



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y  
ELICITORAS DEL AJO**

**ANTIMICROBIAL AND ELICITORY  
PROPERTIES OF GARLIC**

**Marina Justo Muñoz**

Penélope García Angulo y M<sup>a</sup> Luz Centeno Martín

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Julio, 2022**

# Contenido

1. Introducción .....	1
1.1 Alubia común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad riñón.....	1
1.2 La enfermedad de la grasa y métodos para reducir sus daños.....	1
1.3 El sistema inmune de la planta y elicitación de la misma.....	3
1.4 Uso de preparados de plantas como antimicrobianos y elicitors .....	6
1.5 Ajo ( <i>Allium sativum</i> ).....	6
1.6 Objetivo e hipótesis .....	7
2. Material y métodos .....	8
2.1 Elaboración de medios de cultivo .....	8
2.1.1 Bioensayos con polvo de ajo sobre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .....	8
2.1.2 Bioensayos con polvo de ajo sobre <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	10
2.2. El ajo como elicitor de la respuesta inmune de <i>Phaseolus vulgaris</i> variedad riñón .....	11
2.2.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de la alubia variedad riñón .....	11
2.2.2 Preparación de extractos de ajo para elicitación .....	11
2.2.3 Ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno en discos foliares de alubia .....	11
2.2.4 Elicitación en planta e inoculación con Pph .....	13
2.2.5 Tratamiento estadístico de los datos obtenidos.....	14
3. Resultados y discusión .....	14
3.1 Capacidad antiséptica de <i>Allium sativa</i> . .....	14
3.1.1 El ajo favorece el crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> . .....	14
3.1.2 El ajo inhibe el crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	16
3.2 El extracto de ajo induce la formación de ROS en la alubia riñón .....	17
3.2.2 La previa elicitación de plantas de alubia riñón con extracto de ajo reduce los síntomas producidos por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .....	18
3. Conclusión .....	21
4. Referencias.....	21

**Resumen:** Tradicionalmente, el ajo (*Allium sativa*) ha sido empleado con fines curativos sin pleno conocimiento en su acción. Entre sus aplicaciones más destacadas se encuentran sus capacidades antibiótica y antifúngica. Sin embargo, la bibliografía con relación a su aplicación sobre cultivos es prácticamente nula. Por este motivo, el objetivo de este trabajo ha sido determinar por medio de bioensayos si existe efecto inhibitorio del ajo sobre la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y sobre el hongo *Rhizopus stolonifer*. Aunque no se observó capacidad antimicrobiana, sí antifúngica obteniendo un valor I<sub>50</sub> de 32,38 mg/ml. Asimismo, se evaluó su posible papel como elicitador de la respuesta inmune tras medir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> total a través de ensayos de luminiscencia sobre discos foliares de alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad riñón, observándose un pico de ROS en aquellos previamente tratados con ajo 1 mg/ml mostraron un pico de ROS, lo cual es indicativo de elicitación. Las plantas fueron tratadas o no con esta solución antes de inocular la bacteria para evaluar el porcentaje de daño foliar, el cual fue significativamente menor en plantas previamente tratadas con ajo.

**Palabras clave:** protección de cultivos, estrés biótico, alubia común, ajo, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Rhizopus stolonifer*.

**Abstract:** Traditionally, garlic (*Allium sativa*) has been used for curative purposes without full knowledge of its action. Among its most outstanding applications are its antibiotic and antifungal properties. However, the bibliography regarding its application on crops is practically null. For this reason, the objective of this work was to determine by means of bioassays whether there is an inhibitory effect of garlic on the bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and on the fungus *Rhizopus stolonifer*. Although antimicrobial capacity was not detected, antifungal capacity was observed, obtaining an I<sub>50</sub> value of 32.38 mg/ml. Likewise, its possible role as an elicitor of the immune response was evaluated after measuring the total H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through luminescence assays on leaf discs of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) riñón variety, observing a peak of ROS in those previously treated with garlic 1 mg/ml, which is indicative of elicitation. Plants were treated or not with this garlic solution before inoculating the bacterium to evaluate the percentage of leaf damage, which was significantly less in plants previously treated with garlic.

**Key-words:** crop protection, biotic stress, common bean, garlic, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Rhizopus stolonifer*

## 1. Introducción

### 1.1 Alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad riñón

La alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fabácea nativa de América. Fue introducida en Europa a partir del siglo XVI (Ortwin-Sauer, 1966), siendo la Cuenca Mediterránea su área óptima de desarrollo debido sus condiciones edafoclimáticas (Graham y Ranalli, 1997). Tanto es así que la Península Ibérica ha supuesto un centro secundario de diversificación genética de esta especie (Santalla *et al.*, 2002). Concretamente, Castilla y León es una de las zonas donde este cultivo ha sido más explotado (Asensio Vegas *et al.*, 2006a). Es interesante para el mantenimiento de recursos fitogenéticos porque su adaptación a las condiciones ambientales de la zona desemboca en la formación de variedades locales (Casquero *et al.*, 2006). No obstante, lo que hace del cultivo de *Phaseolus vulgaris* un punto estratégico para la economía de la zona es su rentabilidad, ya que el cultivo de variedades locales ha permitido la adquisición de un alto precio en el mercado (Morales Corts *et al.*, 2001). Por este motivo, en 2005 la alubia común cultivada en determinados municipios de las provincias de León y Zamora recibió marca de calidad Indicación Geográfica Protegida "Alubia de La Bañeza - León" (IGP) (Comisión Europea, 2005).

Sin embargo, la producción de sus variedades locales es inestable debido, entre otros factores, a estreses bióticos (Asensio Vegas *et al.*, 2006a). Existen alrededor de 200 patógenos capaces de atacar a la alubia común, pero sólo unos pocos aminoran el rendimiento del cultivo ocasionando importantes pérdidas económicas (Murillo *et al.*, 2010). Concretamente, la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) es capaz de infectar a *Phaseolus vulgaris* L. disminuyendo su rendimiento un 45% (Asensio-S.-Manzanera *et al.*, 2006).

### 1.2 La enfermedad de la grasa y métodos para reducir sus daños

La variedad riñón de la alubia común es susceptible a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Asensio Vegas *et al.*, 2006b). Pph es una gamma-proteobacteria y agente causal la enfermedad de la grasa de la alubia (Arnold *et al.*, 2011). Esta cepa bacteriana obtiene nutrientes de las células vivas del huésped para multiplicarse en el apoplasto e infectar los tejidos vecinos. Por ello, se considera un patógeno hemibiotrófico (Rico y Preston, 2008).

Los síntomas (figura 1) que se reconocen en la planta a causa de la infección por Pph son retraso del desarrollo, distorsión del crecimiento y manchas de aspecto aceitoso en las vainas. Las semillas infestadas de Pph pueden presentar en su episperma zonas amarillentas y arrugadas de aspecto infeccioso, aunque otras pueden ser asintomáticas. Pph libera numerosos factores de virulencia (efectores) a fin de escaparse de la defensa de la planta (O'Leary *et al.*, 2016). Uno de estos efectores es la faseolotoxina, es decir, una fitotoxina bacteriana inhibidora de la enzima ornitina carbamoiltransferasa que participa en el ciclo de la urea. De este modo, se bloquea la biosíntesis de arginina y se produce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de clorofila (Arrebola *et al.*, 2011). Consecuentemente, las vainas presentan zonas necróticas rodeadas por halos verdes (Arnold *et al.*, 2011), síntomas que caracterizan la enfermedad.

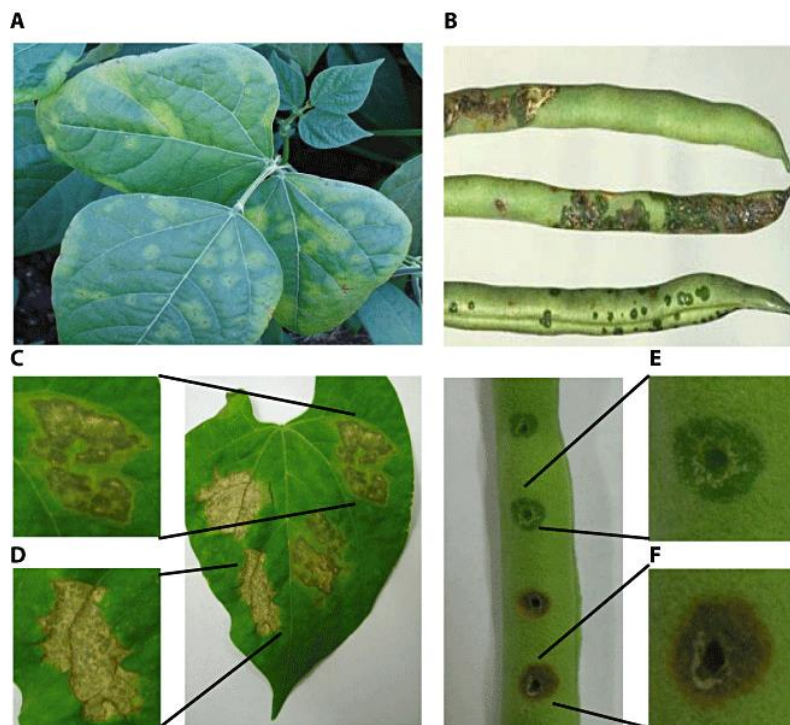


Figura 1. Aspecto de la alubia común infectada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph). Se observa la enfermedad de la grasa en A) hojas de alubia y B) vainas de alubia. Tres días más tarde de la inoculación artificial de Pph, las hojas presentan zonas necróticas con apariencia oleosa rodeada por halos amarillos (C). La susceptibilidad de la alubia se reconoce en las hojas (D) y en las vainas (E) y (F) por presentar tejidos necróticos de color oscuro en el área de inoculación. Tomada de Arnold *et al.*, 2011.

Su capacidad para infectar a la alubia se da, o bien invadiendo el espacio apoplástico por medio de heridas y de aberturas naturales (especialmente estomas), o bien persistiendo en sus semillas secas y activándose tras su germinación (Arnold *et al.*, 2011). De hecho, una única semilla infectada puede ser responsable de un brote grave en el cultivo ya que se puede transmitir por salpicaduras de la lluvia o por riego. De ahí, la importancia de disponer de semilla saneada para

sembrar en la parcela (González, 2003; González Fernández, 2010). Hasta ahora, éste ha sido el único método de control de la enfermedad (Arnold *et al.*, 2011) junto la adquisición de resistencia a través de técnicas de ingeniería genética (Miklas *et al.*, 2014). Sin embargo, existen varias razas de Pph y la obtención de resistencia frente a una no significa que se adquiera para las demás. Además, las interacciones del genoma con el ambiente (Tar'an, Michaels y Pauls, 2002) y la aparición de epistasias (Parvez, Rather y Warsi, 2007) tanto en Pph como en la alubia dificultan la herencia de la resistencia.

No obstante, también han sido estudiados métodos de control químico con preparados a base de cobre (Arnold *et al.*, 2011), pero hay estudios (Zhang, Wang y Yiu, 2017) que han documentado la existencia de algunas patovares de *Pseudomonas syringae* resistentes a este tipo de control. Además, ya existen métodos de control biológico para algunas cepas (Braun-Kiewnick *et al.*, 2000; Völksch y May, 2001), pero no para Pph.

Por estos motivos, se hace evidente la necesidad de descubrir una nueva forma de erradicar la enfermedad o de disminuir sus síntomas para evitar estas pérdidas en el rendimiento puesto que las ya existentes no son eficientes.

### 1.3 El sistema inmune de la planta y su elicitación

La primera línea de defensa de la planta frente la invasión del patógeno comienza con la inmunidad pasiva, la cual está relacionada con la presencia de barreras físicas, como la pared celular (Montes de Gómez, 1990) o de barreras químicas, como la acción de fitohormonas (Bacete *et al.*, 2017). La pared celular se puede remodelar en condiciones de estrés, modificando las proporciones de sus componentes y cambiando el grado de unión entre los polímeros que la constituyen. Como resultado, se opone mayor resistencia frente a la invasión (Bacete *et al.*, 2018; De la Rubia *et al.*, 2021a).

Con todo, las plantas poseen un mecanismo basal de defensa activa contra patógenos como Pph conocida como inmunidad innata (Mackey *et al.*, 2003) (figura 2). Puede inducirse gracias a que los receptores de membrana PPR (Pattern Recognition Receptors) reconocen moléculas conservadas asociados a patógenos PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) activando, así, un tipo de inmunidad conocida como PTI (Pattern-Triggered Immunity) (Couto y Zipler, 2016; De la Rubia *et al.*, 2021b). Un tipo de estas moléculas puede ser la proteína flagelina que forma parte del flagelo bacteriano (Gutiérrez-Beltrán y de la Torre, 2016). Los

PPRs también pueden reconocer el daño indirectamente a través de moléculas liberadas por la pared celular de la propia planta como consecuencia del metabolismo del propio patógeno lo cual recibe el nombre de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Saijo *et al.*, 2018). Un ejemplo de PTI activada por DAMPs puede ser reconocimiento por PPRs de oligómeros de péptina que forman parte de la pared celular (De la Rubia *et al.*, 2021b). De todos modos, la estimulación de PPRs desencadena una cascada intracelular de señalización que acaba con la activación de la defensa de la planta (Rebaque *et al.*, 2021).

Sin embargo, la bacteria ha desarrollado resistencia ante las sustancias antimicrobianas del apoplasto (fitoalxinas, péptidos y alcaloides) (López Solanilla y Rodríguez Palenzuela, 2009) lo cual bloquea la PTI. Pph libera efectores (como la faseolotoxina) a través de sistemas de secreción tipo III en las células de la planta para inactivar sus mecanismos de vigilancia y sus vías de transducción de señales (Rico y Preston, 2008). Consecuentemente, la planta adquiere susceptibilidad mediada por efectores lo que recibe el nombre de ETS (Effector Triggered Susceptibility) (Gutiérrez-Beltrán y de la Torre, 2016).

Esta susceptibilidad puede ser derrotada mediante la activación del sistema de inmunidad innata activada por reconocimiento de efectores por proteínas de resistencia de la planta (proteínas R). Así es como se activa la defensa ETI (Effector Triggered Immunity) (Cooper *et al.*, 2020). Este tipo de respuesta se reconoce por desarrollar una Respuesta Hipersensible (HR) que implica la muerte celular programada en el sitio de infección, evitando la multiplicación del patógeno (Bestwick *et al.*, 1997).

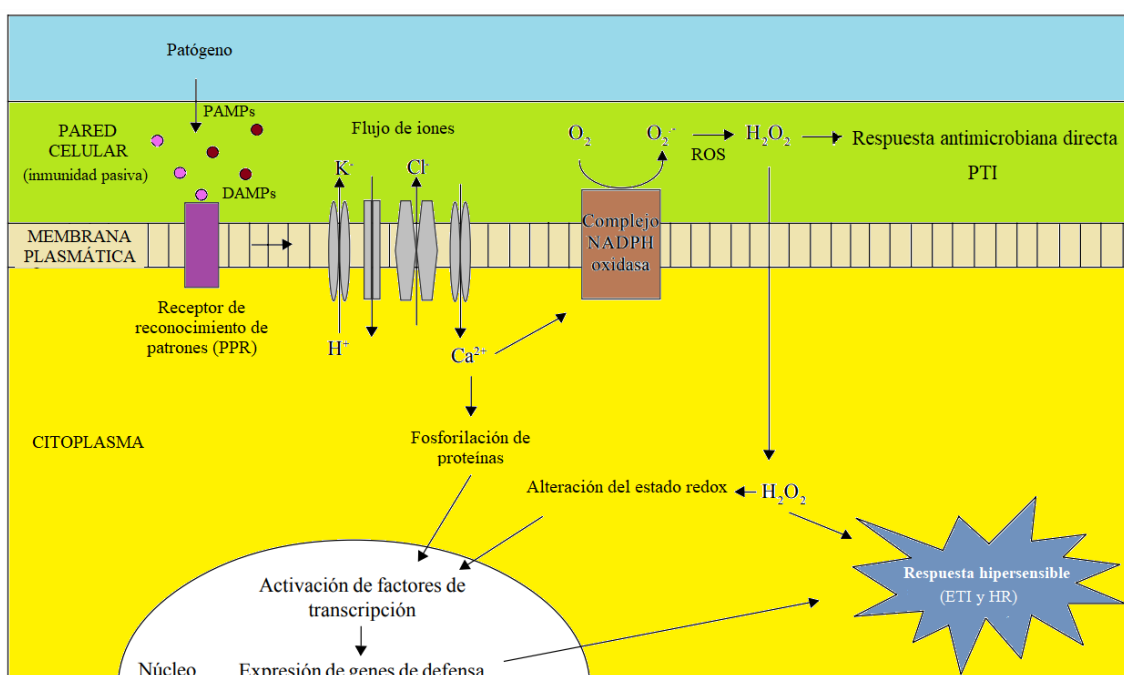


Figura 2. Activación del sistema de inmunidad innata de la planta. El patógeno es capaz de eludir las barreras físicas (pared celular) y químicas (fitohormonas) y difunde hacia el interior celular. En su camino, libera moléculas conservadas (PAMPs) o genera daños en moléculas de las células de la planta (DAMPs) lo cual es reconocido por los receptores de reconocimiento de patrones (PPR) de la alubia. Consecuentemente, se activa la defensa PTI. El desarrollo de resistencia bacteriana a PTI provoca en la alubia la ETS. Sin embargo, es capaz de adquirir de nuevo resistencia activando la defensa ETI cuando reconoce los efectores liberados por Pph. Se produce una alteración en la concentración intracelular de iones provocando una acumulación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el citoplasma. Esto deriva en la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa ubicada en la membrana plasmática cuya función es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que tiene efecto directo sobre Pph. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la alteración de estado redox produce la activación de factores de transcripción que modulan la expresión de genes de defensa y activan la respuesta hipersensible HR (Tomada y editada de Benezzer Benezzer *et al.*, 2008).

Entre los numerosos eventos que ocurren durante la respuesta de defensa de la planta (figura 2), destaca la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Waszczak *et al.*, 2018). El metabolismo basal de las plantas se compone de oxígeno, pero cuando se produce la interacción planta-patógeno, éste se reduce parcialmente por varios sistemas enzimáticos para generar ROS en las plantas (figura 3). Estos incluyen una NADPH oxidasa unida a la membrana (Dwyer *et al.*, 1996) que activa la enzima superóxido dismutasa (SOD) para formar el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). El anión se reduce, a su vez, dando lugar a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Esta molécula presenta actividad antimicrobiana directa, aunque también puede difundir hasta el núcleo actuando como segundo mensajero intracelular (Desikan *et al.*, 2005). De este modo, se activan los factores de transcripción que desencadenan la HR que conlleva la muerte celular programada de la célula o tejido que está siendo atacado para evitar la invasión del patógeno (Benezzer Benezzer *et al.*, 2008). No obstante, los ROS son compuestos tóxicos para las plantas a altas concentraciones, por lo que deben ser eliminados por mecanismos antioxidantes. De esta forma, se previene el estrés oxidativo que podrían sufrir el ADN, el ARN, las proteínas y la membrana celular (Mittler, 2017).

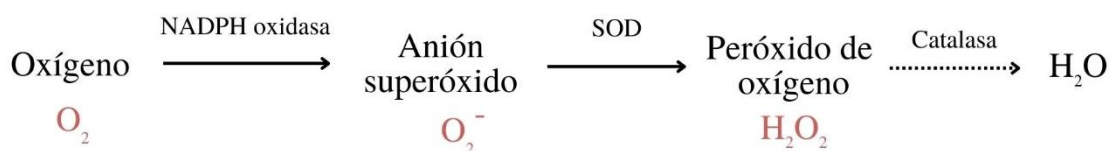


Figura 3. Secuencia de reacciones de reducción oxígeno molecular que dan lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS). Las flechas continuas indican los compuestos formados durante la respuesta inmune activada por PAMP y las enzimas que actúan. La flecha discontinua indica la reacción antioxidante. Creada con Microsoft Paint versión 10.0.21277.1000.



Sin embargo, Pph también ha adquirido resistencia a la defensa ETI de la planta activada por proteína R (Jones y Dangl, 2006). Por ello, aunque la planta responde al estrés biótico modulando su transcriptoma de forma rápida y específica, no es suficiente para evitar la enfermedad (Martínez Aguilar *et al.*, 2016). Por tanto, ya que la planta no es capaz de defenderse por sí misma frente a la infección, ni existen métodos de control ni de erradicación de la invasión por Pph (apartado 1.2), se hace evidente la necesidad de aplicar nuevos métodos enfocados a que los cultivos hagan frente a los estreses bióticos sin afectar a su rendimiento (De la Rubia *et al.*, 2022).

#### 1.4 Uso de preparados de plantas como antimicrobianos y elicitores

Se ha estudiado que la activación de la respuesta inmune previa al ataque de un patógeno prepara la defensa de la planta para una futura infección (Melida *et al.*, 2020). Esto se conoce como elicitación y los compuestos que estimulan cualquier tipo de defensa en la planta se denominan elicitores (Angelova *et al.*, 2006). Las moléculas que actúan como elicitores pueden proceder del patógeno (PAMPs), pueden ser liberados de la propia planta por la acción del patógeno (DAMPs) o pueden ser de origen sintéticos (como el INA; 2,6-dichloroIsoNicotinic Acid) (Martínez Aguilar *et al.*, 2016; De la Rubia *et al.*, 2021a). Dado que los elicitores endógenos son las propias plantas, los preparados a base de plantas pueden ser una fuente de estudio para potenciar la protección de cultivos como se sugirió en el trabajo de De la Rubia *et al.* (2022). En este estudio se demostró que los preparados a base de *Urtica dioica* y de residuo de uva elicitan la respuesta inmune de *Phaseolus vulgaris*, consiguiendo aminorar los daños fenotípicos causados por la infección de Pph.

#### 1.5 Ajo (*Allium sativum*)

Como se ha descrito en el apartado 1.4, el estudio de De la Rubia *et al.* (2022) revela que los preparados a base de plantas son un método de control de la enfermedad de la grasa de la alubia. Esto abre las puertas a la investigación de otras especies de plantas capaces de elicitar la respuesta inmune. Los preparados a base de ajo (*Allium sativa*) podrían ser excelentes candidatos para este fin debido a la gran reputación del ajo como agente terapéutico desde tiempos inmemorables (Aviello *et al.*, 2009). Entre sus componentes de valor nutricional se encuentran el yodo, el fósforo, el potasio y las vitaminas como tiamina, vitamina B6 y C.

También tiene un alto contenido de polisacáridos y azúcares reductores (Queiroz *et al.*, 2009). Asimismo, contiene componentes no nutritivos basados en compuestos sulfurados (Valero Gaspar *et al.*, 2018). El compuesto organosulfurado que se encuentra en mayor proporción es la aliina, la cual es el sustrato de la aliinasa que se activa cuando se libera de su compartimiento intracelular por daño o lisis celular, transformándola en tiosulfonato de alicina. Este compuesto es inestable e incoloro, lo que le confiere el olor y las actividades biológicas que caracterizan al ajo (Ledezma y Apitz-Castro, 2006). Alguno de estos componentes podría ser candidato para la elicitación de la respuesta inmune de *Phaseolus vulgaris* L. frente a la invasión de Pph.

Cada vez aparecen más estudios que proporcionan una base racional a las propiedades del ajo (Corrales Reyes y Reyes Pérez, 2014), como su interés agrícola como plaguicida (Bordones *et al.*, 2018). También es de interés su potencial antibacteriano (Bermúdez Hoyos *et al.*, 2007) y antifúngico (Moctezuma *et al.*, 2016). Sin embargo, la bibliografía con relación a la aplicación de ajo sobre cultivos para tratar enfermedades es prácticamente nula.

## 1.6 Objetivo e hipótesis

Este estudio plantea las siguientes hipótesis: 1) el ajo podría inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico debido a sus propiedades antisépticas y/o 2) el ajo podría ser un agente elicitor que active la respuesta inmune de la planta. Consecuentemente, los objetivos de este trabajo son: a) determinar por medio de bioensayos si existe efecto inhibitorio del extracto de ajo sobre la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) y sobre el hongo *Rhizopus stolonifer*, b) evaluar su posible papel como elicitor de la respuesta inmune tras medir la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> total a través de ensayos de bioluminiscencia (peroxidasa/luminol) en discos foliares de *Phaseolus vulgaris* L. variedad riñón (alubia) y c) valorar la apariencia fenotípica de las hojas cotiledonares de alubia tras la aplicación o no de un extracto de ajo, y su posterior infección o no con Pph.

## 2. Material y métodos

### 2.1 Elaboración de medios de cultivo

El efecto antimicrobiano del ajo sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) y *Rhizopus stolonifer* se evaluó mediante bioensayos. El primer paso para llevar a cabo el experimento fue la elaboración de medios.

Por un lado, se preparó medio TSA (Trypto-Casein Soy Agar) para realizar el bioensayo con Pph. Este medio se compone, por cada litro de agua purificada, de: 15 g de triptona (digerido pancreático de caseína), 5 g Soytone (digerido papaico de harina de soja), 5 g de cloruro sódico y 15 g de agar, y se ajustó el pH a  $7,3 \pm 0,3$ .

Por su parte, el cultivo del hongo se hizo en medio con agar y extracto de malta. La composición de este medio por litro fueron 15 g de agar bacteriológico (agente solidificante), 12,75 g de maltosa (fuente de energía), 2,75 g de dextrina y 2,35 g de glicerol (fuente de carbono) y 0,78 g de peptona (fuente de nitrógeno). El pH del medio fue  $4,7 \pm 0,2$ .

Para llevar a cabo los bioensayos, se añadieron distintas concentraciones de ajo seco molido (Hacendado) que constituirían los diferentes tratamientos. Dichas concentraciones fueron: 0 (control), 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml. En ambos casos se realizaron cuatro réplicas biológicas por tratamiento. Todos los medios fueron autoclavados a 115°C durante 15 min, tras lo cual el medio se plaqueó, se dejó solidificar, antes de inocular la bacteria o el hongo en sus respectivos medios y crecieron durante un tiempo determinado en condiciones de cultivo específicas como se indica en los apartados 2.1.1 y 2.2.2, respectivamente.

#### 2.1.1 Bioensayos con polvo de ajo sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Para llevar a cabo el diseño experimental (figura 4) se siguió el protocolo de De la Rubia *et al.* (2022).

En primer lugar, se llevó a cabo el crecimiento de la bacteria Pph de forma selectiva en el medio líquido de cultivo KB (King B). Este medio se compone por cada litro de agua destilada de: 20 g de peptona (aporta nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento), 1,5 g de  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  (fuente de fósforo), 1,5 g de  $KH_2PO_4$  (cationes que activan la producción de fluoresceína), 15 ml de glicerol (fuente de carbono) y 1,5 % de agar (agente solidificante). El pH fue ajustado a  $7,2 \pm 0,2$  y se autoclavó a 121°C durante 15 minutos.

Inicialmente, se realizó un preinóculo con la finalidad de que las bacterias activen su metabolismo y comiencen a crecer activamente. Para ello, las colonias que estaban creciendo sobre medio sólido fueron recogidas con un asa de siembra y se suspendieron en 10 ml de medio KB líquido en dos tubos estériles (uno con la bacteria y otro sin ella). La bacteria se cultivó a una temperatura de 28°C en condiciones de agitación a 220 rpm durante 24 h. Trascurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a 3.500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se retiró por volteo. El pellet se resuspendió en 100 ml de medio KB líquido y se colocó en un matraz estéril y se incubó toda la noche en agitación 220 rpm a una temperatura de 30°C. Una medida absorbancia a 600 nm comprendida en un rango entre 0,6 y 0,8 significa que la bacteria se encuentra en fase exponencial de crecimiento y está a una densidad aproximada de  $10^8$  CFU/ml y, por tanto, el cultivo se encuentra en su punto de máxima capacidad infectiva. Se midió la absorbancia obteniendo un valor de 0,705, por lo que se dieron las condiciones ideales para elaborar el bioensayo.

Seguidamente, se inoculó la bacteria en condiciones óptimas de infección en las placas con medio TSA solidificado (apartado 2.1). Para ello, se realizó un pocillo en el centro de dichas placas con un sacabocados. La bacteria se diluyó en una solución de NaCl al 0,9% (p/v) y se vertieron 100 µl en cada pocillo. Por último, las placas se sellaron y se incubaron durante cinco días a una temperatura de 30°C para la recogida de resultados.

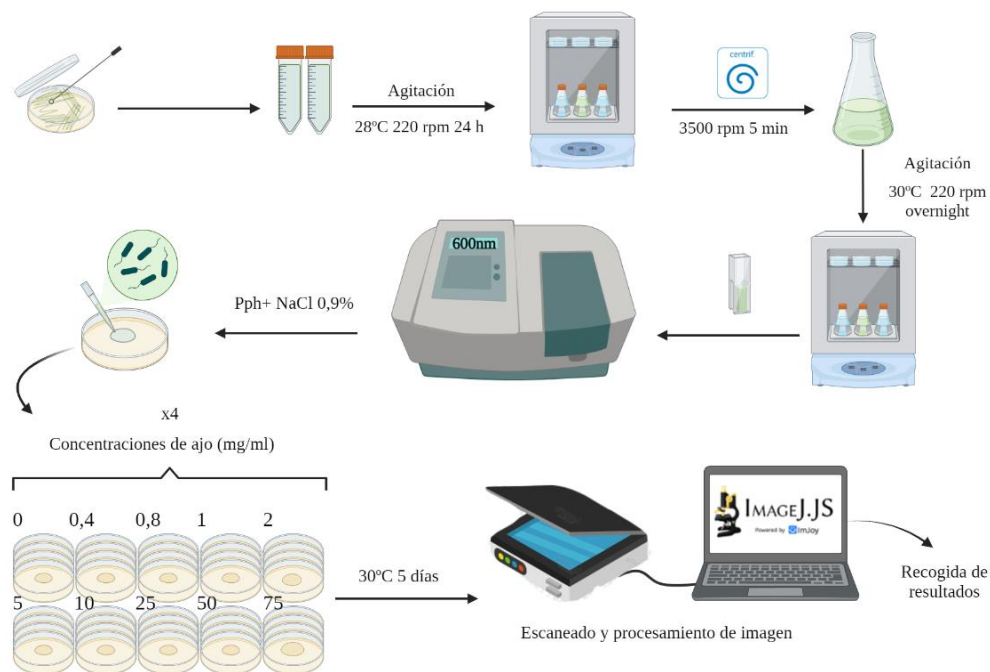


Figura 4. Diseño experimental del bioensayo de las propiedades antibacterianas del ajo (0-15 mg/ml) sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph). Se realizaron cuatro replicas biológicas por tratamiento. Las

placas se escanearon y se midió el porcentaje de crecimiento de la bacteria respecto al control con ayuda del programa ImageJ. Creado con Biorender.com.

### 2.1.2 Bioensayos con polvo de ajo sobre *Rhizopus stolonifer*.

Para el crecimiento del hongo *Rhizopus stolonifer*, se preparó medio de cultivo enriquecido con malta al que se le añadió las distintas concentraciones de ajo (0-75 mg/ml) correspondientes a cada tratamiento tal y como se ha indicado en el apartado 2.1. Una vez solidificaron los medios, se extrajeron tacos con el hongo con un sacabocados de la placa de partida donde crecía el hongo (amablemente cedido por el Dr. Hugo Mérida). Dicho taco se colocó en centro de las placas que conforman los tratamientos del experimento (Figura 5). Todas las placas se crecieron a temperatura ambiente durante 24 h antes de ser escaneadas y analizadas.

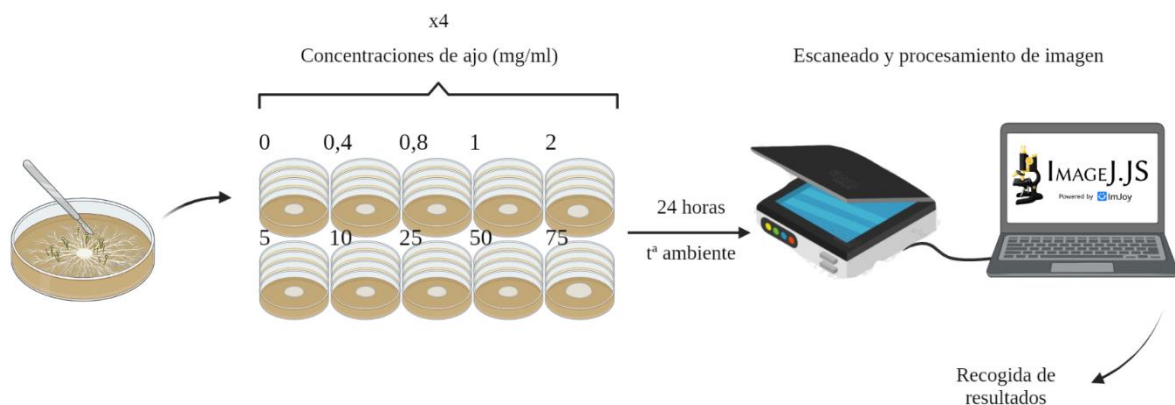


Figura 5. Diseño experimental del bioensayo de las propiedades antifúngicas del ajo (0-75 mg/ml) sobre *Rhizopus stolonifer*. Se realizaron cuatro replicas biológicas por tratamiento. Las placas se escanearon y se midió el porcentaje de crecimiento del hongo respecto al control con ayuda del programa ImageJ. Creado con Biorender.com.

Para la toma de datos (Figura 4 y 5) todas las placas fueron fotografiadas y escaneadas, tras lo cual se cuantificó el área de los halos de crecimiento en los distintos medios de cultivo empleando para ello el programa ImageJ, (Schneider *et al.*, 2012). Por definición el área del tratamiento control se consideró el 100 % de crecimiento y se calculó el porcentaje de crecimiento que suponía el halo medido en el resto de placas con las distintas concentraciones de ajo. Con estos resultados se evaluó si el ajo poseía o no efecto bacteriostático o fungiestático y, en caso afirmativo, se calculó el valor de  $I_{50}$  que representa la concentración de extracto de ajo que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo en un 50%.

## 2.2 *El ajo como elicitador de la respuesta inmune de Phaseolus vulgaris variedad riñón*

### 2.2.1 Establecimiento *in vitro* de la alubia variedad riñón

Para el establecimiento de las plantas *in vitro*, se prepararon botes 946 oz con tapa (Phytolab) a los que se añadió 4-5 cm de sustrato Universal Blumenerde previamente hidratado hasta capacidad de campo con agua del grifo. Todos los botes fueron esterilizados en un autoclave a 121°C 30 minutos antes de ser usados.

Las semillas de alubia común variedad riñón (Identificación Geográfica Protegida de Frijol de La Bañeza-León) se sometieron a un procedimiento de esterilización con etanol 70% durante 30 segundos, seguido de un tratamiento con hipoclorito sódico al 0,8% durante 20 minutos en agitación constante. Por último, se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril en una cabina de flujo laminar.

Las semillas esterilizadas se sembraron en los botes con medio previamente preparados. Tras el establecimiento de las alubias, los botes se cerraron con Parafilm y se colocaron en una cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad bajo una densidad de flujo de protones de  $45 \mu\text{moles}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  proporcionada por tubos fluorescentes de luz diurna (TLD 36 W/830, Philips) hasta que las plantas presentaron las dos hojas cotiledonares totalmente expandidas (estadio V2). Antes de cada experimento, las plantas fueron regadas con 5 ml de agua estéril para asegurar su hidratación.

### 2.2.2 Preparación de extractos de ajo para elicitación

Previo a la ejecución del experimento, se prepararon los extractos de ajo. Para ello, se prepararon dos soluciones de ajo seco y molido a concentraciones 1 mg/ml y 10 mg/ml. Ambas soluciones fueron infusionadas por autoclavado y filtradas a través de un filtro Millipore de  $0,22 \mu\text{m}$ .

### 2.2.3 Ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno en discos foliares de alubia

La producción de ROS tras la elicitación de discos foliares de alubia se realizó mediante el ensayo de luminol descrito por Cheeseman, (2006). Cuando las plántulas estuvieron en estadio V2, se cortaron sus hojas cotiledonares para obtener de ellas discos foliares con la ayuda de un sacabocados. De cada planta se sacaron 8 discos foliares, cada uno de los cuales se sometió a un tratamiento de elicitación distinto ( $n=8$ ). Éstos se depositaron en una placa de 96 pocillos toda la noche que contenía 200  $\mu\text{l}$  de agua del grifo esterilizada en cada uno de los pocillos y se

dejaron toda la noche a temperatura ambiente con el objetivo de reducir las propias ROS producidas por la planta al realizar los discos (efecto herida).

Transcurrido este tiempo, se preparó una solución en un tubo eppendorf con 1  $\mu$ l de luminol L-012 (Wako) a 10 mM, 10  $\mu$ l de peroxidasa tipo VI.A (Sigma, P6782) a concentración 1 mg/ml y 989  $\mu$ l de agua destilada para conseguir un volumen final de 1 ml. Tras retirar, el agua destilada con los ROS producidos por los discos foliares de los distintos pocillos, se añadió 100  $\mu$ l por pocillo de la solución de luminol y peroxidasa y se dejó incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante mínimo 30 minutos. En otra placa multipocillo se prepararon los distintos tratamientos de elicitación que se iban a ensayar: agua estéril (control negativo o Mock), flagelina 22 2  $\mu$ M (Flag22; control positivo), extracto de ajo seco y molido de concentración 1 mg/ml infundido por autoclavado y filtrado (Ai 1 mg/ml) y extracto de ajo seco y molido de concentración 10 mg/ml infundido por autoclavado y filtrado (Ai 10 mg/ml). Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de cada uno de estos tratamientos justo antes de medir la luminiscencia desprendida por la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un lector de placas Varioskan Lux (Thermo Scientific) (Figura 6).

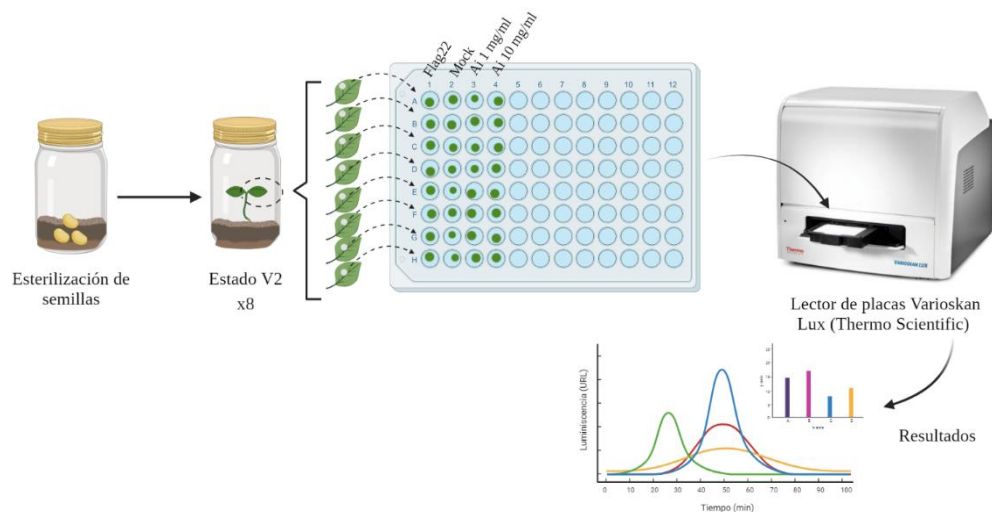


Figura 6. Diseño experimental del ensayo de luminiscencia producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en discos foliares de alubia variedad riñón sometidos a diferentes tratamientos: Flagelina 22 (Flag22), agua (Mock), solución de ajo infundido y filtrado 1 mg/ml (Ai 1 mg/ml) y solución de ajo infundido y filtrado 10 mg/ml (Ai 10 mg/ml). Los resultados de producción de ROS se midieron como unidades relativas de luz (URL) producidas por la reacción del luminol a lo largo del tiempo. Los datos representan la media  $\pm \sigma$  ( $n = 8$ ). Creado con Biorender.com.

## 2.2.4 Elicitación en planta e inoculación con Pph

El ensayo de elicitación con extracto de ajo e infección de plantas de alubia con o sin Pph se llevó a cabo siguiendo los protocolos establecidos por De la Rubia *et al.*, (2022). Para ello, se requirieron: 1) plantas de alubia riñón en estadio V2 crecidas *in vitro* tal y como se describe en el apartado 3.1 (Figura 6) y 2) una densidad poblacional bacteriana de  $10^8$  CFU/ml (aprox. 0.6-0.8 DO<sub>600</sub>) tal y como se describe en el apartado 2.1. Las hojas cotiledonares de plantas en estadio V2 (14 días después de la germinación) se trataron con 2 ml de agua estéril (Mock) o con extracto de ajo infusionado a una concentración de 1 mg/ml. Una semana más tarde (21 días después de la germinación), se dividieron los lotes de plantas Mock y los lotes de plantas elicidadas con ajo en dos para inocular o no Pph y se realizaron los siguientes tratamientos: Mock; Mock + Pph; Ajo y Ajo + Pph. La infección se llevó a cabo mediante spray de 2ml con una suspensión de Pph de  $10^8$  CFU/ml preparado en agua destilada con Tween 20 al 2,5 %. Las plantas no infectadas se pulverizaron también con 2 ml de agua destilada con Tween 20 al 2.5%. Se emplearon 3 botes por tratamiento, y tras una semana de crecimiento en estas condiciones las plantas se fotografiaron y se evaluó el daño foliar midiendo el área foliar necrosada y clorótica con ImageJ sobre hojas escaneadas (Figura 7).

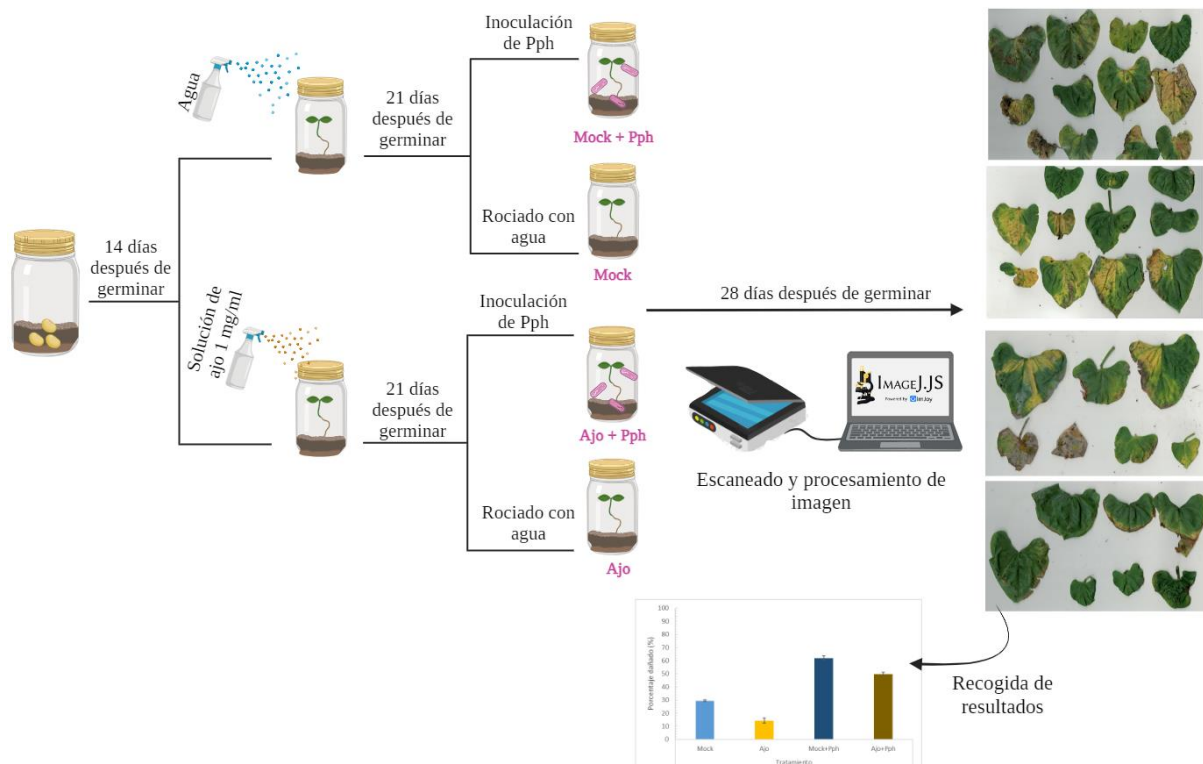


Figura 7. Diseño experimental de elicitación e infección con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) en plantas de alubia riñón en estadio V2 crecidas *in vitro*. Plantas de 14 días crecidas *in vitro* se asperjaron con agua



(Mock) o con una infusión de ajo 1 mg/ml (Ajo). A los 21 días, las plantas se dividieron en lotes y la mitad de las plantas previamente tratadas o no con extracto de ajo fueron rociadas con 2 ml de una solución de (Pph) en las hojas cotiledonares, dando lugar a plantas Mock +Pph y Ajo + Pph. Las plantas no infectadas se trataron con una solución de Tween 20 al 2,5%. Cada tratamiento constó de 3 réplicas. Todas las plantas se cultivaron durante 7 días más antes del fenotipado y la medición del daño foliar. Creado con Biorender.com.

### 2.2.5 Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

En todos los experimentos se expresa la media y el error estándar de los resultados empleando siempre una n igual o superior a 3. Una vez obtenidos los datos de porcentaje de daño foliar en cada tratamiento se estudió si existían diferencias significativas entre los tratamientos mediante el programa PAST3.18 (PAleontological STatistics) (Hammer, Harper y Ryan, 2021).

En primer lugar, se comprobó la normalidad de los datos por la prueba Shapiro-Wilk. Todos los ellos siguieron una distribución normal. Seguidamente, se empleó la prueba paramétrica univariante ANOVA de una vía con test de Tuckey para comprobar si existían diferencias significativas entre muestras. Los resultados se consideraron diferentes significativamente considerando  $p < 0,05$ . Los resultados se representaron en gráficas usando la versión de 2007 de Microsoft Excel.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Capacidad antiséptica de Allium sativa.

#### 3.1.1 El ajo favorece el crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

El potencial del ajo para inhibir el crecimiento de Pph se evaluó mediante bioensayos con un rango de concentración de polvo de ajo de entre 0 y 75 mg/ml. El porcentaje de crecimiento bacteriano con respecto al control se representa en la Figura 8. Como resultado, el crecimiento de Pph no se vio inhibido en ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 8a). Sin embargo, según la bibliografía (De la Rubia et al., 2022) otros preparados a base de plantas como hollejo de uva, *Urtica dioica*, residuos de lúpulo y *Equisetum* sp. sí inhibieron el crecimiento de Pph obteniendo valores de  $I_{50}$  de 0,7 mg/ml, 1,0 mg/ml, 5,9 mg/ml y 6,1 mg/ml, respectivamente.

Probablemente no se consiguieron los resultados esperados porque el ajo después ser autoclavado a 121°C pierde las propiedades antibacterianas dadas por el azufre y polifenoles presentes en *Allium sativum* (Bozin et al., 2008).

De hecho, se observó que las bajas concentraciones de ajo sobre Pph parecen tener un efecto favorable en su crecimiento. Esta observación podría indicar que la bacteria puede emplear el ajo como nutriente. En el estudio realizado por Sunu *et al.* (2019) se demostró que el aumento del contenido de fructooligosacáridos en el ajo intensificó el crecimiento significativamente de *Lactobacillus acidophilus*. Además, Pph se nutre de los componentes del apoplasto de *Phaseolus vulgaris* tales como sacarosa, fructosa, manitol, aspartato, glutamato y metabolitos secundarios propios de la planta (Bialczyk *et al.*, 2004). Los mencionados azúcares coinciden con los componentes nutricionales del ajo (Queiroz *et al.*, 2009), lo que da una posible explicación al incremento del crecimiento de Pph observado en los resultados.

Asimismo, se observó que a bajas concentraciones de ajo aparecen múltiples colonias de Pph dispersas por el medio, mientras que a altas concentraciones la bacteria solo crece en el punto de inoculación (Figura 8b). Esto podría deberse al efecto osmótico del medio de cultivo que retiene a altas concentraciones la dispersión de Pph.

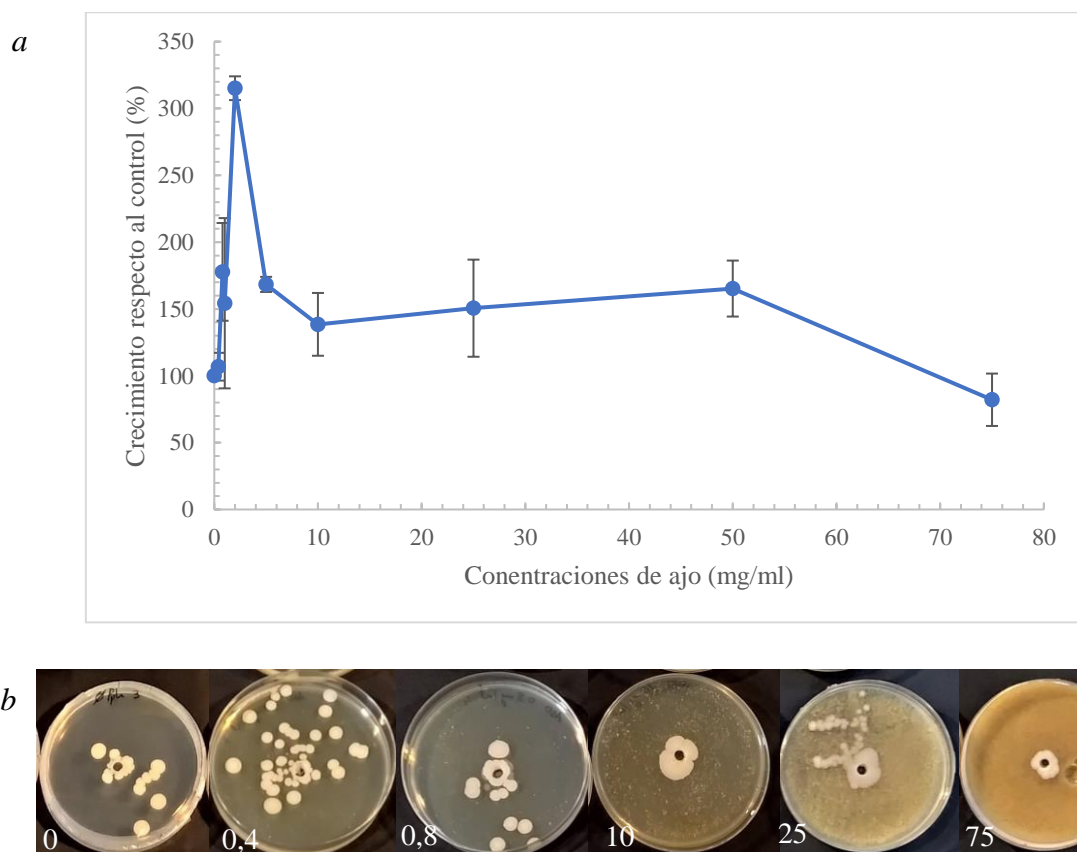


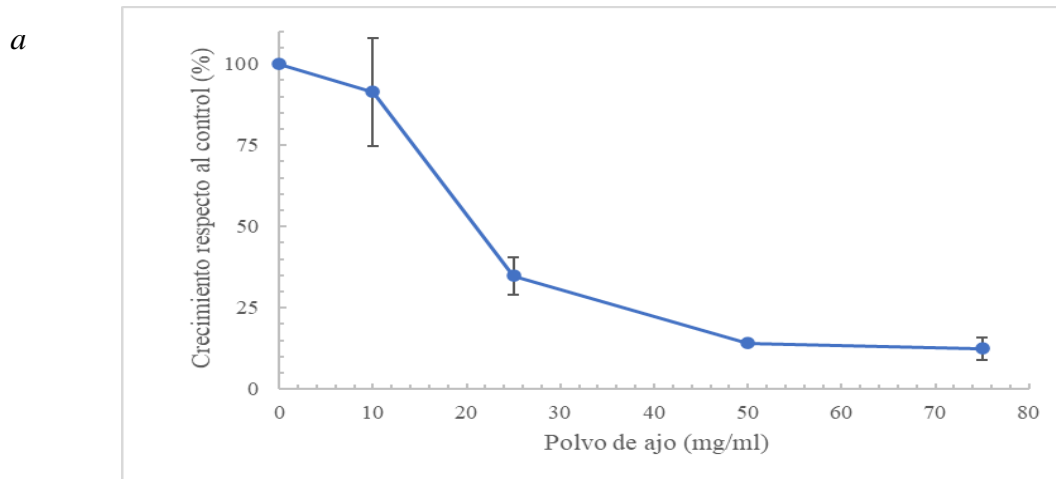
Figura 8. *a*) Porcentaje del crecimiento respecto al control de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) en medio TSA en presencia de concentraciones de extracto de ajo (0-75 mg/ml). Se representa la media  $\pm$  SE (n=4) *b*) Aspecto del crecimiento de Pph en presencia de distintas concentraciones (0 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) representativas de ajo tras su incubación a 30°C durante 5 días.

### 3.1.2 El ajo inhibe el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*.

La toxicidad del ajo sobre el hongo *Rhizopus stolonifer* fue probada por bioensayos empleando polvo de ajo en un rango de entre 0,4 y 75 mg/ml. Como resultado se observó que el crecimiento del hongo disminuyó a medida que la concentración de ajo aumentaba en el medio (Figura 9a), lo cual permitió calcular la concentración de ajo que reduce el crecimiento del hongo en un 50% respecto el control ( $I_{50}$ ) siendo de 32,38 mg/ml. El estudio de Kumar Pundir *et al.* (2010) reveló que soluciones de *Allium sativum* con etanol (25% p/v) de concentración 10 mg/ml son capaces de inhibir a *Rhizopus stolonifer* en un 50% de su crecimiento, proporcionando una base sólida al ensayo.

El efecto inhibitorio del ajo ha sido asociado con su alta concentración en compuestos azufrados como el dialil sulfuro y el dialil disulfuro (ElSayed *et al.*, 2017). Estos compuestos se asocian con proteínas con grupos sulfhídricos de las células del hongo para su destrucción. Esto da una explicación a la capacidad antifúngica observada en los resultados. Sin embargo, los componentes inhibitorios son volátiles (Inouye *et al.*, 2001). Consecuentemente, la concentración de dichos volátiles disminuye con el tiempo y, con ello, su interacción con el hongo haciendo que éste sea capaz de recuperar su metabolismo como en la placa control (Muy-Rangel *et al.*, 2017). Este aspecto podría tenerse en cuenta cuando se considere el tratamiento de cultivos con extracto de ajo.

Por otra parte, existen numerosos productos vegetales a de plantas que tienen efecto fungicida sobre *Rhizopus stolonifer*. En el estudio de Bhaskara *et al.* (1998) se documentó que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* 0,2 mg/ml reduce un 50% el crecimiento de este hongo. También Mohammadi *et al.* (2014) estudió el potencial inhibitorio de aceites de hinojo al 3,5%, anís al 4% y alcaravea al 3% sobre *R. stolonifer*, siendo el aceite esencial de hinojo  $800 \mu\text{l.l}^{-1}$  el que consiguió una mayor inhibición del hongo (76,29 %). Por ello, y, a pesar de demostrar la efectividad del ajo sobre *R. stolonifer*, sería conveniente considerar la combinación de preparados a base de ajo junto con otras plantas para emplearse como una fuente potencial de compuestos antimicrobianos naturales.



*b*



Figura 9. *a*) Porcentaje del crecimiento respecto al control de *Rhizopus stolonifer* en medio enriquecido con malta en presencia de concentraciones de extracto de ajo (0-75 mg/ml). Se representa la media  $\pm$  SE (n=4) *b*) Aspecto del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* en presencia de 0,0,4, 0,8, 10, 25 y 50 mg/ml de polvo de ajo representativas de ajo tras 24 horas a temperatura ambiente.

### 3.2 El extracto de ajo induce la formación de ROS en la alubia riñón

La figura 10 muestra la formación de ROS en discos foliares de alubia tras su elicitación con solución de ajo 1 mg/ml y 10 mg/ml. Se observa que el pretratamiento de discos foliares de alubia con ajo 1 mg/ml provoca un incremento en la producción de ROS, siendo incluso superior a la producida por la Flg22, control positivo del experimento ya que es un péptido de 22 aminoácidos derivado de la flagelina bacteriana que imita la inoculación con Pph (Ojito-Ramos y Portal, 2010). Por su parte, las unidades URL de la solución de ajo 10 mg/ml fueron menores que el Mock, lo cual sugiere que altas concentraciones de ajo saturan la respuesta.

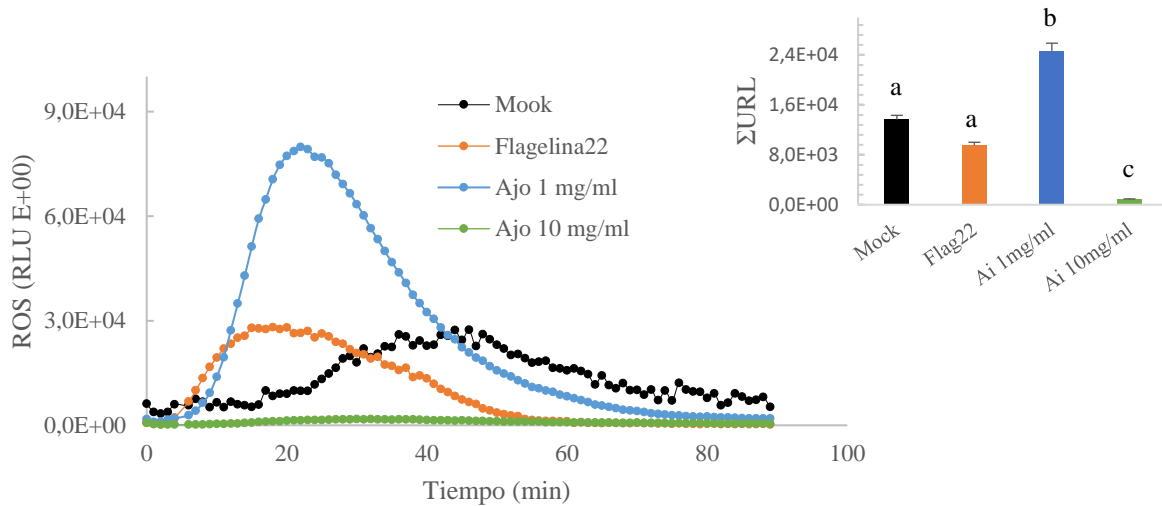


Figura 10. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en discos foliares de alubia riñón sometidos a los tratamientos: agua (Mock; negro), Flagelina22 (Flag22; naranja), infusión de ajo 1 mg/ml (Ai 1 mg/ml; azul) y 10 mg/ml (Ai 10 mg/ml; verde). Se midió en Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) producidas por la reacción con Luminol a lo largo del tiempo. Se integraron las áreas totales bajo las curvas y los valores resultantes se representan en el lado derecho del panel. Los datos representan la media  $\pm$  SE de un experimento representativo de dos independientes con resultados similares. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía con post hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A pesar de que la infusión de ajo 1 mg/ml produce un gran pico de ROS, no se observaron diferencias significativas entre los controles negativos (Mock) y positivos (Flg22), posiblemente debido al bajo número de muestras empleadas. Cabe destacar que los perfiles de Flg22 y ajo 1 mg/ml son más parecidos entre sí que con el resto. Estos perfiles muestran un pico de ROS a los pocos minutos tras la elicitación que disminuye progresivamente, típico de compuestos elicitores (Mélida *et al.*, 2020; De la Rubia *et al.*, 2021b). Sin embargo, el perfil del tratamiento Mock muestra un pico bajo que se extiende a lo largo del tiempo y que, por lo tanto, acumula más área, pero no es típico de compuestos elicitores. Este leve incremento en ROS podría producirse por el estrés inducido al pipetear justo antes de iniciarse la medida.

### 3.2.2 La previa elicitación de plantas de alubia riñón con extracto de ajo reduce los síntomas producidos por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Para determinar si la aplicación de ajo infundido 1 mg/ml es capaz de inducir la defensa en plantas de alubia antes de la infección con Pph, se trataron plantas de alubia con o sin ajo y posteriormente se inocularon con la bacteria. La mayoría de las plantas control (Mock)

presentaron un buen desarrollo foliar y un color verde en las hojas, aunque algunas plantas presentaron algo de clorosis marginal (Figura 11A1 y 11B). Esto pudo deberse a que crecieron pegadas a la pared del bote donde germinaron, quedando expuestas al exceso de humedad condensada en la pared. Además, Pph es una bacteria endógena de semilla (Duman y Soyly, 2019), por lo que algunas semillas podrían estar infectadas previamente. Por otro lado, las plantas tratadas con ajo no presentaron a penas daño foliar (Figura 11A2 y 11B). Por el contrario, la inoculación de Pph a las plantas Mock (Mock + Pph) provocó clorosis general y desarrollo de áreas de tejido necrótico, como se muestra en la Figura 10B3. La activación de la defensa, por lo general, afecta negativamente al crecimiento de la planta y, por tanto, debe estar estrictamente regulado para emplear sus reservas energéticas en crecimiento o en defensa, lo cual tiene un impacto agrícola (Ning, Y., Liu y Wang, 2017). Sin embargo, el daño foliar producido por la inoculación de Pph se redujo un 45,10% en las plantas previamente tratadas con ajo (Ajo + Pph) (Figura 10A4 y 10B) en comparación al tratamiento Mock + Pph. De hecho, el análisis estadístico confirma que entre los tratamientos Ajo + Pph y Mock + Pph existen diferencias significativas. Esta observación puede indicar que las respuestas defensivas celulares ya se han activado y, en consecuencia, se espera un mecanismo defensivo más fuerte (Adám *et al.*, 1995; Cheesman, 2006) ya que prepara a las células de la planta para desarrollar una respuesta de defensa más vigorosa de alguna manera (Marcic *et al.*, 2021). Por este motivo, aunque el ajo no muestre un efecto bactericida frente a Pph, se podría considerar su adición junto con otros compuestos bactericidas en soluciones que favorezcan la activación de las defensas de la planta. En este sentido sería interesante probar en un futuro, soluciones que combinaran extracto de ortiga o de hollejos de vid, previamente descritos como inhibidores de Pph (De la Rubia *et al.*, 2021a) y de ajo, con efecto elicitor, para mejorar las defensas de la alubia frente a la enfermedad de la grasa.

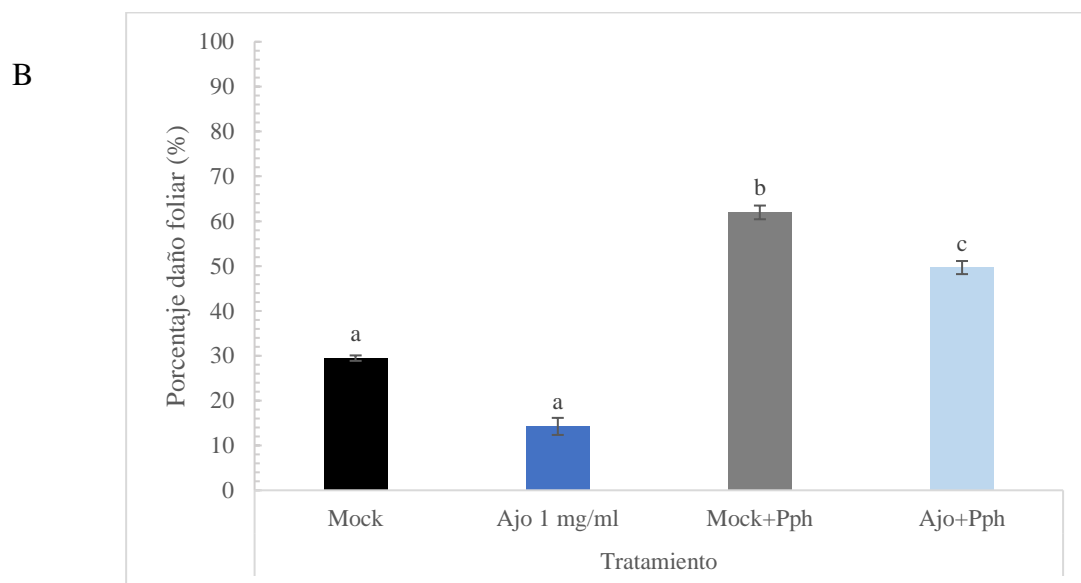


Figura 11. A) Apariencia fenotípica de plantas de alubia riñón tras someterse a: tratamiento con agua sin infección (Mock), tratamiento con solución de ajo infusionado y filtrado 1 mg/ml (Ajo), y sus respectivas infecciones con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph): Mock + Pph y Ajo + Pph. Se muestran las plantas enteras de al menos 3 botes por tratamiento B) Daño foliar de clorosis y necrosis presentado en las hojas cotiledonares de alubia riñón bajo los distintos tratamientos aplicados: plantas sin tratar (Mock; negro) y pretratadas con solución de ajo 1 mg/ml (Ajo; azul), así como las infectadas con Pph sin tratar (Mock+Pph; gris) y tratadas (Ajo+Pph; azul claro). Se representa la media  $\pm$  SE (n=3). Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía con post hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Conclusión

De acuerdo con los resultados mostrados, las conclusiones de este trabajo son:

Los preparados a base de ajo seco y molido no presentan comportamiento inhibitorio sobre la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) en ninguna de las concentraciones estudiadas (0-75 mg/ml). Además, bajas concentraciones de ajo favorecen el crecimiento de dicho patógeno.

Los preparados a base de ajo seco y molido inhibe el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, siendo su  $I_{50}$  de 32,70 mg/ml.

El pretratamiento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad riñón con solución de ajo seco y molido infusionado y filtrado a concentración 1 mg/ml es capaz de elicitar la respuesta inmune de la planta disminuyendo el porcentaje de daño foliar en un 45,10% con respecto a las plantas de alubia común no pretratadas.

#### 5. Referencias

- Ádám, A.L., Bestwick, C.S., Barna, B. y Mansfield, J.W. (1995) "Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*", *Plants*, 197, pp. 240–249
- Angelova, Z., Georgiev, S. y Roos, W. (2006) "Elicitation of Plants", *Biotechnology and biotechnological Equipment*, 20(2), pp. 72–83.
- Arnold, D.L., Lovell, H.C., Jackson, R.W. y Mansfield, J.W. (2011). "*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel", *Molecular Plant Biology*, 12 (7), pp. 16–17.
- Arrebola, E., Cazorla, F.M., Pérez-García, A. y De Vicente, A. (2011) "Chemical and Metabolic Aspects of Antimetabolite Toxins Produced by *Pseudomonas syringae* Pathovars", *Toxins*, 3 (9), pp. 1089–1110.
- Asensio Vegas, C., Asensio S-Manzanera, M.C., López Pérez, R. e Ibeas García, A. (2006a) "Variedades obtenidas de judías (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Agricultura: Revista agropecuaria y ganadería*, 884, pp. 316–317.
- Asensio Vegas, C., Asensio S-Manzanera, M.C., López Pérez, R. e Ibeas García, A. (2006b) "Catálogo de variedades de Judías-Grano del ITACyL", *Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León*, 2, pp. 1–23.
- Asensio-S.-Manzanera, M.C., Asensio, C. y Singh, S.P. (2006) "Gamete selection for resistance to common and halo bacterial blights in dry bean intergene pool populations", *Crop Science*, 46, pp. 131–135.
- Aviello, G., Abenavoli, L., Borrelli, F., Cpasso, R., Izzo, A.A., Lembo, F., Romano, B. y Capasso, F. (2009) "Garlic: empiricism or cience?", *Natural Product Communications*, 4 (12), pp. 85–96.
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E. y Molina, A. (2018) "Plant cell wall-mediated immunity: Cell wall changes trigger disease resistance responses". *Plant Journal Cell Molecular Biology*, 93, pp. 614–636.
- Bacete, L., Mérida, H., Pattathil, S., Hahn, M.G., Molina, A. y Miedes, E. (2017) "Characterization of Plant Cell Wall Damage-Associated Molecular Patterns Regulating Immune Responses". En Shan, L. y He, P. (eds.). *Plant Pattern Recognition Receptors. Methods in Molecular Biology*. 1578. New York: Human Press, pp. 13–23.



Benezzer Benezzer, M., Castro Mercado, E. y García Pineda, E. (2008) “La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas”, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26 (1), pp. 56–61.

Bermúdez Hoyos, M., López Naranjo, L.M. y Zabala González, D.A. (2007) “Elaboración de un preparado magistral a base de ajo (*Allium sativum*) y caléndula (*Calendula officinalis*) y evaluación de su actividad antimicrobiana y antimicótica”, *Ciencia, Tecnología e Innovación En Salud*, 1, pp. 6–11.

Bestwick, C.S., Brown, I.R, Bennett, M.H. y Mansfield, J.W. (1997) “Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*”, *The Plant Cell*, 9(2), pp. 209–221.

Bhaskara M., P. Angers, A. Gosselin & J. Arul. (1998) “Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits”, *Phytochemistry*, 47(8), pp. 1515–1520.

Bialczyk, J., Lechowski, Z., y Dziga, D. (2004) “Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and nitro-gen source as NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>”, *Plant Soil*, 263, pp. 265–272.

Bordones, A., De Gracia, N., Díaz, D., Rodríguez, R y Chen, A. (2018) “Comparación de la efectividad en la protección de cultivos de tomates con insecticidas orgánicos a base de: ajo (*Allium sativum*) y nim (*Azadirachta indica*)”, *Revista Información Científica*, 4, pp. 39–42.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I, Goran, A. y Igetic, R. (2008) “Phenolics as antioxidants in garlic (*A. sativum* L., Alliaceae)”, *Food Chemistry*, 111, pp. 925-929.

Braun-Kiewnick, A., Jacobsen, B.J. y Sands, D.C. (2000) “Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the Causal Agent of Basal Kernel Blight of Barley, by Antagonistic *Pantoea agglomerans*”, *Phytopathology*, 30, pp. 368–375.

Casquero, P.A., Lema, M., Santalla, M. y De Ron, A.M. (2006) “Performance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from Spain”, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, pp. 1021–1032.

Cheeseman, J.M. (2006) “Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions”. *Journal of Experimental Botanic*, 57, pp. 2435–2444.

Comisión Europea (2005) “Reglamento (CE) 510/2005 del Consejo de 6 de septiembre del 2005 por el que se inscribe Inscripción en el registro comunitario de la IGP «Alubia de La Bañeza-León»

Cooper, B., Campbell, K.B., Beard, H.S., Garrett, W.M. y Ferreira M.E. (2020) “The Proteomics of Resistance to Halo Blight in Common Bean”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(9), pp. 1161–1175.

Corrales Reyes, I.E. y Reyes Pérez J.J. (2014) “Actividad antimicrobiana y antifúngica de *Allium sativum* en Estomatología”, *16 de abril*, 254, pp. 59–68.

Couto, D. y Zipfel, C. (2016) “Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants”, *Nature Reviews Immunology*, 16, pp. 55–537.

De la Rubia, A.G., Centeno, M.L., Moreno-González, V., De Castro, M. y García-Ángulo, P. (2021b) “Perception and First Defense Responses Against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris*: Identification of Wall-Associated Kinase Receptors”, *Phytopathology*, 0, pp. 1–11.

De la Rubia, A.G., De Castro, M., Medina-Lozano, I. y García-Angulo, P. (2022) “Using Plant-Based Preparations to Protect Common Bean against Halo Blight Disease: The Potential of Nettle to Trigger the Immune System”, *Agronomy*, pp. 12–63.

De la Rubia, A.G., Mérida, H., Centeno, M.L., Encina, A. y García-Angulo, P. (2021a) “Immune Priming Triggers Cell Wall Remodeling and Increased Resistance to Halo Blight Disease in Common Bean”, *Plants*, 1514(10), pp. 1–25.

Desikan, R., Hancock, J., and Neill, S. (2005) “Reactive oxygen species as signaling molecules”, en Smirnov, N. (ed) *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 169–191.

- Duman, K. y Soyly, S. (2019) "Characterization of antagonistic and plant growth-promoting traits of endophytic bacteria isolated from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*", *Plant Protection Bulletin*, 59 (3), pp. 59–69.
- Dwyer, S.C., Legendre, L., Low, P.S., y Leto, T.L. (1996) "Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1289, pp. 231–237.
- El Ghaouth, A., Arul, G. y Asselin A. (1992) "Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits", *Phytopathology*, 82, pp. 398.
- El-Sayed, H.S., Chizzola, R., Ramadan, A.A., y Edris, A.E. (2017) "Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-micro emulsifying water-based delivery systems", *Food Chemistry*, 221, pp. 196–204.
- González Fernández, A. (2010) "La grasa de la judía, una enfermedad emergente en Asturias", *Tecnología Agroalimentaria*, 7, pp. 12–13.
- González, A. J., (2003) "Desinfección de semilla de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo granja asturiana con antifúngicos y antibacterianos", *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 29, pp. 461–470.
- Graham, P.H. y Ranilli, P. (1997) "Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Field Crops Research*, 53, pp. 131–146.
- Gutiérrez-Beltrán, E. y de la Torre, F.N. (2016) "La coevolución como un sistema de defensa en la interacción planta-patógeno", *Encuentro en la biología*, 9(157), pp.79–81.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) "PAST: Paleontological statistics software package for education and data análisis", *Palaeontologia Electronica*, 4, pp. 1–9.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K. y Yamaguchi, H. (2001) "Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils", *Microbiology and Immunology*, 45, pp. 201–208.
- Jones, J.D. y Dangl, J.L. (2006) "The plant immune system", *Nature*, 444, pp. 323–329.
- Kumar Pundir, P. Jain, P. y Sharma, C. (2010) "Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts of *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* Against Food Associated Bacteria and Fungi", *Ethnobotanical Leaflets*, 14, pp. 60–344.
- Ledezma, E y Apez-Castro, R. (2006) "Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico", *Revista Iberoamericana de Micología*, 23 (2), pp. 75–80.
- López Solanilla, E. y Rodríguez Palenzuela, P. (2009) "*Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas", *Actualidad Sociedad Española de Microbiología*, 47, 14–18.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. y Dangl, J.L. (2003) "*Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance", *Cell*, 112, pp. 379–389.
- Maricic, B., Radman, S., Romic, M., Perkovic, J., Major, N., Urlic, B., Palcic, I., Ban, D., Zoric, Z. y Ban, S.G. (2021) "Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) as an Aqueous Plant-Based Extract Fertilizer in Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Sustainable Agriculture. Sustainability*, 13, pp. 4042.
- Martínez Aguilar, K., Ramírez Carrasco, G., Hernández Chávez, J.L., Barraza, A. y Álvarez Venegas, R. (2016) "Use of BABA and INA as Activators of a Primed State in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Frontiers in Plant Science*, 653(7), pp. 1–17.
- Mélida, H., Bacete, L., Ruprecht, C., Rebaque, D., Del Hierro, I., López, G., Brunner, F., Pfrengle, F., Molina, A. (2020) "Arabinoxylan Oligosaccharides Act as Damage Associated Molecular Patterns in Plants Regulating Disease Resistance", *Frontiers in Plant Science*, 11(1210), pp. 1–16.
- Miklas, P.N., Fourie, D., Trapp, J., David, J. y Myers, J.R. (2014) "New loci including conferring resistance to halo bacterial blight on chromosome Pv04 in common bean", *Crop Science*, 54, pp. 2099–2108.

- Mittler, R. (2017) “ROS Are Good”, *Trends Plant Sci*, 22, pp. 11–19.
- Moctezuma Zárate, M.G., Pedraza Ramos, M., Cárdenas González, J.F., Martínez Juárez, V.M. y Acosta Rodríguez, J.I. (2016) “Efecto del ajo (*Allium sativum*) sobre el crecimiento de algunas especies de hongos”, *Revista Académica de Investigación*, 22, pp. 120–136.
- Mohammadi, S., Aroiee, H., Hossein-Aminifard, M., Tehranifar, A. y Jahanbakhsh, V. (2014) “Effects of Essential Oils to Control *Rhizopus stolonifer* in vitro and in vivo on Strawberry”, *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 8(23), pp. 71–78.
- Montes de Gómez, V. (1990) “Aspectos del mecanismo de defensa de las plantas”, *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 17 (67), pp. 741–747.
- Morales Corts, R., Petisco Rodríguez, C. y Sanz, M.A. (2001) “Variedades de Judía de Castilla y León”, *Agricultura, Revista Agropecuaria*, 829, pp. 500-501.
- Murillo, J., Bardaji, L. y Führer, M.E. (2010) “La grasa de las judías, causada por *Pseudomonas syringa* pv. *phaseolicola*”, *Phytoma*, 223: pp. 1–5.
- Muy-Rangel, M.D., Osuna-Valle, J.R., García-Estrada, R.S., San Martín-Hernández, C., y Quintana-Obregón, E.A. (2017) “In vitro antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima*”, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), pp. 162–171.
- Ning, Y., Liu, W. y Wang, G. L. (2017) “Balancing immunity and yield in crop plants”, *Trends Plant Science*, 22, pp. 1069–1079.
- O’Leary, B. M., Neale, H. C., Geilfus, C. M., Jackson, R. W., Arnold, D. L. y Preston, G. M. (2016) “Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*”, *Plant Cell and Environment*, 39, pp. 2172–2184.
- Ojito-Ramo, K. y Portal, O. (2010) “Introducción al sistema inmune en plantas”, *Biotecnología Vegetal*, 10 (1), pp. 3–19.
- Ortwin-Sauer C., (1966) “The early Spanish men”, *Berkeley and Los Angeles*, pp. 51–298.
- Parvez, A.S., Rather, A.G y Warsi, M.Z.K. (2007) “Implications of epistasis in maize breeding”, *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 1, pp. 1–11.
- Queiroz, S., Ishimoto, E.Y., Bastos, B.H.M, Sampaio, G.R., Torres E.A.F.S.V (2009) “Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: in vitro antioxidant activity”, *Food Chemistry*, 115, pp. 371–374.
- Rebaque, D., del Hierro, I., López, G., Bacete, L., Vilaplana, F., Dallabernardina, P., Pfrengle, F., Jordá, L., Sánchez-Vallet, A., Pérez, R. *et al.* (2021) “Cell wall-derived mixed-linked  $\beta$ -1,3/1,4-glucans trigger immune responses and disease resistance in plants”, *Plant Journal*, 106, pp. 601–615.
- Rico, A. y Preston, G.M. (2008) “*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), pp. 269–282.
- Saijo, Y., Loo, E. P., y Yasuda, S. (2018) “Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions”, *Plant Journal*, 93, pp. 592–613.
- Santalla, M. Rodiño, A.P. y De Ron, A.M. (2002) “Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for common vean”, *Theoretical Applied Genetics*, 104, pp. 934–944.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. y Eliceiri, K.W. (2012) “NIH Image to ImageJ: 25 years of image análisis”, *Natutal Methods*, 9, pp. 671–675.
- Sunu, P., Sunarti, D., Mahfudz, L. D., y Yuniyanto, V. D. (2019) “Prebiotic activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Lactobacillus acidophilus*”, *Veterinary world*, 12(12), pp. 2046–2051.
- Tar’an, B., Michaels, T.E. y Pauls, K.P. (2002) “Genetic mapping of agronomic traits in common vean”, *Crop Science*, 42, pp. 544–556.

Valero Gaspar, T., Rodríguez Alonso, P., Ruíz Moreno, E. Ávila Torres, J.M. y Varela Moreiras, G. (2018) “La alimentación Española: Características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta”, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2, pp. 147–148.

Völksch, B. y May, R. (2001) “Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions”, *Microbial Ecology*, 41, pp. 132–139.

Waszczak, C., Carmody y M. Kangasjärvi, J. (2018) “Reactive Oxygen Species in Plant Signaling”, *Annual Review of Plant Biology*, 29 (69), pp. 209–236.

Zhang, S., Fu, Y., Mersha, Z. y Pernezny, K. (2017) “Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean” *Crop Protection*, 98, pp. 8–15.