se limpió el cultivo eliminando el medio PY mediante centrifugación a temperatura ambiente y 3000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en agua estéril. Este proceso se repitió dos veces más y al finalizar la limpieza se añadió más agua estéril para una última resuspensión.

6.5 Inoculación e imposición de sequía

La inoculación se realizó en plantas con una edad de 2 semanas después de la siembra (sds), añadiendo directamente en el sustrato más cercano al tallo 2 ml de inóculo por maceta. El estrés por sequía se impuso al suspender el riego en las macetas. Para las macetas inoculadas que debían permanecer al 100 % CC el riego se retuvo y se reanudó con B & D (Broughton & Dilworth) después de 48 h. La exposición al estrés hídrico se inició con la suspensión del riego en las macetas hasta alcanzar una capacidad de campo de 80 %, 60 %, 40 % y 20 %. El nivel de humedad del sustrato (expresado como la capacidad de campo [CC]) se controló mediante el análisis gravimétrico (Ramegowda et al., 2013). La CC a la que se encontraban las macetas después de 48 h desde la inoculación se calculó con el peso fresco (PF) de la maceta, usando la fórmula $\% \text{ CC} = [(PF-PS) / (PST-PS)] \times 100$ (Choudhary & Senthil-Kumar, 2020). A partir de esta fórmula, se mantuvo la CC deseada al agregar la cantidad en gr de agua o solución necesaria hasta alcanzar el peso fresco correspondiente al porcentaje de CC. El riego se realizó de esta forma durante 5 semanas más para continuar con el estrés hídrico.

6.6 Evaluación del impacto del estrés y la simbiosis en las plantas

Para determinar el impacto de la sequía y la simbiosis con *Rt* en las plantas se realizaron diversas mediciones: el peso apical fresco, longitud internodal, largo del pecíolo, número de trifolios, contenido relativo de agua en la hoja (LWRC, por sus siglas en inglés, Leaf Water Relative Content), área foliar, contenido de clorofila, fuga de iones, largo total de raíz, peso de raíz fresco, densidad relativa de raíces laterales, número de nódulos primordiales, maduros, senescentes y el peso total de nódulos.

6.7 Parámetros del tallo

Para determinar el peso fresco apical en gramos el tallo se cortó en secciones, incluyendo las hojas, para después pesar en la balanza analítica (Denver Instrumental 210 g). La longitud internodal de las plantas se calculó utilizando una regla graduada de 30 cm y se midió la distancia entre el tercer y cuarto nodo a partir del inicio del tallo de cada planta.

6.8 Análisis de la hoja

Para determinar el largo del pecíolo se utilizó una regla graduada de 30 cm y se midió el pecíolo de 3 hojas a partir del segundo trifolio desde la base y se promediaron los datos. El número de trifolios se contó de manera manual para cada planta.

6.8.1 Contenido relativo de agua en la hoja

Para calcular el porcentaje de LRWC y siguiendo el protocolo descrito en Sinha et al., 2019 se cortó el tercer trifolio a partir de la base de cada planta y se pesó en la balanza analítica (Denver Instrument 210 g) para obtener el peso fresco (PF) de la hoja. Después se sumergieron en agua estéril desionizada durante 5 h a temperatura ambiente para determinar el peso turgente (PT) de la hoja. Luego, las muestras se secaron en un horno-incubadora Ecocell (MMM Group-Accessolab) a 60 °C durante 2 días y se volvieron a pesar para medir el peso seco (PS). Se utilizó la siguiente fórmula: % LRWC= $[(PF-PS) / (PT-PS)] \times 100$.

6.8.2 Área foliar

El cálculo del área foliar se obtuvo utilizando el software de análisis de imágenes digitales-ImageJ 1.4.1 (descargado de NIH) y una fotografía digitalizada de cada hoja. Para la fotografía se colocó el tercer trifolio desde la base (antes del procedimiento de LRWC) en un fondo blanco y luz directa. Siguiendo el protocolo de Glozer. (2007) se ajustó la imagen hasta obtener hojas de color rojo, a partir de esto se calculó el área con ayuda de la herramienta ROI.

6.8.3 Contenido de clorofila

El contenido de clorofila se midió con un cuantificador portátil no destructivo (Modelo CCM-200, Opti Sciences) durante 4 semanas, a partir de la segunda semana post inoculación. Las mediciones se realizaron de forma continua en el mismo trifolio, utilizado el segundo trifolio a partir de la base para cada planta, y se iniciaron a la misma hora del día en cada semana. Se consideró un punto por foliolo y se calculó el promedio de los tres foliolos para determinar el contenido de clorofila de cada trifolio.

6.8.4 Fuga de iones

La sequía afecta la integridad de la membrana celular, lo que resulta en una mayor fuga de electrolitos, cuya estimación puede ser un parámetro valioso para evaluar la extensión del daño a las plantas bajo tratamientos de estrés único y combinado con simbiosis. Para la fuga de iones se midió la conductividad de diversas muestras con un conductímetro (SevenCompact, Mettler-Toledo) durante 4 semanas. La medición se realizó en el segundo trifolio desde la base y se cortó 1 disco de 5 mm de diámetro por hoja por planta, teniendo un total de 6 discos por CC. Los discos agrupados se colocaron en un tubo con agua desionizada. Las muestras se lavaron dejando en reposo cada tubo por 30 min para remover los electrolitos adheridos a la superficie de la hoja y

liberados durante el corte del disco. Una vez finalizado este tiempo se reemplazó el agua desionizada anterior por agua nueva. Después del lavado, las muestras se mantuvieron en agua por 6 hrs más (Hatsugai & Katagiri, 2018) y se procedió a medir introduciendo el electrodo previamente lavado con agua desionizada en los tubos de muestra, evitando que los discos entren en contacto con el electrodo.

6.9 Parámetros de raíz

Las raíces se extrajeron y limpiaron manualmente en agua hasta remover el sustrato visible. Para la determinación de la longitud y el peso fresco, se utilizó una regla graduada de 30 cm y una balanza analítica. Se consideró como largo de raíz a la longitud en cm desde el inicio de la raíz principal hasta el ápice radical. El peso fresco se calculó después de la limpieza de la raíz, secando superficialmente con una toalla de papel el exceso de agua proveniente del lavado. La densidad de las raíces laterales se calculó al contar manualmente las raíces laterales totales presentes en una longitud de 5 cm a partir del inicio de la raíz principal y dividiendo este resultado entre 5 cm.

6.9.1 Cuantificación del fenotipo nodular

Los nódulos fueron retirados manualmente de la raíz y lavados cuidadosamente con agua para remover el sustrato presente. El número de nódulos de raíz tempranos o primordiales, maduros y senescentes se calculó en función del color visible de cada nódulo en la zona de fijación del nitrógeno. Se contaron como tempranos los nódulos que presentaron un color blanco. Los nódulos maduros fueron considerados aquellos con una coloración rosada o rojiza, asociada con la presencia de la proteína funcional leghemoglobina. Se contabilizó como nódulos senescentes los que presentaron un color verde o marrón, que se asocia con la degradación del heme grupo (Nanjareddy et al., 2014). La suma de estos valores se utilizó para determinar el número de nódulos totales. El peso total de los nódulos se calculó colocando todos los nódulos en una caja Petri previamente tarada y se registró su peso utilizando una balanza analítica (Denver Instrumental 210 g).

6.10 Análisis bioquímicos

6.10.1 Cuantificación de azúcares totales solubles en el tejido

Para analizar el contenido de azúcares totales en el tejido de las plantas se extrajeron los azúcares del tejido según Chow & Landhäusser (2004) utilizando el método de etanol caliente. El tallo y las hojas de cada planta se recolectaron y secaron en un horno-incubadora Ecocell (MMM Group-Accessolab) a 68 °C durante 3 días. Con ayuda de un mortero y pistilo, se molieron las

muestras secas hasta obtener un polvo fino. Para cada muestra se separaron 3 submuestras colocando 50 mg de polvo en tubos de centrífuga de 15 ml y se extrajeron tres veces. La extracción se llevó a cabo añadiendo 5 ml de etanol al 80 % (v:v) al tubo. Todos los tubos se taparon con canicas de vidrio y se pusieron a hervir en un mini baño de agua Hot Tub (Boekel Scientific) a 95 °C durante 10 min cada una. Después de cada extracción, los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min y los sobrenadantes de las tres extracciones se combinaron para el análisis de azúcar. Una vez obtenidos los extractos del tejido en etanol se utilizó el método colorimétrico de ácido sulfúrico-UV propuesto por Albalasmeh (2013), el cual es una variación del método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956) para la determinación de la concentración de carbohidratos en soluciones acuosas. En un tubo de centrífuga de 15 ml se colocó una alícuota de 1 ml del extracto acuoso que se mezcló rápidamente con 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó en un vortex durante 30 s. Debido a la adición del ácido sulfúrico la temperatura de las soluciones aumentó rápidamente dentro de 10 a 15 s por lo que las muestras se enfriaron en hielo durante 2 min para llevarlas a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorción de luz UV a 315 nm utilizando un espectrofotómetro UV (Velab). Se tomó como solución blanco una alícuota de 1 ml de etanol y 3 ml de ácido sulfúrico y se preparó siguiendo el mismo procedimiento que el de las muestras.

6.10.2 Curva estándar de azúcares para referencia

Para elaborar la curva de referencia con la que se cuantificó el contenido de azúcares totales en el tejido (**Figura A 1**), se adaptó el protocolo propuesto por Chow & Landhäusser (2004). Se elaboraron 4 soluciones de azúcar a una concentración de 100 mg/L utilizando glucosa, sacarosa, xilosa y una mezcla 1:1:1 de cada azúcar para cada solución. Todas las muestras se diluyeron 5 veces a 80 mg/L, 65 mg/L, 50 mg/L, 35 mg/L y 20 mg/L. A partir de estas soluciones se tomó 1 ml de solución y se siguió el protocolo ácido sulfúrico-UV de Albalasmeh (2013) previamente descrito. En esta ocasión la solución blanco se preparó con el mismo método, pero sustituyendo la mezcla de azúcar con agua.

6.10.3 Determinación de los porcentajes del contenido de azúcares totales solubles

Se utilizó la ecuación de la pendiente resultante de la curva estándar (**Figura A 1**): $y=0.0129x-0.0002$ donde “y” es la absorbancia y “x” la concentración de azúcar (mg/L). Se despejó “x” obteniendo la fórmula $x=(y+0.0002) / 0.0129$.

6.11 Análisis estadísticos

Para la determinación de la significancia entre las respuestas se utilizaron análisis de varianza de múltiples variables (MANOVA) (Steel y Torrie, 1960) utilizando un software de análisis estadístico (SAS, Institute Inc., 2013). Las medias de los tratamientos se separaron mediante la prueba HDS de Tukey ($P < 0,05$).

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis de la simbiosis en la mortalidad de plantas por sequía

Dentro de los principales efectos visibles ocasionados por la limitación de agua, se evaluó la resistencia al estrés hídrico en cada variedad. Considerando una planta muerta aquella que visualmente llegó a un punto de marchitez del cual no se puede recuperar, deteniendo su crecimiento y presentando falta de turgencia, senescencia y abscisión. En primer lugar, se observó que las plantas no inoculadas de NJ (NJ – *Rt*) a una capacidad de campo del 20 % tuvieron una mortalidad del 66 %, siendo que cuatro de los seis individuos murieron por marchitez, la cual se presentó a partir de los 20 días de la imposición de la sequía (**Figura 1A**). Cuando se redujo el agua hasta el 40 % CC, el porcentaje de plantas muertas fue del 16 % (**Figura 2 A**). Bajo las mismas condiciones la mortalidad de las plantas de MA no inoculadas (MA – *Rt*) sólo se presentó al 20 % CC y fue del 16 % teniendo la muerte de un individuo de seis como se puede ver en la **Figura 3 A** respectivamente. Mientras que para el 40 % CC únicamente se presentaron signos leves de marchitez. Al finalizar el experimento no se observó mortalidad para los porcentajes restantes de CC en ambas variedades. En segundo lugar, se apreció que gracias a la inoculación con *Rt* en las plantas NJ (NJ + *Rt*) al 20 % CC la mortalidad por sequía se redujo hasta un 50 % ya que solamente se registró la muerte de dos individuos (**Figura 1 B**). Para las plantas de esta misma línea al 40 % CC + *Rt* se tuvo una reducción del 100 % en la mortalidad, pues no se contabilizó ninguna muerte, sin embargo, se observaron signos de marchitez leve (**Figura 2 B**). De igual forma las plantas en simbiosis con *Rt* de MA (MA + *Rt*) bajo una disponibilidad de agua del 20 % presentaron un porcentaje de mortalidad de 0, dado que todos los individuos sobrevivieron (**Figura 3 B**). Los signos de marchitez estuvieron ausentes en el caso de las plantas en simbiosis con *Rt* al 40 % CC. Las plantas inoculadas pertenecientes a las CC restantes no mostraron diferencias en cuanto a la mortalidad en comparación con las no inoculadas.

En comparativa, las plantas sin simbiosis de NJ tuvieron porcentaje de mortalidad más alto que las plantas de MA. Bajo condiciones de estrés hídrico severo (20 % CC) NJ superó con un 50 % la mortalidad de MA, mientras que a un 40 % CC la mortalidad fue mayor con un 100 % en NJ debido a que MA tuvo 0 % de mortalidad. Para el caso del tratamiento de sequía + *Rt* se observó una tendencia similar a la anterior, debido a que la mortalidad entre las plantas de NJ y MA difiere en un 100 % a una CC del 20 % siendo superior en NJ. En general, se observó que MA tuvo un porcentaje de mortalidad menor a NJ en todos los casos anteriores (**Tabla 1**).

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad en las plantas de *P. vulgaris* de NJ y MA bajo diferentes condiciones de capacidad de campo (CC) e inoculación.

CC (%) \ Tratamiento	NJ - <i>Rt</i>	NJ + <i>Rt</i>	MA - <i>Rt</i>	MA + <i>Rt</i>
20	66%	33%	16%	0%
40	16%	0%	0%	0%
60	0%	0%	0%	0%
80	0%	0%	0%	0%
100	0%	0%	0%	0%

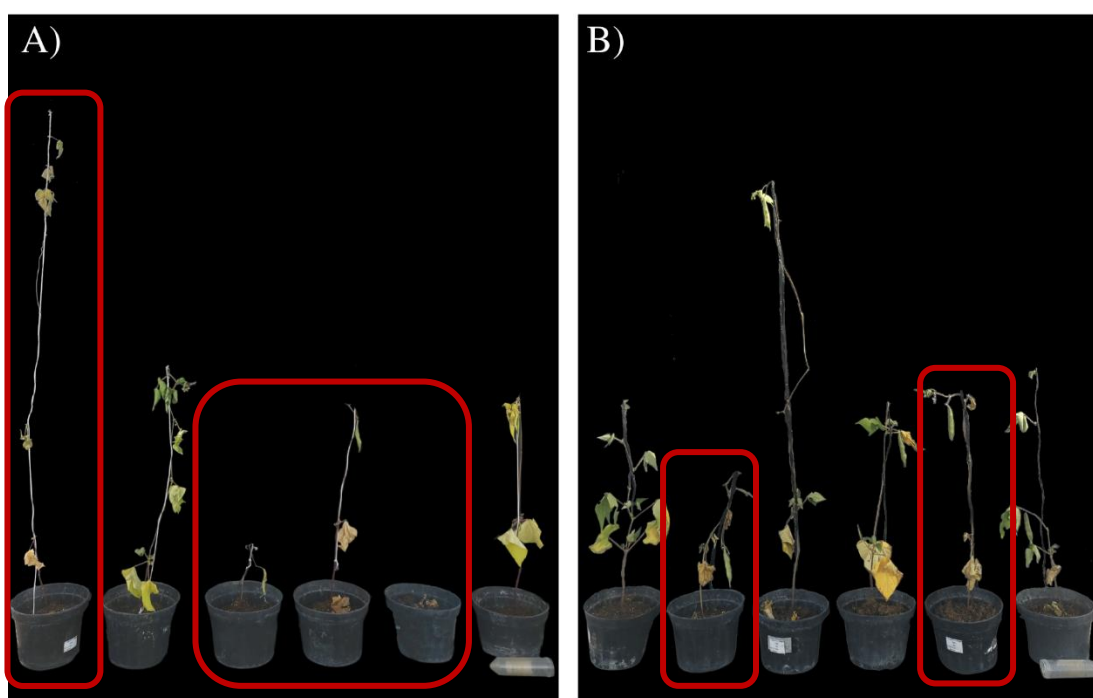


Figura 1. Plantas de *P. vulgaris* cultivar Negro Jamapa bajo diferentes condiciones de inoculación y CC. **A)** El grupo experimental NJ - *Rt* bajo condiciones de 20 % de CC mostró una mortalidad del 66.66 % de las plantas cultivadas [enmarcadas en color rojo] **B)** La mortalidad en NJ + *Rt* al 20 % de CC a la quinta semana del tratamiento con estrés hídrico presentó una mortalidad del 33.33 % [enmarcadas en rojo]

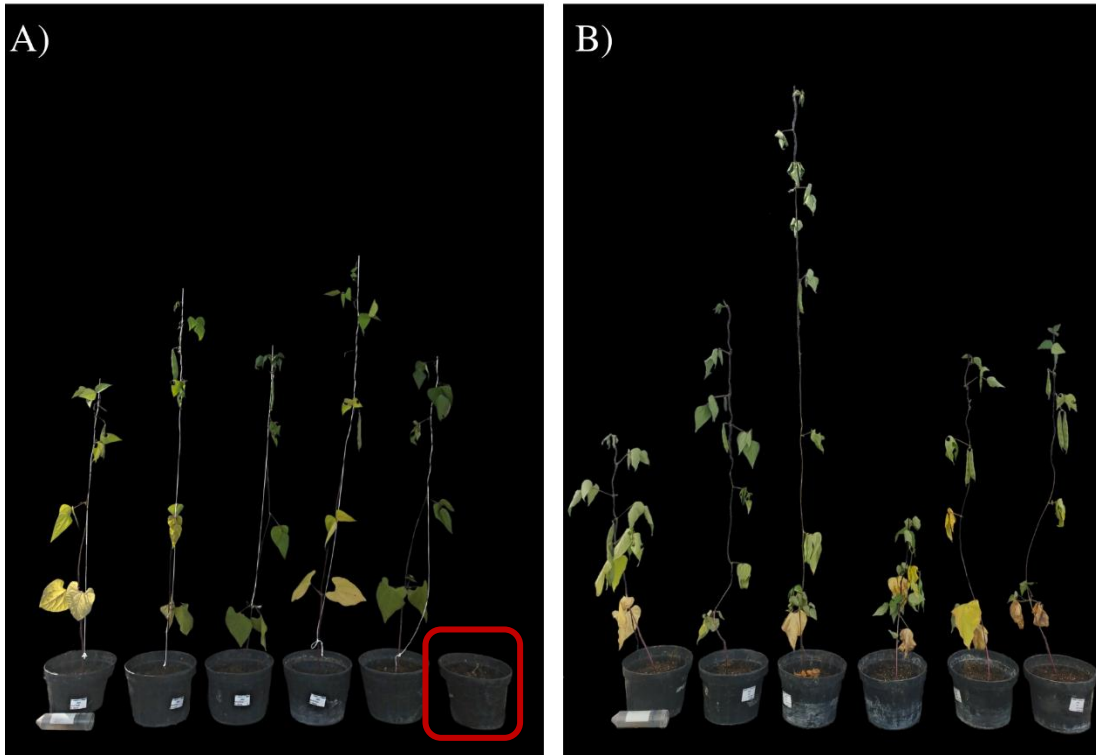


Figura 2. Plantas de *P. vulgaris* cultivar Negro Jamapa bajo diferentes condiciones de inoculación y CC. **A)** El grupo experimental NJ – *Rt* bajo condiciones de CC al 40 % presentó una mortalidad del 16.6 % de las plantas cultivadas a la quinta semana del tratamiento con estrés hídrico [enmarcados en rojo]. **B)** NJ + *Rt* al 40 % de CC en la quinta semana del tratamiento con sequía no mostró mortalidad.

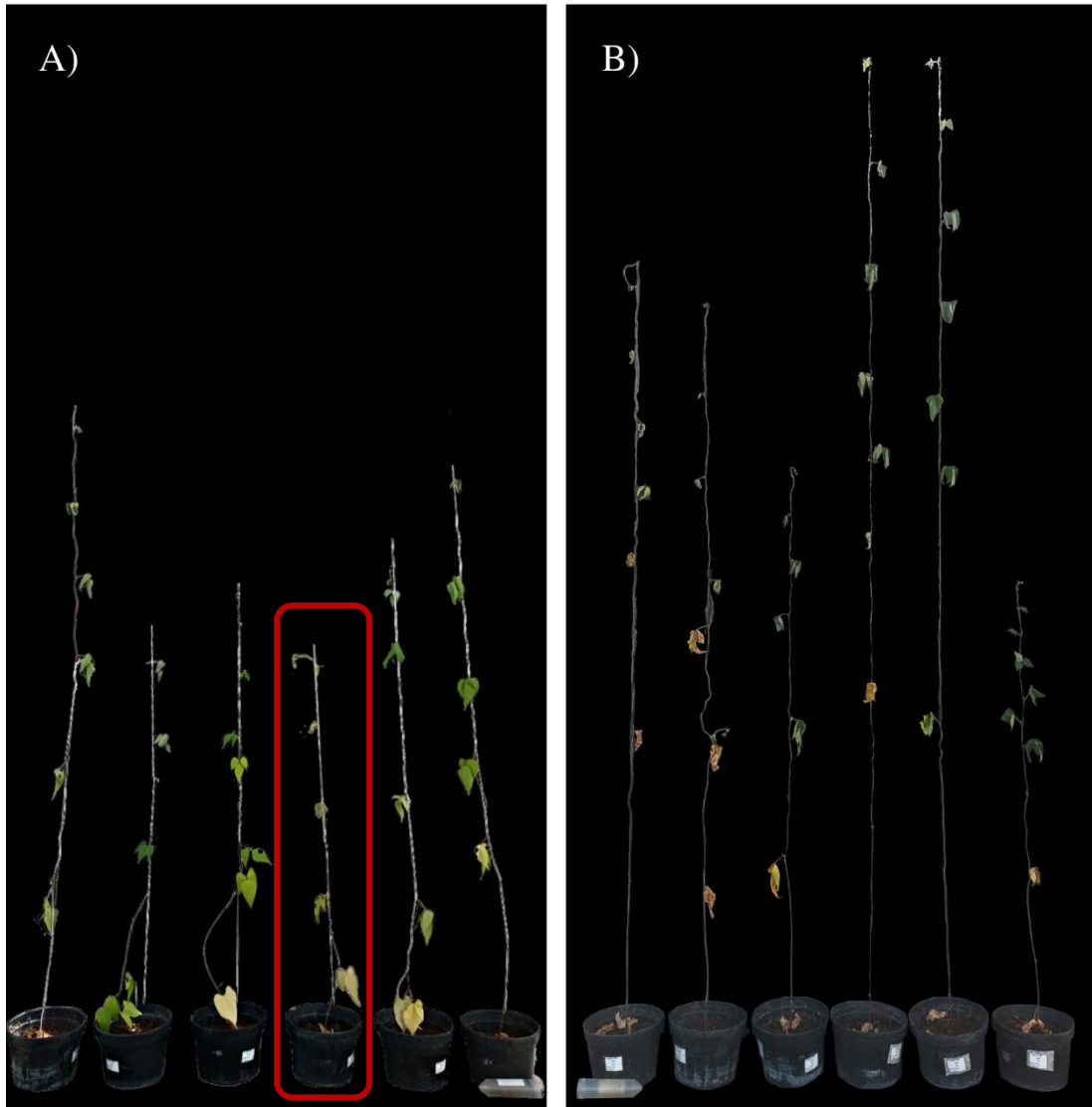


Figura 3. Plantas de *P. vulgaris* silvestre mesoamericano bajo diferentes condiciones de inoculación y CC. **A)** El grupo experimental MA – *Rt* mostró mortalidad del 16.6 % de las plantas cultivadas [enmarcadas en rojo] después de 5 semanas de exposición a condiciones del 20 % de CC. **B)** El grupo MA + *Rt* al 20 % CC en la 5ta semana del tratamiento con sequía no mostró mortalidad a diferencia del grupo con diferentes condiciones de inoculación.

7.2 Análisis de la simbiosis en la producción de biomasa apical bajo estrés hídrico

En cuanto a la producción de biomasa apical se observó que las plantas de NJ - *Rt* en condiciones de 100 % CC tuvieron un peso fresco apical promedio de 5.7 g, al cambiar la CC a 80 % este valor se redujo más de la mitad en un 65 %, presentando un peso promedio apenas superior a los 2 g. A partir de esta CC, el peso fresco apical se reduce en el 60 %, 40 % y 20 % CC, alcanzando un

peso mínimo de 0.94 g bajo esta última condición. En el caso de las plantas pertenecientes a MA – *Rt* y bajo una CC del 100 % se registró un peso apical fresco promedio de 6.14 g, valor que disminuye hasta 4.02 g al alcanzar un 80 % CC cambiando en un 35 %. Al bajar la CC a 60 % el peso promedio se redujo casi un 50 % en comparación con el peso apical al 80% CC y un valor de 2.64 g, para el resto de los porcentajes de CC (40 % y 20 %) el peso apical disminuye gradualmente hasta poco menos de 1 g. Para las plantas del cultivar NJ + *Rt* se apreció un incremento del 300% en el peso apical fresco promedio, registrando un peso de 15.3 g. Esto sólo sucedió bajo el 100 % CC, ya que el resto de los porcentajes mantiene un valor por debajo de los 5 g. De igual forma, el peso apical promedio en MA + *Rt* se triplicó bajo una CC del 100 %, obteniendo un valor de 16.5 g. La disminución del peso entre el 100 % y 80 % CC es menor ya que al reducirse la CC el peso promedio de las plantas únicamente disminuyó un 41% mientras que del 100 % CC con el resto de los porcentajes el peso apical se reduce hasta un 80% (**Figura 4**).

El incremento de la biomasa en las plantas de ambas variedades bajo la ausencia de estrés y un estrés leve (100 % y 80 % CC) durante la inoculación con *Rt* destaca sobre aquellas no inoculadas especialmente, ya que su peso aumentó casi el triple al 100 % CC. Sin embargo, al cambiar la CC de 100 % a 80 % el peso fresco apical promedio en NJ se redujo drásticamente hasta un 75 %, mientras que en estas mismas condiciones el valor de la disminución para las plantas de MA fue de un 50 % (**Figura 4**).

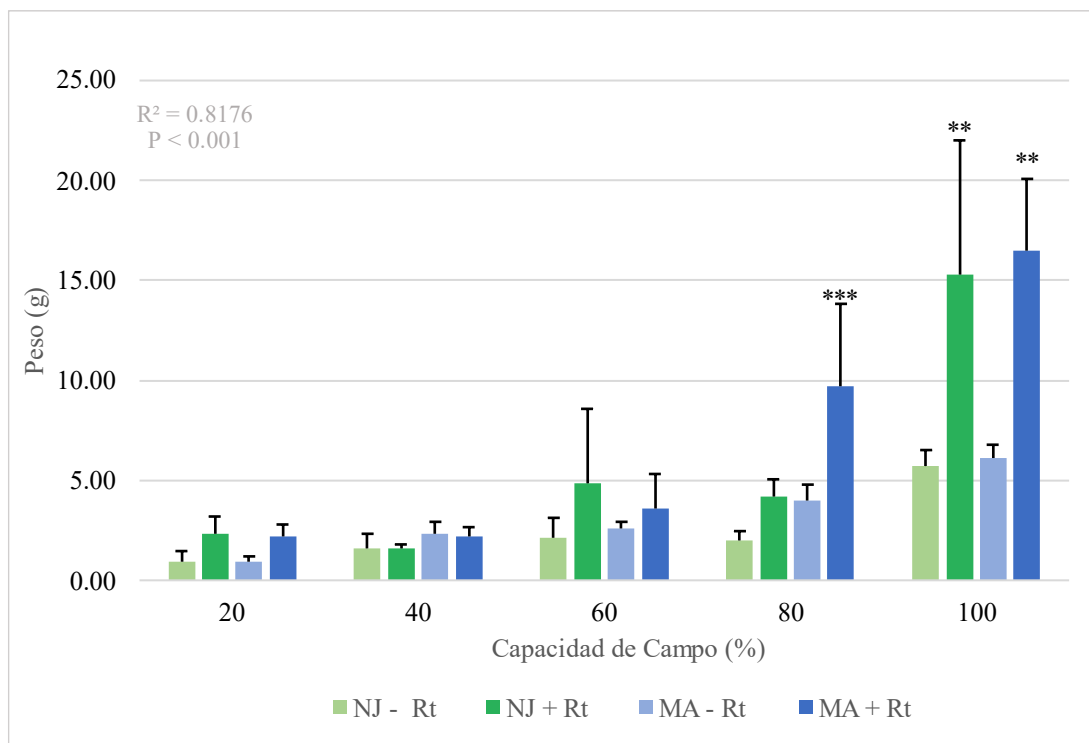


Figura 4. Promedio del peso apical fresco (g) de los grupos experimentales: NJ – Rt, NJ + Rt, MA – Rt y MA + Rt señalados en diferentes colores bajo diferentes condiciones de CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

7.3 Análisis de la simbiosis en la longitud internodal bajo estrés hídrico

Las observaciones sobre la longitud internodal mostraron que dentro del tratamiento NJ – Rt, no se presentaron cambios notables con la reducción de la CC. De manera contraria se apreció una disminución en la longitud internodal para las plantas pertenecientes a los grupos 40 % MA – Rt y 20 % MA – Rt en comparación con el valor de 100 % MA - Rt. También se registró que las plantas de NJ + Rt, redujeron su longitud en comparación con NJ – Rt, sin embargo, los valores fueron constantes entre las CC. Para el tratamiento MA + Rt se obtuvo un incremento del 20 % en la longitud internodal sobre el tratamiento de MA – Rt (**Figura A 2**).

En comparativa, la longitud de las plantas de MA para ambos estados de inoculación tuvo valores promedio superiores en al menos un 50 % a los de NJ, además, la disminución de la CC a hasta un 60 % generó reducciones descartables en la longitud del internodo para MA. En general la longitud internodal es significativamente ($p < 0.001$) mayor con la inoculación en MA en comparación con la inoculación en NJ (**Figura A 2**).

7.4 Análisis de la simbiosis en la producción de trifolios bajo estrés hídrico

Para este parámetro se observó que las plantas NA – *Rt* generaron un número de trifolios promedio que se mantuvo constante entre las CC. El número de trifolios promedio para MA – *Rt* fue mayor que el de la línea doméstica, superándola por el doble en el 100 %, 80 % y 40 % de CC, mientras que para el 20 % y 60 % CC sólo rebasó a NJ – *Rt* en un tercio de su valor. Además, se registró que el promedio de trifolios se incrementó para NJ + *Rt* y MA + *Rt* en comparación con los valores de las plantas no tratadas con *Rt* en ambas variedades. Sin embargo, el número de trifolios producidos por 100 % NJ + *Rt* se redujo significativamente (<0.001) a la mitad al bajar la CC a 80 % y a partir de este porcentaje este valor se mantuvo muy similar. Mientras que en MA el promedio de trifolios tuvo una disminución no significativa entre 100 %, 80 % y 60 % CC (**Figura A 3**).

Por otro lado, el aumento en la producción de trifolios en NJ + *Rt* fue significativamente (<0.001) menor que el registrado para MA + *Rt*, específicamente en las CC de 80 % y 60 % donde la superioridad que tiene MA es de un 33 % por sobre NJ (**Figura A 3**).

7.5 Análisis de la simbiosis en la integridad membranal bajo estrés hídrico

Para determinar la integridad de la membrana se cuantificó la fuga de iones intracelulares. El porcentaje de iones liberados de las muestras de NJ – *Rt* aumentó un 50 % al paso de las semanas, empezando aproximadamente con un 20 % de iones libres y terminando en un 70 % de iones fugados. Se registró una variación notable entre el 100 % de CC y el resto de los porcentajes, elevándose un cuarto el porcentaje de iones fugados en las CC más bajas (**Figura 5 A**). Del mismo modo las plantas del grupo MA – *Rt* tuvieron un incremento en el porcentaje de iones fugados conforme avanzó el tiempo, pero en promedio sólo llegó a un 60 % de iones liberados a excepción de 40 % MA – *Rt*, que registró un valor de 85 %. También se observó que los niveles de iones fugados fueron similares entre 100 %, 80 % y 60 % de CC, permaneciendo por debajo del 60 % de iones libres (**Figura 5 C**). El grupo de muestras pertenecientes a NJ + *Rt* presentaron una disminución de 8 % en los iones liberados durante la tercera semana, en las semanas siguientes los valores volvieron a incrementarse de manera similar al grupo NJ – *Rt*, teniendo una diferencia de aproximadamente 20 % entre ambos tratamientos, siendo menor el porcentaje de iones fugados en las plantas con inoculación. Además, los valores observados para las CC debajo de 100 % fueron 50 % más altos que 100 % CC (**Figura 5 B**). De igual forma el tratamiento MA + *Rt* mostró una disminución en los iones liberados durante la tercera semana, pero el incremento en las semanas subsecuentes fue 50 % menor en comparación a MA – *Rt*, llegando a fugarse máximo un 45 % de iones intracelulares. Los valores obtenidos para cada CC se mantuvieron

cercanos, exceptuando el grupo 40 % CC, ya que el porcentaje de iones fugados se incrementa un 5 % más que el resto (**Figura 5 D**).

En comparación, el porcentaje de fuga de iones se reduce mínimamente de NJ - *Rt* a NJ + *Rt*. Mientras que el grupo MA + *Rt* presentó una reducción drástica de hasta por debajo del 50 % sobre MA - *Rt*. En general, los niveles de iones liberados para NJ son mayores que en MA. Los tratamientos de - *Rt* fueron los que se vieron más afectados negativamente, en particular en CC del 40 %, que mostró una fuga de electrolitos superior al resto de CC (**Figura 5**).

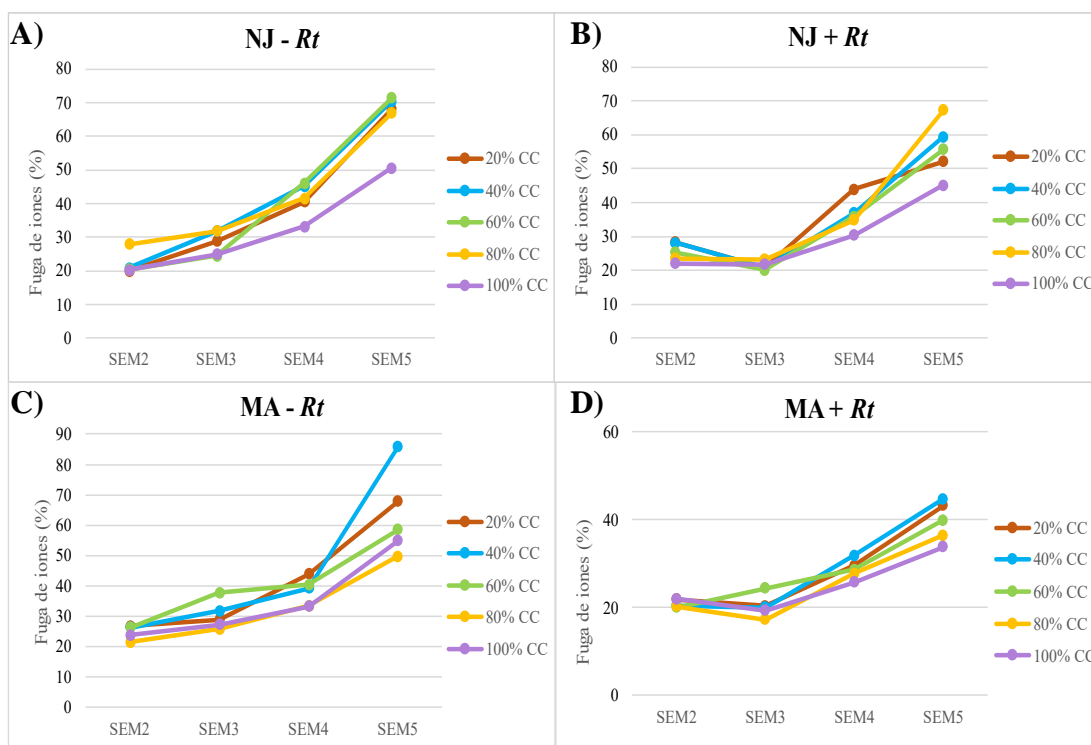


Figura 5. Promedio del porcentaje de iones liberados durante cuatro semanas y a diferentes CC (indicadas en distintos colores) para los grupos experimentales: **A)** NJ - *Rt* **B)** NJ + *Rt* **C)** MA - *Rt* y **D)** MA + *Rt*

7.6 Análisis de la simbiosis en el largo del pecíolo bajo estrés hídrico

Los datos recolectados para el largo del pecíolo indicaron que la diferencia entre la línea de frijol analizada fue la variable que determinó los cambios entre los valores. En ese sentido, se observó que entre cada CC para NJ - *Rt* el promedio del largo del pecíolo fue constante, reduciéndose sin significancia estadística en cada nivel de sequía. También se observó un comportamiento similar para MA - *Rt*, sin embargo, el largo del pecíolo disminuyó significativamente (<0.0001) a partir de 40 % CC. El grupo de NJ + *Rt* mostró una drástica disminución en el largo del pecíolo con la reducción de

la CC desde el 80 %, sin embargo, en comparativa con NJ – *Rt* el promedio de longitud aumentó aproximadamente un 50 % con la inoculación. De manera contraria, la disminución en los valores para MA + *Rt* al modificar la CC no tuvo significancia al cambiar de 100 % a 80 % y 60 % CC. En comparativa con MA – *Rt*, la longitud del pecíolo para MA + *Rt* aumentó levemente, pero sin significancia (**Figura A 4**).

En general, el aumento en el promedio del largo del pecíolo en NJ + *Rt* fue significativamente (<0.0001) mayor que el registrado para MA + *Rt*, sin embargo, el elevar los niveles de sequía al cambiar la CC redujo con significancia estadística los valores en NJ lo que no sucedió para MA (**Figura A 4**).

7.7 Análisis de la simbiosis en el LRWC bajo estrés hídrico

En las plantas del grupo NJ – *Rt* se observó que no tuvieron una variación estadística significativa en su contenido de agua entre los diversos niveles de sequía. De igual forma, los valores se mantuvieron constantes en las plantas del grupo MA – *Rt* al exponerse a diferentes porcentajes de CC. Mientras que para el tratamiento NJ + *Rt* se registró una disminución del 23 % en el porcentaje de LRWC en comparación con NJ – *Rt* en todas las CC. Además, este cambio en el contenido de agua de la hoja se redujo al pasar de la CC máxima a niveles inferiores, siendo la reducción más alta de 20 % en el caso de 20 % CC. Los valores obtenidos para el tratamiento MA + *Rt* fueron levemente superiores en un 7 %, 14 % y 3 % a los de MA – *Rt* pero únicamente para 100 %, 80 % y 60 % de CC respectivamente. En la sequía alta y severa (40 % y 20 % CC) el grupo MA – *Rt* (**Figura A 5**) tuvo un mayor LRWC.

En general, las plantas de MA + *Rt* presentaron un contenido de agua promedio mayor que el resto de los grupos para 100 %, 80 % y 60 % CC, pero para 40 % y 20 % el grupo MA – *Rt* fue superior en el porcentaje de LRWC. Sin embargo, las diferencias entre los niveles de estrés no tuvieron significancia estadística entre los efectos de cada variable aplicada (**Figura A 5**).

7.8 Análisis de la simbiosis en el área foliar bajo estrés hídrico

El registro de datos indica que el área foliar para el grupo 100 % NJ – *Rt* fue de 36 cm², valor que permaneció casi constante en 80 % NJ – *Rt*. Al reducir la CC a 60 %, 40 % y 20 % se identificó una disminución de 18 %, 29 % y 62 % respectivamente en el promedio del área foliar en comparación con el valor superior en la CC, la reducción en el área foliar solo fue significativamente (<0.0001) mayor en 40 % y 20 % de CC. De igual manera, para 100 % MA – *Rt* se obtuvieron hojas con un área

promedio de 52 cm². Este valor se redujo sin significancia estadística de forma similar en un 15 % entre cada CC. La inoculación con *Rt* aumentó el área foliar en NJ, alcanzando 71 cm² para NJ + *Rt* a 100 % CC. Sin embargo, la disminución en la CC perjudicó el tamaño de la hoja, reduciendo con significancia ($p < 0.0001$) su área un 43 % para 80 % NJ + *Rt* y que se mantuvo así para las demás CC. En el tratamiento de MA + *Rt*, también se observó un aumento en el promedio del área de la hoja, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el tamaño de las hojas de MA + *Rt* y MA – *Rt*. En conjunto, se observó que los valores entre las CC no cambiaron demasiado (**Figura A 6**).

Las plantas de NJ y MA bajo inoculación en comparación con las no inoculadas no mostraron grandes diferencias en el tamaño de la hoja, a excepción del grupo al 100 % CC de NJ que incrementó su tamaño al doble. En general, el área foliar promedio de MA es significativamente superior a los valores obtenidos en NJ para cada CC (**Figura A 6**).

7.9 Análisis de la simbiosis en el contenido de clorofila bajo estrés hídrico

Al determinar el contenido de clorofila en las hojas se observó en el grupo NJ – *Rt* una disminución del 3 % en los valores a lo largo de 5 semanas para cada CC, a excepción de las muestras al 20 % CC, dónde la reducción en el contenido de clorofila través del tiempo fue del 36 %. Además, al disminuir la CC también el contenido de clorofila fue menor, siendo que las plantas al 100 % y 60 % CC tuvieron mayor contenido de clorofila (**Figura 6 A**). Del mismo modo las plantas del grupo MA – *Rt* tuvieron una disminución del 11 % en los valores de clorofila en sus hojas, siendo más notable en este grupo a comparación de NJ – *Rt*. También se observó que los niveles de clorofila cambian drásticamente entre cada CC, siendo mayor para 100 % y 60 % CC (**Figura 6 C**). El grupo de muestras pertenecientes a NJ + *Rt* mostraron un aumento de casi el doble en el contenido de clorofila en comparación con el grupo NJ – *Rt*, ya que el nivel más bajo para cada tratamiento fue de 15 contra 8 (**Figura 6 B**). La disminución entre las CC en NJ + *Rt* es menor, ya que los valores para 100 %, 80 % y 60 % se mantuvieron constantes entre estas CC. Para el tratamiento MA + *Rt* se mostró una disminución del 28 % en el contenido de clorofila al pasar las semanas, incluso mayor al grupo MA – *Rt*. Además, los valores registrados para cada CC difieren al menos un 30 % entre ellos y a medida que se reduce la CC también lo hace el nivel de clorofila (**Figura 6 D**).

En comparación, el nivel de clorofila disminuye a más del doble para el grupo MA + *Rt* que para el resto de los tratamientos. Mientras que el grupo NJ + *Rt* mantiene con mayor constancia y por más tiempo niveles más altos. Los tratamientos en las CC más bajas fueron los que se vieron más afectados negativamente, en particular 20 % CC para las plantas no inoculadas y 40 % CC para las inoculadas,

que mostraron una pérdida en el contenido de clorofila superiores, en un 20 % y un 44 % respectivamente, en comparación al resto de las CC (**Figura 6**).

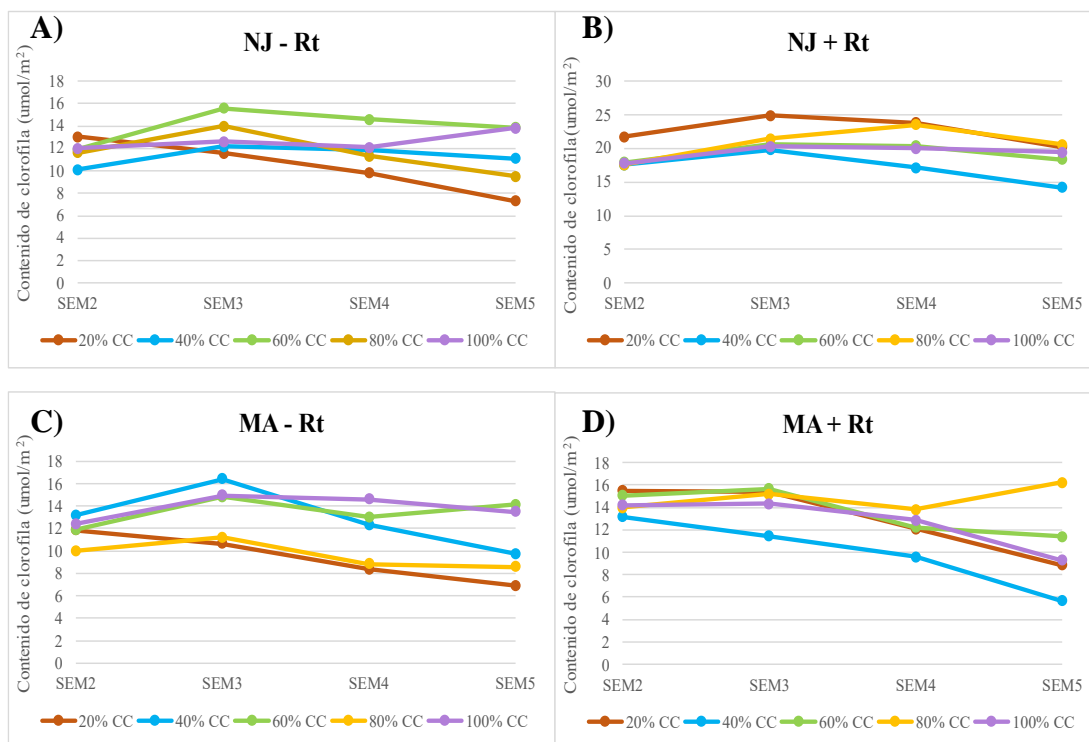


Figura 6. Contenido de clorofila promedio durante 4 semanas por tratamiento en *P. vulgaris* bajo diferentes condiciones experimentales tanto de CC (indicadas en distintos colores) como de inoculación con *Rt* para los grupos experimentales **A)** NJ – *Rt* **B)** NJ + *Rt* **C)** MA – *Rt* y **D)** MA + *Rt*.

7.10 Análisis de la simbiosis en la biomasa radicular

El fenotipo radicular se determinó en base al peso fresco de la raíz, a su longitud y a la cantidad de raíces laterales que se tiene para cada variedad en los diferentes tratamientos. En la **Figura 7** podemos observar que el promedio del peso fresco de la raíz de NJ – *Rt* varía sin significancia estadística entre cada CC, donde el peso mayor se registró en el 100 % CC y fue de apenas 3.7 g. Las plantas de MA – *Rt* siguieron una tendencia similar a las del cultivar, ya que presentaron diferencias no significativas conforme se redujo la CC, y su valor promedio tan sólo alcanzó los 3.3 g.

En la misma figura podemos observar que el peso promedio del cultivar NJ + *Rt* bajo una CC del 100 % se incrementó significativamente (<0.0001), pues comparado con las plantas de NJ – *Rt*, su valor se duplicó alcanzando los 8 g. Sin embargo, este comportamiento fue exclusivo de la CC máxima y al 40 %, los porcentajes restantes sólo aumentaron su peso en un tercio. Al comparar los valores de cada CC entre sí, podemos observar que la disminución del peso al reducir la CC del 100 % al 80 %

fue del 50 %, obteniendo un valor de peso fresco promedio de 4 g. Los datos obtenidos para la variedad silvestre MA + *Rt* muestran que el peso de las plantas aumentó con significancia estadística a más del doble para todas las CC a excepción del 20 % que solamente se incrementó la mitad, en comparación con las plantas de la variedad silvestre MA – *Rt*.

Al comparar el peso promedio de la raíz en las plantas de NJ + *Rt* contra las de MA + *Rt* podemos observar que el aumento de los valores para MA + *Rt* bajo 100 % y 80 % de CC fue significativamente superior a los valores que se registraron para NJ + *Rt* en un 30 % y 50 % respectivamente. Para el resto de los porcentajes de CC también se obtuvieron incrementos en el peso promedio que destacan en la variedad silvestre MA sobre el cultivar NJ, sin embargo, este crecimiento fue menor al 30 % y carece de significancia estadística (**Figura 7**).

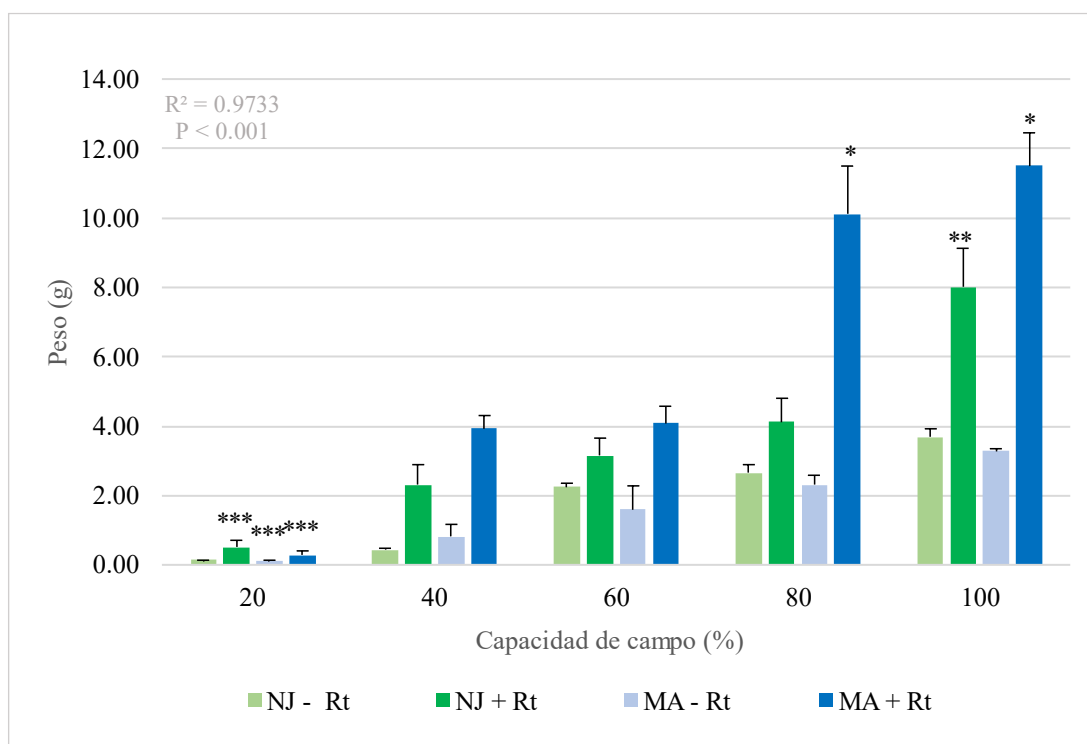


Figura 7. Promedio del peso fresco de raíz (g) de los grupos experimentales (identificados con diferentes colores): NJ – *Rt*, NJ + *Rt*, MA – *Rt* y MA + *Rt* bajo diferentes condiciones de CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

7.11 Análisis de la simbiosis en la longitud de raíz bajo estrés hídrico

La longitud de la raíz en 100 % NJ – *Rt* fue de 15 cm, valor que disminuyó significativamente (<0.0001) con los cambios en la CC, llegando a medir 7 cm en 20 % NJ – *Rt*. Se registró un comportamiento similar en MA – *Rt*, con valores de 16.5 cm y 8.2 cm a 100 % y 20 % CC. La

aplicación del inóculo generó un aumento significativo de un tercio en la longitud de la raíz de 100 % NJ + Rt y 80 % NJ + Rt en comparación con NJ – Rt. A pesar del incremento mencionado, a nivel general se presentó una disminución estadísticamente significativa de la longitud de raíz al cambiar la CC. Mientras que en el grupo de MA + Rt, se dio un incremento sobre MA – Rt del 50 % en el largo de la raíz. Con la reducción de la CC en MA + Rt también se mostró una disminución en los valores de longitud, que no tuvo significancia estadística entre 100 % y 80 % CC y con significancia a partir del 60 % CC (**Figura A 7**).

La comparación entre NJ y MA muestra que los valores de la longitud de raíz fueron similares entre NJ – Rt y MA – Rt, pero fueron significativamente mayores para MA + Rt que para NJ + Rt. También se observó que los niveles más bajos de CC afectaron más gravemente al grupo NJ que al MA, produciendo raíces más cortas (**Figura A 7**).

7.12 Análisis de la simbiosis en la densidad de raíces laterales bajo estrés hídrico

El registro de la densidad de raíces laterales en el grupo NJ – Rt mostró una variación sin significancia estadística al modificar la CC a 60 %, 40 % y 20 %, teniendo un máximo de 1.16 raíces laterales promedio en 100 % CC. De manera similar se registró que en MA – Rt, se produjeron en promedio 1.66 raíces laterales bajo una CC de 100 %. El número de raíces laterales no tuvo una disminución significativa al bajar la CC a un porcentaje de 80. También se observó que en el grupo NJ + Rt, la reducción de la CC afectó negativamente en un 50 % el número de raíces, pero hubo un incremento significativo (<0.0001) en el número de raíces laterales en comparación con NJ – Rt. Este aumento se registró en igual medida para cada CC. Para el tratamiento MA + Rt se registró un número de raíces superiores a las producidas en MA – Rt, siendo casi 50 % más productivo. En cuanto a las variaciones con el cambio en la CC se observó que las raíces laterales tuvieron una disminución sin significancia al pasar de 100 % MA + Rt a 80 % MA + Rt (**Figura A 8**).

La densidad de raíces laterales de MA – Rt fue significativamente mayor que en NJ – Rt en casi un 40 %, si bien ocurrió un incremento en los valores de NJ + Rt estos apenas lograron ser similares a MA – Rt. En ese sentido, el grupo de MA + Rt fue superior ya que produjo más raíces laterales por cm que el resto, además de que mantuvo una mejor estabilidad en sus valores al reducirse la CC. También se observa que el número de raíces laterales no tiene diferencia estadística significativa entre el grupo MA + Rt al 60 % y 80 % de CC y el grupo NJ + Rt al 100 % CC (**Figura A 8**).

7.13 Análisis de la sequía en la nodulación

Número de nódulos

En referencia al fenotipo nodular se tuvieron las siguientes observaciones. En primer lugar, se observó que en NJ al 100 % CC se produjeron un promedio de 106 nódulos totales. Ligado a esto, la reducción en la CC afectó negativamente el número de nódulos disminuyendo su promedio en aproximadamente un 40 % para NJ a 80 % CC. A partir de 80 % CC la disminución se hizo más evidente, generando un poco más de 30 nódulos a CC de 20 %. En las raíces de MA a 100% CC se contabilizó una producción de 112 nódulos. Al modificar la CC en 80 % y 60 %, la diferencia entre estas CC y el 100 % CC es de 21 % y 30 % respectivamente y no presenta significancia estadística (Figura 8).

A pesar de que el número de nódulos totales bajo 100 % CC fue muy similar entre NJ y MA, se registró que para el resto de los porcentajes el tratamiento en MA produjo entre 20 % y 30 % más nódulos que en NJ. Además, el efecto de la sequía se destacó con superioridad en NJ pues la variación del número de nódulos entre un porcentaje de CC y otro fue mayor que los cambios en MA (Figura 8).

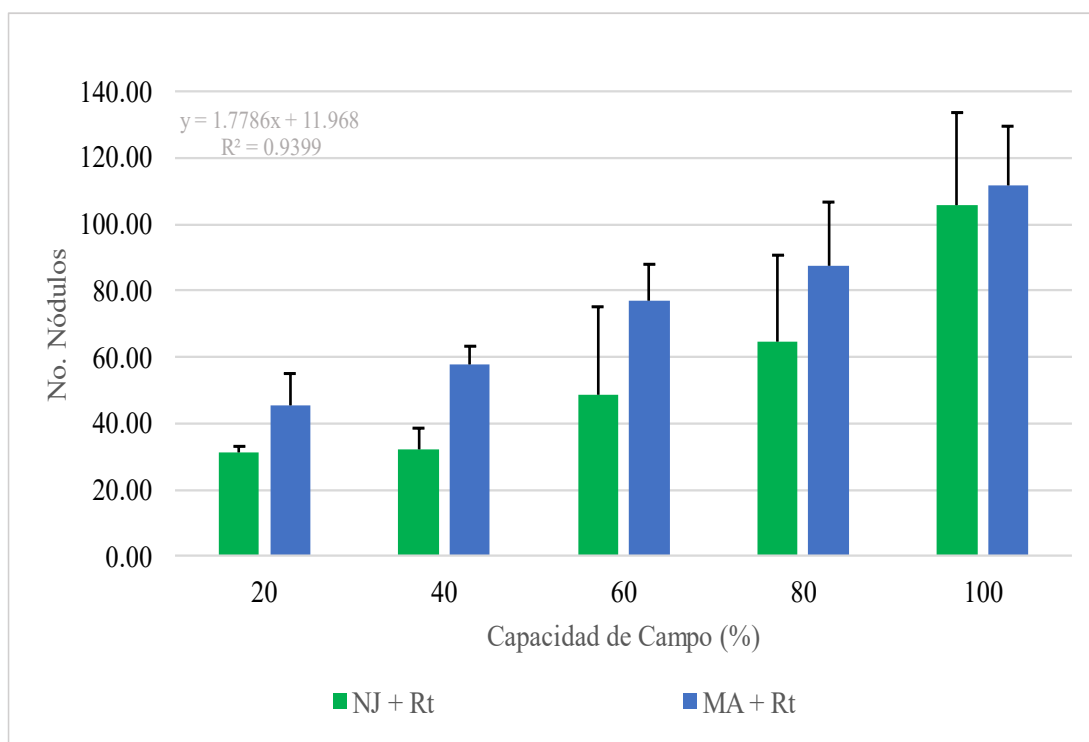


Figura 8. Promedio de nódulos totales en *P. vulgaris* NJ y MA bajo condiciones de inoculación positiva (NJ + Rt y MA + Rt) expuestas a diferentes CC.

Nódulos primordiales, maduros y senescentes

En segundo lugar, los nódulos totales se clasificaron en base a su coloración y se observó que el número de nódulos primordiales que se produjo en NJ a 100% CC fue de 29 y disminuyó al modificar la CC, teniendo casi la mitad de los nódulos primordiales en 80 % CC y reduciéndose aún más en 20 % CC con un promedio de sólo 5 nódulos. Mientras que en MA se cuantificó un promedio de 57 nódulos primordiales y, al disminuir la CC a 80 % y 60 %, la reducción del promedio de nódulos fue de tan sólo el 20 %, considerando que no existe una variación importante en el número de nódulos primordiales entre 100 % MA, 80 % MA y 60 % MA (**Figura 9 A**). En el caso de los nódulos maduros se observó un comportamiento similar a la producción de nódulos primordiales. Para 100 % NJ se obtuvo una producción promedio de 30, valor que disminuyó desde un 30 % hasta un 78 % en las CC menores. Al igual, MA produjo un mayor número de nódulos maduros en 100 % CC, alcanzando un conteo de 42 nódulos. La producción de nódulos maduros disminuyó un 15 % y un 24 % al pasar de 100 % CC a 80 % CC y 60 % CC respectivamente (**Figura 9 B**). La cuantificación de los nódulos senescentes en NJ indicó un aumento en el número de nódulos senescentes conforme se aumentaba la CC. Produciéndose un promedio de 47 nódulos senescentes en las plantas NJ al 100 % CC. De manera contraria, esta misma variable en MA fue disminuyendo con el aumento de la CC, bajando de 17 nódulos en MA al 20 % CC a 13 nódulos senescentes en MA al 100 % CC (**Figura 9 C**).

La producción de nódulos primordiales en las raíces de MA fue superior en un 50 % que la de NJ para 100 % CC y, en un 100 % para 80 % y 60 % (**Figura 9 A**). También se pudo observar que la producción de nódulos maduros incrementó en aproximadamente un 33 % en MA sobre NJ. En general, modificar la CC impactó negativamente en la producción de nódulos primordiales y maduros en mayor medida en NJ que en MA, ya que la línea silvestre fue más constante en su producción hasta el 60 % CC (**Figura 9 B**). Mientras que, en la producción de nódulos senescentes, el cambio de CC provocó una disminución en los valores para MA y un aumento en NJ, resultando en una menor producción de nódulos senescentes en MA en comparativa con NJ (**Figura 9 C**).

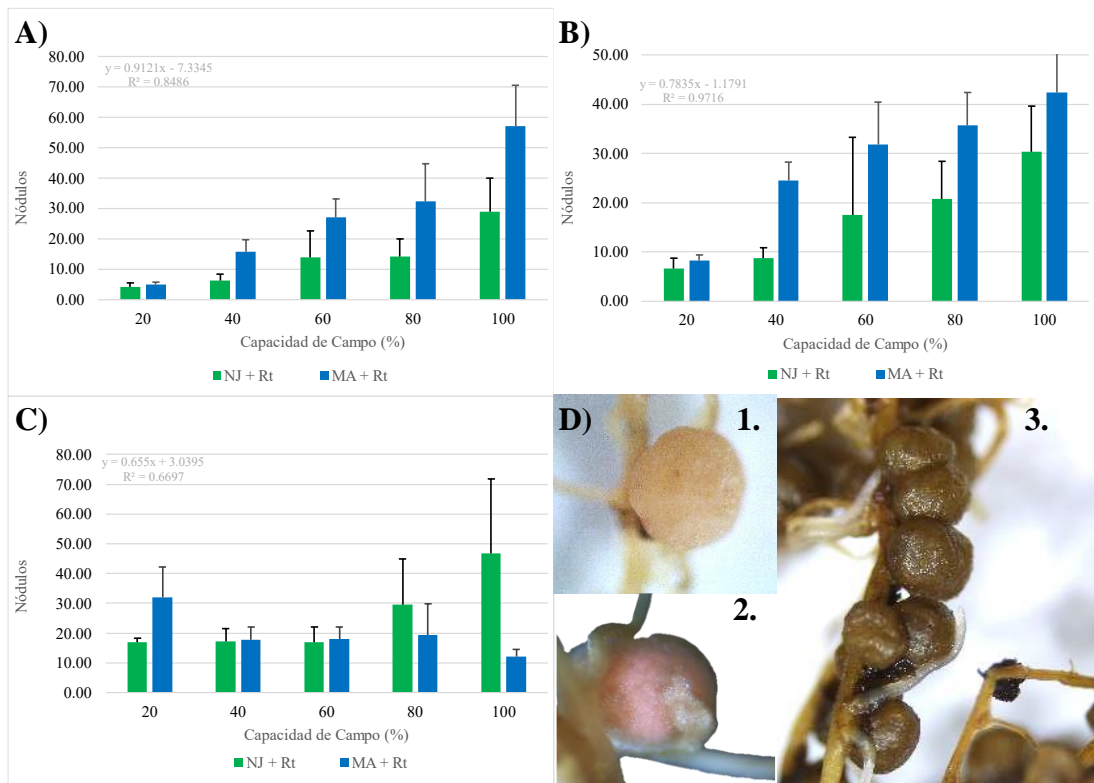


Figura 9. Número promedio de nódulos primordiales, maduros y senescentes bajo diferentes porcentajes de CC para *P. vulgaris* NJ y MA. **A)** Promedio de nódulos primordiales en ambos grupos de inoculación positiva [NJ + Rt y MA + Rt] **B)** Promedio del número de nódulos maduros en NJ + Rt y MA + Rt **C)** Promedio del número de nódulos senescentes en NJ + Rt y MA + Rt **D)** Fotografías de nódulos en donde se destacan las características principales de coloración observables durante las diferentes etapas de desarrollo de los nódulos rizobiales 1. Primordiales [coloración blanca] 2. Maduros [coloración roja debida a la presencia de leghemoglobina] y 3. Senescentes [color verde derivado de la oxidación del grupo hemo], todas las fotografías fueron tomadas con un microscopio estereoscópico Leica MZ10 F.

Peso de los nódulos

En cuanto al peso de los nódulos se observó un comportamiento similar al número de los nódulos. En el grupo 100 % NJ se cuantificó un peso de 0.48 g, que con la reducción en la CC se afectó esta variable, disminuyendo su peso aproximadamente en un 50 % para 80 % y 60 % CC y en un 76 % para 40 % y 20 % CC. El promedio del peso total de nódulos para 100 % MA fue de 0.56 g, con una disminución del 20 % entre las CC (**Figura A 9**).

Al comparar los valores obtenidos en NJ y MA se observó que a 100 % CC el peso de los nódulos fue superior un 14 % para MA, pero esta diferencia entre las líneas se amplificó hasta en un 50 % al disminuir el porcentaje de CC. Además, el impacto de la reducción en la CC tuvo menos impacto

sobre los valores de MA que en NJ, ya que la disminución de la CC hace variar el peso de los nódulos en tan solo un 18 % para cada CC (**Figura A 9**).

7.14 Análisis de la simbiosis en el contenido de azúcares totales bajo estrés hídrico

Los análisis bioquímicos mostraron que la concentración de azúcares totales solubles en el tejido de las plantas de NJ – *Rt* aumentó sin significancia estadística al disminuir la CC, presentando un porcentaje de azúcares solubles máximo de casi 40 % en un 40 % CC y mínimo de 25 % al 100 % CC. De manera similar, el contenido de azúcares en MA – *Rt* se incrementó conforme se agravó la sequía a la que se expusieron, llegando a 51 % en 40 % CC y 32 % en 100 % CC pero no hubo significancia en este cambio. El contenido de azúcares registrado para NJ + *Rt* señalan un comportamiento parecido al grupo NJ – *Rt*, pues el contenido de azúcar se elevó en CC más bajas existiendo un pico en 40 % CC. Sin embargo, se presentó una disminución estadísticamente significativa (<0.0001) entre más alta era la CC, pasando de 64 % a 37 %. Por el contrario, el grupo MA + *Rt*, difirió en las tendencias anteriores. Aunque el nivel de azúcares solubles disminuyó al elevarse el agua disponible en el sustrato, esta disminución no fue estadísticamente significativa entre cada CC, sin considerar el caso de 40 % CC, que presentó un aumento en sus valores para cada grupo experimental (**Figura 10**).

En general, el contenido de azúcares totales solubles en el tejido de NJ fue significativamente menor que el registrado para MA en cada tratamiento, siendo superior en un 25 % para las plantas no inoculadas y un 33 % para las inoculadas (**Figura 10**).

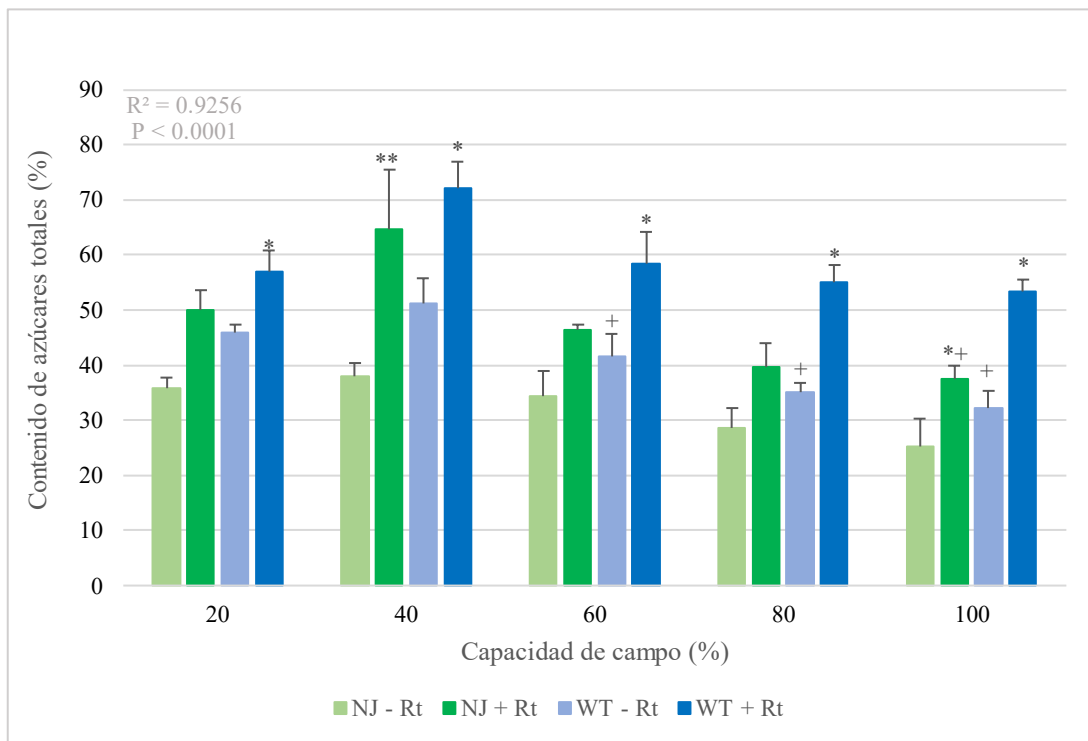


Figura 10. Promedio de azúcares totales solubles en los grupos experimentales: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes porcentajes de CC

VIII. DISCUSIÓN

Las relaciones planta-microorganismo, tanto benéficas como patógenas, son de gran interés científico por sus múltiples efectos en los organismos hospederos. La simbiosis con bacterias promotoras del crecimiento es considerada benéfica por el impacto positivo en el desarrollo de una planta (Nadeem et al., 2014). Existen algunos estudios que señalan la capacidad de los inóculos bacterianos para mitigar los daños causados por estrés abiótico en plantas (Ide Franzini et al., 2010). Sin embargo, aún no está bien descrito el proceso mediante el cual las rizobacterias confieren tolerancia a la sequía en *P. vulgaris* y se desconoce aún más en variedades silvestres. Este trabajo caracteriza el fenotipo de simbiosis de dos variedades de *P. vulgaris*, el cultivar NJ y el silvestre MA, y sus efectos en referencia a la tolerancia al estrés hídrico. En general, se demostró que las plantas de MA tienen mayor resistencia al estrés hídrico y su tolerancia aumenta bajo inoculación con *Rt*, mientras que NJ es afectado de moderadamente a grave en diversas características. Estas observaciones señalan las ventajas fisiológicas de la variedad silvestre sobre el cultivar doméstico al exponerse a condiciones de sequía, por lo que es importante considerar la implementación de programas de fitomejoramiento que se enfoquen en la introgresión de caracteres silvestres benéficos a los cultivares domésticos.

8.1 La simbiosis reduce la mortalidad por sequía en plantas de MA

La selección artificial de características agrológicas en un cultivo genera una limitante en la variabilidad genética de las plantas domesticadas, reduciendo su tolerancia al estrés abiótico y aumentando su mortalidad (Zhu et al., 2007). En contraste, las líneas silvestres de los cultivos presentan mayor adaptabilidad a las condiciones climáticas adversas (Koziol et al., 2012).

En ese sentido, los resultados obtenidos indican que en condiciones de sequía severa y alta (20 % y 40 % CC) las plantas de MA presentan un fenotipo de resistencia al estrés hídrico natural superior al del cultivar NJ, dado que el porcentaje de mortalidad es menor en la línea ancestral que en la doméstica para cada CC. Además, podemos resaltar que el tratamiento de inoculación positiva con *Rt* genera un incremento notable en la tolerancia a la sequía para ambas variedades, sin embargo, la eficiencia con la que la inoculación con *Rt* alivia la mortalidad en la línea silvestre MA es mayor que en el cultivar NJ pues mejora su tolerancia al estrés hídrico por completo cuando la disponibilidad de agua se limita hasta un 20 % de CC. Estos comportamientos pueden deberse a que la línea ancestral originalmente tuvo mayor adaptación y resistencia al estrés hídrico para garantizar su supervivencia en la naturaleza, y que aún conserva estos mecanismos en su genoma, tal como se ha observado en plantas ancestrales

de betabel (*Beta marítima* L.) que presentan una mayor tolerancia a sequía y salinidad en comparación con el cultivar doméstico (*Beta vulgaris* L.) (Yolcu et al., 2021).

8.2 La producción de biomasa total aumenta con la inoculación de *Rt*

Parte de los efectos de la sequía en el fenotipo de las plantas se pueden observar en la producción de biomasa. La falta de agua se traduce en un impacto negativo en el desarrollo de los tejidos, a nivel celular se limita la elongación y multiplicación de las células corticales, mientras que en un grado hormonal la acumulación de etileno y ácido abscísico (ABA) favorece la senescencia y caídas de las hojas, el cierre de estomas y reduce la transpiración. Esto genera plantas de menor longitud y débiles debido a la disminución en el número, peso y tamaño de tallos, pecíolos, hojas y raíces (Yang et al., 2009; Agurla et al., 2018; X. Li et al., 2021). Con este experimento pudimos apreciar que el peso apical en ambas variedades aumenta drásticamente al imponerse la inoculación con *Rhizobium*, esto ocurre especialmente en MA, que eleva sus valores hasta por encima de los expresados en NJ. También, fue posible observar que otras características como la longitud internodal, el número de trifolios, el largo del pecíolo y el área foliar se modificaron con la inoculación y con ello lograron igualar o superar en MA lo registrado para NJ. Otra característica importante modificada por la inoculación fue la estabilidad de los rasgos frente a la disminución de la CC. Demostrando la optimización en la capacidad de resistencia al estrés hídrico principalmente en MA debido a la simbiosis que incrementa la disponibilidad de nitrógeno aprovechable para la formación de tejidos.

Nuestro experimento también demostró que las plantas pertenecientes a MA – *Rt* tuvieron valores similares al grupo de NJ – *Rt* en cuestión del peso fresco de la raíz, longitud radicular y densidad de raíces laterales. Además, se observó que el grupo MA + *Rt* presentó un mayor peso fresco de la raíz que las plantas del resto de los grupos experimentales. Este fenotipo puede estar ligado directamente al aumento en la profundidad de la raíz y la cantidad de raíces laterales generadas bajo la inoculación. Por lo que, al igual que en la biomasa apical, las plantas de MA mejoran sus características en cuanto a la producción de biomasa al establecer la simbiosis y el impacto negativo a estos rasgos es menos drástico durante la exposición a sequía. La infección por *Rhizobium* en las leguminosas genera una alteración en la arquitectura de la raíz, favoreciendo la elongación de la raíz y produciendo un incremento en la densidad de raíces pilosas y laterales que mejora la absorción de agua y la toma de nutrientes (Vurukonda et al., 2016). La falta de agua no solo cambia la morfología del tallo y raíz, sino que también afecta la partición proporcional entre la biomasa apical y radicular producida. En plantas expuestas a sequía se puede apreciar como la formación de biomasa radicular prolifera sobre

la apical (Kunert et al., 2016). Los datos de la investigación revelaron que las plantas de MA expuestas a inoculación logran restablecer la proporción de biomasa en las plantas al enfrentarse a condiciones de sequía moderada y leve, evitando que la raíz incremente su desarrollo por sobre el tallo.

En general, el establecimiento de las bacterias de *Rhizobium* dentro de la raíz favorecen la producción de biomasa mediante la fijación de nitrógeno, la estimulación de enzimas degradantes de etileno y ABA, y las modificaciones estructurales en raíz, tienen un impacto benéfico en ambas variedades, misma que resalta fácilmente en MA debido a su alta producción de biomasa total (Kunert et al., 2016; Barnawal et al., 2017; Saikia et al., 2018). En la industria agroalimentaria, el desarrollo de cultivares en base a rasgos específicos suele tener como finalidad potencializar la producción de biomasa de las plantas y los frutos (Fita et al., 2015; Li et al., 2019). Por lo que es interesante observar que las plantas de MA inoculadas pueden alcanzar o superar los valores de NJ, siendo que este último fue diseñado para tener mejores rendimientos. Esto puede vislumbrar nuevas estrategias para satisfacer las necesidades alimenticias e incrementar la producción en condiciones adversas.

8.3 La inoculación con *Rt* mantiene la integridad membranal en MA expuesto a sequía

La producción de especies reactivas de oxígeno se genera de manera natural en algunos organelos celulares como subproductos del metabolismo (Holze et al., 2018), sin embargo, bajo estrés hídrico su acumulación incrementa llevando a la muerte celular programada y la fuga de electrolitos intracelulares (Verslues et al., 2006). Nuestros resultados muestran una mayor estabilidad en la membrana celular de las plantas de MA sobre NJ, ya que en ambos tratamientos el porcentaje de iones liberados es menor en la línea silvestre. Además, podemos destacar que la inoculación con *Rt* es más efectiva en MA, ya que disminuye drásticamente los niveles de electrolitos fugados para cada CC y detiene el daño membranal a través del tiempo. Esto sustenta otros estudios que han demostrado la capacidad de *Rt* para aminorar los efectos de la sequía en la integridad de la membrana (Arthikala et al., 2015). Es posible que esta respuesta se deba a la capacidad de algunas bacterias promotoras del crecimiento para elevar la producción de enzimas antioxidantes que eliminan las ROS en las plantas (Scandalios et al., 1997). Como se ha observado en plantas de *P. vulgaris* L. (Figueiredo et al., 2008), *Vigna radiata* (Saravanakumar et al., 2011), *Lactuca sativa* L. (Kohler et al., 2008) y *Helianthus annuus* L (Sandhya et al., 2009).

8.4 La retención de agua en la planta aumenta con *Rt* incluso bajo sequía

El contenido relativo de agua es una medida utilizada para evaluar el estado hídrico de las plantas como consecuencia fisiológica del déficit de agua en las células (Barrs & Weatherley, 1962). Este indicador determina el nivel de estrés osmótico en la hoja, debido a que refleja el equilibrio entre el suministro de agua en el tejido y la tasa de transpiración (Soltys-Kalina et al., 2016). Por lo que en condiciones de estrés se considera el LRWC una excelente herramienta para señalar la tolerancia a la sequía (Zhang et al., 2021).

Nuestros resultados mostraron que las plantas expuestas a la inoculación con *Rt* tienen diferentes niveles de contenido relativo de agua. Sin embargo, el estrés hídrico redujo mínimamente el porcentaje de LRWC entre los tratamientos. En general, el presente estudio reveló que la inoculación con *R. tropici* mejora el LRWC en las plantas de MA, reduciendo el impacto de la sequía. A pesar de que las diferencias en el LRWC entre los tratamientos son pequeñas, algunos estudios en soya (O. N. Igiehon & Babalola, 2021) han señalado la relevancia de este comportamiento en relación con la producción de semillas y sus características. Aunque la literatura expone un leve incremento en LRWC bajo simbiosis microbiana en diferentes variedades de *P. vulgaris* (Ide Franzini et al., 2010), en las plantas de NJ + *Rt* se presentó un comportamiento contrario y se redujo el porcentaje de agua en comparación con NJ – *Rt*. Es posible que la disminución observada para NJ sea producto del estado de desarrollo en el que se encontraban las plantas, ya que durante el experimento de LRWC se realizó a las cinco semanas después de la siembra cuando las plantas atravesaban la etapa reproductiva. En algunos casos, los mecanismos de resistencia al estrés incluyen la floración temprana como un escape a la sequía y para asegurar el éxito de su progenie, por lo que es probable que prioricen el uso de agua en la florescencia y el llenado de la vaina (Gupta et al., 2020).

Una de las respuestas de las plantas al suministro limitado de agua consiste en la alteración de diversas características de las hojas, como reducir el número y el tamaño de las hojas, así como el área foliar específica (Marron et al., 2003). Durante este experimento se observaron aumentos en el tamaño de las hojas entre las diferentes CC, siendo más evidente en MA + *Rt* sobre NJ + *Rt*. Con el incremento en el área foliar y la superficie de transpiración de las plantas de MA se esperaría observar valores menores en LRWC, sin embargo, los niveles permanecen constantes para MA, dando indicios de que esta variedad bajo sequía puede mantener el contenido de agua sin reducir excesivamente el área de sus hojas, posiblemente por la producción de osmolitos que retienen el agua en la hoja (Sattar et al., 2020).

8.5 La interacción simbiótica retrasa la senescencia foliar durante el estrés por sequía

En ocasiones la abscisión del follaje en las plantas es una respuesta de evasión que ocurre con frecuencia bajo condiciones de estrés hídrico, ya que al reducir el número de hojas logran disminuir la tasa de transpiración y extender el uso de las reservas de agua en el sustrato (Wingler et al., 2004). Para dar pie a este proceso, las hojas comienzan a presentar senescencia debido al daño que sufren los cloroplastos mismos que dejan de metabolizar clorofila, afectando directamente la tasa fotosintética (Kamal et al., 2019; Zadražnik et al., 2019). Investigaciones previas han descrito un retraso en la senescencia de las hojas en plantas de alfalfa y frijol que fueron inoculadas con bacterias simbióticas (Antolín et al., 1995; Lodeiro et al., 2000).

En este experimento se observaron niveles similares de clorofila en ambas variedades sin nodulación, pero el establecimiento de la simbiosis con *Rt* destacó un incremento en el contenido de clorofila para las plantas de NJ. En comparación, la variedad MA + *Rt* aumenta levemente la clorofila total del tejido durante la semana 2 y 3, sin embargo, esta se reduce nuevamente hasta valores apenas superiores a las plantas MA - *Rt*. Con esto podemos asociar un retraso en la senescencia y abscisión de las hojas a la inoculación con *Rt*. Además de considerar que las plantas bajo simbiosis presentan mayor tolerancia a la sequía que las plantas no inoculadas, que recurren a la evasión como proceso de protección. Como ya se mencionó anteriormente la relación planta-*Rhizobium* aumenta el contenido de clorofila, en ese sentido se esperaría observar un incremento notorio en la clorofila de las plantas MA + *Rt*, sin embargo, la diferencia entre las plantas no inoculadas y las inoculadas en MA es mínima. Este comportamiento puede estar afectado por la metodología en la recolección de datos, ya que la medición se realizó en el segundo trifolio desde la base y no en la hoja madura más joven (4to trifolio desde la base) debido a que al iniciar la toma de datos únicamente se disponía de dos trifolios maduros y uno en desarrollo. La importancia de la senescencia tardía radica en el impacto que tiene sobre el rendimiento de las plantas, ya que las mantiene fotosintéticamente activas y productivas por más tiempo (Borrell et al., 2014). Por esta razón, la capacidad de mantener las hojas verdes en condiciones adversas es una característica que ha sido seleccionada artificialmente desde inicios del siglo XX para el desarrollo de cultivares adaptados a diferentes ambientes (Thomas & Ougham, 2014; Christopher et al., 2016). En ese sentido, es fundamental resaltar el potencial que tienen las plantas de MA inoculadas y no inoculadas de alcanzar niveles similares de clorofila total a los que presentan las plantas de NJ, que fueron domesticadas y seleccionadas específicamente para mostrar altos contenidos de clorofila.

8.6 La sequía impacta con menor severidad la nodulación en MA

Estudios previos en *Glycine max* han reportado que la colonización por *Bradyrhizobium* se ve fuertemente afectada por el estrés hídrico (Fenta et al., 2012; Marquez-Garcia et al., 2015). En este trabajo se confirma que la sequía restringió la formación de nódulos de raíz por *Rt* en las plantas, sin embargo, el impacto negativo en el número de nódulos fue menor en MA en contraste con NJ. Ligado a la superioridad numérica que presentó MA en los nódulos, también se observó un mayor peso promedio de los mismos. Curiosamente, al comparar ambas variedades al 100 % CC se puede apreciar que NJ y MA forman una cantidad similar de nódulos, aunque ligeramente superior en MA, resaltando que el peso de los nódulos bajo estas condiciones es mayor en MA. Este comportamiento puede indicar que la biomasa de los nódulos en MA sobrepasa a NJ. Las diferencias en la producción de nódulos promedio y la biomasa de los nódulos entre MA y NJ señalan que el estrés hídrico afectó con mayor severidad la simbiosis de *Rt* con NJ. Existe evidencia que señala que, mediante la activación de las rutas de señalización para la respuesta a estrés, las plantas producen ciertas fitohormonas consideradas reguladores negativos de la nodulación, como lo es el etileno y el ABA, ya que inhiben la respuesta de la planta a los factores Nod rizobianos (Oldroyd & Downie, 2008; Stec et al., 2016).

En cuanto al fenotipo observado del total de los nódulos para cada variedad, podemos señalar que el incremento en estos valores al aumentar la CC en MA, corresponde principalmente al fenotipo primordial y maduro, cuyos valores se elevan notablemente mientras que los nódulos senescentes se mantienen en niveles más bajos pero similares entre ellos y que solamente incrementan sin relevancia a partir del 40 % CC, ya que en condiciones de sequía severa el número de nódulos senescentes es mayor al resto de los fenotipos. De manera contraria, el comportamiento en NJ para el fenotipo nodular denota que la senescencia nodular se sobrepone a la producción de nódulos maduros y primordiales, que se incrementan en igual proporción conforme la CC es más alta. Las observaciones registradas revelan una extensión en el tiempo de vida de los nódulos en MA bajo sequía, ya que se producen continuamente nódulos primordiales y que, una vez alcanzada su etapa de maduración, permanecen fijando nitrógeno a pesar de las limitaciones de agua en el suelo. La información disponible sobre la relación del fenotipo nodular y el estrés hídrico es poco abundante, sin embargo, existe la hipótesis de que el proceso de fijación de nitrógeno depende fuertemente del estado fisiológico en el que se encuentren los hospederos (Zahran, 1999). El deterioro del suministro de fotosintato a los nódulos, el daño oxidativo y la pérdida de leghemoglobina son consecuencias de la sequía que inhiben la nodulación (Arrese-Igor et al., 2011). Por esta razón nuestros resultados pueden

atribuirse a que la sequía daña en mayor medida el vigor de las plantas de NJ, lo que limita la capacidad de los rizobios para fijar el N₂.

8.7 La simbiosis favorece el incremento de azúcares en MA bajo sequía y buen riego

Bajo condiciones de sequía, las plantas activan diversos mecanismos de protección para reducir los daños causados por la falta de agua. En plantas de *Lavandula* y *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que uno de estos medios de defensa es la acumulación de azúcares solubles en el tejido (Gurrieri et al., 2020; Gorgini Shabankareh et al., 2021), ya que ayudan a la producción de osmolitos de prolina, sacarosa, trehalosa y otros compuestos que retienen el agua dentro de las células evitando su deshidratación y muerte (Hayat et al., 2012). En ese sentido, nuestros resultados muestran que la concentración de azúcares totales incrementa durante la exposición a sequía (severa y alta) con relación a las plantas bien regadas, siendo mayor en el grupo MA sobre NJ. Además, en MA gracias al establecimiento de la simbiosis con *Rt*, no hay una disminución marcada del contenido de azúcares con el incremento de la CC lo que sí ocurre para NJ. Con estos valores podemos denotar la superioridad de MA para acumular azúcares solubles en sus tejidos y sobrellevar los efectos del estrés hídrico. Además del efecto mejorado por la inoculación, aumentando la disponibilidad de carbonos en las plantas en todas las CC. Algunas investigaciones han demostrado que bajo condiciones de estrés la interacción con bacterias promotoras del crecimiento pueden favorecer el contenido de azúcares (Kang et al., 2021), aunque durante los déficits de agua no ha sido bien estudiado este comportamiento, en *Medicago truncatula* se observó que durante la simbiosis con bacterias diazotróficas la producción de esqueletos de carbono dentro de la planta se incrementa debido al aumento en el contenido de N fijado, lo que brinda mayor información acerca del equilibrio interno C:N durante la simbiosis (Staudinger et al., 2016).

IX. CONCLUSIONES

Los hallazgos informados aquí resaltan que la interacción simbiótica con *Rhizobium tropici* produjo cambios fenotípicos, fisiológicos, y metabólicos que generaron un fuerte impacto en la estrategia de respuesta al estrés por sequía en *Phaseolus vulgaris*. Además, estos cambios presentaron diferentes niveles según la variedad NJ o MA. Las plantas bajo inoculación mantuvieron sus características funcionales a pesar de ser sometidas a estrés hídrico demostrando diversos grados de tolerancia, mientras que las plantas no inoculadas tendieron a reaccionar significativamente para evitar acentuar los déficits de agua. En ambas variedades fue posible observar la disminución en la mortalidad de las plantas bajo condiciones de inoculación, sin embargo, MA sin y con inoculación tuvo una tasa de supervivencia mayor a la de NJ. Las ventajas agrícolas del fenotipo del cultivar NJ fueron igualadas e inclusive superadas por algunos rasgos en MA gracias al establecimiento de la simbiosis con *Rt*. Entre lo más destacado tenemos la producción de biomasa total, que se mostró más elevada en MA que en NJ, tanto en las plantas expuestas a sequía como en las que estaban bien irrigadas. La capacidad de mantener las hojas verdes y activamente fotosintéticas se igualó para 3 de los 4 tratamientos, destacando el aumento de la clorofila en las plantas domesticadas debido a la inoculación. La acumulación de azúcares en el tejido expuesto a sequía fue mayor en MA en comparativa con NJ, además de mantenerse estable a pesar de la variación en la CC. También se muestra cómo las limitantes en el riego de las plantas afectaron mínimamente la nodulación rizobial en las raíces de MA. Además, datos como el tamaño de las hojas y el contenido de agua sugieren que las plantas de MA cuentan con una mayor disponibilidad energética para la síntesis y acumulación de osmolitos, la liberación de ACC deaminasa y la partición de carbonos. Todas estas comparaciones evidencian la superioridad en los mecanismos de resistencia a estrés por sequía de la variedad silvestre sobre el cultivar y cómo esta resistencia se ve optimizada gracias a la interacción simbiótica. Por lo tanto, concluimos que la simbiosis de *P. vulgaris* con *R. tropici* incrementa la tolerancia al estrés hídrico llegando a generar resistencia, principalmente en la línea ancestral de *P. vulgaris*. Esta afirmación puede servir como un punto de partida para el desarrollo de futuras investigaciones que deslumbren el complejo mecanismo que relaciona las vías de señalización para la respuesta al estrés hídrico y a la infección por *Rhizobium*. Aunado a esto, se abre la posibilidad de tener un enfoque agroalimentario y desarrollar nuevos cultivares a través de programas de fitomejoramiento que permitan generar variedades que cuenten con la tolerancia natural de la variedad silvestre y el alto rendimiento seleccionado del cultivar.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Díaz, E., Hernandez-Torres, I., Amador-Ramirez, M. D., Padilla-Ramirez, J. S., Zavala-García, F., & Baez-Gonzalez, A. D. (2015). Collection and characterization of wild species of *Phaseolus* (Fabaceae) in northeastern Mexico for ex situ conservation. *Plant Ecology and Evolution*, *148*(1). <https://doi.org/10.5091/plecevo.2015.1009>
- Agurla, S., Gahir, S., Munemasa, S., Murata, Y., & Raghavendra, A. S. (2018). Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1081). https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_12
- Ahanger, M. A., Siddique, K. H. M., & Ahmad, P. (2021). Understanding drought tolerance in plants. In *Physiologia Plantarum* (Vol. 172, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/ppl.13442>
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, *97*(2). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Antolín, M. C., Yoller, J., & Sánchez-Díaz, M. (1995). Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. *Plant Science*, *107*(2). [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04108-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04108-7)
- Arrese-Igor, C., Esther González, B. M., Daniel Marino, B., Rubén Ladrera, B., Estíbaliz Larrainzar, B., & Erena Gil-Quintana, B. (2011). Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant Stress*, *5*(1).
- Arthikala, M. K., Nava, N., & Quinto, C. (2015). Effect of Rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on electrolyte leakage in *Phaseolus vulgaris* roots overexpressing RbohB. *Plant Signaling and Behavior*, *10*(4). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1011932>
- Baez-González, A. D., Acosta-Díaz, E., Padilla-Ramírez, J. S., Almeyda-León, I. H., & Zavala-García, F. (2019). Conservation status of eleven wild bean (*Phaseolus* spp. Fabaceae) species in northeastern Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *10*(2). <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1475>
- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiologia Plantarum*, *161*(4). <https://doi.org/10.1111/ppl.12614>
- Barrs, H., & Weatherley, P. (1962). A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, *15*(3). <https://doi.org/10.1071/bi9620413>
- Beebe, S., Rengifo, J., Gaitan, E., Duque, M. C., & Tohme, J. (2001). Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. *Crop Science*, *41*(3). <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413854x>
- Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., Spagnoletti Zeuli, P., Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Nanni, L., & Papa, R. (2013). Molecular

- analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist*, 197(1). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., & Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.1108973109>
- Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M. L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G., & Papa, R. (2017). Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00722>
- Blair, M. W., Díaz, J. M., Hidalgo, R., Díaz, L. M., & Duque, M. C. (2007). Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 116(1). <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0644-8>
- Borrell, A. K., Mullet, J. E., George-Jaeggli, B., van Oosterom, E. J., Hammer, G. L., Klein, P. E., & Jordan, D. R. (2014). Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. *Journal of Experimental Botany*, 65(21). <https://doi.org/10.1093/jxb/eru232>
- Brónnvik, H., & von Wettberg, E. J. (2019). Bird Dispersal as a Pre-Adaptation for Domestication in Legumes: Insights for Neo-Domestication. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01293>
- Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *The Biochemical Journal*, 125(4). <https://doi.org/10.1042/bj1251075>
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Pérez-Negrón, E., & Valiente-Banuet, A. (2007). In situ management and domestication of plants in Mesoamerica. En *Annals of Botany* (Vol. 100, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/aob/mcm126>
- CIAD, Herrera Salguero, M. F. & Gutiérrez Grijalva, E. P. (2020, 13 noviembre). *Frijol negro: un alimento accesible, nutritivo y antioxidante*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). <https://www.ciad.mx/frijol-negro-un-alimento-accesible-nutritivo-y-antioxidante/>
- Chacón S, M. I., Pickersgill, B., & Debouck, D. G. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3). <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1842-2>
- Choudhary, A., & Senthil-Kumar, M. (2020). An efficient, high-throughput method for the simultaneous exposure of drought stress and bacterial infection in plants. *Applications in Plant Sciences*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/aps3.11399>
- Chow, P. S., & Landhäusser, S. M. (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology*, 24(10). <https://doi.org/10.1093/treephys/24.10.1129>

- Christopher, J. T., Christopher, M. J., Borrell, A. K., Fletcher, S., & Chenu, K. (2016). Stay-green traits to improve wheat adaptation in well-watered and water-limited environments. *Journal of Experimental Botany*, *67*(17). <https://doi.org/10.1093/jxb/erw276>
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., & Udvardi, M. K. (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant Journal*, *39*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>
- de Ron, A. M., & Santalla, M. (2013). *Phaseolus vulgaris* (Beans). En *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01145-1>
- Defez, R., Andreozzi, A., Dickinson, M., Charlton, A., Tadini, L., Pesaresi, P., & Bianco, C. (2017). Improved drought stress response in alfalfa plants nodulated by an IAA over-producing *Rhizobium* Strain. *Frontiers in Microbiology*, *8*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02466>
- Denham, T., Barton, H., Castillo, C., Crowther, A., Dotte-Sarout, E., Florin, S. A., Pritchard, J., Barron, A., Zhang, Y., & Fuller, D. Q. (2020). The domestication syndrome in vegetatively propagated field crops. *Annals of Botany*, *125*(4). <https://doi.org/10.1093/aob/mcz212>
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, *32*(12). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3). <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- FAO. (2018). Nuestras legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. In *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.
- Fenta, B. A., Driscoll, S. P., Kunert, K. J., & Foyer, C. H. (2012). Characterization of Drought-Tolerance Traits in Nodulated Soya Beans: The Importance of Maintaining Photosynthesis and Shoot Biomass Under Drought-Induced Limitations on Nitrogen Metabolism. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *198*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2011.00491.x>
- Ferguson, B. J., & Mathesius, U. (2003). Signaling Interactions during Nodule Development. En *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 22, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0032-9>
- Figueiredo, M. V. B., Burity, H. A., Martínez, C. R., & Chanway, C. P. (2008). Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology*, *40*(1). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.04.005>
- Fita, A., Rodríguez-Burruezo, A., Boscaiu, M., Prohens, J., & Vicente, O. (2015). Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: A new paradigm for increasing food production. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Issue NOVEMBER). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00978>

- Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, 89(2). <https://doi.org/10.1093/aob/mcf027>
- Flood, P. J., & Hancock, A. M. (2017). The genomic basis of adaptation in plants. En *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.02.003>
- Fuller, D. Q. (2007). Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: Recent archaeobotanical insights from the old world. En *Annals of Botany* (Vol. 100, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/aob/mcm048>
- Gherbi, H., Markmann, K., Svistoonoff, S., Estevan, J., Autran, D., Giczey, G., Auguy, F., Péret, B., Laplaze, L., Franche, C., Parniske, M., & Bogusz, D. (2008). SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankia bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.0710618105>
- Glozer, K. (2007). Protocol for Leaf Image Analysis – Surface Area. En *Associate Project Scientist Dept. of Plant Sciences, University of California, Davis* (Vol. 11, Issue 36).
- González, A. M., Yuste-Lisbona, F. J., Lores, M., de Ron, A. M., Lozano, R., & Santalla, M. (2014). Dissecting the genetic basis of popping ability in nuña bean, an ancient cultivar of common bean. *Euphytica*, 196(3). <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1039-3>
- Gorgini Shabankareh, H., Khorasaninejad, S., Soltanloo, H., & Shariati, V. (2021). Physiological response and secondary metabolites of three lavender genotypes under water deficit. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98750-x>
- Gregersen, P. L., Culetic, A., Boschian, L., & Krupinska, K. (2013). Plant senescence and crop productivity. En *Plant Molecular Biology* (Vol. 82, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0013-8>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. En *Science* (Vol. 368, Issue 6488). <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Gurrieri, L., Merico, M., Trost, P., Forlani, G., & Sparla, F. (2020). Impact of drought on soluble sugars and free proline content in selected arabidopsis mutants. *Biology*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biology9110367>
- Hatsugai, N., & Katagiri, F. (2018). Quantification of Plant Cell Death by Electrolyte Leakage Assay. *BIO-PROTOCOL*, 8(5). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2758>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemini, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. En *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 7, Issue 11). <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). Phaseolus vulgaris - Recalcitrant potential. En *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.06.001>
- Holze, C., Michaudel, C., MacKowiak, C., Haas, D. A., Benda, C., Hubel, P., Pennemann, F. L., Schnepf, D., Wettmarshausen, J., Braun, M., Leung, D. W., Amarasinghe, G. K., Perocchi, F.,

- Staheli, P., Ryffel, B., & Pichlmair, A. (2018). Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway article. *Nature Immunology*, 19(2). <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0013-y>
- Ide Franzini, V., Azcón, R., Latanze Mendes, F., & Aroca, R. (2010). Interactions between Glomus species and Rhizobium strains affect the nutritional physiology of drought-stressed legume hosts. *Journal of Plant Physiology*, 167(8). <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.11.010>
- Igiehon, N. O., Babalola, O. O., Cheseto, X., & Torto, B. (2021). Effects of rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi on yield, size distribution and fatty acid of soybean seeds grown under drought stress. *Microbiological Research*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126640>
- Igiehon, O. N., & Babalola, O. O. (2021). Rhizobium and Mycorrhizal Fungal Species Improved Soybean Yield Under Drought Stress Conditions. *Current Microbiology*, 78(4). <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02432-w>
- IPCC. (2007). IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007 (AR4) - Synthesis Report. En *Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team IPCC]*.
- IPGRI. (2001). Descriptores para Phaseolus vulgaris. En *Handbook of Flowering: Volume I*.
- Irshad, A., Rehman, R. N. U., Kareem, H. A., Yang, P., & Hu, T. (2021). Addressing the challenge of cold stress resilience with the synergistic effect of Rhizobium inoculation and exogenous melatonin application in Medicago truncatula. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112816>
- Kamal, N. M., Gorafi, Y. S. A., Abdelrahman, M., Abdellatef, E., & Tsujimoto, H. (2019). Stay-green trait: A prospective approach for yield potential, and drought and heat stress adaptation in globally important cereals. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235837>
- Kang, J. P., Huo, Y., Yang, D. U., & Yang, D. C. (2021). Influence of the plant growth promoting Rhizobium panacihumi on aluminum resistance in Panax ginseng. *Journal of Ginseng Research*, 45(3). <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2020.01.001>
- Kaplan, L. (1981). What is the origin of the common bean? *Economic Botany*, 35(2). <https://doi.org/10.1007/BF02858692>
- Kaplan, L. (2003). Taxonomy, Distribution, and Ecology of the Genus Phaseolus (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. *Economic Botany*, 57(3). [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0421:bredfa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0421:bredfa]2.0.co;2)
- Ke, Q., Wang, Z., Ji, C. Y., Jeong, J. C., Lee, H. S., Li, H., Xu, B., Deng, X., & Kwak, S. S. (2015). Transgenic poplar expressing Arabidopsis YUCCA6 exhibits auxin-overproduction phenotypes and increased tolerance to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.003>
- Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., & Roldán, A. (2008). Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*, 35(2). <https://doi.org/10.1071/FP07218>

- Koziol, L., Rieseberg, L. H., Kane, N., & Bever, J. D. (2012). Reduced drought tolerance during domestication and the evolution of weediness results from tolerance-growth trade-offs. *Evolution*, 66(12). <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01718.x>
- Kromdijk, J., & Long, S. P. (2016). One crop breeding cycle from starvation? How engineering crop photosynthesis for rising CO₂ and temperature could be one important route to alleviation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1826). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2578>
- Kunert, K. J., Vorster, B. J., Fenta, B. A., Kibido, T., Dionisio, G., & Foyer, C. H. (2016). Drought stress responses in soybean roots and nodules. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue JULY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01015>
- Laffont, C., de Cuyper, C., Fromentin, J., Mortier, V., de Keyser, A., Verplancke, C., Holsters, M., Goormachtig, S., & Frugier, F. (2018). MtNRLK1, a CLAVATA1-like leucine-rich repeat receptor-like kinase upregulated during nodulation in *Medicago truncatula*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20359-4>
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., & White, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. En *Letters in Applied Microbiology* (Vol. 66, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/lam.12855>
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., & Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344(6268). <https://doi.org/10.1038/344781a0>
- Li, P., Wei, J., Wang, H., Fang, Y., Yin, S., Xu, Y., Liu, J., Yang, Z., & Xu, C. (2019). Natural variation and domestication selection of *zmpgp1* affects plant architecture and yield-related traits in maize. *Genes*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/genes10090664>
- Li, X., Bao, J., Wang, J., Blackman, C., & Tissue, D. (2021). Antecedent Drought Condition Affects Responses of Plant Physiology and Growth to Drought and Post-drought Recovery. *Frontiers in Forests and Global Change*, 4. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.704470>
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolution and phylogeny of *Rhizobium*. En *Revista Latinoamericana de Microbiología* (Vol. 47, Issues 1–2).
- Lodeiro, A. R., González, P., Hernández, A., Balagué, L. J., & Favelukes, G. (2000). Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grown common beans. *Plant Science*, 154(1). [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00246-0)
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A., & Poole, P. S. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*, 422(6933). <https://doi.org/10.1038/nature01527>
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the rhizobium-legumes symbiosis. *Plant Physiology*, 125(1). <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.69>
- Mark Sutton, J., Lea, E. J. A., & Allan Downie, J. (1994). The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9990>
- Marquez-Garcia, B., Shaw, D., Cooper, J. W., Karpinska, B., Quain, M. D., Makgopa, E. M., Kunert, K., & Foyer, C. H. (2015). Redox markers for drought-induced nodule senescence, a process occurring after drought-induced senescence of the lowest leaves in soybean (*Glycine max*). *Annals of Botany*, 116(4). <https://doi.org/10.1093/aob/mcv030>
- Marron, N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., Petit, J. M., Delmotte, F. M., & Brignolas, F. (2003). Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, “Dorskamp” and “Luisa_Avanzo”. *Tree Physiology*, 23(18). <https://doi.org/10.1093/treephys/23.18.1225>
- Mitra, R. M., Shaw, S. L., & Long, S. R. (2004). Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.0402186101>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. En *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Aguirre, A. L., Gómez, B. M., & Lara, M. (2017). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in the common bean. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(130). <https://doi.org/10.3791/56140>
- Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M. K., Affantrange, X. A., Sánchez, F., & Lara, M. (2014). Nitrate regulates rhizobial and mycorrhizal symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 281–298. <https://doi.org/10.1111/jipb.12156>
- Oldroyd, G. E. D. (2001). Dissecting symbiosis: Developments in Nod factor signal transduction. En *Annals of Botany* (Vol. 87, Issue 6). <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1410>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. En *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Pareek, A., Sopory, S. K., Bohnert, H. J., & Govindjee. (2010). Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and genomic foundation. En *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3112-9>
- Parker, T. A., & Gepts, P. (2021). *Population Genomics of Phaseolus spp.: A Domestication Hotspot*. https://doi.org/10.1007/13836_2021_89

- Penmetsa, R. V., & Cook, D. R. (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*, 275(5299). <https://doi.org/10.1126/science.275.5299.527>
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P., & Hurrell, R. F. (2015). Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/nu7021144>
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. En *Annals of Botany* (Vol. 100, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/aob/mcm193>
- Rai, R. K., Singh, V. P., & Upadhyay, A. (2017). Chapter 17 - Soil analysis. In *Planning and evaluation of irrigation projects*.
- Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. En *Journal of Plant Physiology* (Vol. 176). <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., Ishiga, Y., Kaundal, A., Udayakumar, M., & Mysore, K. S. (2013). Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ijms14059497>
- Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti Cei, F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, 17(2). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1). <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- SAGARPA. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Frijol Mexicano. En *Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*.
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue MAY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21921-w>
- Salcedo C., J., Arroyave, J. A., Toro Ch., O., & Debouck, D. G. (2006). *Phaseolus novoleonensis*, a new species (Leguminosae, Phaseolinae) from the Sierra Madre Oriental, Nuevo León, Mexico. *Novon*, 16(1). [https://doi.org/10.3417/1055-3177\(2006\)16\[105:PNANSL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/1055-3177(2006)16[105:PNANSL]2.0.CO;2)
- Sandhya, V., Z., A. S., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida*

- strain GAP-p45. *Biology and Fertility of Soils*, 46(1). <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0401-z>
- Saravanakumar, D., Kavino, M., Raguchander, T., Subbian, P., & Samiyappan, R. (2011). Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1). <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0539-1>
- SAS Institute Inc 2013. SAS/ACCESS® 9.4 Interface to ADABAS: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sattar, A., Sher, A., Ijaz, M., Ul-Allah, S., Rizwan, M. S., Hussain, M., Jabran, K., & Cheema, M. A. (2020). Terminal drought and heat stress alter physiological and biochemical attributes in flag leaf of bread wheat. *PLoS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232974>
- Scandalios, J. G., Lingqiang, G., & Polidoros, A. N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, 34.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M., ... Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7). <https://doi.org/10.1038/ng.3008>
- Sheteiwy, M. S., Ali, D. F. I., Xiong, Y. C., Brestic, M., Skalicky, M., Hamoud, Y. A., Ulhassan, Z., Shaghaleh, H., AbdElgawad, H., Farooq, M., Sharma, A., & El-Sawah, A. M. (2021). Physiological and biochemical responses of soybean plants inoculated with Arbuscular mycorrhizal fungi and Bradyrhizobium under drought stress. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02949-z>
- Signora, L., de Smet, I., Foyer, C. H., & Zhang, H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. *Plant Journal*, 28(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01185.x>
- Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3). <https://doi.org/10.1007/BF02887079>
- Sinha, R., Irulappan, V., Mohan-Raju, B., Suganthi, A., & Senthil-Kumar, M. (2019). Impact of drought stress on simultaneously occurring pathogen infection in field-grown chickpea. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41463-z>
- Skalak, J., Nicolas, K. L., Vankova, R., & Hejatko, J. (2021). Signal Integration in Plant Abiotic Stress Responses via Multistep Phosphorelay Signaling. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.644823>
- Soltys-Kalina, D., Plich, J., Strzelczyk-Żyta, D., Śliwka, J., & Marczewski, W. (2016). The effect of drought stress on the leaf relative water content and tuber yield of a half-sib family of ‘Katahdin’-derived potato cultivars. *Breeding Science*, 66(2). <https://doi.org/10.1270/jsbbs.66.328>

- Staudinger, C., Mehmeti-Tershani, V., Gil-Quintana, E., Gonzalez, E. M., Hofhansl, F., Bachmann, G., & Wienkoop, S. (2016). Evidence for a rhizobia-induced drought stress response strategy in *Medicago truncatula*. *Journal of Proteomics*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.006>
- Stec, N., Banasiak, J., & Jasiński, M. (2016). Abscisic acid - an overlooked player in plant-microbe symbioses formation? En *Acta Biochimica Polonica* (Vol. 63, Issue 1). https://doi.org/10.18388/abp.2015_1210
- Stougaard, J. (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. En *Plant Physiology* (Vol. 124, Issue 2). <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.531>
- Thomas, H., & Ougham, H. (2014). The stay-green trait. En *Journal of Experimental Botany* (Vol. 65, Issue 14). <https://doi.org/10.1093/jxb/eru037>
- Trenberth, K. E., Dai, A., van der Schrier, G., Jones, P. D., Barichivich, J., Briffa, K. R., & Sheffield, J. (2014). Global warming and changes in drought. En *Nature Climate Change* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nclimate2067>
- Tuteja, N., & Sopory, S. K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. En *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 3, Issue 8). <https://doi.org/10.4161/psb.3.8.6186>
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- Vibrans, H. (2021). *Malezas de México*. Tagetes Filifolia Lag. Anís de Monte.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. En *Microbiological Research* (Vol. 184). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Wingler, A., Marès, M., & Pourtau, N. (2004). Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist*, 161(3). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.00996.x>
- Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2016). Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Molecular Biology*, 90(6). <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0442-2>
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. En *Trends in Plant Science* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yolcu, S., Alavilli, H., Ganesh, P., Panigrahy, M., & Song, K. (2021). Salt and drought stress responses in cultivated beets (*Beta vulgaris* L.) and wild beet (*Beta maritima* L.). In *Plants* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/plants10091843>
- Zdražnik, T., Moen, A., & Šuštar-Vozlič, J. (2019). Chloroplast proteins involved in drought stress response in selected cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *3 Biotech*, 9(9). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1862-x>

- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4). <https://doi.org/10.1128/membr.63.4.968-989.1999>
- Zhang, F., Zhang, J., Ma, Z., Xia, L., Wang, X., Zhang, L., Ding, Y., Qi, J., Mu, X., Zhao, F., Ji, T., & Tang, B. (2021). Bulk analysis by resequencing and RNA-seq identifies candidate genes for maintaining leaf water content under water deficit in maize. *Physiologia Plantarum*, 173(4). <https://doi.org/10.1111/ppl.13537>
- Zhou, W., Lozano-Torres, J. L., Blilou, I., Zhang, X., Zhai, Q., Smant, G., Li, C., & Scheres, B. (2019). A Jasmonate Signaling Network Activates Root Stem Cells and Promotes Regeneration. *Cell*, 177(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.006>
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. En *Cell* (Vol. 167, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zhu, Q., Zheng, X., Luo, J., Gaut, B. S., & Ge, S. (2007). Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: Severe bottleneck during domestication of rice. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3). <https://doi.org/10.1093/molbev/msm005>
- .

ANEXOS

Tabla A 1. Preparación de las 4 soluciones stock que se utilizan para hacer la solución nutritiva B & D extraída del sitio web Legume-Microbe Interactions Laboratory de la Universidad de Missouri basado en el trabajo de Broughton & Dilworth 1971 para crecer leguminosas en macetas o jarrones.

Stock Solution number	Element	Final Molarity (μM)	Form	Mol. Wt.	Gram/liter	Molarity of Stock Solution
A	Ca	1000	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.03	294.1	2.0
B	P	500	KH_2PO_4	136.09	136.1	1.0
C	Fe	10	Fe-Citrate	335.04	6.7	0.02
D	Mg	250	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5	123.3	0.5
	K	1500	K_2SO_4	174.06	87.0	0.5
	S	500				
	Mn	1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169.02	0.338	0.002
	B	2	H_3BO_4	61.84	0.247	0.004
	Zn	0.5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.56	0.288	0.001
	Cu	0.2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.69	0.100	0.004
	Co	0.1	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	281.12	0.056	0.0002
	Mo	0.1	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.98	0.048	0.0002

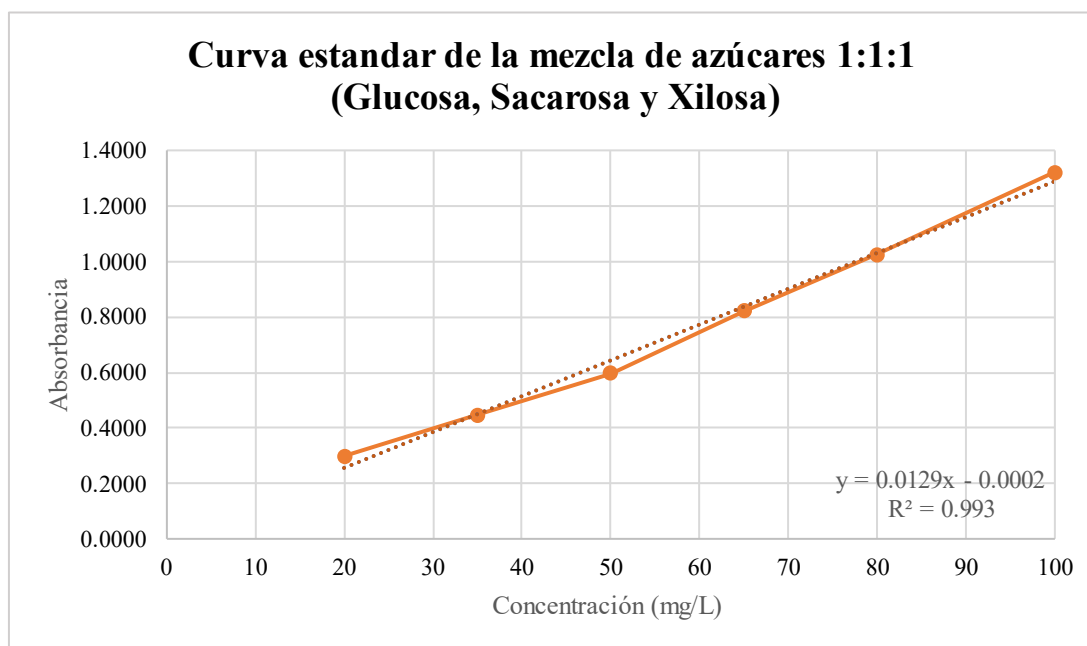


Figura A 1. Gráfica que muestra la tendencia de la curva estándar utilizada para la cuantificación de azúcares totales solubles. Se midió el coeficiente de absorción de una mezcla de tres azúcares solubles (glucosa, sacarosa y xilosa) en igual proporción y a diferentes concentraciones. Con esto se obtuvo la ecuación de la recta para encontrar el coeficiente de concentración en los tejidos muestra.

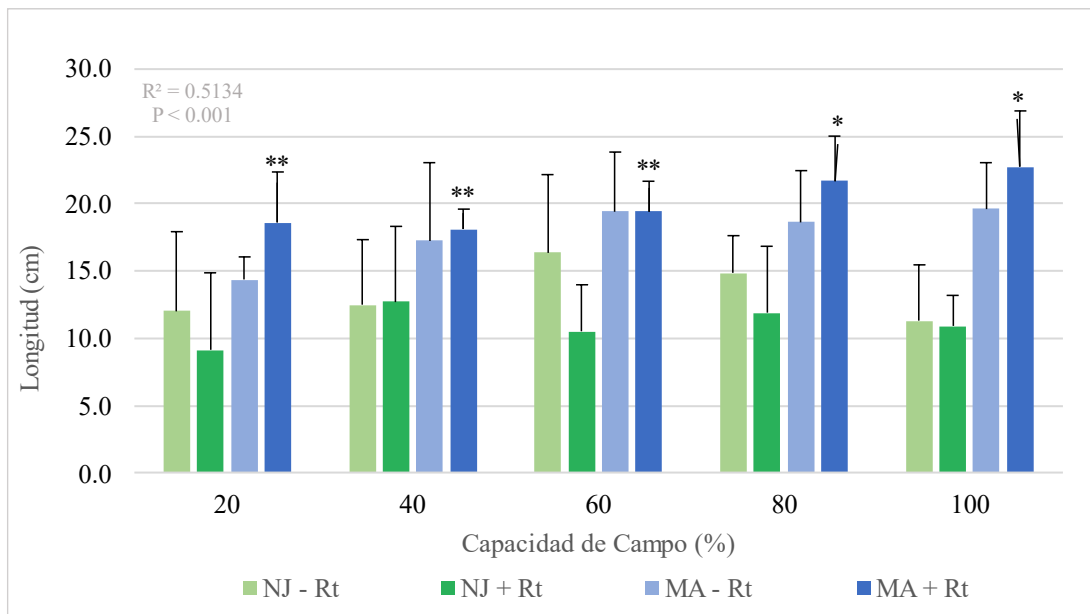


Figura A 2. Gráfica que muestra la longitud internodal promedio (cm) de los siguientes grupos experimentales: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes condiciones de CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

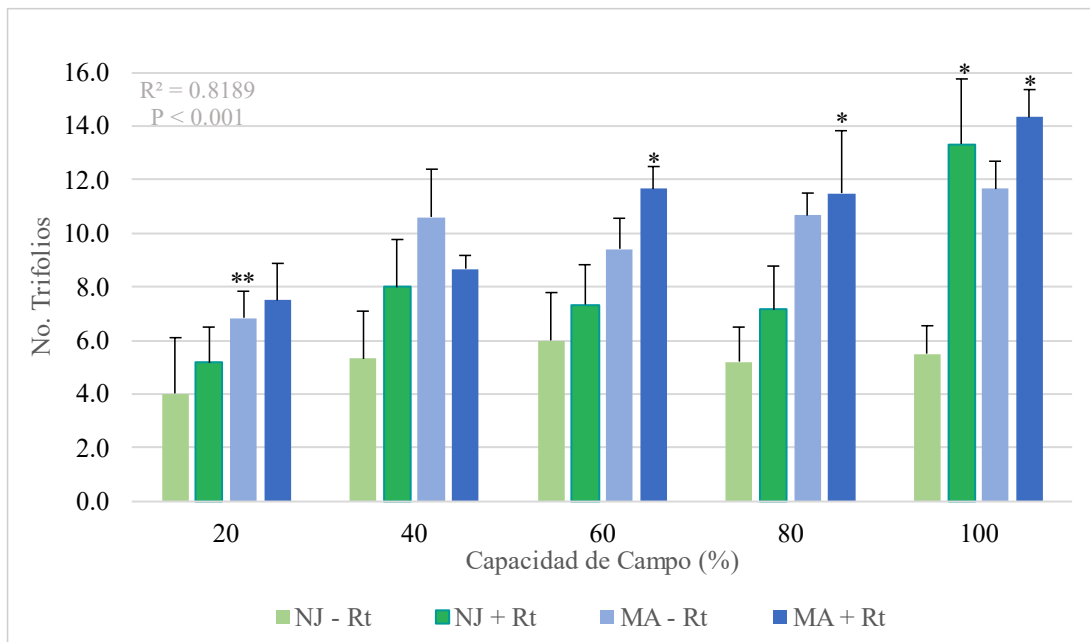


Figura A 3. Gráfica que muestra el número promedio de trifolios de las plantas de los siguientes grupos experimentales: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

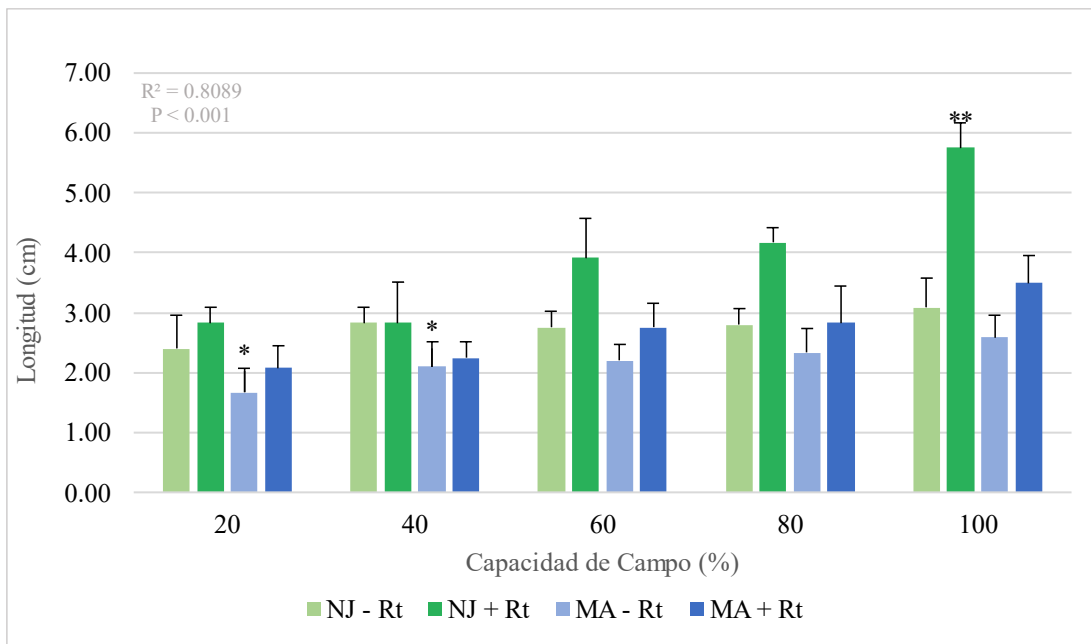


Figura A 4. Gráfica que muestra el promedio del largo del pecíolo de las hojas (cm) de cada grupo experimental: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

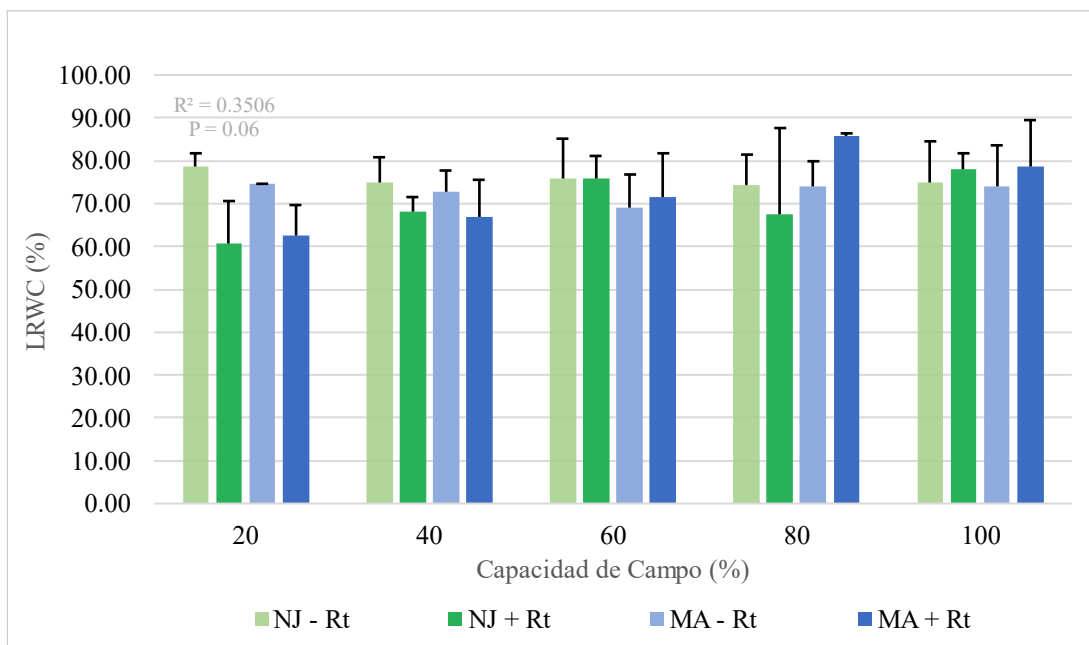


Figura A 5. Gráfica que muestra el promedio del contenido relativo de agua en la hoja de las plantas de los grupos experimentales: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

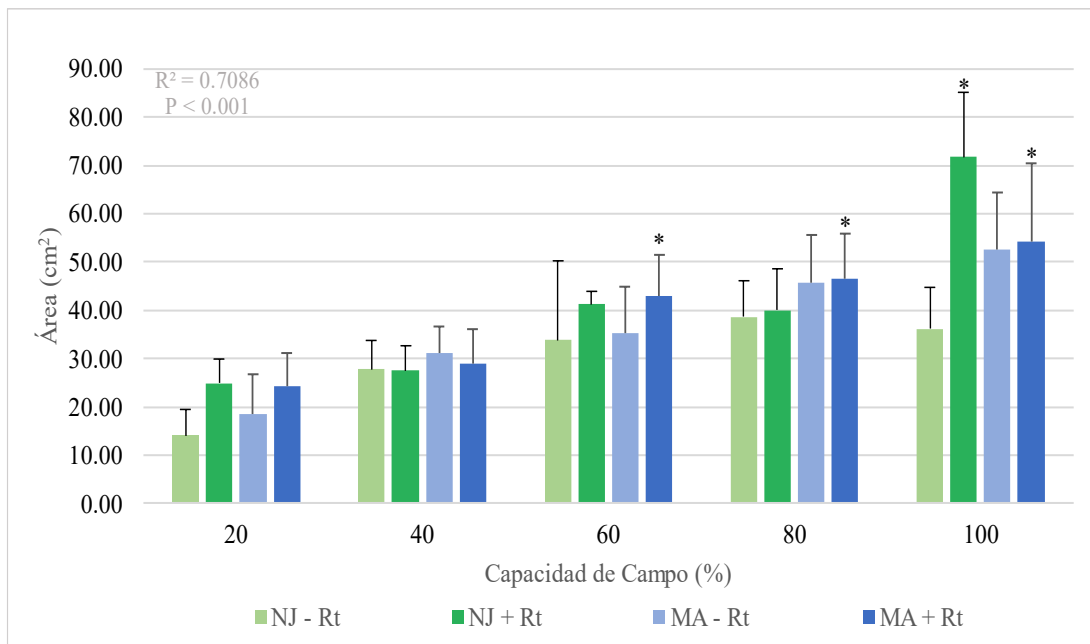


Figura A 6. Gráfica que muestra el área foliar promedio (cm²) de las plantas de los siguientes grupos experimentales: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes porcentajes de CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

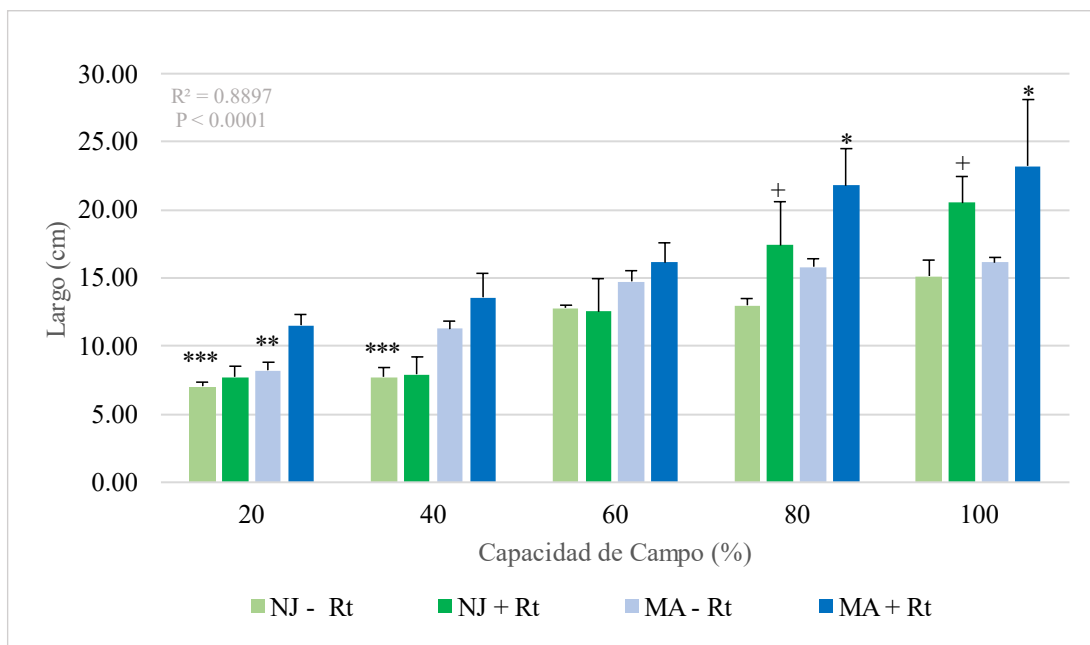


Figura A 7. Gráfica que muestra la longitud promedio de la raíz (cm) de los 4 grupos experimentales: NJ - Rt, NJ + Rt, MA - Rt y MA + Rt bajo diferentes porcentajes de CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

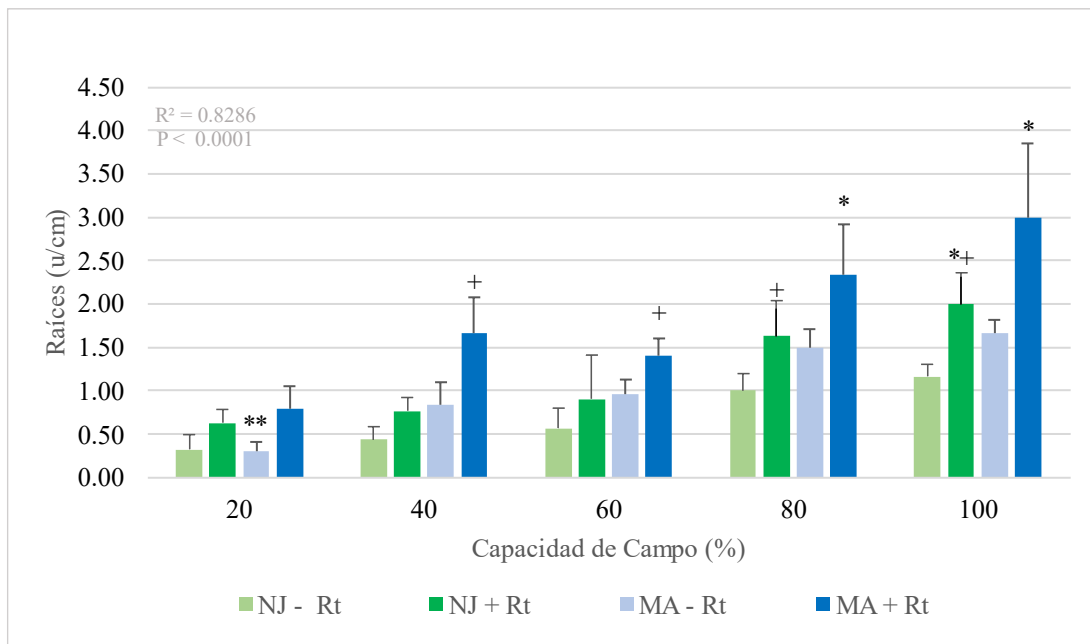


Figura A 8. Gráfica que muestra el promedio de la densidad de raíces laterales de las plantas: NJ – Rt, NJ + Rt, MA – Rt y MA + Rt bajo diferentes porcentajes de CC (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %).

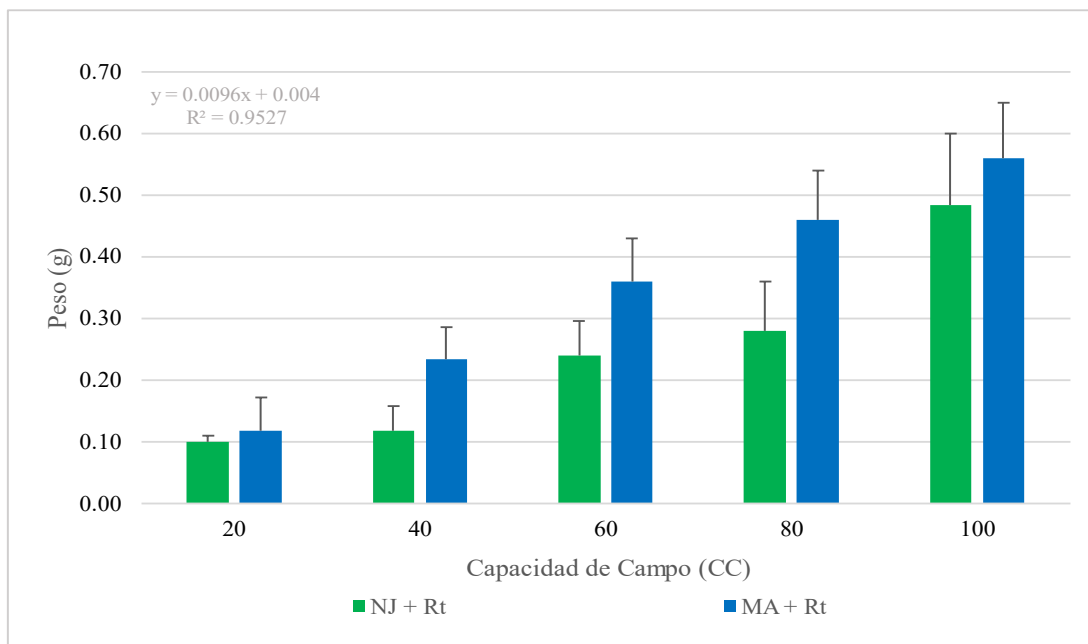


Figura A 9. Gráfica que muestra el peso promedio de nódulos totales en *P. vulgaris* NJ y MA bajo condiciones de inoculación positiva (NJ + Rt y MA + Rt) expuestas a diferentes CC.