



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS PUEBLA**

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**USO DE LA ESPECTROSCOPIA Y MICROSCOPIA EN EL ESTUDIO DE  
LAS REACCIONES DE *Vicia faba* L. ANTE FACTORES ADVERSOS**

**SERGIO ENRIQUE PICHÓN POSADA**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2019



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Sergio Enrique Pichón Posada**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Ramón Díaz Ruiz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Uso de la espectroscopía y microscopía en el estudio de las reacciones de *Vicia faba* L. ante factores adversos** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 2 de Diciembre del 2019.

Sergio Enrique Pichón Posada

Vo. Bo. Profesor Consejero o Director de Tesis  
Dr. Ramón Díaz Ruiz

La presente tesis, titulada: **Uso de la espectroscopia y microscopía en el estudio de las reacciones de *Vicia faba* L. ante factores adversos**, realizada por el alumno: **Sergio Enrique Pichón Posada**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:   
DR. RAMÓN DÍAZ RUIZ

ASESOR:   
DR. ARTURO HUERTA DE LA PEÑA

ASESOR:   
DR. JUAN CONTRERAS RAMOS

ASESOR:   
DR. JUAN MORALES JIMÉNEZ

ASESOR:   
MTRO. IGNACIO MUÑOZ MÁXIMO

Puebla, Puebla, México, 2019

# USO DE LA ESPECTROSCOPIA Y MICROSCOPIA EN EL ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE *VICIA FABA* L. ANTE FACTORES ADVERSOS

**Sergio Enrique Pichón Posada, MC.**

**Colegio de Posgraduados, 2019**

El haba (*Vicia faba* L.) es una leguminosa cuyo grano tiene un alto valor económico y nutricional. De acuerdo con el Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) el estado de Puebla ha sido el principal productor de haba en los últimos 10 años, llegando el valor de producción hasta 255 millones de pesos. Sin embargo, la superficie de siembra en el estado ha disminuido hasta un 15 %, trayendo como consecuencia una pérdida de rendimiento promedio de 1.37 a 1.29 Toneladas/hectárea. Esto se debe en parte a la sensibilidad del cultivo ante diversos factores bióticos y abióticos que limitan el desarrollo y rendimiento de la planta. La Mancha de Chocolate (*Botrytis fabae* S.) y la Roya (*Uromyces fabae* P.) son los principales factores bióticos que dañan al haba, que junto con la sequía provocan una rápida infección y la pérdida de hasta un 90 % del cultivo. Sin embargo, la planta genera diversos mecanismos de acción a nivel químico y estructural que permiten contrarrestar los efectos provocados por estos factores adversos. Conocer los cambios químicos y morfológicos generados por la planta permitirá implementar estrategias que permitan de manera oportuna disminuir y contrarrestar los efectos negativos e irreversibles en el cultivo. Por ende, en este se identificaron los compuestos químicos de defensa de las habas ante el daño provocado por enfermedades y factores ambientales a nivel químico y estructural mediante las técnicas de espectroscopía y microscopía. Los principales resultados demuestran que durante el ataque de *Botrytis fabae* S. los principales compuestos generados fueron ácido aspártico, prolina, citosina, purinas y pectina, así como la producción de elementos químicos Oxígeno, Magnesio y Sodio. Para *Uromyces fabae* P. fueron los fosfolípidos y la pectina, así como la producción de Oxígeno, Potasio, Fosforo, Silicio y Azufre. Asimismo, se detectó que el agua, los carbohidratos, la Amida I, la glucosa, los ácidos grasos, los ácidos nucleicos y la lignina los compuestos más sensibles y afectados por la sequía.

Palabras clave: *Vicia faba* L., *Botrytis fabae* S., *Uromyces fabae* P., Sequía, FTIR, SEM-EDS

# USE OF SPECTROSCOPY AND MICROSCOPY IN THE STUDY OF THE REACTIONS OF *VICIA FABAE* L. UNDER ADVERSE FACTORS

Sergio Enrique Pichón Posada, MC.

Colegio de Posgraduados, 2019

The faba bean (*Vicia faba* L.) is a legume whose grain has a high economic and nutritional value. According to the Agricultural and Fisheries Information Service (SIAP), the state of Puebla has been the main producer of faba beans in the last 10 years, with a production value of 255 million pesos. However, the planting area in the state has decreased to 15%, resulting in an average yield loss of 1.37 to 1.29 Tons / hectare. This is due in part to the sensitivity of the crop to various biotic and abiotic factors that limit the development and performance of the plant. The *Botrytis fabae* S. and *Uromyces fabae* P. are the main biotic factors that damage beans, which together with drought cause rapid infections and loss of up to 90% of the crop. However, the plant generates various mechanisms of action at the chemical and structural level that allow to counteract the effects caused by these adverse factors. Knowing the changes generated by the plant will allow the implementation of strategies that allow timely decrease and counteract the negative and irreversible effects on the crop. In this work, the chemical defense compounds of faba beans were identified against the damage caused by diseases and environmental factors at a chemical and structural level by means of spectroscopy and microscopy techniques. The main results show that during the attack of *Botrytis fabae* S. the main compounds generated were aspartic acid, proline, cytosine, purines and pectin, as well as the production of chemical elements Oxygen, Magnesium and Sodium. For *Uromyces fabae* P. it was phospholipids and pectin, as well as the production of Oxygen, Potassium, Phosphorus, Silicon and Sulfur. Likewise, it was detected that water, carbohydrates, amide I, glucose, fatty acids, nucleic acids and lignin are the most compounds affected by drought.

Keywords: *Vicia faba* L., *Botrytis fabae* S., *Uromyces fabae* P., Drought, FTIR, SEM-EDS

## DEDICATORIA

- ❖ A dios, por darme una nueva oportunidad para seguir viviendo, permitiéndome valorar y disfrutar los pequeños placeres de la vida. Por ayudarme a curar de mi enfermedad y ponerme a la gente correcta en los momentos correctos, “*los tiempos de dios son perfectos*”.
- ❖ A mis padres, que a pesar de los problemas siempre tuvieron en mente darme una educación, otorgándome la herramienta más esencial en la vida. Además, de sus cuidados y de no dejarme ni un minuto solo cuando me encontré en la etapa más difícil de mi vida.
- ❖ A mi esposa y a mi hijo, que son los pilares que me sostienen y me dan fuerza, impulsan y motivan a seguir adelante. Esas dos personitas que tenía en mi mente en cada momento y que fueron la razón por la que nunca me rendí y siempre seguí adelante, a pesar de las circunstancias.
- ❖ A mis hermanos, que siempre estuvieron al pendiente de mí, por sus cuidados y que siempre me brindaban su ayuda, ofreciéndome lo que estuviese en sus manos.
- ❖ A amigo Mijaíl, que como un hermano siempre está a mi lado apoyándome en las buenas y en las malas, siendo un amigo leal y excelente persona que tengo la fortuna de conocer.
- ❖ A mi amigo Jordi, que siempre se dio un espacio para poder verme y dándome hermosas lecciones que ahora tengo presente cada día “*No hay ni bueno ni malo*”.
- ❖ A mi consejero Ramón, que como un segundo padre y amigo siempre se preocupó por mí, me procuró y apoyo en todo momento de mi recuperación, dándome esas palabras de aliento y esas ganas de seguir adelante “*paso a pasito*”.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado y la confianza por otorgarme la beca, crucial para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados Campus Puebla (CP) por permitirme subir un escalón más de mi formación académica y superación personal, a través de la Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional (EDAR), en la línea de Recursos Genéticos, Biotecnología e innovación.

Al Centro Universitario de Vinculación (Buap), que siempre me ha abierto sus puertas para el desarrollo de mis trabajos de investigación.

Al Dr. Ramón Díaz Ruiz por comprenderme, por permitirme ser su alumno, teniendo la paciencia y el tiempo de orientarme y apoyarme en cada momento durante mi estancia en el colegio. Teniendo siempre en mente los consejos que me ha dado para ser un profesionista de calidad y no de cantidad, que me permita la toma de decisiones de manera correcta y sobretodo con ética profesional.

A mis asesores el M.C Ignacio Muñoz Máximo, Dr. Arturo Huerta de la Peña, Dr. Juan Contreras Ramos y al Dr. Juan Morales Jiménez por su tiempo invertido, su confianza y su atención constante hacia mi persona.

Al Dr. Mario Tornero por apoyarme en la revisión y en la redacción adecuada de este trabajo de investigación, así como sus consejos para poder comprender lo que en su momento no valoraba y poder ser así un mejor profesionista.

A los académicos, personal administrativo y compañeros del colegio, por su apoyo constante para que me pudiese desenvolver de manera adecuada en el colegio. Así mismo, por la accesibilidad y la humanidad con la que me trataron. Especialmente a Lourdes que siempre en biblioteca tenía un espacio seguro con el calor de un hogar, así como las atenciones, consejos y risas que compartiste conmigo; teniendo siempre presente que tengo una amiga leal con quien acudir.

## CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Problema de investigación</b> .....	1
<b>1.2 Preguntas de investigación</b> .....	2
<b>1.3 Justificación</b> .....	3
<b>1.4 Hipótesis general</b> .....	3
<b>1.5 Objetivo general</b> .....	4
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
2.1 Taxonomía del haba.....	5
2.2 Diversidad de especie y variabilidad.....	5
2.3 Morfología (INIA, 2004).....	6
2.4 Fenología (SIAP, 2019).....	7
2.5 La producción del haba en México.....	13
2.6 Factores abióticos adversos.....	19
2.7 Factores bióticos adversos.....	20
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	40
3.1 Material vegetal y siembra.....	40
3.2 Obtención de inóculos.....	40



3.3 Análisis <i>Botrytis fabae</i> .....	41
3.4 Análisis <i>Uromyces fabae</i> .....	41
3.5 Simulación de estrés por sequía.....	42
3.6 Espectroscopía FTIR.....	42
3.7 Análisis de conjunto de datos .....	42
3.8 Microscopía Electrónica de Barrido .....	43
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
4.1 <i>Botrytis fabae</i> .....	44
4.2 <i>Uromyces fabae</i> .....	56
4.3 Sequía.....	74
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>99</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>101</b>
<b>ANEXO A. Frecuencias correspondientes a <i>Botrytis fabae</i> con respecto a cada zona de daño</b> .....	<b>111</b>
<b>ANEXO B. Frecuencias correspondientes a <i>Uromyces fabae</i> con respecto a cada zona de daño</b> .....	<b>114</b>
<b>ANEXO C. Fotografías de plantas de haba infectadas con <i>Botrytis fabae</i> S.</b> .....	<b>116</b>
<b>ANEXO D. Fotografías de plantas de haba infectadas con <i>Uromyces fabae</i> S.</b> .....	<b>117</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estadios principales de crecimiento de haba.....	9
Cuadro 2. Estadios fenológicos de desarrollo de <i>Vicia faba</i> L. ....	10
Cuadro 3. Principales estados de México productores de haba en grano .....	13
Cuadro 4. Principales estados de México productores de haba en grano bajo riego .....	14
Cuadro 5. Principales estados de México productores de haba en grano bajo temporal .....	14
Cuadro 6. Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba en grano bajo temporal .....	15
Cuadro 7. Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba en grano bajo riego .....	15
Cuadro 8. Principales estados de México productores de haba verde .....	16
Cuadro 9. Principales estados de México productores de haba verde bajo riego .....	16
Cuadro 10. Principales estados de México productores de haba verde bajo temporal .....	17
Cuadro 11. Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba verde bajo temporal .....	17
Cuadro 12. Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba verde bajo riego .	18
Cuadro 13. Principales compuestos químicos más utilizados como defensa en la planta .....	27
Cuadro 14. Bandas de absorción FTIR y su asignación a grupos funcionales de <i>Vicia faba</i> L. (Mecozzi y Sturchio, 2017).....	34
Cuadro 15. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C-H correspondientes a <i>Botrytis fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño.....	45
Cuadro 16. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C=O correspondientes a <i>Botrytis fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño.....	46
Cuadro 17. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace N-H correspondientes a <i>Botrytis fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño.....	47
Cuadro 18. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace O-H, C=C, -COOH, -CHO, P=O y C-O correspondientes a <i>Botrytis fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño. ....	48

Cuadro 19. Principales elementos químicos presentes durante el ataque de <i>Botrytis fabae</i> S. en hoja sana.....	55
Cuadro 20. Principales elementos químicos presentes durante el ataque de <i>Botrytis fabae</i> S. en hoja necrosada.....	56
Cuadro 21. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C-H correspondientes a <i>Uromyces fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño. ....	57
Cuadro 22. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C=O correspondientes a <i>Uromyces fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño. ....	58
Cuadro 23. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C-O correspondientes a <i>Uromyces fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño. ....	58
Cuadro 24. Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace O-H, -COOH, P=O y C-C correspondientes a <i>Uromyces fabae</i> y variaciones de intensidad por cada zona de daño.....	59
Cuadro 25. Principales elementos químicos presentes durante el ataque de <i>Uromyces fabae</i> P..	66
Cuadro 26. Elementos químicos presentes durante el ataque de <i>Botrytis fabae</i> S. y <i>Uromyces fabae</i> P. en hoja sana.....	67
Cuadro 27. Elementos químicos presentes durante el ataque de <i>Botrytis fabae</i> S. y <i>Uromyces fabae</i> P. en hoja necrosada.....	69
Cuadro 28. Variaciones del % de Transmitancia en frecuencias características de hojas maduras de <i>Vicia faba</i> L. sometida a distintos periodos de sequía con respecto a su testigo. ....	87
Cuadro 29. Variaciones del % de Transmitancia en frecuencias características de hojas jóvenes de <i>Vicia faba</i> L. sometida a distintos periodos de sequía con respecto a su testigo. ....	87
Cuadro 30. Variaciones del % de Transmitancia en frecuencias características de la raíz de <i>Vicia faba</i> L. sometida a distintos periodos de sequía con respecto a su testigo. ....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios fenológicos de <i>Vicia faba</i> L. ....	12
Figura 2. Ciclo de vida del hongo <i>Botrytis fabae</i> S. ....	22
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Uromyces fabae</i> . ....	25
Figura 4. Infección de la hoja ocasionada por urediosporas y basidiosporas. ....	25
Figura 5. Representación del IR dentro del espectro electromagnético. ....	31
Figura 6. Vibraciones de tensión y flexión de enlaces moleculares. ....	31
Figura 7. . Funcionamiento de espectrofotómetro FTIR. ....	32
Figura 8. Espectro FTIR obtenido en modalidad de Transmitancia de <i>Vicia faba</i> L.. ....	33
Figura 9. Modalidades empleadas por FTIR. ....	35
Figura 10. Bombardeo de electrones primarios e identificación de electrones secundarios para la formación de la imagen. ....	39
Figura 11. Frecuencias predominantes en la parte sana de la hoja afectada por <i>Botrytis fabae</i> S. ....	49
Figura 12. Frecuencias predominantes al inicio del daño provocado por <i>Botrytis fabae</i> S. ....	49
Figura 13. Frecuencias predominantes durante la fase agresiva provocada por <i>Botrytis fabae</i> S. ....	50
Figura 14. Frecuencias predominantes durante el final del ataque de <i>Botrytis fabae</i> S. ....	51
Figura 15. Fase agresiva de <i>Botrytis fabae</i> S. ....	52
Figura 16. Fase destructiva de <i>Botrytis fabae</i> S. ....	53
Figura 17. Superficie utilizada para análisis EDS de cada zona de daño presentada por el hongo .....	54
Figura 18. Superficie utilizada para análisis EDS de la zona destructiva generada por el patógeno .....	55
Figura 19. Frecuencias predominantes en la parte sana de la hoja afectada por <i>Uromyces fabae</i> P. .....	60
Figura 20. Frecuencias predominantes al inicio del daño provocado por <i>Uromyces fabae</i> P. ....	60

Figura 21. Frecuencias predominantes durante la fase agresiva provocado por <i>Uromyces fabae</i> P. ....	61
Figura 22. Fase agresiva de <i>Uromyces fabae</i> P., .....	62
Figura 23. Iteración de la fase agresiva de <i>Uromyces fabae</i> P. y la fase destructiva de <i>Botrytis fabae</i> S. ....	63
Figura 24. Iteración de la fase agresiva de <i>Uromyces fabae</i> P. y la fase destructiva de <i>Botrytis fabae</i> S. ....	64
Figura 25. Superficie utilizada para análisis EDS de la fase agresiva provocada por urediosporas, la fase de inicio de inicio de la enfermedad y es la zona sana de la hoja .....	65
Figura 26. Superficie utilizada para análisis EDS de la fase agresiva provocada por urediosporas, la fase de inicio de inicio de la enfermedad y la zona necrosada de la hoja provocada por <i>Botrytis fabae</i> .....	66
Figura 27. Superficie utilizada para análisis EDS de la estructura regular presente durante la fase destructiva provocada por <i>Botrytis</i> y fase agresiva en la epidermis de la hoja provocada por <i>Uromyces</i> .....	68
Figura 28. Distribución del elemento carbono en distintas zonas de daño .....	69
Figura 29. Distribución del elemento oxígeno en distintas zonas de daño .....	70
Figura 30. Distribución del elemento magnesio en distintas zonas de daño .....	70
Figura 31. Distribución del elemento cloro en distintas zonas de daño.....	71
Figura 32. Distribución del elemento potasio en distintas zonas de daño .....	71
Figura 33. Distribución del elemento calcio en distintas zonas de daño .....	72
Figura 34. Distribución del elemento sodio en distintas zonas de daño .....	72
Figura 35. Distribución del elemento azufre en distintas zonas de daño.....	73
Figura 36. Distribución del elemento azufre en distintas zonas de daño.....	73
Figura 37. Distribución del elemento silicio en distintas zonas de daño .....	74
Figura 38. Comportamiento de la planta tras el avance de cinco periodos de la sequía.....	74
Figura 39. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	75

Figura 40. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	76
Figura 41. Variación de producción de grupos C-O durante cinco periodos de sequía.....	77
Figura 42. Variación de producción de grupos C=O durante cinco periodos de sequía.....	78
Figura 43. Variación de producción de Amida I durante cinco periodos de sequía .....	79
Figura 44. Variación de producción de Amida II durante cinco periodos de sequía.....	80
Figura 45. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	80
Figura 46. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	81
Figura 47. Variación de producción de -CHO durante cinco periodos de sequía.....	82
Figura 48. Variación de producción de C-H durante cinco periodos de sequía .....	82
Figura 49. Variación de producción de C-H durante cinco periodos de sequía .....	83
Figura 50. Variación de producción de grupos P=O durante cinco periodos de sequía .....	84
Figura 51. Variación de producción de C-O durante cinco periodos de sequía .....	85
Figura 52. Variación de producción de C-O durante cinco periodos de sequía .....	85
Figura 53. Variación de producción de ARN y ADN durante cinco periodos de sequía .....	86
Figura 54. Variación de producción de C-O durante cinco periodos de sequía .....	86
Figura 55. Comportamiento de raíces tras el avance de la sequía .....	89
Figura 56. Variación de producción de grupos O-H durante cinco periodos de sequía .....	90
Figura 57. Variación de producción de grupos C-O durante cinco periodos de sequía.....	91
Figura 58. Variación de producción de grupos C=O durante cinco periodos de sequía.....	92
Figura 59. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	93
Figura 60. Variación de producción de grupos -CHO durante cinco periodos de sequía.....	94
Figura 61. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	94
Figura 62. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	95

Figura 63. Variación de producción de grupos P=O durante cinco periodos de sequía .....	96
Figura 64. Variación de producción de grupos C-O durante cinco periodos de sequía.....	97
Figura 65. Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía.....	97

## I. INTRODUCCIÓN

El haba (*Vicia faba* L.) es una leguminosa cuyo grano aporta alrededor de un 30 % de proteínas esenciales para la nutrición humana. Cuenta con otras bondades nutricionales como un alto contenido de vitamina B1, fibra, fósforo y con un bajo contenido de grasas. Por otra parte, el estado de Puebla aporta 27 mil de las 53 mil toneladas de haba producidas en México y que hacen que el país sea el noveno productor de este cultivo a nivel mundial (ASERCA, 2001). Asimismo, en el estado se han destinado alrededor de 15 mil hectáreas para la producción de este grano, colocándose como el la segundo productor de haba a nivel nacional (Rojas-Tiempo *et al.*, 2012). En el presente año la producción de grano a alcanzado un precio mínimo de \$ 40.00 y un máximo de \$ 66.00 pesos por kilogramo (SNIIM, 2019). Por consiguiente, la producción de este cultivo se considera un medio de sustento y alimentación de cientos de familias en México.

### 1.1 Problema de investigación

Los principales limitantes productivas en los rendimientos de haba son la presencia de factores bióticos (enfermedades o plagas) y abióticos (sequía y heladas). Normalmente en México, el cultivo de haba tanto bajo las modalidades de temporal y riego, se ve afectado en forma continua por la interacción conjunta biótica o abiótica de dos o más de los factores descritos.

La mancha de chocolate es una de las enfermedades más destructivas que afecta al haba, provocada por el hongo *Botrytis fabae* S., se caracteriza lesiones en forma de pequeños puntos color marrón-rojizos que dañan y disminuyen el tejido sano de las plantas. Su ataque provoca fuertes defoliaciones, colapso de tallo, necrosis y una pérdida de hasta un 90% del cultivo. El control químico es posible, pero costoso y dañino para el medio ambiente, lo que reduce la rentabilidad del cultivo.

La roya es provocada por el hongo *Uromyces fabae* P. es otra de las enfermedades que ataca al cultivo, esta se caracteriza por generar puntos café-rojizos de hasta un milímetro de diámetro. La epidemia comienza en los primeros folíolos de la planta, expandiéndose por las ramas, tallos y vainas. Sin embargo, cuando la infección se da durante el llenado de grano se estima una pérdida



de rendimiento de hasta un 20 % y cuando se presenta a principios de temporada se estima una pérdida de rendimiento de hasta un 90 % del rendimiento del cultivo.

La planta de haba, es también susceptible a los cambios climáticos o factores abióticos. En tal sentido, la sequía se considera como un fenómeno climático extremo que provoca efectos en los procesos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos de un cultivo; limitando su producción, rendimiento, índice de cosecha y calidad de grano. El estrés hídrico generado afecta directamente a la densidad, diámetro y longitud de la raíz, disminuyendo la capacidad de adquisición de los recursos del suelo, limitando la expansión del área foliar, provocando senescencia de las hojas y afectaciones durante la floración y llenado de grano.

El ataque de las enfermedades Mancha de Chocolate y Roya junto con la sequía además de generar bajos rendimientos en el cultivo, provocan la pérdida de forraje y de semilla ya que está se deteriora y contamina, por lo que se considera una pérdida total para el productor.

## **1.2 Preguntas de investigación**

De acuerdo con la problemática anterior, se formularon las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son los cambios a químicos y morfológicos que la planta de haba genera para mitigar los efectos de las enfermedades Mancha de Chocolate - Roya y la sequía?
2. ¿Existe alguna relación entre la Mancha de Chocolate y la Roya con los efectos provocados por la sequía?
3. Las metodologías de investigación para el estudio de estos factores adversos ¿proporcionan información adecuada que permitan identificar los cambios químicos de la planta en tiempo real?, ¿es posible estimar el porcentaje de concentración de cada compuesto?
4. Una vez identificados los cambios químicos que la planta genera, ¿es posible implementar el uso de compuestos orgánicos o químicos que permitan compensar un porcentaje compuestos perdidos por estos factores abióticos?, ¿es posible identificarlos e implementarlos de manera temprana y así disminuir los efectos negativos en el cultivo?

### **1.3 Justificación**

Si bien, la presencia de estos factores adversos ha sido estudiada mediante diferentes enfoques y métodos, aún se necesita más trabajo de investigación para conocer la dimensión del daño provocado en la planta por parte del patógeno y su relación que esta tiene con la sequía. Por ende, un estudio basado en los cambios químicos y morfológicos que la planta genera ante la presencia de estos factores adversos, hará posible implementar acciones que ayuden al productor a predecir de manera temprana el efecto negativo de estos factores en el cultivo y así evitar la pérdida de extensiones sembradas de haba, lo cual se verá reflejado en los costos y la producción de grano de los agricultores.

### **1.4 Hipótesis general**

Las plantas de haba generan distintos compuestos químicos a diferentes concentraciones y variaciones morfológicas ante los diferentes grados de daño provocado por enfermedades y factores ambientales.

#### **1.4.1 Hipótesis específicas**

1. Las plantas de haba generan diferentes compuestos químicos cuando son infectadas por los hongos de la mancha de chocolate y roya en concentraciones distintas en los diferentes grados de infección.
2. Las plantas de haba presentan variaciones morfológicas y cambios químicos elementales cuando son atacadas por la mancha de chocolate y la roya.
3. Las hojas y raíces de haba bajo estrés por sequía forman compuestos químicos a diferentes concentraciones al ser sometidas a distintos periodos de sequía.

## **1.5 Objetivo general**

Identificar los compuestos químicos de defensa de las habas ante el daño provocado por enfermedades y factores ambientales a nivel químico y estructural mediante las técnicas de espectroscopía y microscopía.

### **1.5.1 Objetivos específicos**

1. Identificar y describir los compuestos químicos generados por las plantas de haba durante la infección de la mancha de chocolate y roya mediante la espectroscopía FTIR.
2. Identificar y describir las variaciones morfológicas y cambios químicos elementales en las plantas de haba cuando son infectadas por la mancha de chocolate y la roya utilizando microscopía electrónica de barrido.
3. Identificar y describir los compuestos químicos presentes en las plantas de haba bajo estrés por sequía en hojas y raíces mediante la técnica de espectroscopía FTIR.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Taxonomía del haba

El haba es una especie de planta herbácea anual perteneciente al género *Vicia* de la familia Fabaceae, cuyo fruto es una legumbre que se expresa en forma de vaina.

Reino: Plantae

División: Supermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Género: *Vicia*

Especie: *faba*

Nombre científico:

*Vicia faba* L., 1753

### 2.2 Diversidad de especie y variabilidad

El haba es una especie dicotiledónea anual la cual se agrupa principalmente en tres variedades botánicas, diferenciadas fundamentalmente por el tamaño y color de sus semillas.

- a) *Vicia faba* L. variedad minor (Harz) Beck: semillas cilíndricas de forma elipsoidal cuyo tamaño son entre 0.7 cm de ancho y 1.3 cm de largo. Este tipo predomina como cultivo en el norte de Europa, especialmente en Gran Bretaña, en el Valle del Nilo, India y Norteamérica, pero su utilización principal es forrajera o como abono verde.
- b) *Vicia faba* L. variedad esquina Pers: semillas de forma aplastada con tamaño de 1.3 cm de ancho y 1.7 cm de largo. Este tipo, como sus nombres latino e inglés (horse bean) lo indican, se utiliza preferentemente en la alimentación de ganado.

- c) *Vicia faba* L. variedad mayor (Harz) Beck: semillas con dimensiones de 2 cm de ancho y 3 cm de largo. Esta variedad botánica es la más usada como haba verde en el mundo, especialmente en Asia, América Latina y Europa. En esta variedad se distinguen los cultivares "asiáticos" de vaina corta, gruesa y con pocos granos grandes como Jumbo y Nintoku Giant, los cultivares "europeos" de vaina larga, gruesa, de varios granos como los españoles Aguadulce y Mucha? miel, y de otros países como Portuguesa (Portugal), D'Aquitaine (Francia), Windsor (Inglaterra) y Witkiem (Holanda).

## **2.3 Morfología (INIA, 2004)**

### **2.3.1 Raíz**

El sistema radicular es de forma pivotante, cuya raíz principal es base para el desarrollo de raíces secundarias, terciarias y hasta cuaternarias. Asimismo, permiten el anclaje, almacenamiento, transporte de nutrientes en la planta y ayudan al enriquecimiento de nutrientes al suelo mediante la fijación simbiótica de nitrógeno (N<sub>2</sub>) a través de bacterias *Rhizobium* localizadas en los nódulos (Fischer *et al.*, 2019).

### **2.3.2 Tallo**

El tallo está formado por nudos donde se desarrollan las hojas. Presenta estructura cilíndrica cuadrangular, que tiende a crecer de manera recta hasta alcanzar una altura que varía entre los 50 cm hasta 1.8 m. Sin embargo, en ocasiones el tallo colapsa por la cantidad de hojas, ramas y vainas producidas, por lo que es necesario tutorar la planta.

### **2.3.3 Hoja**

Las hojas generalmente son pinnadas compuestas por 3 a 7 folíolos glabros de borde entero, color verde intenso en el haz y menor en el envés y con el raquis bien desarrollado. Éstas se unen por medio del peciolo en el nudo del tallo. El peciolo tiene forma largada con orientación hacia arriba. Las estipulas nacen en la base de la hoja y protegen las yemas de la misma.

### **2.3.4 Flor**

Las flores son de simetrías bilaterales, zigomorfas y agrupadas en racimos de entre 2 a 12 flores, con una superficie lisa y cerosa. Son de color blanca-cremosas con manchas negras o pardas, con un cáliz color verde y en forma de tubo con cinco sépalos unidos junto con cinco lóbulos.

### **2.3.5 Fruto**

El fruto es en vaina o legumbre, gruesa, carnosa, alargada y algo comprimida, con las semillas dispuestas en una hilera ventral. Las vainas son de color verde en estado tierno y en la madurez se tornan coriáceas color negro. La disposición de los frutos varía, desde erguidos, formando un ángulo muy agudo con el tallo. Las dimensiones son variables de acuerdo con las variedades, pudiendo alcanzar desde 5 hasta 30 cm. Puede contener de 2 a 6 semillas comprimidas o grandes de color y tamaño diferentes.

### **2.3.6 Semilla**

Las semillas son de forma ovalada, de superficie lisa, opaca y brillante, de coloración variada, que va desde colores oscuros hasta los claros; así el color puede ser negro, rojo, verde, morado, pardo, grisáceo, blanco-cremoso o blanco; también pueden ser jaspeadas o de dos colores. La posibilidad de germinar disminuye notablemente después de 5 ó 6 años.

## **2.4 Fenología (SIAP, 2019)**

### **2.4.1 Ciclo de madurez**

La primera flor generalmente se presenta entre los 70 y 85 días después de la siembra (dds) y el inicio de vainas fluctúa desde los 83 a los 105 dds, siendo el ciclo completo de aproximadamente 124-128 días.

### **2.4.2 Adaptación**

De acuerdo a la variedad utilizada, el haba comúnmente se adapta en regiones subtropicales, templadas y tropicales de altura, con régimen subhúmedo. Asimismo, tiene la posibilidad de

adaptarse a regiones áridas y semiáridas, húmedas con estación seca, cálida, semi-cálida, templada y semifrías.

### **2.4.3 Altitud**

De acuerdo a la variedad utilizada, el haba puede desarrollarse desde el nivel del mar (en latitudes medias) hasta 2700 m (en latitudes bajas). De igual manera, se puede desarrollar en altitudes de 1800 a 3050 m. Sin embargo, la óptima para mayores rendimientos oscila entre 2000 y 2650 m.

### **2.4.4 Temperatura**

Se ha demostrado que el cultivo tiene un desarrollo óptimo cuando se presentan temperaturas bajas alrededor de los 16 ° C. Asimismo, la temperatura óptima para la floración oscila entre 19.9 - 25.4°C. De igual manera, la temperatura base para formación de vainas y madurez fisiológica es de 25°C).

### **2.4.5 Precipitación**

El cultivo puede lograrse con precipitaciones desde 200 hasta 2600 mm de lluvia, sin embargo el nivel óptimo de precipitación está alrededor de los 1000 mm. Cabe mencionar que el cultivo de haba es muy sensible a la falta de agua, especialmente desde la floración hasta la formación de los granos.

### **2.4.6 Suelo**

El cultivo es poco exigente en suelo, aunque prefiere suelos arcillosos, silíceos y arcillosos calizos ricos en humus, profundos y frescos; le perjudican los suelos húmedos mal drenados, el pH óptimo oscila entre 7.3 y 8.2, y es relativamente tolerante a la salinidad. Los requerimientos nutricionales para producir una tonelada de haba son: 60-13.5-48 kg/ha de N-P-K, donde la mayor parte de su demanda de nitrógeno la cubre mediante fijación atmosférica.

### 2.4.7 Escala extendida BBCH (Bleiholder *et al.*, 1996)

La escala BBCH es un sistema para la codificación uniforme de identificación fenológica de estadios de crecimiento para todas las especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas a nivel mundial. Esta escala plantea al ciclo de desarrollo de las plantas en diez estadios principales de crecimiento; los cuales son descritos utilizando una numeración ascendente del 0 al 9, la cual permite establecer un criterio de madurez fisiológica de una planta (Cuadro 1).

Así mismo, los estadios principales se dividen en estadios secundarios de dos dígitos, los cuales describen de manera más precisa las fases cortas del desarrollo de la planta (Figura 1).

**Cuadro 1.** Estadios principales de crecimiento de haba

Estadio	Descripción
0	Germinación, brotación, desarrollo de la yema
1	Desarrollo de las hojas (brote o tallo principal)
2	Formación de brotes laterales/macollamiento (ahijamiento)
3	Crecimiento longitudinal del tallo o crecimiento en roseta, desarrollo de brotes (retoños)/ encañado (tallo principal)
4	Desarrollo de las partes vegetativas cosechables de la planta o de órganos vegetativos de propagación/embuchamiento
5	Emergencia de la inflorescencia (tallo principal)/espigamiento
6	Floración (tallo principal)
7	Desarrollo del fruto
8	Coloración o maduración de frutos y semillas
9	Senescencia, comienzo de la dormancia

Bleiholder *et al.*, (1996)

Sin embargo, los estadios no necesariamente deben ocurrir de manera estricta, ya que suelen presentarse cambios en el proceso de desarrollo de la planta. Asimismo, estos cambios se deben a las condiciones en que la planta se desarrolla, factores bióticos, abióticos y la variedad misma.

La escala BBCH permite la comparación entre códigos de la numeración siempre y cuando pertenezcan al mismo estadio de crecimiento. Para la codificación es necesario usar criterios fenológicos y no siempre estadios de desarrollo análogos, lo cual permite realizar una descripción de crecimiento basada en las características de la planta.



De acuerdo con la escala BBCH el haba presenta 99 estadios secundarios de desarrollo, los cuales abarcan desde la obtención de la semilla hasta la cosecha (Cuadro 2).

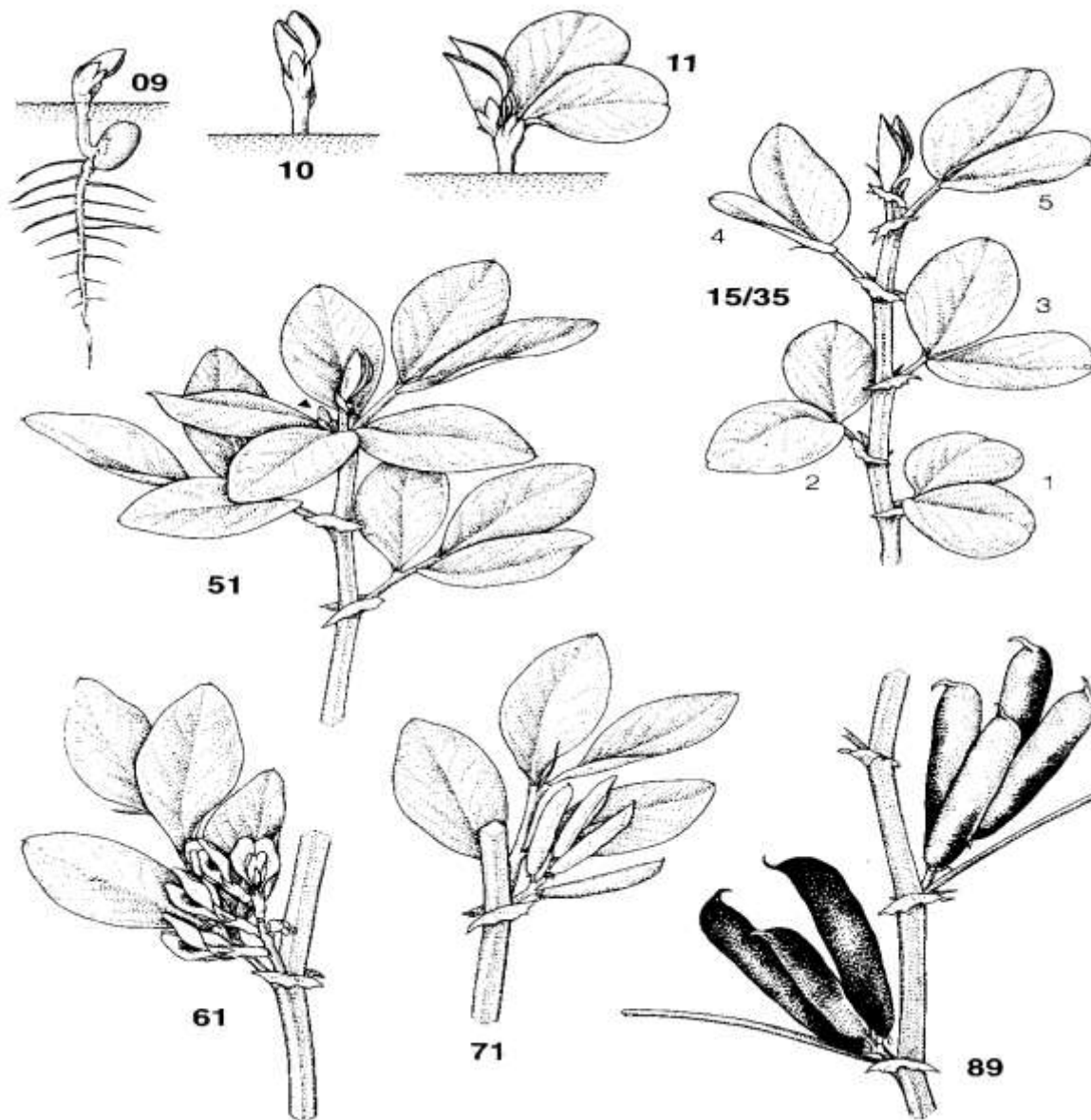
**Cuadro 2.** Estadios fenológicos de desarrollo de *Vicia faba* L.

<b>Estadio principal 0</b>	<b>Germinación</b>
<b>00</b>	Semilla seca
<b>01</b>	Comienzo de la imbibición de la semilla
<b>03</b>	Fin de la imbibición de la semilla
<b>05</b>	La radícula (raíz embrional), fuera de la semilla
<b>07</b>	Brote fuera de la semilla (se ve la plúmula)
<b>08</b>	Brote crece hacia la superficie del suelo
<b>09</b>	Emergencia: El brote traspasa la superficie del suelo
<b>Estadio principal 1</b>	<b>Desarrollo de las hojas (tallo principal)</b>
<b>10</b>	Par de hojas escama, visibles (pueden perderse o ser comidas)
<b>11</b>	1 hoja, desplegada
<b>12</b>	2 hojas, desplegadas
<b>13</b>	3 hojas, desplegadas
...	...
<b>19</b>	9 o más hojas, desplegadas
<b>Estadio principal 2</b>	<b>Formación de brotes laterales</b>
<b>20</b>	No hay brotes laterales
<b>21</b>	Comienzo de los brotes laterales: se detecta el 1er. brote lateral
<b>22</b>	Se detectan 2 brotes laterales
<b>23</b>	Se detectan 3 brotes laterales
...	...
<b>29</b>	Fin de brotes laterales: 9 o más brotes laterales
<b>Estadio principal 3</b>	<b>Crecimiento longitudinal del tallo principal</b>
<b>30</b>	Comienzo del crecimiento longitudinal del tallo
<b>31</b>	1 entrenudo alargado visiblemente
<b>32</b>	2 entrenudos alargados visiblemente
<b>33</b>	3 entrenudos alargados visiblemente
...	...
<b>39</b>	9 o más entrenudos alargados visiblemente
<b>Estadio principal 5</b>	<b>Aparición del órgano floral (tallo principal)</b>

50 51 55 59	Botones florales, presentes, aún rodeados por las hojas Primeros botones florales, visibles fuera de las hojas Primeros botones florales individuales cerrados, visibles por fuera de las hojas Primeros pétalos, visibles; muchos botones florales individuales, aún cerrados
<b>Estadio principal 6</b>	<b>Floración (tallo principal)</b>
60 61 63 65 67 69	Primeras flores, abiertas Comienzo de la floración: flores del primer racimo, abiertas Flores abiertas en 3 racimos de cada planta Plena floración: flores, abiertas en 5 racimos de cada planta La floración decae Fin de la floración
<b>Estadio principal 7</b>	<b>Formación del fruto</b>
70 71 72 73 74 75 76 77 78 79	Primeras vainas han alcanzado su tamaño final ("legumbre plana") 10 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 20 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 30 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 40 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 50 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 60 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 70 % de las vainas han alcanzado su tamaño final 80 % de las vainas han alcanzado su tamaño final Casi todas las vainas han alcanzado su tamaño final
<b>Estadio principal 8</b>	<b>Maduración de frutos y semillas</b>
80 81 82 83 84 85 86 87 88 89	Comienzo de la maduración: semillas, verdes; rellenando la cavidad de la vaina 10 % de las vainas maduras; semillas, secas y duras 20 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras 30 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras 40 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras 50 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras 60 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras 70 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras 80 % de las vainas maduras y oscuras; semillas, secas y duras Madurez completa: casi todas las vainas, oscuras; semillas, secas y duras
<b>Estadio principal 9</b>	<b>Senescencia</b>

93	Los tallos comienzan a oscurecerse
95	50 % de los tallos marrones o negros
97	Planta, muerta y seca
99	Partes cosechadas

Codificación BBCH (Bleiholder *et al.*, 1996)



**Figura 1.** Estadios fenológicos de *Vicia faba* L. donde 09) emergencia, 10) par de hojas escama, 11) 1ra. hoja desplegada, 15/35 desarrollo de las hojas, formación de brotes laterales y crecimiento longitudinal del tallo principal, 51) primeros botones florales, 61) comienzo de la floración, 71) formación de frutos, 89) madurez completa de vainas (Bleiholder *et al.*, 1996).

## 2.5 La producción del haba en México

El haba se considera como una de las leguminosas más importantes del mundo, siendo su contenido proteico y nutricional superior en comparación con otras fuentes como el maíz y frijol. En México, su producción se concentra en las principales zonas de la región denominada “Valles Altos”, la cual se sitúa principalmente en los estados de Puebla, México, Tlaxcala, Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Chiapas. En Puebla, la zona productora se encuentra ubicada en la región oriente del estado, la cual abarca los distritos de desarrollo de Tlacotepec, Chalchicomula de Sesma (Cd. Serdán), Libres, hasta llegar a Huitzilán. En esta región, la época de siembra es determinada por el establecimiento de la temporada de lluvias y la conservación de humedad, durante el mes de Noviembre y hasta el mes de Marzo. Asimismo los sistemas de producción se dan en la modalidad de riego y temporal, mediante siembras por monocultivo y asociada con otro cultivo, siendo comúnmente maíz (ASERCA, 2001).

En México, el estado de Puebla es considerado como principal productor de haba en grano seguido por el estado de Veracruz y Tlaxcala. De igual manera, los rendimientos más altos en condiciones de temporal corresponden al estado de Morelos con un valor de 3.64 Ton/ha, seguido del estado de Veracruz con 2.8 Ton/ha y en México con 2.16 Ton/ha (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Principales estados de México productores de haba en grano

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>Puebla</b>	12,173.00	12,173.00	16,359.06	1.29	15,025.27	255,908,133.21
<b>Veracruz</b>	5,399.50	5,399.50	14,988.93	2.8	9,021.63	135,368,436.32
<b>Tlaxcala</b>	2,547.00	2,547.00	3,845.85	2.12	11,320.27	45,374,857.75
<b>México</b>	287	287	662.57	2.16	15,449.15	10,281,813.66
<b>Michoacán</b>	338	338	526.98	1.48	5,407.83	3,436,158.53
<b>Hidalgo</b>	326.6	326.6	438.51	1.27	11,864.58	5,385,390.00
<b>Morelos</b>	47.5	47.5	171.92	3.64	7,446.96	1,257,932.61
<b>Oaxaca</b>	30.3	30.3	34.67	1.28	7,084.36	243,729.18
<b>Aguascalientes</b>	15	15	9	0.6	7300	65700
	21,163.90	21,163.90	37,037.49	1.85	9,991.12	457,322,151.26

Año Agrícola:2018, Modalidad: Riego + Temporal (SIAP, 2018)

En la modalidad de riego, el estado de Veracruz es el principal productor de haba en grano, seguido de Puebla y Tlaxcala. El estado que presenta un mayor rendimiento es el estado de Veracruz con 3.93 Ton/ha, Tlaxcala con 2.68 Ton/ha y Oaxaca con 2.40 Ton/ha (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Principales estados de México productores de haba en grano bajo riego

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>Veracruz</b>	2,362.50	2,362.50	9,489.27	3.93	9,076.88	86,123,985.00
<b>Puebla</b>	1,265.00	1,265.00	3,119.14	2.16	16,624.22	47,061,860.42
<b>Tlaxcala</b>	80.00	80.00	211.15	2.68	10,002.89	2,103,261.75
<b>Michoacán</b>	70.00	70.00	126.00	1.80	5,850.00	737,100.00
<b>Hidalgo</b>	62.60	62.60	83.70	1.36	10,675.00	919,890.00
<b>Aguascalientes</b>	15.00	15.00	9.00	0.60	7,300.00	65,700.00
<b>Oaxaca</b>	3.20	3.20	7.64	2.40	7,120.00	54,405.60
	3,858.30	3,858.30	13,045.90	2.13	9,521.28	137,066,202.77

Año Agrícola:2018, Modalidad: Riego (SIAP, 2018)

En condiciones de temporal, el estado de Puebla es el mayor productor de haba en grano, seguido de Veracruz y Tlaxcala. El estado que presenta mayor rendimiento por hectárea es el estado de Morelos con 3.64 Ton/ha, seguido por el Estado de México con 2.16 Ton/ha y Tlaxcala con 1.89 Ton/ha (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Principales estados de México productores de haba en grano bajo temporal

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>Puebla</b>	10,908.00	10,908.00	13,239.92	1.14	14,754.67	208,846,272.79
<b>Veracruz</b>	3,037.00	3,037.00	5,499.66	1.80	8,972.53	49,244,451.30
<b>Tlaxcala</b>	2,467.00	2,467.00	3,634.70	1.89	11,869.18	43,271,596.00
<b>México</b>	287.00	287.00	662.57	2.16	15,449.15	10,281,813.66
<b>Michoacán</b>	268.00	268.00	400.98	1.44	5,358.70	2,699,058.53
<b>Hidalgo</b>	264.00	264.00	354.81	1.18	13,054.17	4,465,500.00
<b>Morelos</b>	47.50	47.50	171.92	3.64	7,446.96	1,257,932.61
<b>Oaxaca</b>	27.10	27.10	27.03	1.00	7,075.44	189,323.58
	17,305.60	17,305.60	23,991.59	1.78	10,497.60	320,255,948.47

Año Agrícola:2018, Modalidad: Temporal (SIAP, 2018)

En el estado de Puebla, los sitios con mayor producción de haba en grano en condiciones de temporal son los distritos de desarrollo de Libres, Zacatlán y Teziutlán. El distrito de Cholula cuenta con el mayor rendimiento con 1.42 Ton/ha, seguido de Zacatlán con 1.27 Ton/ha y Libres con 1.24 Ton/ha (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba en grano bajo temporal

<b>Distrito de desarrollo</b>	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>Libres</b>	6,841.50	6,841.50	8,398.18	1.24	17,676.14	162,393,079.15
<b>Zacatlán</b>	1,784.30	1,784.30	2,207.48	1.27	9,777.78	20,168,389.40
<b>Teziutlán</b>	1,517.00	1,517.00	1,767.59	1.10	11,406.70	15,252,886.48
<b>Cholula</b>	531.00	531.00	760.91	1.42	12,305.65	9,358,383.37
<b>Tecamachalco</b>	164.20	164.20	64.51	0.38	18,687.81	1,209,734.42
<b>Tehuacán</b>	70.00	70.00	41.25	0.58	10,969.23	463,799.97
	10,908.00	10,908.00	13,239.92	1.00	13,470.55	208,846,272.79

Año Agrícola:2018, Modalidad: Temporal (SIAP, 2018)

En la modalidad de riego, los distritos de desarrollo con mayor producción de haba en grano son Tecamachalco con un rendimiento de 2.38 Ton/ha, seguido por Libres con 2.12 Ton/ha y Cholula con 1.8 Ton/ha (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba en grano bajo riego

<b>Distrito de desarrollo</b>	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>Tecamachalco</b>	507.00	507.00	1,605.97	2.38	12,014.46	13,706,876.32
<b>Libres</b>	753.00	753.00	1,504.17	2.12	19,246.14	33,246,084.10
<b>Cholula</b>	5.00	5.00	9.00	1.80	12,100.00	108,900.00
	1,265.00	1,265.00	3,119.14	2.10	14,453.53	47,061,860.42

Año Agrícola:2018, Modalidad: Riego (SIAP, 2018)

En cuanto a la producción de haba verde, el Estado de México es el principal productor, seguido de Puebla y Tlaxcala. El mayor rendimiento por hectárea se da en el estado de Puebla con un

valor de 7.78 Ton/ha, seguido por el Estado de México con 7.05 Ton/ha y Durango con 6.82 Ton/ha (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Principales estados de México productores de haba verde

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>México</b>	5,637.65	5,637.65	37,962.72	7.05	6,228.01	255,395,668.22
<b>Puebla</b>	3,317.71	3,317.71	23,128.93	7.78	4,370.32	92,685,207.39
<b>Tlaxcala</b>	2,078	2,078	7,961.94	3.87	6,144.63	49,648,770.16
<b>Michoacán</b>	860.3	860.3	5,779.48	6.3	4,668.79	25,598,573.50
<b>Veracruz</b>	229	229	1,206.24	5	4,865.26	5,381,835.82
<b>Hidalgo</b>	89.50	89.50	541.52	5.51	3,801.00	2,055,884.50
<b>Ciudad de México</b>	168.58	168.58	693.14	3.68	7,341.67	5,487,872.97
<b>Morelos</b>	43.5	43.5	284.85	6.44	4,479.79	1,235,399.81
<b>Aguascalientes</b>	15	15	105	7	7,100.00	745,500.00
<b>Durango</b>	4	4	27.28	6.82	3,220.00	87,841.60
<b>Zacatecas</b>	2.5	2.5	8	3.2	5,800.00	46,400.00
	12,535.24	12,535.24	78,240.62	6.11	5,562.45	440,424,838.47

Año Agrícola:2018, Modalidad: Riego + Temporal (SIAP, 2018)

En la modalidad de riego, los principales estados productores de haba verde son el Estado de México, Puebla y Tlaxcala. El estado de Puebla tiene el mayor rendimiento por hectárea con 8.3 Ton/ha, por el Estado de México con 7.69 Ton/ha y Michoacán con 7.17 Ton/ha (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Principales estados de México productores de haba verde bajo riego

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>México</b>	1,541.75	1,541.75	12,393.93	7.69	6,610.08	81,660,174.85
<b>Puebla</b>	1,541.67	1,541.67	11,970.12	8.3	4,849.36	53,879,989.21
<b>Tlaxcala</b>	1,536.00	1,536.00	6,221.45	4.14	6,027.27	39,780,962.39
<b>Michoacán</b>	563	563	4,077.15	7.17	4,561.77	17,176,763.19
<b>Hidalgo</b>	82	82	526.52	6.33	3,663.75	1,990,634.50
<b>Aguascalientes</b>	15	15	105	7	7,100.00	745,500.00
<b>Durango</b>	4	4	27.28	6.82	3,220.00	87,841.60

<b>Zacatecas</b>	2.5	2.5	8	3.2	5,800.00	46,400.00
<b>Cd. México</b>	0.3	0.3	1.5	5	7,875.00	11,812.50
	5,286.22	5,286.22	35,330.95	6.18	5523.03	195,380,078.24

Año Agrícola:2018, Modalidad: Riego (SIAP, 2018)

En condiciones de temporal, el Estado de México es el principal productor de haba verde, seguido por el estado de Puebla y Tlaxcala. El mayor rendimiento se presenta en el estado de Puebla con 6.95 Ton/ha, seguido por el Estado de México con 6.66 Ton/ha y Morelos con 6.44 Ton/ha (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Principales estados de México productores de haba verde bajo temporal

<b>Estado</b>	<b>Sup. Sembrada (Ha)</b>	<b>Sup. Cosechada (Ha)</b>	<b>Producción (Ton)</b>	<b>Rendimiento (Ton/Ha)</b>	<b>Precio Medio Rural (\$/Ton)</b>	<b>Valor de la Producción (Miles de pesos)</b>
<b>México</b>	4,125.90	4,125.90	25,712.79	6.66	6,003.65	174,502,412.89
<b>Puebla</b>	1,776.04	1,776.04	11,158.81	6.95	3,610.46	38,805,218.18
<b>Tlaxcala</b>	542	542	1,740.49	3.34	6,374.25	9,867,807.77
<b>Michoacán</b>	297.3	297.3	1,702.33	5.22	4,802.56	8,421,810.31
<b>Veracruz</b>	229	229	1,206.24	5	4,865.26	5,381,835.82
<b>Ciudad de México</b>	168.28	168.28	691.64	3.49	7,265.48	5,476,060.47
<b>Morelos</b>	43.5	43.5	284.85	6.44	4,479.79	1,235,399.81
<b>Hidalgo</b>	7.5	7.5	15	2.25	4,350.00	65,250.00
	7,189.52	7,189.52	42,512.15	4.92	5218.93	243,755,795.25

Año Agrícola:2018, Modalidad: Temporal (SIAP, 2018)

En el estado de Puebla, los distritos de desarrollo más productores de haba verde en condiciones de temporal son Cholula, Libres y Zacatlán. Asimismo, el distrito de Cholula tiene el mayor rendimiento del cultivo de 10.0 Ton/ha, seguido de Zacatlán con 6.64 Ton/ha y Libres con 4.45 Ton/ha (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba verde bajo temporal

<b>Distrito de desarrollo</b>	<b>Sup. Sembrada (Ha)</b>	<b>Sup. Cosechada (Ha)</b>	<b>Producción (Ton)</b>	<b>Rendimiento (Ton/Ha)</b>	<b>Precio Medio Rural (\$/Ton)</b>	<b>Valor de la Producción (Miles de pesos)</b>
<b>Cholula</b>	597.50	597.50	5,983.33	10.00	2,172.98	14,280,283.74



<b>Libres</b>	861.04	861.04	3,976.35	4.45	4,926.43	19,323,580.71
<b>Zacatlán</b>	110.00	110.00	746.46	6.64	2,993.33	2,148,649.80
<b>Tecamachalco</b>	207.50	207.50	452.67	1.27	6,641.93	3,052,703.93
	1,776.04	1,776.04	11,158.81	5.59	4,183.67	38,805,218.18

Año Agrícola:2018, Modalidad: Temporal (SIAP, 2018)

En la modalidad de riego, los distritos de desarrollo con mayor producción de haba verde son Cholula, Libres y Tecamachalco. Asimismo, el mayor rendimiento del cultivo se da en el distrito de Cholula con un valor de 11.61 Ton/ha, seguido por Libres con 4.84 Ton/ha y Tecamachalco con 4.02 Ton/ha (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Principales distritos de desarrollo de Puebla productores de haba verde bajo riego

<b>Distrito de desarrollo</b>	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de la Producción (Miles de pesos)
<b>Cholula</b>	710	710	8,135.04	11.61	4,047.30	32,608,831.31
<b>Libres</b>	450.67	450.67	2305.16	4.84	4982.07	11,416,999.5
<b>Tecamachalco</b>	381	381	1,529.92	4.02	6,420.79	9,854,158.40
	1,541.67	1,541.67	11,970.12	6.82	5,150.05	53,879,989.21

Año Agrícola:2018, Modalidad: Riego (SIAP, 2018)

De acuerdo con el SIAP del 2008 al 2018, en el estado de Puebla el valor de producción de haba verde produjo un aumento de 398.5 % (de 23.6 a 92.6 millones de pesos) y 173.1 % para la producción de haba en grano (147.8 a 255.9 millones de pesos). Asimismo, la superficie de siembra para haba verde aumentó de 1,073.0 a 3,317 ha con una producción de 4,734.40 a 23,128.93 Ton, generando un aumento de rendimiento de 4.44 a 7.78 Ton/ha en el cultivo. Sin embargo, para haba en grano la superficie de siembra disminuyó 84.6 % por ende la producción bajo hasta un 85.5 % y el rendimiento del cultivo paso 1.37 al 1.29 Ton/ha. Esta disminución de superficie condujo a pérdidas millonarias de hasta 302.5 millones de pesos para el estado de Puebla en estos últimos 10 años.

Este problema puede deberse a que el cultivo se comercializa en su mayoría como grano. Asimismo, el cultivo es sensible a los factores abióticos como heladas y sequías; inclusive es amenazado y devastado por la presencia de factores bióticos provocados por patógenos externos,

limitando el desarrollo y provocando la muerte de la planta. Como consecuencia, el productor opta por buscar otros cultivos más rentables y con menos problemas fitosanitarios.

## **2.6 Factores abióticos adversos**

Estos factores brindan las condiciones necesarias para la conformación y desarrollo de un ecosistema. En especial el clima es un factor que influye en la producción de cultivos. Por ende, los agricultores viven en la incertidumbre en cuanto a su producción, presentando la necesidad de predecir fechas de siembra adecuadas para evitar el encuentro con heladas o sequías y así obtener buenos rendimientos de sus cultivos.

### **2.6.1 Sequía**

La sequía es un fenómeno natural devastador que afecta directamente a las comunidades agrícolas a nivel mundial, revirtiendo los logros alcanzados en temas de seguridad alimentaria y reducción de pobreza (FAO, 2017). En la agricultura, la sequía se considera cuando la cantidad de humedad del suelo no satisface las necesidades de un cultivo en particular, ocasionando la pérdida de hectáreas sembradas y afectando la posibilidad de que los agricultores recuperen la inversión hecha al cultivo.

La sequía afecta el rendimiento y productividad del haba, debido a la deshidratación celular y a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*); afectando negativamente a las estructuras celulares, lípidos, proteínas, asimilación de CO<sub>2</sub> y al metabolismo de la planta (Siddiqui *et al.*, 2015; Cominelli *et al.*, 2013; Zlatev y Cebola-Lidon, 2012).

No obstante, la planta genera como mecanismo de defensa diversos cambios químicos para contrarrestar los efectos provocados por este factor abiótico tales como la regulación de genes, proteínas y metabolitos (Cominelli *et al.*, 2013). En el caso de la regulación de genes, esta se divide en genes de función primaria (conforman la producción de osmolitos, proteínas y enzimas que eliminan las ROS) y genes de función secundaria (responsables de la producción de

proteínas quinasas, proteínas fosfatasas y proteinasas) (Alamri *et al.*, 2018; Venekamp y Koot, 1998).

## **2.7 Factores bióticos adversos**

El haba es amenazada por la presencia de enfermedades y plagas que disminuyen significativamente el rendimiento del cultivo. Estas se manifiestan por causar daños en las plantas desde la raíz hasta la semilla y su severidad está en función de las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla. Entre los principales factores abióticos que afectan a este cultivo se encuentran las enfermedades de Mancha de Chocolate y Roya.

### **2.7.1 Mancha de chocolate**

La Mancha de Chocolate es producida por el hongo *Botrytis fabae* Sard. la cual es causante de la pérdida de un 20 hasta un 90 % de los cultivos de haba cada año; ya que este hongo puede metabolizar y suprimir a las fitoalexinas producidas por la planta de haba, las cuales son compuestos antimicrobianos que ayudan a limitar la expansión del patógeno (Davidson *et al.*, 2007)

#### **2.7.1.1 Taxonomía**

El hongo *Botrytis fabae* causante de la mancha de chocolate en haba se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Leotiomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotinicaeae

Género: *Botrytis*

Especie: *Botrytis fabae* Sardiña; 1929

### **2.7.1.2 Descripción y morfología (Sánchez-Yupangui, 2019)**

Este hongo produce abundante micelio gris, conidióforos largos y ramificados que portan racimos de conidios ovoides, unicelulares, produciéndose a menudo esclerocios de color negro.

- a) Hifas: son una red de filamentos cilíndricos que conforman la estructura de los hongos multicelulares. Están constituidos por una fila de células alargadas y tubulares, envueltas por una pared celular compuesta de quitina.
- b) Micelio: Se conoce como micelio al conjunto de hifas que forman la parte vegetativa de del hongo. Tienen un tamaño de 12 a 70  $\mu$  de longitud y sus hifas presentan de 4.9 a 15.1  $\mu$  de diámetro. Las ramas con conidióforos surgen por los estomas y a medida que se van desarrollando los conidióforos, va constituyéndose un estroma de color castaño oscuro sobre el que quedan implantados los sucesivos aparatos conidióforos.
- c) Conidióforo: Es la parte del hongo especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Estas miden entre 162 a 231  $\mu$  de longitud, erguidos, con 1 a 3 tabiques en su tronco principal y de 3 a 4 ramas primarias las cuales se ramifican; en sus extremidades se encuentran insertos los conidios, estos conjuntos de conidios tienen un diámetro de entre 38 a 63  $\mu$ .
- d) Conidio: Es una spora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o un conidióforo y sirven para dispersar al hongo a nuevos hábitats.
- e) Esclerocio: Es una masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias para el hongo, la cual le permite sobrevivir a periodos ambientales extremos. Durante las condiciones adecuadas estas germinan dando lugar a un nuevo micelio y poseen la capacidad de producir conidióforos.

### **2.7.1.3 Sintomatología**

La sintomatología de la Mancha de Chocolate varía desde una necrosis menor hasta la destrucción del tejido y frutos de la planta. La enfermedad se presenta en su fase no agresiva

mediante lesiones pequeñas regulares de color marrón-rojizo de aproximadamente 1 a 3 mm de diámetro en las hojas. De acuerdo a las condiciones de humedad y temperatura donde se desarrolle la planta, el hongo puede alcanzar su fase agresiva causando manchas necrosadas color negro en toda la planta; provocando fuertes defoliaciones de hojas, flores y manchas en vainas y semillas (Stoddard *et al.*, 2010).

### 2.7.1.4 Ciclo de vida

El hongo se desarrolla rápidamente, presenta fuerte agresividad a temperaturas entre 18 y 20°C, humedad relativa de 90 a 100%. El ciclo de vida inicia con la germinación de esclerocios que sobreviven en plantas infectadas, desechos de plantas y suelo. Los esclerocios producen micelios los cuales esporulan y forman conidios ramificados o conidióforos, los cuales invaden al tejido sano y son dispersados por el contacto con hojas infectadas, el viento y el agua (Figura 2) (Díaz-Ruiz,2010).

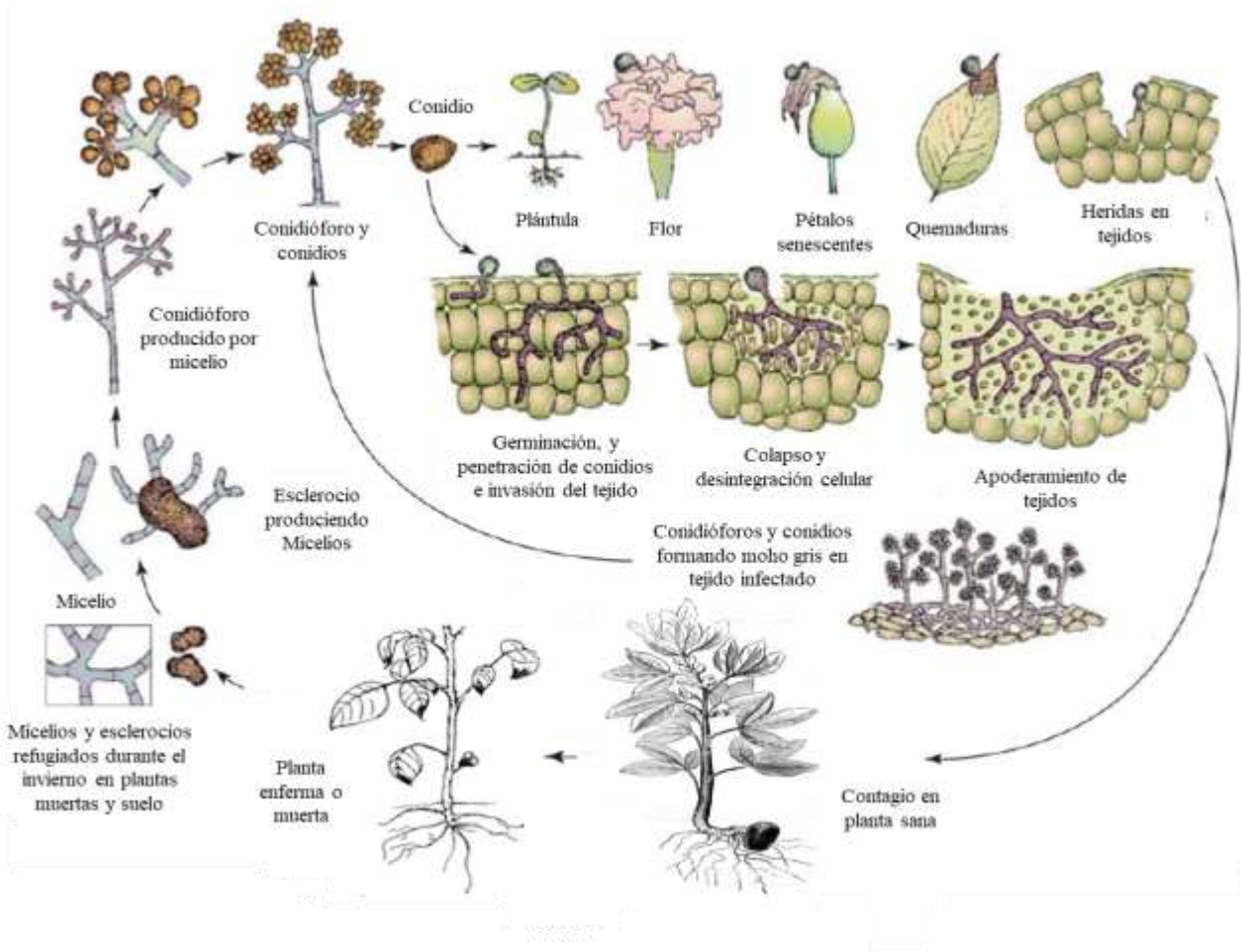


Figura 2. Ciclo de vida del hongo *Botrytis fabae* S.

### 2.7.1.5 Métodos de control

El uso de químicos en la producción agrícola es una manera de controlar la enfermedad, sin embargo ocasionan deterioro ambiental y daño a la salud humana. El control de *Botrytis fabae* se da mediante el uso de pesticidas como Mancozeb, Folpet, Selix o Benomyl (Espinal-Chutara *et al.*, 2010). Asimismo, los sistemas alternos de control comúnmente utilizados son: control biológico, uso de cultivos intercalados (Fernández-Aparicio *et al.*, 2011), búsqueda de variedades resistentes (Sillero *et al.*, 2010), prácticas culturales y biológicas (El-Sayed *et al.*, 2011).

### 2.7.2 Roya

La roya es una de las principales enfermedades que atacan a las regiones productoras del estado de Puebla, presentando daños y pérdidas superiores al 60 % de la producción. Esta es causada por el hongo *Uromyces fabae* Pers. y la infestación se presenta en las etapas vegetativas y reproductivas del haba (Díaz-Ruiz, 2010).

#### 2.7.2.1 Taxonomía

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Subclase: Incertae sedis

Orden: Uredinales

Familia: Pucciniaceae

Género: *Uromyces*

Especie: *Uromyces fabae* Pers., 1875

#### 2.7.2.2 Descripción y morfología

- a) Teliosporas diploides: son esporas que permanecen en reposo durante el invierno, las cuales permiten la emergencia y desarrollo de un basidio.
- b) Basidio: estructura microscópica productora de esporas, donde ocurre la meiosis.
- c) Meiosis: forma de reproducción celular.

- d) Picniosporas: son esporas que se producen en estructuras especiales en forma de copa llamadas picnias o pynidia.
- e) Dicariotización: fenómeno de duplicación de núcleos en los hongos, pasando de células monocarióticas a dicarióticas.
- f) Aeciosporas: encargadas de iniciar la infección en las hojas.
- g) Urediosporas: encargadas de infectar al cultivo de forma progresiva.

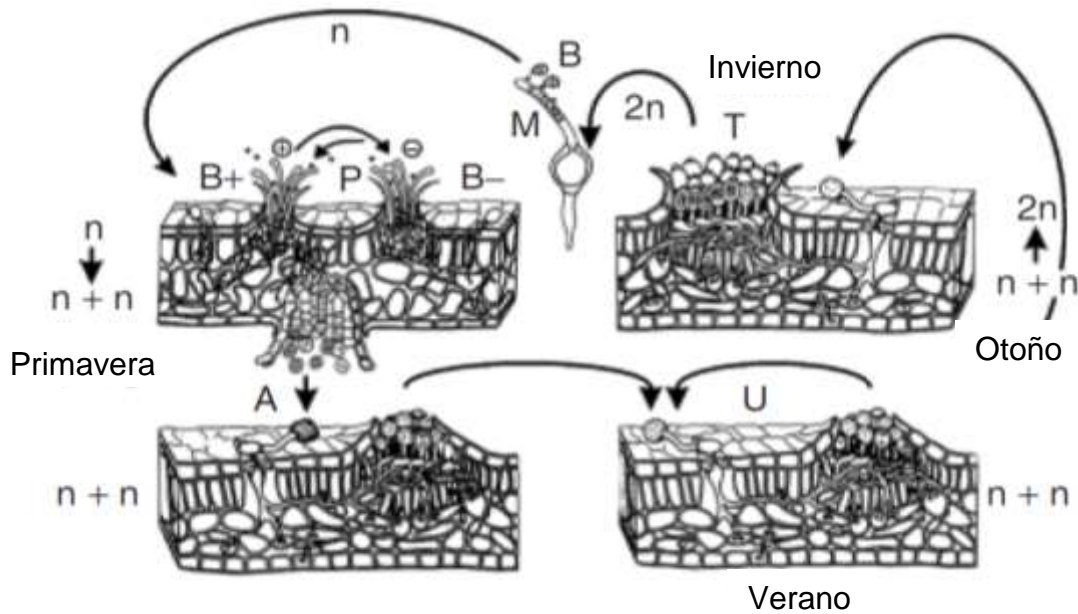
### **2.7.2.3 Ciclo de vida**

Después de pasar el invierno en el material vegetal residual, las teliosporas diploides germinan en la primavera con un metabasidio. Después de la meiosis, esta última produce cuatro basidiosporas haploides con dos tipos de apareamiento diferentes. Estos son expulsados del metabasidio y después de aterrizar en una hoja de un huésped, entran por las estomas, germinando y produciendo estructuras de infección. Se producen picnias que contienen picniosporas e hifas receptoras. Las picniosporas se intercambian entre las picnias y ocurre la espermatización. Posteriormente ocurre una dicariotización produciendo aeciosporas, las cuales germinan e inician la infección de la hoja produciendo urediosporas (forma asexual del hongo) que irán infectando al cultivo de forma progresiva mientras se den las condiciones óptimas de humedad y temperatura. A medida que maduran las plantas o cuando no son favorables las condiciones ambientales, se observarán las teliosporas, las cuales se forman debajo de la epidermis de la hoja, permaneciendo en éstas (restos de cosechas) durante el otoño-invierno, completándose así el ciclo de vida del hongo (Figura 3) (Voegelé, 2006).

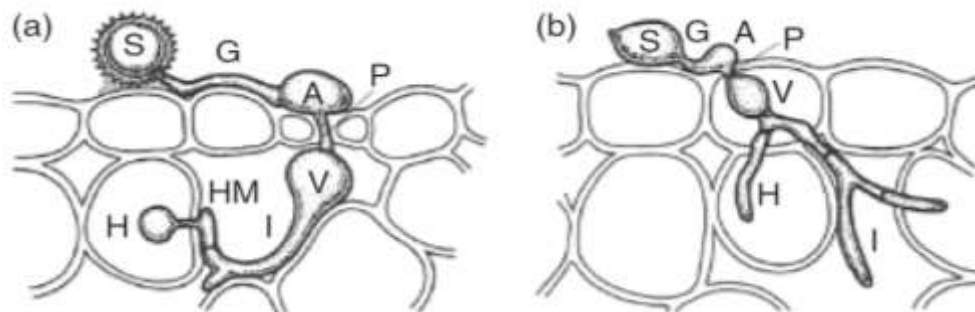
### **2.7.2.4 Mecanismo de infección**

El hongo desarrolla una serie de estructuras de infección que permiten alcanzar el parénquima de la hoja provocando la infección del hospedero. El tubo germinativo de la urediospora se posiciona en la superficie de la cutícula de la planta y posiciona un apresorio sobre un estoma. El hongo penetra dentro de la cámara subestomatal donde produce una vesícula y una hifa de infección (Figura 4a). Sin embargo, las basidiosporas desarrollan estructuras de infección mediante un tubo de germinación corto y con un apresorio poco desarrollado, adhiriéndose a la

cutícula del hospedero, formando un gancho y creciendo a través de la cutícula (Figura 4b). En la epidermis celular, el hongo produce una vesícula intrapidermal y a partir de la hifa se propaga dentro de la hoja. Ambas estructuras de infección pueden ser formadas en ausencia de la planta hospedera (Díaz-Ruiz, 2010).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Uromyces fabae*. Inicia cuando la teliospora (T) diploide ( $2n$ ) germina en la primavera con un metabasidio (M) a partir de cuatro haploides ( $n$ ) son formadas badiosporas (B) de dos tipos de apareamientos distintos (+, -). Picniosporas haploides (P) se intercambian entre picnias de diferente tipo (+, -) en la superficie de la hoja. Posteriormente se genera una espermatización dicarización ( $n+n$ ) formando aeciosporas que son formadas en el envés de la hoja. De las aeciosporas infecciosas se producen urediosporas (U). Al final del verano, de la urediospora se forma una teliospora cerrando el ciclo (Voegelé, 2006).



**Figura 4.** Infección de la hoja ocasionada por a) urediosporas y b) basidiosporas donde: S es la espora; G es el tubo germinativo; A es el apresorio posicionado encima de un estoma; P es la penetración donde se produce una vesícula intrapidermal (V) y una de la hifa de infección (I), HM es la célula madre haustoria; H es un haustorio (Voegelé, 2006).



Los métodos de control comúnmente utilizados son químicos y biológicos, prácticas culturales como densidad de siembra, disponibilidad de nitrógeno y resistencia inducida sistémica (Sillero *et al.*, 2010).

### **2.7.3 Resistencia a enfermedades**

Los cultivos están en constante interacción con patógenos que ponen en juego la supervivencia del cultivo. La planta a su vez tiene que ejercer resistencia mediante mecanismos de defensa para que esta no perezca. El haba presenta contenidos elevados de taninos y fitoalexinas, metabolitos que ayudan a la resistencia a las enfermedades, bacterias e insectos. Sin embargo, cabe mencionar que los mecanismos químicos de defensa llegan a perder su efectividad, por lo que los patógenos llegan a romper dicha resistencia (Díaz-Ruiz, 2010).

#### **2.7.3.1 Defensa de las plantas contra patógenos**

Las plantas presentan mecanismos de defensa para repeler los ataques de organismos herbívoros y patógenos tales como la síntesis de sustancias químicas inorgánicas (*p. ej.* selenio), metabolitos primarios e intermediarios (*p. ej.* ácido cítrico, cisteína) y ciertos aminoácidos, entre otros. Sin embargo, la efectividad de las plantas depende de su estado de desarrollo, pH, estructuras anatómicas de protección, acumulación de metabolitos secundarios, etc.; así como factores ajenos a la planta como la calidad del suelo, calidad del agua, variaciones ambientales, vida de la planta y el patógeno. Durante la defensa química de la planta, ésta realiza un gasto metabólico de producción, que está determinado por una distribución de suministros de metabolitos en la planta (Granados-Sánchez *et al.*, 1989).

#### **2.7.3.2 Distribución de defensas en la planta**

La formación de compuestos secundarios de defensa no se conforma de igual manera en las distintas partes de la planta. Estos compuestos están heterogéneamente distribuidos dentro de la planta. Esta distribución difiere principalmente en su síntesis y degradación o en la translocación de una parte a otra. Las defensas químicas de la planta pueden cambiar según sus necesidades relativas durante su desarrollo y esto va acompañado de las cantidades y distribución de los metabolitos secundarios (Granados-Sánchez *et al.*, 1989). Por ejemplo, en el caso de las hojas viejas (parte basal) contienen menos metabolitos que las hojas jóvenes, por lo que no hay

suficiente protección para todo el tejido de estas hojas. De acuerdo con lo anterior, esto puede explicar por qué en el caso del ataque de la mancha de chocolate en el cultivo de haba, las hojas viejas son más susceptibles que las hojas jóvenes; de igual manera la roya se hace presente en el tercio inferior de la planta, donde inicia la propagación en toda la planta (Díaz-Ruiz, 2010).

### 2.7.3.3 Compuestos químicos de defensa

Los metabolitos secundarios determinan el establecimiento de las relaciones entre diferentes tipos de organismos. Las defensas químicas incluyen alcaloides, piretrinas, rotenoides, isobutalamidas, glicósidos, fitoecdisonas, caraenolidos, saponinas, lactonas, aminoácidos, oxalatos, ácidos grasos, taninos, resinas y compuestos fenólicos, alcoholes aromáticos e inhibidores de proteínas (Granados-Sánchez *et al.*, 1989).

La defensa química de las plantas puede clasificarse de la siguiente manera:

- a) Constitutiva: cuando existen estos metabolitos de defensa desde antes del contacto de la planta con el agente amenazante.
- b) Inducida: cuando la acumulación de metabolitos es provocado por las interacciones físicas entre la planta y el agente amenazante.

Los compuestos químicos pueden almacenarse en toda la planta, los cuales tienen una función específica para la protección de la misma (Cuadro 13). Sin embargo, en el tallo y raíz se encuentran defensas químicas en altas concentraciones como los taninos, flavonoides, estilbenos, tropolones y otros compuestos.

**Cuadro 13.** Principales compuestos químicos más utilizados como defensa en la planta

Compuesto	Localización	Función y producción secundaria
Sesquiterpenlactonas	hojas, tallos y flores	- inapetencia, - sabor amargo - inhiben el crecimiento de insectos y ovoposición de otros
Flavonoides	todas partes de la planta	- Fitoalexinas: microbicidas y fungicidas - Ptericárpanos: microbicidas y fungicidas - Isoflavonoides: funguicida - Flavonoles: tóxicos para insectos

		- Rotenoides: funcionan como insecticidas
<b>Glucósidos Cianogénicos</b>	raíz, flores, tallos, semillas y hojas	- repelentes por su mal sabor - tóxicos especialmente para herbívoros
<b>Taninos</b>	todas partes de la planta	- propiedad astringente (insectos las rechazan) - inhiben la actividad alimenticia - Evitan la acción de las hidrolasas extracelulares de los hongos al secuestrar proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos de la misma planta en tejidos enfermos y células muertas - afectan al metabolismo de los patógenos al secuestrar enzimas esenciales para el hongo - interfieren en la división celular de los patógenos al combinarse con polímeros de la pared celular
<b>Alcaloides</b>	vacuolas de las células de toda la planta	- inhiben el crecimiento de hongos - repelente de insectos por su mal sabor - tóxico y repelente para insectos

Granados-Sánchez *et al.* (1989)

#### 2.7.3.4 Estudios realizados para defensa del haba

En la actualidad se han hecho varios estudios para conocer la iteración química de defensa del haba con respecto a factores adversos bióticos y abióticos. El estudio para conocer la resistencia y defensas del haba generalmente se ha hecho mediante resistencia genética, marcadores moleculares, colecta de variedades cultivadas, evaluación de campo y metabolitos secundarios (Díaz-Ruiz, 2010).

En caso de factores adversos abióticos, se han realizado estudios sobre la adaptación y mecanismos de defensa del haba ante la sequía, son comúnmente estudiados a través de los análisis de metabolitos secundarios (Kabbadj *et al.*, 2017), genética (Ammar *et al.*, 2017) y respuestas fisiológicas de la planta (Ammar *et al.*, 2015).

Para factores adversos bióticos, en el caso de mancha de chocolate se han realizado estudios sobre la propagación, mecanismos de acción y nuevas formas de control, mediante el análisis de metabolitos secundarios (Cimmino *et al.*, 2011), ensayos de campo en múltiples ubicaciones (Villegas-Fernández *et al.*, 2009), uso de encuestas de campo (Sahile *et al.*, 2008) y por

mecanismos de acción genética (Beyene *et al.*, 2007). Para roya se han realizado estudios sobre la resistencia, mecanismos de acción y nuevas maneras de control, mediante evaluaciones de potencial genético (Kumari *et al.*, 2018), colecciones de germoplasma en condiciones de campo (Sillero *et al.*, 2017) y evaluación de nuevos fungicidas (Emeran *et al.*, 2011).

Sin embargo, las metodologías empleadas para el estudio de estos factores adversos se basan en métodos físicos, empleando soluciones químicas, equipos costosos, complejos, difíciles de interpretar y con un tiempo de respuesta extenso. No obstante, en la actualidad la implementación de métodos analíticos basados en la iteración entre la radiación electromagnética y la materia ha sido una estrategia novedosa y eficaz para el estudio del comportamiento de sistemas biológicos; tal es caso del uso de espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica y análisis químico elemental (Barraza-Garza *et al.*, 2013).

#### 2.7.4 Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica de caracterización de materiales, la cual se basa en la absorción de radiación IR por parte de los enlaces moleculares, provocando vibraciones o movimientos específicos para cada molécula.

La absorción de radiación IR se basa en la ley propuesta por Beer-Lambert, también conocida como la ley de Lambert-Beer. Esta ley relaciona la absorción de la luz con las propiedades del material que atraviesa y se puede escribir de la siguiente manera:

$$T = \frac{I_f}{I_0} = 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot [B]}$$

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I_f} = \varepsilon(\lambda) \cdot [B] \cdot L = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right)$$

Dónde:

T = Transmitancia

A = Absorbancia

I<sub>0</sub> = Intensidad de la radiación incidente

$I_t$  = Intensidad transmitida

$\lambda$  = Longitud de onda

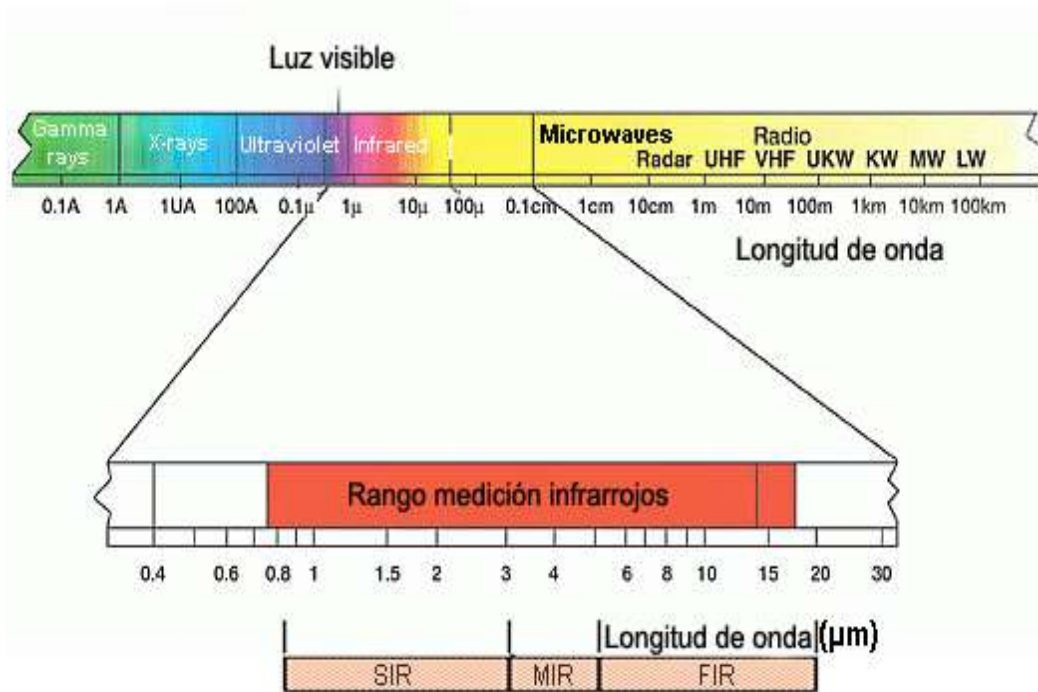
[B] = Concentración molar del analito

L = Longitud atravesada por la luz en el medio

$\epsilon(\lambda)$  = Absortividad molar o coeficiente de extinción molar (cuán fuertemente una sustancia absorbe la luz a una longitud de onda dada por unidad de masa).

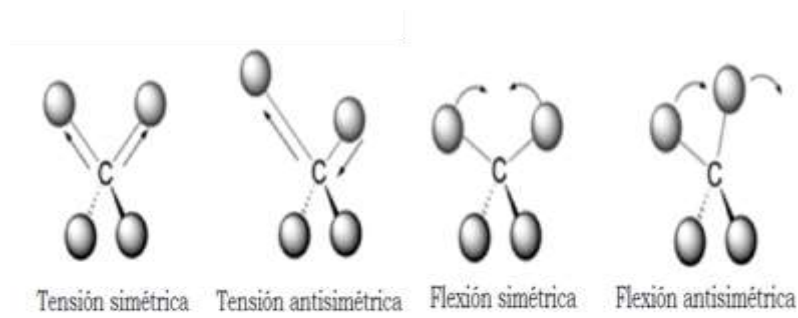
La radiación absorbida tiene características ondulatorias que viajan a la velocidad de la luz y se difiere de acuerdo a su longitud de onda (distancia entre dos crestas de una onda). Esta longitud se representa por la letra griega  $\lambda$  (lambda) y su equivalencia se denota por la velocidad de la luz (c) dividida entre la frecuencia  $\tilde{\nu}$  ( $\lambda = c/\tilde{\nu}$  dada en  $\mu\text{m}$ ). La frecuencia son el número de ciclos ondulatorios que pasan por un punto fijo en un segundo. Donde el inverso de la frecuencia es el número de onda, representado por  $1/\tilde{\nu} = \text{cm}^{-1}$ , siendo esta última utilizada en la representación de los resultados emitidos por la espectroscopía de infrarrojo (Skoog *et al.*, 2009).

La radiación IR forma parte de las radiaciones planteadas en el espectro electromagnético. La cual localiza entre la región del UV-Visible y la región de microondas. La radiación infrarroja se divide generalmente en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio y lejano, llamado así por su relación con el espectro visible. La energía del IR cercano comprende un número de onda entre  $14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 0.7$  a  $2.5 \mu\text{m}$ ), para IR medio comprende  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 2.5$  a  $25 \mu\text{m}$ ) y para IR lejano comprende  $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 25$  a  $1000 \mu\text{m}$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Representación del IR dentro del espectro electromagnético.

Para moléculas diatómicas los movimientos vibraciones generan desplazamiento en los enlaces, los cuales se conocen como vibraciones de tensión o flexión (Barraza-Garza *et al.*, 2013). Donde las tensiones provocan estiramiento o estrechamiento del enlace y las flexiones generan la deformación del enlace; si el número de átomos que forma un enlace es de tres o más, los movimientos pueden presentarse como simétricos o asimétricos. Los movimientos simétricos se caracterizan porque los enlaces se desplazan en direcciones contrarias y los movimientos asimétricos se caracterizan por un movimiento en la misma dirección o sentido (Figura 6).

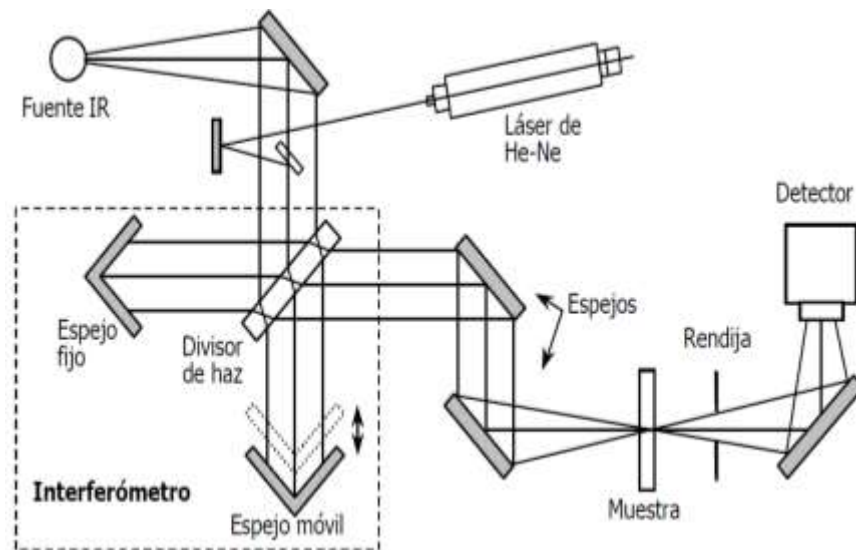


**Figura 6.** Vibraciones de tensión y flexión de enlaces moleculares (Barraza-Garza *et al.*, 2013).

### 2.7.4.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

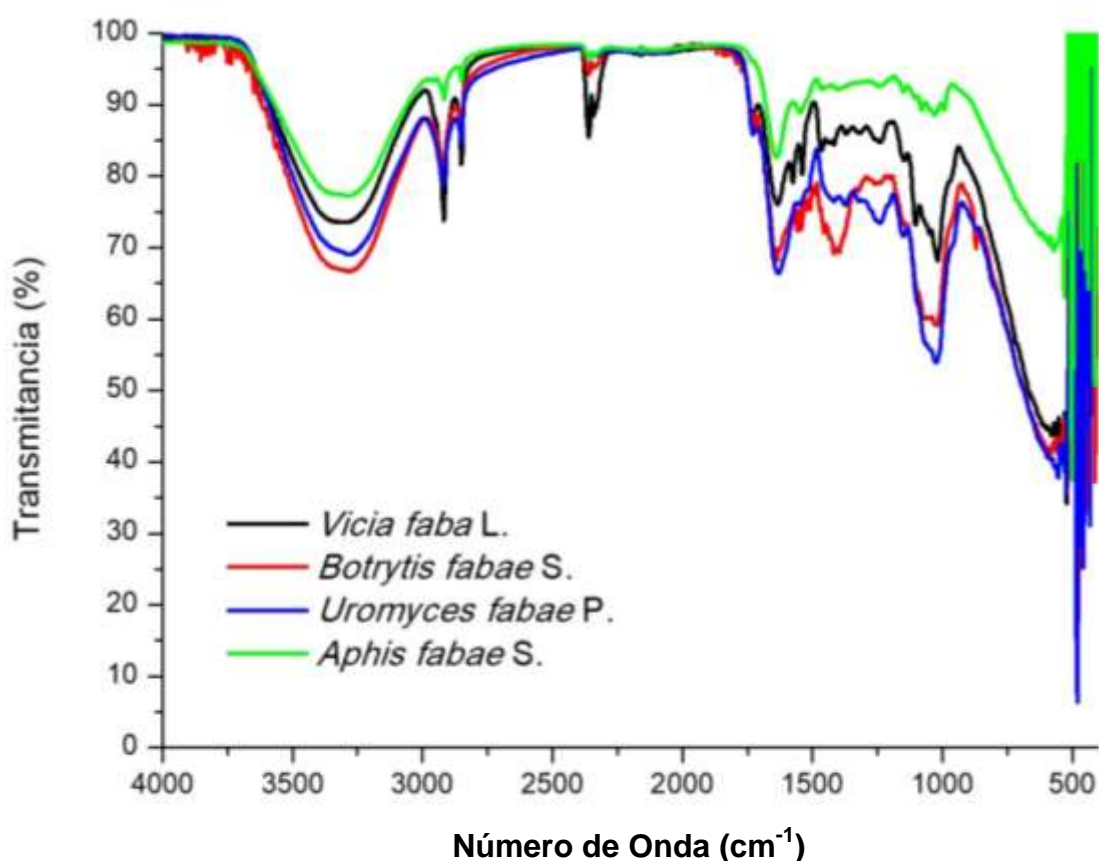
Un espectro infrarrojo convencional se compone de una fuente de luz infrarroja, componentes ópticos (espejos, lentes, divisores de luz, entre otros) constituidos por materiales adecuados no absorbentes en el IR (sales KBr o NaCl) y un fotodetector sensible a la luz IR. La fuente de luz IR es un filamento que se mantiene al rojo vivo mediante el paso de corriente eléctrica, alcanzando la temperatura correspondiente a un cuerpo negro.

Los espectrofotómetros infrarrojos más modernos son del tipo FTIR. Su sistema óptico esencial y lo que lo diferencia es un interferómetro de Michelson que está formado por divisor de haz y dos espejos (uno fijo y uno móvil). Cuando la luz colimada procedente de la fuente incide sobre el divisor del haz, se divide en dos rayos que se reflejan en cada uno de los espejos y vuelven al divisor de haz, donde se recombinan y del interferómetro para ser conducidos por los espejos a través de la muestra y hasta el detector. El objeto de dividir el haz es conseguir la interferencia de los dos rayos de luz infrarroja que recorren distancias distintas. Esta diferencia de distancia se regula con la posición del espejo móvil. Proporciona a su vez una ventaja debido a su rapidez en la adquisición del espectro y adquiere simultáneamente todos los componentes de la frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ ) del espectro, permitiendo obtener un gran número de espectros de diferentes muestras en poco tiempo (Figura 7) (UPO, 2019).



**Figura 7.** Funcionamiento de espectrofotómetro FTIR (UPO, 2019).

El análisis de una muestra promueve de un interferograma o también llamado espectro de absorción infrarrojo, el cual proporciona información acerca de la estructura y concentración molecular en el rango del infrarrojo medio ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ). Todas las moléculas manifiestan una serie de bandas o picos de absorción, la cual cada una corresponde a una vibración de un enlace específico dentro de la molécula. Las bandas de absorción pueden ser divididas en dos regiones principales: la región que comprende  $4000-1450 \text{ cm}^{-1}$  donde vibran la mayoría de las muestras analizadas y  $1450-400 \text{ cm}^{-1}$  donde se emiten las señales únicas y características de cada muestra o también llamada “huella dactilar” (Figura 8).



**Figura 8.** Espectro FTIR obtenido en modalidad de Transmitancia de *Vicia faba L.* en comparación con FTIR de factores bióticos más agresivos para el cultivo.

Cada banda localizada en determinado número de onda corresponde a la presencia de grupos funcionales correspondientes a un compuesto específico presente en cada muestra. Sin embargo, en ocasiones, la presencia de un grupo funcional puede localizarse en una o más bandas en distintas frecuencias o números de onda (Cuadro 14).



**Cuadro 14.** Bandas de absorción FTIR y su asignación a grupos funcionales de *Vicia faba* L. (Mecozzi y Sturchio, 2017)

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
3350-3450	O-H perteneciente a carbohidratos, proteínas y polifenoles
3200-3250	NH <sub>2</sub> perteneciente a los aminoácidos
3010-3020	C-H de los grupos alquenos
3020-3060	C-H de los anillos aromáticos
2850-2950	CH – CH <sub>2</sub> de grupos aromáticos
2100-2500	enlaces C=C y C≡C
1730-1740	C=O éster de los ácidos grasos
1700-1715	C=O ácidos grasos
1620-1670	C=O Amida I
1670	giro β perteneciente a la Amida I
1650	α-hélice perteneciente a la Amida I
1635	lamina β perteneciente a la Amida I
1625-1630	Amida I (desnaturalización de proteínas)
1540-1550	C-N Amida II
1510	Lignina
1400-1460	Estiramiento del enlace –C=O del carbonato inorgánico
1350-1440	Flexión del enlace C-H de grupos alifáticos
1240-1340	C-N Amida III
1120-1160	C-O-C de polisacáridos en ADN y ARN
1085-1080	P=O fosfolípidos en ADN y ARN
1080-1060	C-O de carbohidratos en ADN y ARN
900-800	C=C, C=N, C-H del ADN y ARN

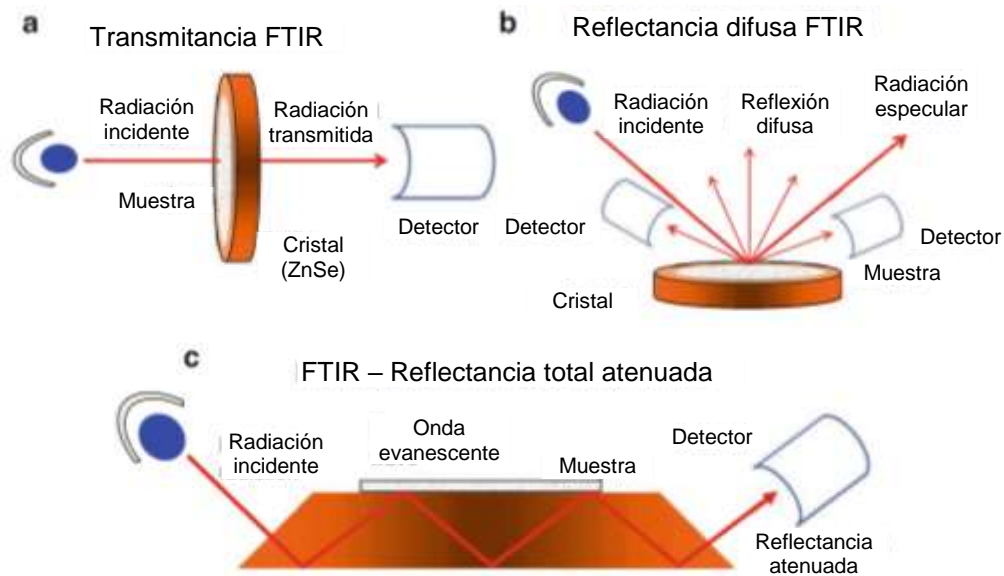
El FTIR tiene la capacidad de trabajar en distintas modalidades, en la cual generalmente se elige el modo de trabajo dependiendo del tipo de muestra a analizar (Alvarez-Ordóñez y Prieto, 2012).

En la espectroscopía FTIR en la modalidad de Transmitancia, la muestra es colocada en la trayectoria del haz IR, es atravesada por el haz y esta última escaneada por el detector; es utilizada para el estudio de muestras húmedas, líquidas y sólidas (Figura 9 a).

En espectroscopía FTIR por reflectancia difusa (DRIFT por sus siglas en inglés), el haz IR es proyectado hacia la muestra, donde esta es reflejado, dispersado y transmitido a través de la

muestra. La parte de la radiación dispersada de manera difusa dentro de la muestra y regresado al detector óptico es considerada como reflexión difusa. Esta técnica es utilizada preferentemente para el análisis de muestras biológicas liofilizadas (Figura 9 b).

En espectroscopía FTIR por reflexión total atenuada (ATR por sus siglas en inglés), la muestra es colocada dentro de un cristal ópticamente denso de índice de refracción alto y necesita poca o nula preparación en la muestra. El haz IR es reflejado desde la superficie interna del cristal y crea una onda evanescente, que se extiende más allá de la superficie del cristal y la cual se proyecta hacia la muestra en contacto con el cristal ATR. Parte de la energía de la onda es absorbida por la muestra y la radiación reflejada al detector que se encuentra en la salida del cristal (Figura 9 c).



**Figura 9.** Modalidades empleadas por FTIR donde a) Transmisión, b) Reflectancia difusa, c) Reflectancia total atenuada.

Se ha demostrado que mediante esta técnica FTIR es posible determinar el contenido de sustancias y compuestos biológicos como proteínas, carbohidratos y lípidos en células (Wagner *et al.*, 2013), la calidad de diferentes tipos de aceites (Chen *et al.*, 2018), los efectos de fertilización por Nitrógeno (N) en solanáceas de especies *Physalis L.* (Leite *et al.*, 2018), los cambios químicos provocados por alteraciones de humedad, envejecimiento y temperatura en el cultivo de trigo (Aghababaei *et al.*, 2017), el contenido de ácidos grasos en arroz (Genkawa *et al.*, 2016), los cambios moleculares producidos por contaminantes como arsénico

en el cultivo de haba (Mecozzi y Sturchio, 2017), el cambio en la estructura de la proteína en las raíces de haba para su potencial aplicación como pesticida (Mecozzi y Sturchio, 2015), entre otros.

### **2.7.5 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional. El SEM es capaz de generar imágenes mediante el impacto de un haz de electrones de alta energía, la cual produce señales que son detectadas por el equipo. Estas señales proveen información acerca de la topografía, composición y conductividad eléctrica de la muestra. El microscopio posee un poder de resolución muy elevado que va desde los x10 aumentos hasta los x50,000 aumentos lo que permite observar detalles de aproximadamente 10 nm. Posee una profundidad de campo (distancia por delante y por detrás del punto enfocado que aparece con nitidez en una foto) mayor a la del microscopio óptico, por lo que permite la obtención de imágenes perfectamente enfocadas de objetos tridimensionales (Quintana-García, 2011).

#### **2.7.5.1 Preparación de la muestra (Quintana-García, 2011)**

La preparación de la muestra depende de diversos factores: el tipo de muestra a analizar, el tipo de observación que se desea hacer (morfología, análisis composicional o microanálisis), la resolución que se desea alcanzar y el tipo de microscopio a utilizar (microscopio ambiental, alta resolución o convencional).

En el SEM se pueden utilizar muestras pulverizadas o macizas pero siempre sólidas. Para alcanzar una resolución específica depende del tamaño de la cámara, la distancia entre el detector y la muestra; para ello se manejan portamuestras generalmente circulares de media pulgada de diámetro a una pulgada, dependiendo del tamaño de muestra.

Para muestras húmedas blandas es necesaria la deshidratación previa de la misma, así mismo para muestras biológicas. Para muestras rígidas como minerales o metales bastará con secarlas con aire o estufa.

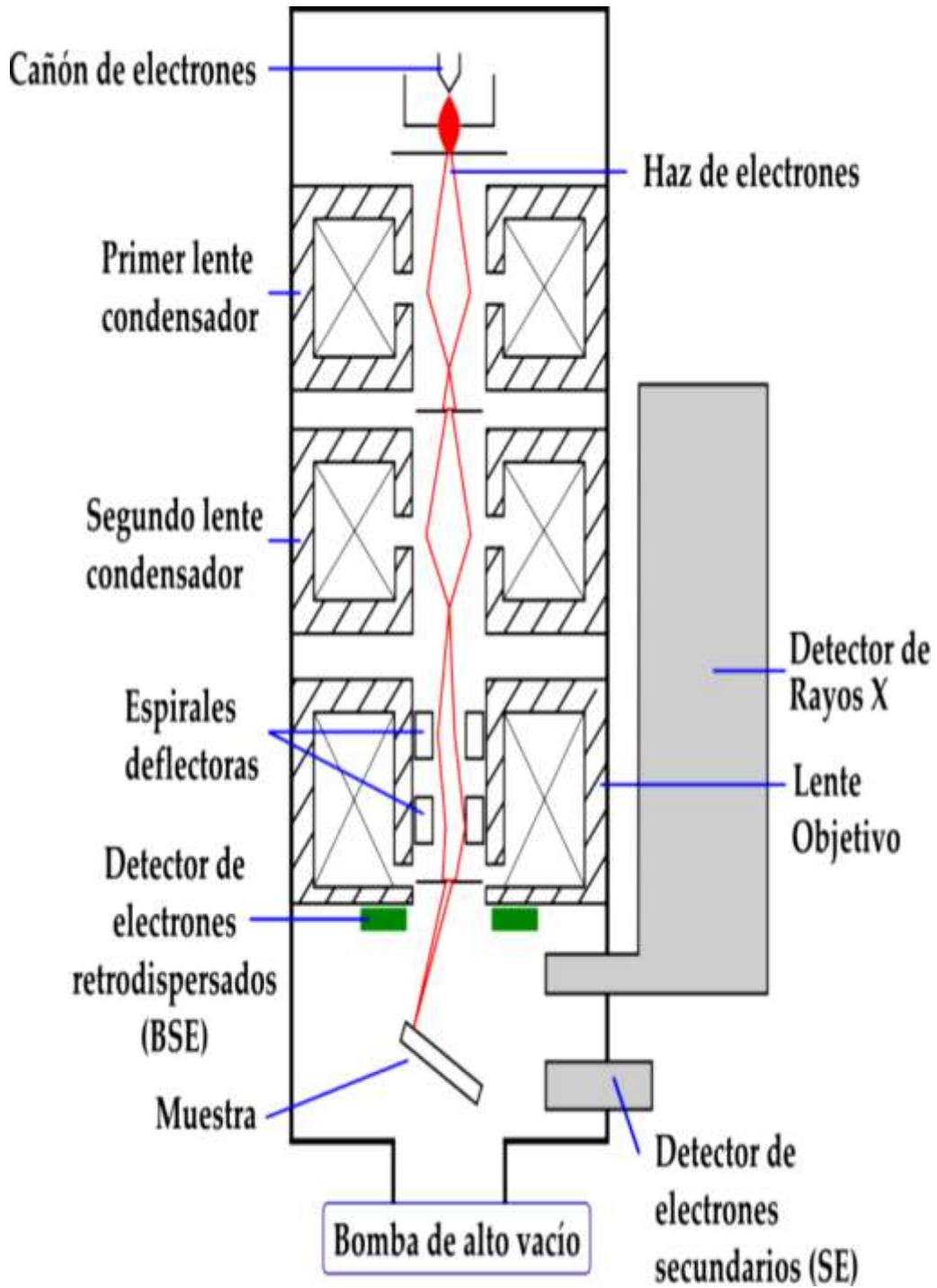
La conductividad eléctrica de una muestra es importante, debido a que para observar una superficie es necesario que la misma sea conductora de electricidad. Sin embargo, si un material no lo es por su naturaleza, es necesario recubrir esta superficie con una película muy fina de material conductor, generalmente oro o grafito con unos pocos nanómetros de espesor.

En ocasiones durante la observación, las muestras no soportan la energía que reciben del haz por su descomposición por el calor, lo cual causa problemas en la observación y degradación de la muestra en su morfología y composición. Esto generalmente ocurre en superficies poliméricas y películas delgadas.

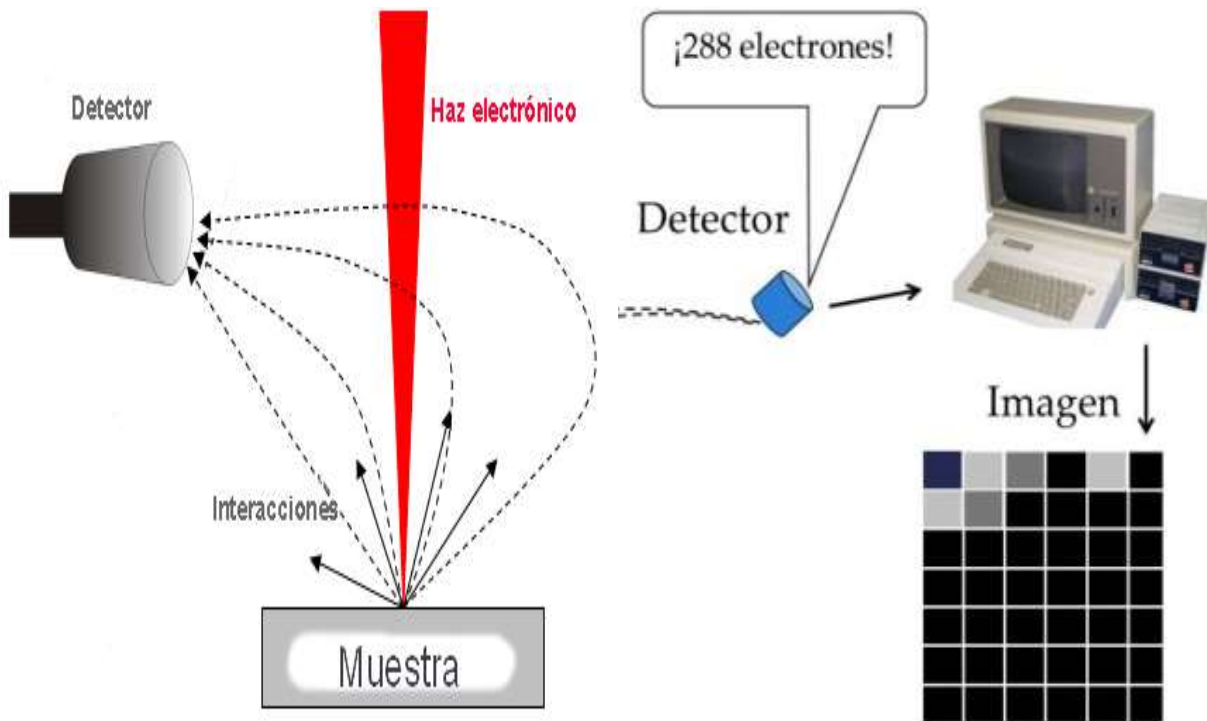
### **2.7.5.2 Funcionamiento del SEM**

Se basa mediante la incidencia de un haz de electrones de alta energía (electrones primarios generados por el calentamiento de un filamento de tungsteno) sobre la muestra, utilizando un sistema de lentes electromagnéticas para focalizar el haz a la zona de interés. El impacto generado por los electrones primarios y la muestra, producen electrones secundarios (SE por sus siglas en inglés *Secondary Electrons*) y retrodispersados (BSE por sus siglas en inglés *Backscattered Electrons*) los cuales rebotan de la muestra y son percibidos por un detector. El detector registra la cantidad de electrones y los convierten en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, construyendo la imagen. Cabe destacar, que el interior del equipo durante el análisis se debe de tener una atmosfera inexistente (alto vacío) para evitar obtener interferencias en la imagen (provocadas por la iteración entre los electrones primarios con las moléculas del aire) (Figura 10) (Clavijo, 2013).

Los electrones secundarios y retrodispersados proporciona información diferente de cada muestra. Los *SE* son generados por la colisión de los electrones primarios con los átomos superficiales de la muestra y proveen información de la morfología de la muestra. Sin embargo, los electrones *BSE* son electrones que inciden en el interior de la muestra, proporcionando información acerca de la composición química de la muestra (Figura 11).



**Figura 10.** Representación gráfica del equipo y funcionamiento del SEM (Clavijo, 2013).



**Figura 10.** Bombardeo de electrones primarios e identificación de electrones secundarios para la formación de la imagen.

### 2.7.5.3 Análisis Químico Elemental (EDS)

Esta técnica permite detectar los rayos X emitidos por los electrones primarios originados por el SEM. De igual manera, permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos de manera puntual o por mapeo elemental sobre la superficie de la muestra. La concentración elemental es manejada en unidades de % en peso y son representados en forma de picos en graficas o espectros EDS (Chávez-Rivas *et al.*, 2014).

Se ha demostrado el uso del SEM-EDS para estudios de residuos de cultivos de arroz, paja, maíz y trigo para la producción de larvas *Tenebrio molitor* L. para consumo de insectos (Shan-Shan *et al.*, 2019), la evaluación de nutrientes ante la exposición de contaminantes en el cultivo de arroz (Singh *et al.*, 2018), en la obtención de carbón vegetal para la eliminación de metales pesados (Sun *et al.*, 2014), para la evaluación fisiológica y molecular de cultivos ante la presencia de metales pesados (Prabhat *et al.*, 2019).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal y siembra**

Fue utilizada una variedad de haba criolla de semilla color amarillo perteneciente al grupo botánico equina. La investigación se desarrolló en el invernadero del colegio de Postgraduados Campus Puebla, el cual se localiza entre los paralelos 19°04'26.9" latitud N y 98°15'40.8" longitud O. La siembra se llevó a cabo en macetas de plástico con capacidad de 6 kg, las cuales fueron llenadas con suelo agrícola, fueron colocadas 2 semillas por maceta a una profundidad de 3 cm. Los riegos fueron aplicando un litro de agua cada tercer día. Después de la emergencia, se aplicó una solución a base de jabón para evitar cualquier tipo de contaminación por plagas o enfermedades.

##### **3.1.1 Solución a base de jabón**

Se utilizó jabón potásico marca Zote<sup>®</sup> debido a su capacidad para controlar plagas sin contaminar ni generar problemas de toxicidad. Se pesaron 20 g de jabón diluyéndolo en 1 litro de agua a una temperatura de 50°C con agitación constante durante 10 min. La solución se vertió en una botella de plástico con aspersor y se evitó la presencia de grumos no disueltos.

#### **3.2 Obtención de inóculos**

Plantas infectadas con *Botrytis fabae* y *Uromyces fabae* fueron obtenidas de un cultivo de haba sembrado en campo perteneciente al Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Serdán cuyas coordenadas son 18°59'59.3" latitud N y 97°27'53.1" longitud O. Las plantas se trasplantaron en macetas de plástico llenadas con suelo agrícola, fueron regadas y llevadas tanto al laboratorio e invernadero para su conservación de los patógenos, de esta manera se obtuvo el inóculo para infectar plantas que sirvieron para estudiar el ciclo de infección de cada uno de ellos en haba.

##### **3.2.1 Reproducción de inóculos**

###### **3.2.1.1 Reproducción por medio de cultivo**

Para *Botrytis fabae* y *Uromyces fabae* se utilizó Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés).

- I. Se disolvieron 39 g del medio de cultivo en un litro de agua purificada a 100 °C y con agitación constante hasta alcanzar el punto de ebullición durante un minuto.
- II. La solución se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- III. Se vertieron 20 ml de agar en cajas Petri de vidrio estéril y se dejaron enfriar por 1 hora.
- IV. Hojas infectadas fueron sumergidas en alcohol al 70% por 30 segundos, trasladándolas en agua destilada por 20 segundos y dejándolas secar sobre papel filtro.
- V. Se realizaron cortes de diferente tamaño en zonas donde se presentaba enfermedad y posteriormente fueron sembradas en las cajas Petri con agar, selladas con Parafilm® e incubadas a 37 °C durante 48 horas.

### **3.2.1.2 Reproducción por contacto**

Para *Botrytis fabae* y *Uromyces fabae* se utilizaron hojas de haba portadoras de la enfermedad, éstas se frotaron directamente en hojas y tallos de plantas sanas. Las plantas contaminadas se separaron de las sanas, sacándolas del invernadero y llevándolas a traspatio. Asimismo, se colocaron bajo malla negra, a riego constante y manteniendo la humedad del lugar.

### **3.3 Análisis *Botrytis fabae***

Para el análisis se utilizaron 8 plantas inoculadas con distintos grados de daño en sus hojas y sus respectivos testigos. Se denominaron los grados de daño como: zona verde para la parte sana de la hoja, zona amarilla para el inicio del daño de la enfermedad, zona roja para la fase agresiva del patógeno y la zona necrosada para la fase destructiva del tejido causado por el hongo. Todas las zonas se analizaron por espectroscopía FTIR y SEM - EDS. Así mismo, los resultados se sometieron a un análisis de conjunto de datos para conocer de forma más precisa el comportamiento de la planta ante la enfermedad.

### **3.4 Análisis *Uromyces fabae***

Para el análisis se utilizaron 12 plantas inoculadas con distintos grados de daño en sus hojas y sus respectivos testigos. Se denominaron los grados de daño como: zona verde para la parte sana de la hoja, zona amarilla para el inicio del daño de la enfermedad y zona roja para la fase agresiva del patógeno. Las zonas se sometieron al análisis por espectroscopía FTIR y SEM - EDS. Los resultados fueron examinados mediante un análisis de conjunto de datos para conocer el desarrollo de la enfermedad en la planta.



### **3.5 Simulación de estrés por sequía**

Fue establecido un experimento en el mes de Mayo y un segundo en el mes de Octubre de 2018. En cada uno de ellos, las plantas se mantuvieron en crecimiento hasta alcanzar una etapa fenológica de 8 hojas desplegadas y evitando cualquier tipo de contaminación por plaga o enfermedades. Se utilizaron un total de 35 plantas para tratamientos divididas en 4 grupos de 5 macetas para el primer experimento y 3 grupos de 5 macetas para el segundo, todos los tratamientos con su respectivo testigo. En los dos experimentos se trabajó con periodos de 10, 15, 20, 25 y 30 días de sequía, evitando el riego durante cada periodo y sometiendo a los testigos a riego constante. De cada maceta se eligió la planta con la etapa fenológica antes mencionada, denominando a la segunda hoja desplegada como hoja madura y a la octava hoja desplegada como hoja joven. La parte central del foliolo lateral derecho y la parte central de la raíz principal de cada planta se sometieron a análisis por espectroscopia FTIR. Asimismo, para cada resultado se realizó un análisis de conjunto de datos para conocer de forma el comportamiento químico de estas partes de la planta en cada periodo de sequía.

### **3.6 Espectroscopía FTIR**

Cada espectro infrarrojo fue obtenido mediante el modo de Transmitancia usando un espectrofotómetro marca BRUKER modelo VERTEX 70, equipado con un accesorio de cristal de diamante utilizado para generar *Background* espectroscópico. La obtención del espectro fue trabajado en la región del infrarrojo medio que comprende un número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 8 escaneos para cada muestra a una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.7 Análisis de conjunto de datos**

Los datos de los espectros infrarrojos de cada muestra fueron guardados en formato DPT y organizados en Excel (versión 2010) para Windows. Los espectros fueron graficados con el programa Origin Pro 8, realizando acercamientos precisos a cada una de las bandas de absorción, obteniendo los valores de Transmitancia de cada pico. Para conocer el comportamiento de las frecuencias durante cada periodo de sequía, los valores de Transmitancia fueron promediados y graficados en Excel.

## **3.8 Microscopía Electrónica de Barrido**

### **3.8.1 Especificaciones del equipo**

Para cada análisis se utilizó un microscopio electrónico de barrido Marca JEOL modelo JSM-6610 LV; equipado con un cañón de filamento de wolframio, con posibilidad de funcionamiento en alto y bajo vacío, con una resolución teórica de 3 nm (nanómetros) permitiendo obtener micrografías por encima de los x50000 aumentos y dotado con detectores de electrones secundarios y retrodispersados para la obtención de imágenes morfológicas y composicionales.

### **3.8.2 Preparación de la muestra**

Se realizaron cortes de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> en hojas donde se presentaba enfermedad y fueron fijadas con cinta metálica adherente sobre un portamuestras de acero inoxidable. Asimismo, sabiendo que las muestras son poco conductoras de electricidad, se realizó recubrimiento con una capa conductora a base de partículas de oro, mediante el uso de un equipo de recubrimiento de oro marca Balzers modelo SCD 004. Para evitar alteraciones en las imágenes, las muestras se estudiaron mediante la implementación de alto vacío y se realizaron acercamientos de acuerdo con las necesidades de estudio en cada muestra.

### **3.8.3 Análisis químico elemental**

Se realizó mediante un equipo marca Inca energy-350 de la casa Oxford Instruments, con detector de rayos X modelo X-Max 50, de 50 mm<sup>2</sup> y con una resolución teórica de 127 eV a la energía del pico K del Mn. En este análisis mediante el uso del cursor guiado por el ratón de computadora y haciendo clic en la imagen emitida por el SEM, se realizó la sección del punto o zonas de interés. Asimismo, se obtuvo de forma inmediata y precisa la composición química elemental de esos puntos y zonas, de manera cualitativa y cuantitativa a nivel superficial con una resolución espacial del orden de una micra. De la misma manera, el software permitió obtener una imagen composicional de la superficie estudiada en forma de espectros de emisión de rayos X, lo que permitió visualizar los elementos químicos y hacer el análisis cuantitativo a nivel de concentración porcentual de cada punto o zona de estudio.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 *Botrytis fabae*

#### 4.1.1 Espectroscopía FTIR

La obtención de cada espectro infrarrojo permitió observar las vibraciones moleculares representadas por bandas en distintas frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ), las cuales corresponden a la presencia de grupos funcionales atribuidos a la formación de diversos compuestos. Asimismo, se observa la variación de intensidad de dichos compuestos característicos a las distintas etapas de avance de la enfermedad o también conocidas como zonas de daño.

El enlace C-H se caracterizó por la presencia de quince bandas, las cuales cinco corresponden a la formación de Amida III en las frecuencias:  $1319 \text{ cm}^{-1}$  (Zhu *et al.*, 2005),  $1317 \text{ cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2005),  $1315 \text{ cm}^{-1}$  (Al-Kadhemy *et al.*, 2016) y  $1259 \text{ cm}^{-1}$  (Cai y Singh, 1999); tres bandas correspondientes a lípidos en  $2918\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$  (Leite *et al.*, 2018) y  $1462 \text{ cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013); dos bandas correspondientes a prolina en  $1436 \text{ cm}^{-1}$  (Kher *et al.* (2007) y  $1338 \text{ cm}^{-1}$  (Jian-Hua *et al.*, 2011); dos bandas correspondientes a carbohidratos de la celulosa y hemicelulosa en  $1369 \text{ cm}^{-1}$  (Jung *et al.*, 2018) y  $1363 \text{ cm}^{-1}$  (Sharma y Uttam, 2017; Dai y Fan, 2011); una banda correspondiente a pentosas en  $1471 \text{ cm}^{-1}$  (Dudek *et al.*, 2019), una banda correspondiente a lignina en  $1458 \text{ cm}^{-1}$  (Sharma y Uttam, 2017), una banda correspondiente a Pectina en  $1442 \text{ cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013) y una banda correspondiente a la Citosina en  $1375 \text{ cm}^{-1}$  (Veronezi *et al.*, 2017).

De acuerdo con cada zona de daño, la variación en intensidad de Transmitancia puede aumentar o disminuir con respecto al testigo. En la zona amarilla se presentó un aumento del 44.83 % en la producción de pectina ( $1442 \text{ cm}^{-1}$ ), así como una disminución de lípidos del 20.53 % ( $2850 \text{ cm}^{-1}$ ). La zona roja correspondiente a la fase agresiva del patógeno presentó aumento de 21.07% en la producción lipídica ( $2918 \text{ cm}^{-1}$ ), sin presentar disminución de los demás compuestos detectados. De igual manera en la zona necrosada definida como fase destructiva se registró aumento del 33.03 % en la producción lipídica correspondiente a la frecuencia  $1462 \text{ cm}^{-1}$  y disminución del 22.1% en  $2850 \text{ cm}^{-1}$  del mismo compuesto.

Por otro lado, la producción de Amida III fue registrada únicamente en la zona amarilla en la frecuencia 1317  $\text{cm}^{-1}$ , en la zona roja, los compuestos pentosa, citosina, prolina, lignina (1458  $\text{cm}^{-1}$ ), carbohidratos (1363  $\text{cm}^{-1}$ ) y Amida III (1319 y 1259  $\text{cm}^{-1}$ ) fueron localizados solamente en dicha zona (Cuadro 15).

**Cuadro 15.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C-H correspondientes a *Botrytis fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Variación Zona amarilla	Variación Zona roja	Variación Zona necrosada
2918	Lípidos	68.67	9.39	-21.07	13.20
2850	Lípidos	63.61	20.53	-11.86	22.10
1471	Pentosas	--	--	* 80.24	--
1462	Lípidos	76.87	-12.68	--	-33.03
1458	Lignina	--	--	* 77.20	--
1442	Pectina	87.45	-44.83	--	--
1436	Prolina	--	--	* 77.29	--
1375	Citosina	--	--	* 78.79	--
1369	Carbohidrato	76.11	-1.89	--	--
1363	Carbohidrato	--	--	* 79.18	--
1338	Prolina	--	--	* 80.06	--
1319	Amida III	--	--	* 79.94	--
1317	Amida III	--	* 53.29	--	--
1315	Amida III	86.68	--	--	--
1259	Amida III	--	--	* 39.68	--

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo.

El enlace C=O se caracterizó por la presencia de catorce bandas, las cuales ocho pertenecen a la presencia del enlace peptídico Amida I, perteneciente a la conformación de estructuras secundarias  $\alpha$ -Hélice y lamina  $\beta$  de la proteína en las frecuencias: 1699  $\text{cm}^{-1}$  (Motoyama *et al.*, 2018; Sharma y Uttam, 2017), 1683  $\text{cm}^{-1}$  (Motoyama *et al.*, 2018), 1668  $\text{cm}^{-1}$  (Motoyama *et al.*, 2018), 1652  $\text{cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013; Movasagui *et al.*, 2008), 1647  $\text{cm}^{-1}$  (Tesar *et al.*, 2017), 1635  $\text{cm}^{-1}$  (Mecozzi y Sturchio, 2015), 1625  $\text{cm}^{-1}$  (Sureka *et al.* (2005), 1618  $\text{cm}^{-1}$  (Tesar *et al.*, 2017); dos bandas correspondientes a la lignina en 1593  $\text{cm}^{-1}$  (Cornet *et al.*, 2018; Barraza-Garza *et al.*, 2013) y 1508  $\text{cm}^{-1}$  (Sharma y Uttam, 2017; Timar *et al.* 2016); dos bandas

atribuidas a la presencia de CO<sub>2</sub> en 2360 – 2340 cm<sup>-1</sup> (Leng y Hall, 2019) y una banda en 1732 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la oxidación proteica en 1732 cm<sup>-1</sup> (Mecozii y Sturchio, 2015). Asimismo, en la zona amarilla se presentó un aumento en la Amida I del 39.74 % en la frecuencia 1635 cm<sup>-1</sup>. La zona roja presentó aumento en la degradación de proteínas de 32.58 % y una disminución de la presencia de CO<sub>2</sub> de ambas frecuencias. La zona necrosada presentó aumento de la presencia de CO<sub>2</sub> de ambas frecuencias y una disminución en la degradación proteica.

Por otra parte, las purinas, lignina y siete frecuencias correspondientes a la Amida I son producidas únicamente durante la fase agresiva de la enfermedad. La lignina perteneciente a la frecuencia 1593 cm<sup>-1</sup> fue característica únicamente de la zona necrosada de la hoja (Cuadro 16)

**Cuadro 16.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C=O correspondientes a *Botrytis fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Variación Zona amarilla	Variación Zona roja	Variación Zona necrosada
2360	CO <sub>2</sub>	36.94	-13.12	22.76	-13.80
2340	CO <sub>2</sub>	36.97	-12.94	23.12	-13.51
1732	O. Proteínas	84.81	-0.03	-32.58	3.63
1716	Purinas	--	--	* 84.84	--
1699	Amida I	--	--	* 84.58	--
1683	Amida I	--	--	* 81.49	--
1668	Amida I	--	--	* 47.05	--
1652	Amida I	--	--	* 71.19	--
1647	Amida I	--	--	* 71.02	--
1635	Amida I	78.86	-39.74	-34.80	--
1625	Amida I	--	--	* 72.03	--
1618	Amida I	--	--	* 72.48	--
1593	Lignina	--	--	--	* 78.75
1508	Lignina	--	--	* 79.90	--

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo.

El enlace N-H se caracterizó por la presencia de cinco bandas, las cuales pertenecen al enlace peptídico Amida II, perteneciente a la conformación de estructuras secundarias α-Hélice y

lamina  $\beta$  de la proteína en las frecuencias:  $1577\text{ cm}^{-1}$  (Motoyama *et al.*, 2018; Abidi *et al.*, 2008),  $1570\text{ cm}^{-1}$  (Zhu *et al.*, 2005),  $1558\text{ cm}^{-1}$  (Sharma y Uttam, 2017),  $1541\text{ cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013; Sharma y Uttam, 2017),  $1521\text{ cm}^{-1}$  (Wu *et al.*, 2019; Motoyama *et al.*, 2018; Sharma y Uttam, 2017; Barraza-Garza *et al.*, 2013). Presentándose estas frecuencias únicamente en la zona roja (Cuadro 17).

**Cuadro 17.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace N-H correspondientes a *Botrytis fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Variación Zona amarilla	Variación Zona roja	Variación Zona necrosada
<b>1577</b>	Amida II	--	--	* 76.61	--
<b>1570</b>	Amida II	--	--	* 62.25	--
<b>1558</b>	Amida II	--	--	* 75.99	--
<b>1541</b>	Amida II	--	--	* 76.87	--
<b>1521</b>	Amida II	--	--	* 79.40	--

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo.

El enlace O-H se presentó en la frecuencia  $3317\text{ cm}^{-1}$  atribuido al agua (Mecozzi *et al.*, 2007), la cual tuvo una presencia máxima durante en la zona roja y una disminución máxima en la zona necrosada. El enlace C=C se presentó en la frecuencia  $1498\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la formación de compuestos fenólicos (Abbas *et al.*, 2017) en la hoja, la cual únicamente se presentó en la zona roja. El grupo  $-\text{COOH}$  se presentó en dos ocasiones, en la frecuencia  $1419\text{ cm}^{-1}$  y  $1396\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la pectina y al ácido aspártico respectivamente, compuestos que únicamente se presentaron en la zona roja. El grupo  $-\text{CHO}$  fue localizado en la frecuencia  $1415\text{ cm}^{-1}$  el cual fue atribuido a la glucosa, el cual se presentó en la zona amarilla y roja. El enlace P=O presentó señal en las frecuencias  $1240$  y  $1049\text{ cm}^{-1}$  las cuales fueron atribuidas a la formación de ácidos nucleicos, concentrándose principalmente en la zona roja. Por último, la vibración del enlace C-O se atribuyó a la formación de carbohidratos en  $1147\text{ cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013), pectina en  $1101\text{ cm}^{-1}$  (Leite *et al.*, 2018) y ácidos grasos en  $1018\text{ cm}^{-1}$  (Sofi *et al.*, 2013), las cuales presentaron aumentos en la zona amarilla y la zona roja, con excepción de los ácidos grasos que siguió presente durante zona necrosada (Cuadro 18).

**Cuadro 18.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace O-H, C=C, -COOH, -CHO, P=O y C-O correspondientes a *Botrytis fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Enlace	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Variación Zona amarilla	Variación Zona roja	Variación Zona necrosada
3317	O-H	Agua	70.32	4.97	-25.03	16.97
1498	C=C	C. fenólicos	--	--	* 83.39	--
1419	-COOH	Pectina	--	--	* 75.69	--
1396	-COOH	Ac. aspártico	--	--	* 76.45	--
1415	-CHO	Glucosa	87.63	-23.29	--	-24.48
1240	P=O	Ac. nucleicos	83.87	-2.53	-34.52	-0.25
1049	P=O	Ac. nucleicos	58.41	-13.55	-21.88	-32.57
1147	C-O	Carbohidratos	80.24	-23.08	-36.30	--
1101	C-O	Pectina	69.71	-38.19	-31.15	--
1018	C-O	Ac. grasos	62.43	-13.98	-31.72	-22.37

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo.

#### 4.1.1.1 Zona verde

La parte sana de la hoja presentó una producción mínima (mayor al 85% de Transmitancia) de grupos C-O (CO<sub>2</sub>), C-H (moléculas lipídicas, celulosa y Amida III), -CHO (glucosa); una producción media (entre el 70 y 85 % de Transmitancia) de O-H (Agua), C-H (lípidos, polisacáridos y carbohidratos), C=O (oxidación proteica y Amida I), P=O (ácidos nucleicos) y C-O (biomasa) una producción máxima (menor al 70% de Transmitancia) de C-O (pectina y ácidos grasos) y P=O (fosfolípidos, DNA y RNA) (Figura 12).

#### 4.1.1.2 Zona amarilla

Al inicio del daño de la enfermedad se presentó una producción mínima de C-O (CO<sub>2</sub>), C-H (moléculas lipídicas, Amida III) y -CHO (glucosa); una producción media de O-H (Agua), C-H (lípidos, polisacáridos, carbohidratos y celulosa), C-O (biomasa), C=O (Degradación proteica y Amida I) y P=O (ácidos nucleicos); una producción máxima de C-O (pectina y ácidos grasos) y P=O (fosfolípidos, DNA y RNA) (Figura 13).

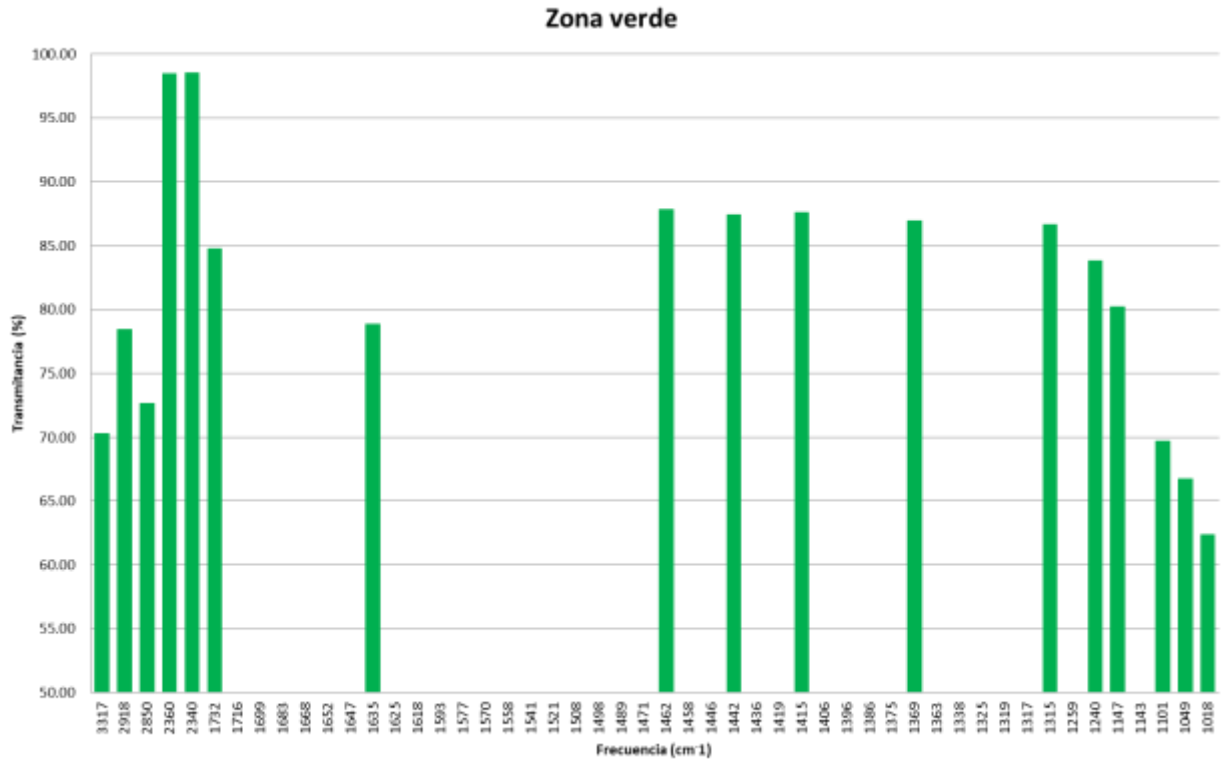


Figura 11. Frecuencias predominantes en la parte sana de la hoja afectada por *Botrytis fabae* S.

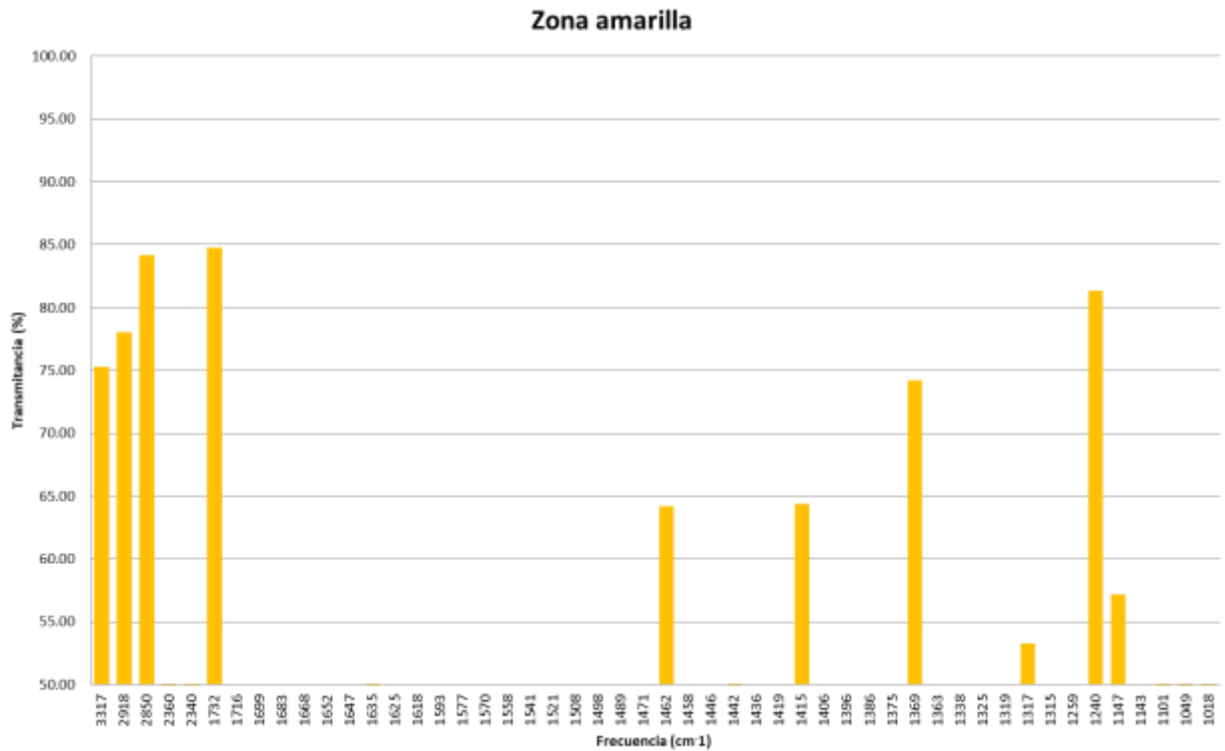


Figura 12. Frecuencias predominantes al inicio del daño provocado por *Botrytis fabae* S.



#### 4.1.1.3 Zona roja

Para la fase agresiva de la enfermedad se presentó una producción mínima de C-O (CO<sub>2</sub> y biomasa); una producción media de O-H (Agua, alcoholes aromáticos), C-H (lípidos, polisacáridos, carbohidratos, pentosas, lignina, prolina, citosina, celulosa, hemicelulosa), C=O (oxidación proteica, purinas, lignina, Amida I correspondiente a la estructura secundaria proteica lámina β y α-Hélice, hemicelulosa), C=C (compuestos fenólicos), N-H (Amina II correspondiente a la estructura secundaria proteica lámina β y α-Hélice, Amida III correspondiente a la estructura secundaria proteica lámina α-Hélice), C-N (Amida II y Amida III correspondiente a la estructura secundaria proteica lámina α-Hélice), -COO<sup>-</sup> (pectina, ácido aspártico) y P=O (ácidos nucleicos) y C-O (CO<sub>2</sub> y biomasa); una producción máxima de C-O (pectina y ácidos grasos) y P=O (fosfolípidos, DNA y RNA) (Figura 14).

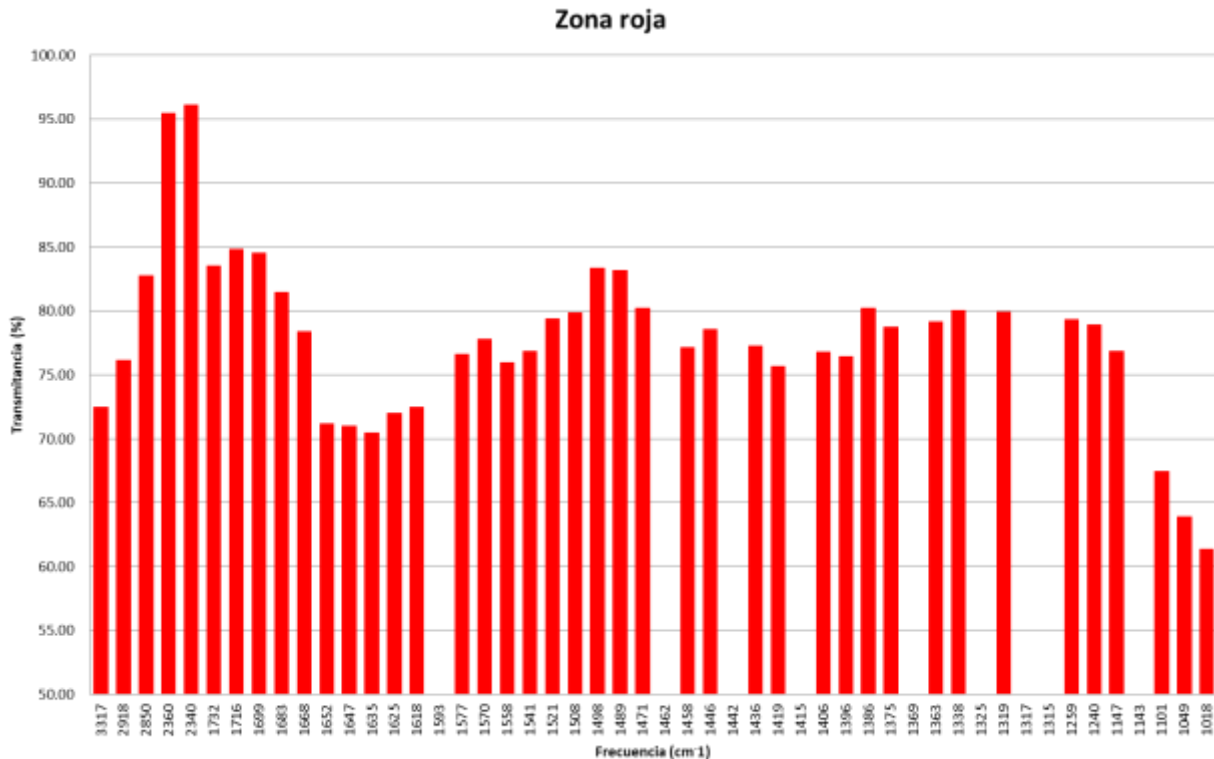


Figura 13. Frecuencias predominantes durante la fase agresiva provocada por *Botrytis fabae* S.

#### 4.1.1.4 Zona necrosada

Para la fase destructiva del tejido causado por la enfermedad se presentó una producción mínima de O-H (Agua), C-H (lípidos) y C-O (CO<sub>2</sub>) y C=O (Degradación proteica); una producción

media de C-H (lípidos, polisacáridos y carbohidratos), C=O (lignina), -CHO (glucosa), O-H (compuestos fenólicos) y P=O (ácidos nucleicos); una producción máxima de P=O (DNA y RNA) y C-O (ácidos grasos) (Figura 15).



**Figura 14.** Frecuencias predominantes durante el final del ataque de *Botrytis fabae* S.

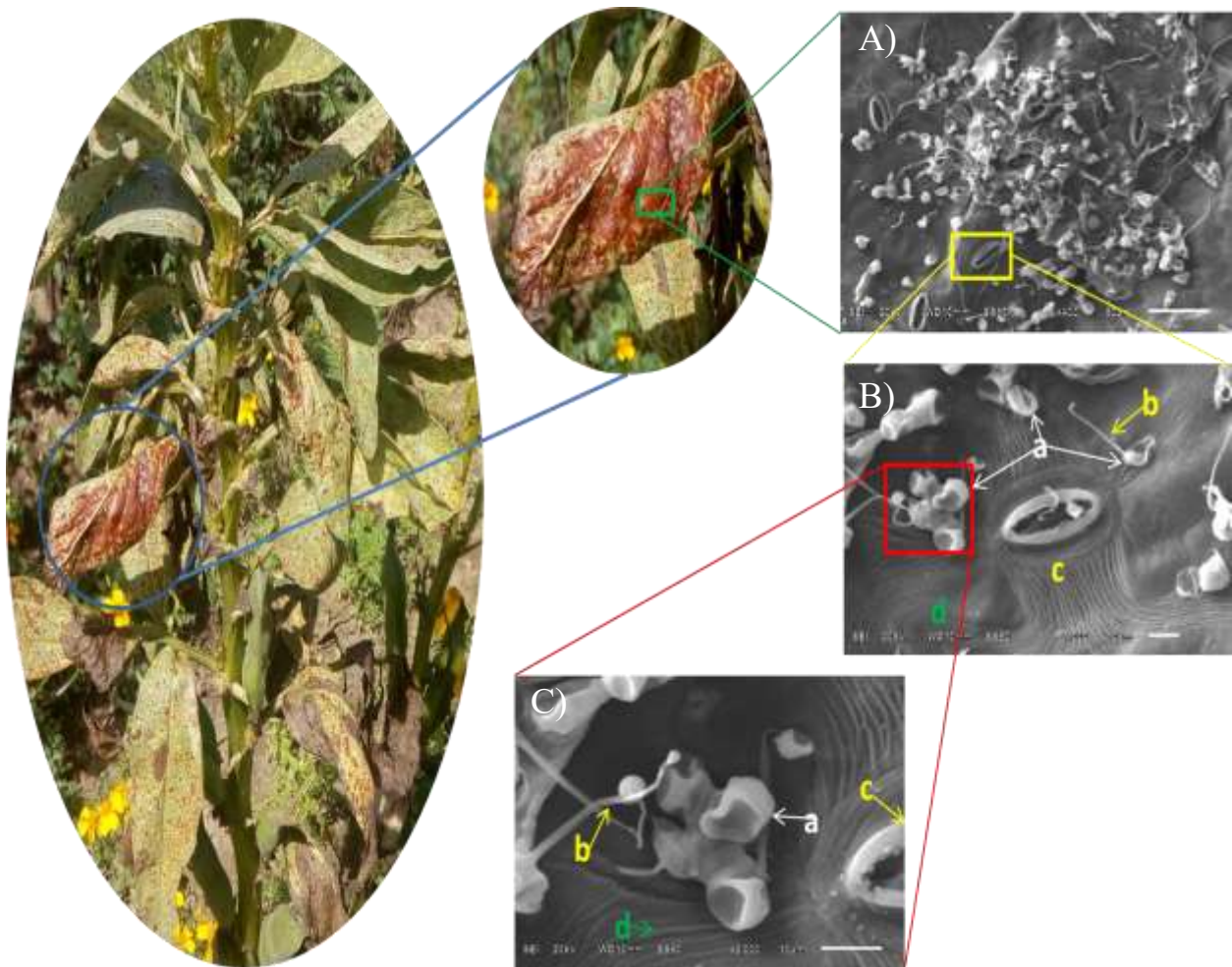
#### 4.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Esta técnica permitió observar la estructura morfológica de la planta al ser invadida y atacada por mancha de chocolate y roya, así como conocer la afectación química elemental en distintas zonas de daño.

##### 4.1.2.1 Mancha de Chocolate en hoja sana

En este estudio se observó la iteración de *Botrytis fabae* en su fase agresiva sobre la planta, también conocida como la zona roja. Se puede observar la invasión de conidios y conidióforos sobre la superficie de la hoja, así mismo la hoja aún no presenta alteración en su superficie, además de presentar estomas abiertos (Figura 16A). Además, mediante un acercamiento se

observa el inicio del mecanismo de infección mediante la entrada de los conidios e hifas a través del estoma que presentan a su vez un tamaño aproximado de 30 micras o micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 16 B). Asimismo, se puede observar que los conidios presentan una morfología con hundimientos en su superficie, teniendo un tamaño promedio a  $10 \mu\text{m}$  y aproximadamente  $1 \mu\text{m}$  de ancho x  $20 \mu\text{m}$  de largo para cada hifa (Figura 16 C).

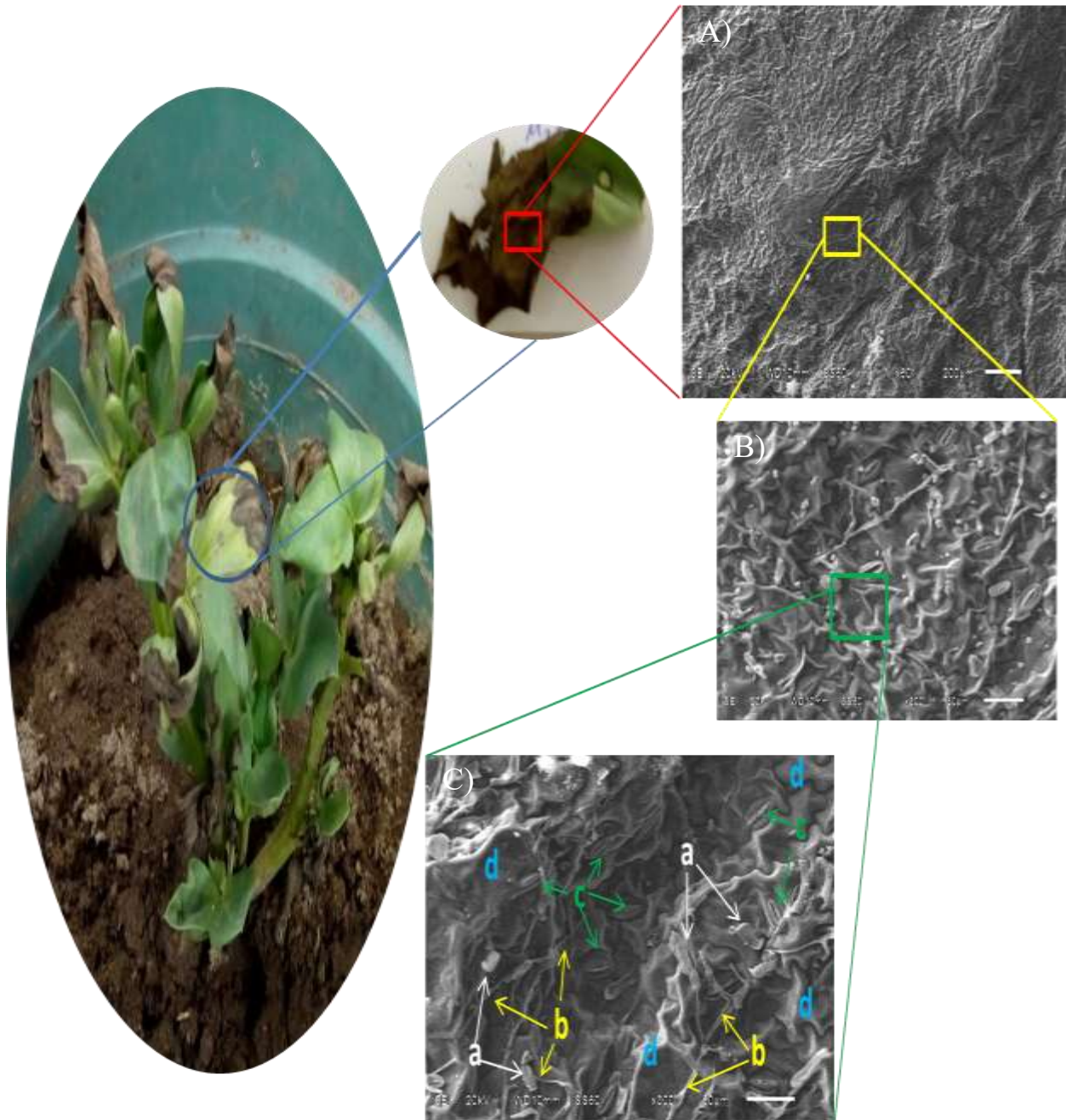


**Figura 15.** Fase agresiva de *Botrytis fabae* S. dónde: a) conidios, b) hifas, c) estomas y d) pared celular. Se puede observar imágenes obtenidas a A) x400, B) x1000 y C) x2000 aumentos

#### 4.1.2.2 Mancha de Chocolate en hoja necrosada

Una vez que hongo ha invadido a hospedero, se genera la necrosis de la zona infectada. Se puede observar que la zona dañada, presentando fracturas y deformación en forma de arrugamiento en la superficie de la hoja (Figura 17 A y B); se observa el cierre total de estomas, el colapso la

pared celular ya que presenta divisiones en la superficie con una morfología triangular – irregular de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  cada una, al igual se presenta la invasión de micelios y presencia de conidios en la superficie de la hoja (Figura 17 C).

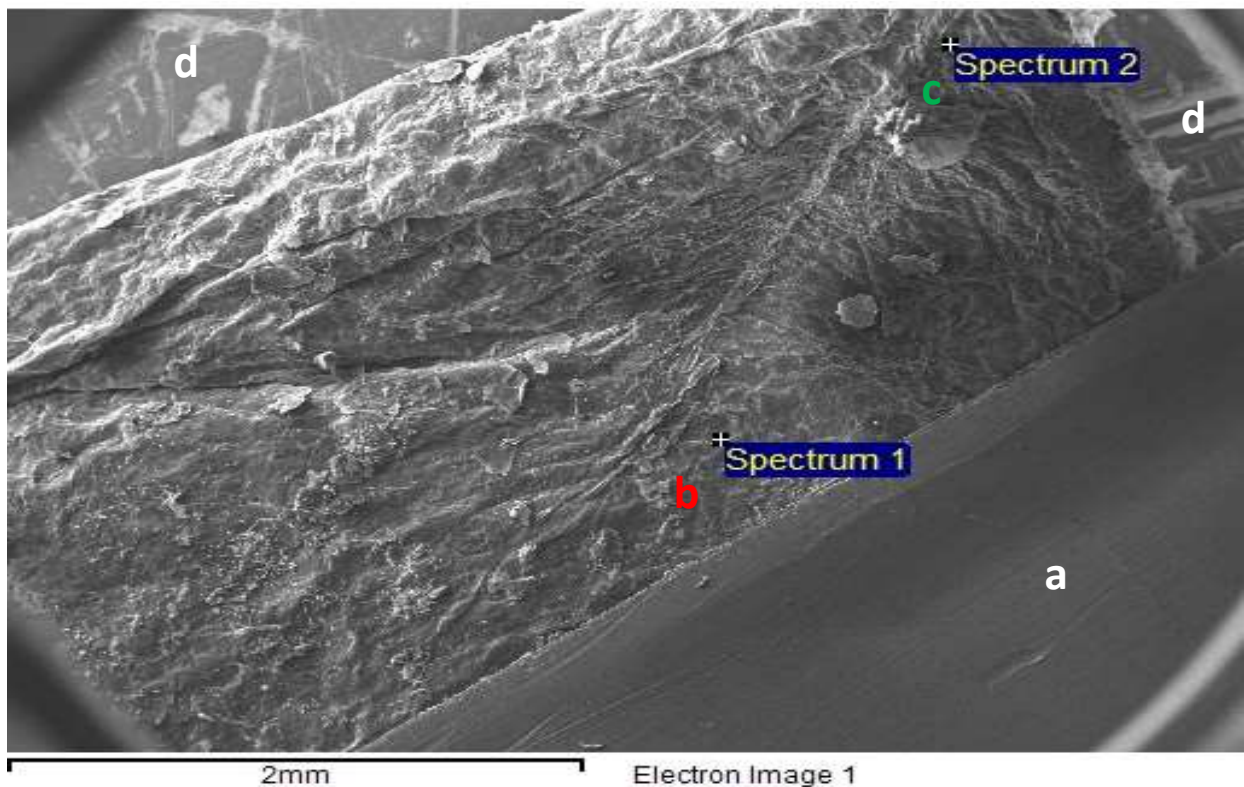


**Figura 16.** Fase destructiva de *Botrytis fabae* S. dónde: a) conidios, b) micelios, c) estomas cerradas y d) pared celular. Se puede observar imágenes obtenidas a A) x60, B) x300 y C) x300 aumentos

### 4.1.3 Análisis Químico Elemental

#### 4.1.3.1 Análisis Químico elemental de Mancha de Chocolate en hoja sana

Se realizó análisis en dos puntos de la hoja, se puede observar las características morfológicas de la hoja, la cual empieza a presentar arrugamiento provocado por el inicio del necrosamiento de la hoja. Se puede apreciar conidios y conidióforos esparcidos sobre la superficie de la misma y una parte de la cinta metálica utilizada para mejorar la conductividad de la muestra. Asimismo, se analizó la composición química de la zona donde se presenta la fase agresiva provocada por el hongo *Spectrum 1* (zona roja) y la zona sana o lo más alejado posible de la zona de daño *Spectrum 2* (Zona verde) (Figura 18).



**Figura 17.** Superficie utilizada para análisis EDS donde a) cinta metálica conductora, b) zona de daño presentada por el hongo donde se pueden observar pequeños puntos (conidios y conidióforos), c) la zona sana de la planta, d) portamuestras utilizada en el análisis

Los análisis presentaron la presencia de elementos de composición química en unidades de % en peso. Predominando los elementos químicos carbono (C), oxígeno (O), magnesio (Mg), cloro (Cl), potasio (K) y calcio (Ca). Se puede observar que durante la fase agresiva del patógeno se

presenta mayor producción de carbono (2.58 %), Magnesio (0.1 %), y calcio (0.38 %) con respecto a la parte sana de la hoja (Cuadro 19).

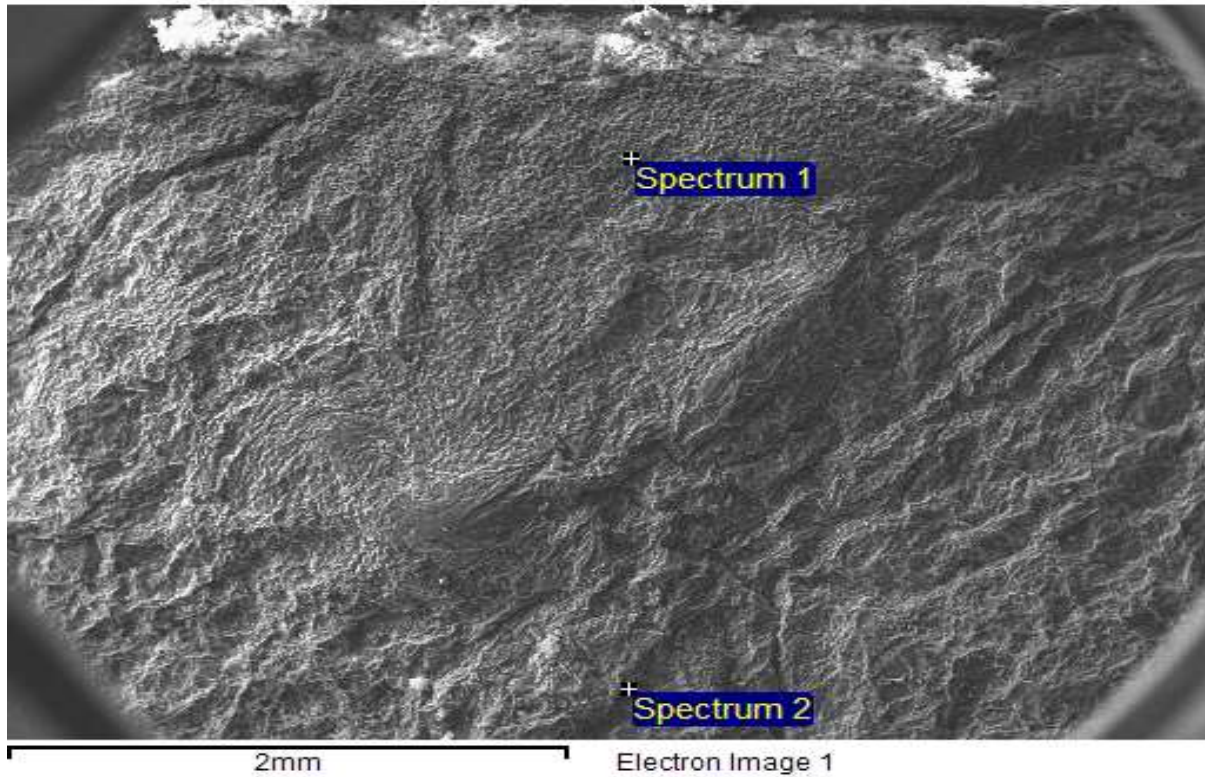
**Cuadro 19.** Principales elementos químicos presentes durante el ataque de *Botrytis fabae* S. en hoja sana

Zona de análisis	C	O	Mg	Cl	K	Ca
<b>Zona roja</b>	64.80	30.77	0.77	0.37	1.47	1.81
<b>Zona verde</b>	62.22	31.61	0.67	1.30	2.77	1.43
<b>Promedio</b>	63.51	31.19	0.72	0.84	2.12	1.62

Elementos químicos expresados en unidades de % en Peso

#### 4.1.3.2 Mancha de Chocolate en hoja necrosada

En la zona necrosada de la hoja, se presentó en su morfología arrugamientos en la superficie y formación de estructuras irregulares y fisuras de la misma. Se realizó un análisis en la zona de inicio del ataque del patógeno (zona amarilla) en el *Spectrum 1* y en la fase destructivo del mismo (zona necrosada) en el *Spectrum 2* (Figura 19).



**Figura 18.** Superficie utilizada para análisis EDS donde *Spectrum 1* es la fase de inicio de inicio de la enfermedad y *Spectrum 2* es la zona destructiva generada por el patógeno

Se puede observar que durante el inicio de la enfermedad, los principales elementos presentes son el carbón, el oxígeno y el calcio. Sin embargo, presenta sodio (Na) en una proporción del 0.35 %. Durante la fase destructiva se presenta una disminución de carbono (32.3%), oxígeno (30.95 %) y magnesio (1.62 %); de igual manera presenta un incremento en silicio (Si) del (7.07 %), cloro (2.74 %), potasio (8.9 %) y calcio (46.51 %) (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Principales elementos químicos presentes durante el ataque de *Botrytis fabae* S. en hoja necrosada

Zona de análisis	C	O	Na	Mg	Si	Cl	K	Ca
Zona amarilla	45.51	39.80	0.35	3.03	0.27	0.53	0.80	9.72
Zona necrosada	13.21	8.85	-	1.41	7.34	3.27	9.70	56.23
Promedio	29.36	24.325	0.35	2.22	3.805	1.9	5.25	32.975

Elementos químicos expresados en unidades de % en Peso

## 4.2 *Uromyces fabae*

### 4.2.1 Espectroscopía FTIR

La obtención de cada espectro infrarrojo permitió observar diferentes frecuencias características de la enfermedad y variaciones de intensidad en cada zona de daño.

El enlace C-H presentó la formación de tres bandas que corresponden a la formación de lípidos en las frecuencias 2918 - 2850  $\text{cm}^{-1}$  (Leite *et al.*, 2018), y 1462  $\text{cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013); dos bandas correspondientes a la Amida III en 1321  $\text{cm}^{-1}$  (Hidayat *et al.*, 2018) y 1315  $\text{cm}^{-1}$  (Al-Kadhemy *et al.*, 2016); una banda correspondiente a la pectina en 1440  $\text{cm}^{-1}$  (Barraza-Garza *et al.*, 2013); una banda a la citosina en 1375  $\text{cm}^{-1}$  (Veronezi *et al.*, 2017) y una a los carbohidratos en 956  $\text{cm}^{-1}$  (Dudek *et al.*, 2019; Barraza-Garza *et al.*, 2013). De acuerdo con cada zona de daño, la variación en intensidad de Transmitancia puede aumentar o disminuir con respecto al testigo. En la zona amarilla presentó un aumento la producción de los compuestos mencionados, con la excepción de la Amida III perteneciente a la frecuencia 1321  $\text{cm}^{-1}$ . La zona roja correspondiente a la fase agresiva del patógeno presentó aumento de 1.32 % en la

producción de lípidos perteneciente a la frecuencia 1462  $\text{cm}^{-1}$ , además de presentar una disminución del 5.03 % en la producción de citosina y 5.11 % en Amida III (1321  $\text{cm}^{-1}$ ) respectivamente. Por otra parte, la formación de Amida III en 1315  $\text{cm}^{-1}$  y carbohidratos en 956  $\text{cm}^{-1}$  fueron frecuencias que se presentaron únicamente en la zona amarilla (Cuadro 21).

**Cuadro 21.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C-H correspondientes a *Uromyces fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Var. Zona amarilla	Var. Zona roja
<b>2918</b>	Lípidos	77.23	-9.58	0.30
<b>2850</b>	Lípidos	83.92	-7.31	0.61
<b>1462</b>	Lípidos	83.09	-8.84	-1.32
<b>1440</b>	Pectina	84.86	-5.27	--
<b>1375</b>	Citosina	83.96	-6.75	5.03
<b>1321</b>	Amida III	84.76	--	5.11
<b>1315</b>	Amida III	--	* 90.29	--
<b>956</b>	Carbohidratos	--	* 82.02	--

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo.

El enlace C=O presentó la formación de cinco bandas de las cuales dos fueron atribuidas a la presencia de  $\text{CO}_2$  en 2360 – 2340  $\text{cm}^{-1}$  (Leng y Hall, 2019), dos fueron atribuidas a la formación de Amida I correspondientes a los componentes lamina  $\beta$  y  $\alpha$ -hélice de la estructura secundaria de las proteínas en 1635 (Mecozzi y Sturchio, 2015) y 1615  $\text{cm}^{-1}$  (Farkas *et al.*, 2013) y una banda correspondiente a la oxidación proteica en 1732  $\text{cm}^{-1}$  (Mecozzi y Sturchio, 2015). Frecuencias de las cuales la zona amarilla presentó aumento en la intensidad de Transmitancia en sus compuestos con la excepción de la Amida I de la frecuencia 1635  $\text{cm}^{-1}$ , asimismo esta zona presentó la única presencia de Amida I en la frecuencia 1615  $\text{cm}^{-1}$ . La zona roja solo presentó disminución de sus compuestos a excepción de la Amida I en 1615  $\text{cm}^{-1}$  (Cuadro 22).



**Cuadro 22.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C=O correspondientes a *Uromyces fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Var. Zona amarilla	Var. Zona roja
<b>2360</b>	CO <sub>2</sub>	95.87	-2.04	2.03
<b>2340</b>	CO <sub>2</sub>	96.37	-1.90	1.51
<b>1732</b>	Proteínas	86.09	-2.07	0.38
<b>1635</b>	Amida I	75.31	--	3.37
<b>1615</b>	Amida I	--	* 79.27	--

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo

El enlace C-O presentó la formación de cinco bandas del cual el compuesto de la frecuencia 1029 cm<sup>-1</sup> no pudo ser identificado para plantas por literatura. Se identificó una banda correspondiente a carbohidratos en 1178 cm<sup>-1</sup> (Barraza-Garza *et al.*, 2013), una banda en 1147 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la pectina, una banda en 1101 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los ácidos nucleicos (Leite *et al.*, 2018) y una banda característica a la presencia de ácidos grasos en 1018 cm<sup>-1</sup> (Sofi *et al.*, 2013). Para la zona amarilla se percató que hubo un aumento del 6.95 % en la producción de ácidos nucleicos, además de presentar dos frecuencias características de la zona en 1178 y 1029 cm<sup>-1</sup>. La zona roja presentó disminución de presencia de sus compuestos a excepción de las frecuencias 1178 y 1029 cm<sup>-1</sup> (Cuadro 23).

**Cuadro 23.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace C-O correspondientes a *Uromyces fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Var. Zona amarilla	Var. Zona roja
<b>1178</b>	Carbohidratos	--	* 90.55	--
<b>1147</b>	Pectina	80.06	--	4.49
<b>1101</b>	Ac. nucleicos	71.33	-6.95	2.42
<b>1029</b>	--	--	* 87.65	--
<b>1018</b>	Ac. grasos	65.17	--	7.64

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores propios de la zona que no aparecen en el testigo.

El enlace O-H presentó la formación de una banda atribuida a la formación de agua en 3317 cm<sup>-1</sup> (Mecozzi *et al.*, 2007), la cual tuvo una mayor presencia en la zona amarilla. El grupo -COOH atribuido a la pectina fue localizado en la frecuencia 1419 cm<sup>-1</sup> (Mohamed *et al.*, 2011), presentando mayor formación en la zona amarilla. El enlace P=O atribuido a los ácidos nucleicos fue localizado en las frecuencias 1240 (Pistorius *et al.*, 2008) y 1049 cm<sup>-1</sup> (Mecozzi *et al.*, 2007), el cual presentó mayor formación en la zona amarilla (1240 cm<sup>-1</sup>). El enlace C-C atribuido a la presencia de ribosas en la frecuencia 879 cm<sup>-1</sup> (Dudek *et al.*, 2019) fue únicamente localizada en la zona amarilla (Cuadro 24).

**Cuadro 24.** Frecuencias y formación de compuestos característicos del enlace O-H, -COOH, P=O y C-C correspondientes a *Uromyces fabae* y variaciones de intensidad por cada zona de daño.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Enlace	Compuesto	Zona verde (Testigo)	Var. Zona amarilla	Var. Zona roja
3317	O-H	Agua	70.67	-9.46	-2.86
1419	-COOH	Pectina	81.90	-7.65	3.42
1240	P=O	A. nucleicos	83.07	-4.56	5.18
1049	P=O	Ac. nucleicos	67.89	--	6.38
879	C-C	Ribosas	--	* 87.67	--

Las variaciones del % de Transmitancia de cada zona de daño se encuentran dadas con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad.

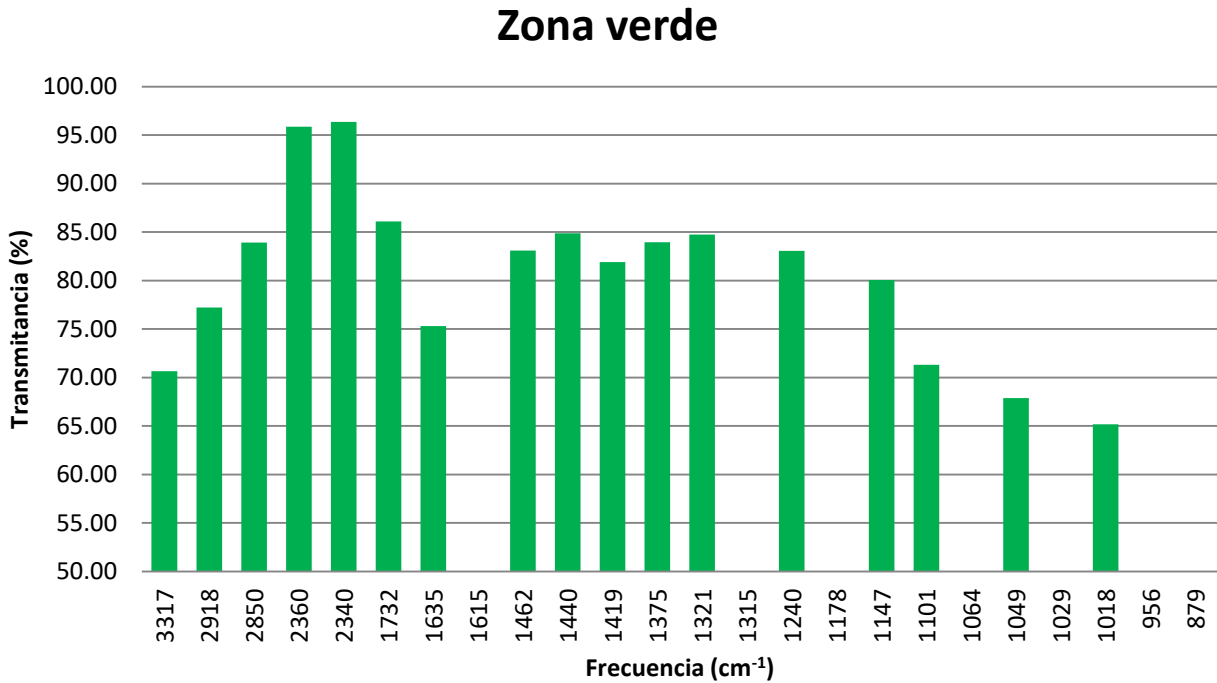
#### 4.2.1.1 Zona verde

La parte sana de la hoja presentó una producción mínima de C-O (CO<sub>2</sub>) y C=O (oxidación proteica); una producción media de O-H (Agua), C-H (lípidos, polisacáridos, carbohidratos y citosina), C=O (Amida I perteneciente a la estructura secundaria proteica lámina β), -CHO (glucosa) y P=O (ácidos nucleicos) y C-O (biomasa y pectina); una producción máxima de P=O (los fosfolípidos, DNA y RNA) y C-O (ácidos grasos) (Figura 20)

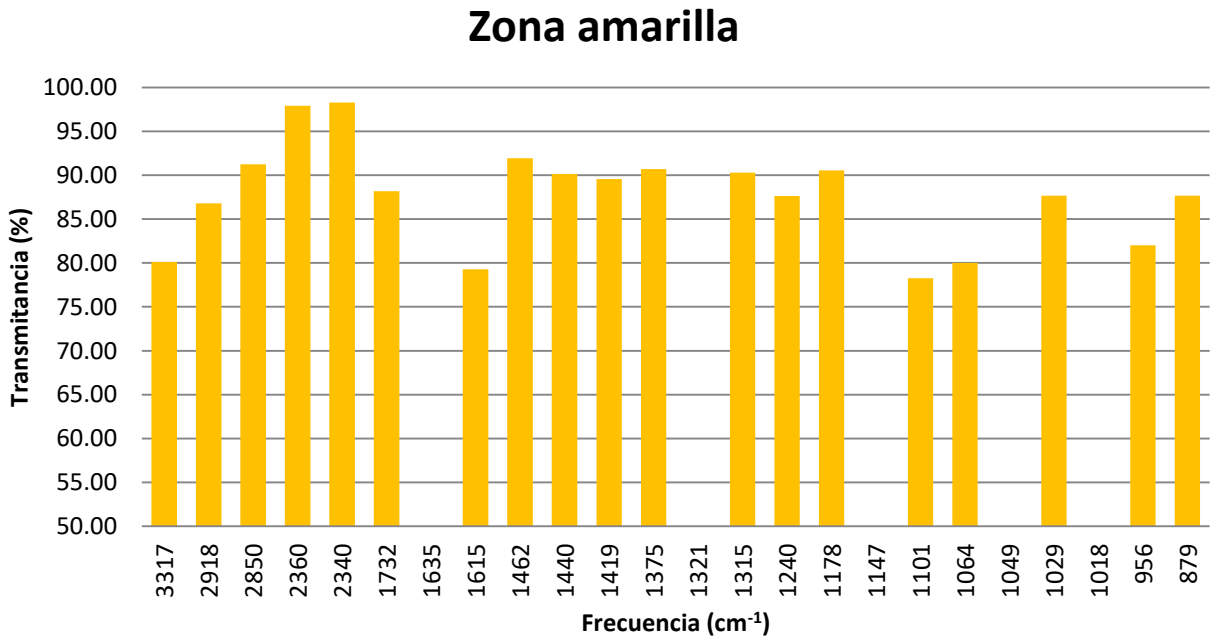
#### 4.2.1.2 Zona amarilla

Al inicio del daño de la enfermedad se presentó una producción mínima C-H (lípidos, polisacáridos, carbohidratos, citosina y Amida III), C-O (CO<sub>2</sub>), -CHO (glucosa), C-O-C (lípidos y carbohidratos), C=O (Degradación proteica), P=O (ácidos nucleicos) y C-C (ribosa); una producción media de O-H (Agua), C=O (Amida I perteneciente a la estructura secundaria

proteica lámina  $\beta$ ), C-O (pectina) y C-H (carbohidratos y polisacáridos). Sin embargo, en esta zona no se presentó alguna producción máxima de algún compuesto (Figura 21).



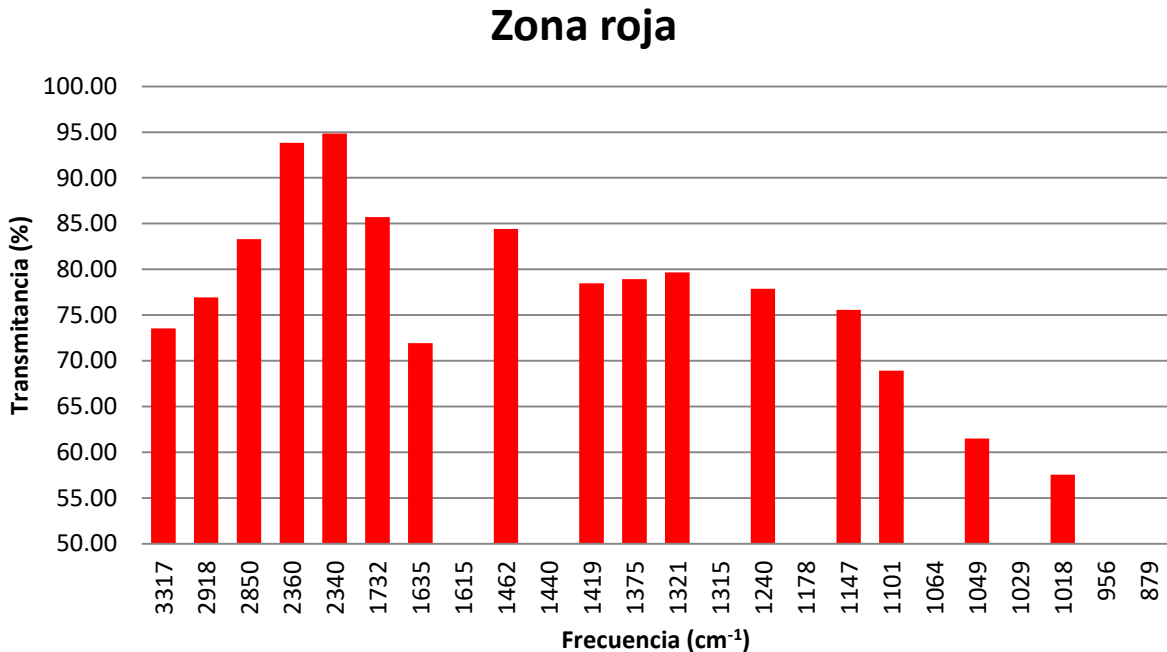
**Figura 19.** Frecuencias predominantes en la parte sana de la hoja afectada por *Uromyces fabae* P.



**Figura 20.** Frecuencias predominantes al inicio del daño provocado por *Uromyces fabae* P.

### 4.2.1.3 Zona roja

Para la fase agresiva de la enfermedad se presentó una producción mínima de C-O (CO<sub>2</sub>) y C=O (degradación proteica); una producción media de O-H (Agua), C-H (lípidos, polisacáridos, carbohidratos, citosina), C=O (Amida I perteneciente a la estructura secundaria proteica lámina β), -CHO (glucosa), P=O (ácidos nucleicos) y C-O (biomasa y ácidos grasos); una producción máxima de C-O (pectina) y P=O (fosfolípidos, DNA y RNA) (Figura 22).



**Figura 21.** Frecuencias predominantes durante la fase agresiva provocado por *Uromyces fabae* P.

## 4.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido

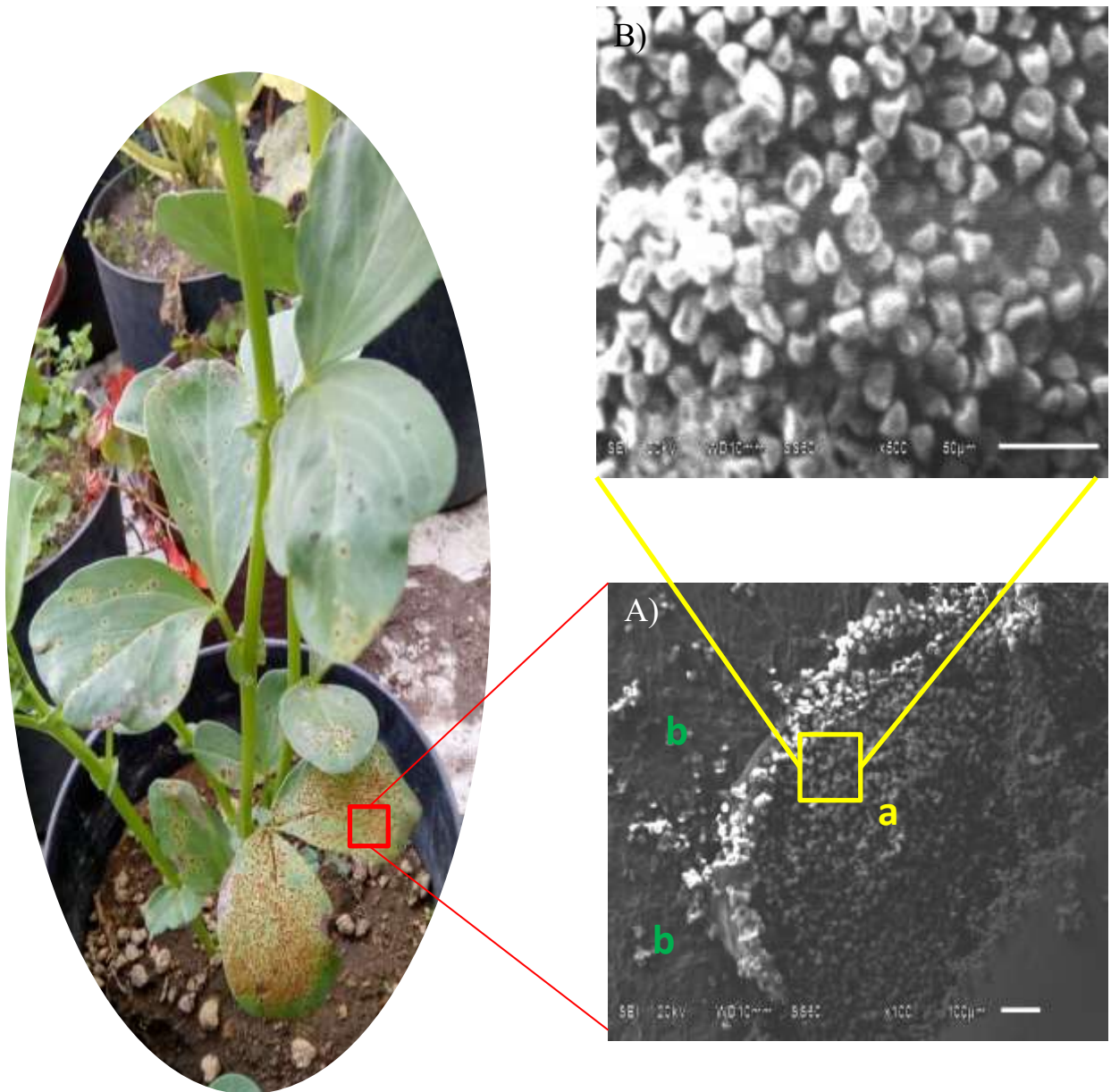
### 4.2.2.1 Roya en hoja sana

Se puede apreciar el daño provocado por las urediosporas que han roto la epidermis de la hoja. De igual manera, se percata la presencia de vesículas intrapidermales y el cierre total de estomas en toda la superficie de la hoja (Figura 23 A). Asimismo, se percata que la superficie de las urediosporas presenta hundimientos; contando con un tamaño promedio de 20 μm (Figura 23 B).

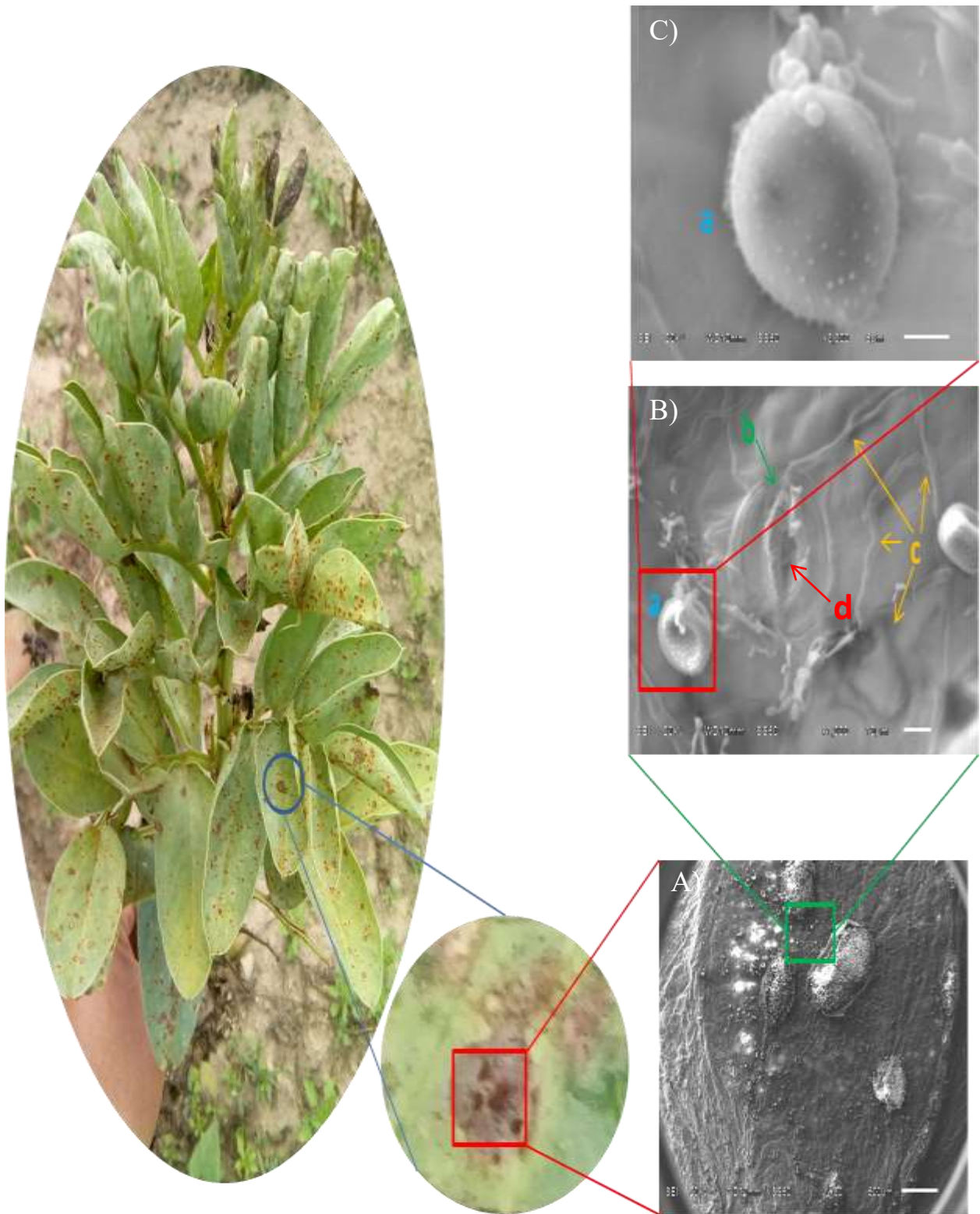
### 4.2.2.2 Roya y Mancha de Chocolate en hoja sana

En esta se observa el daño provocado por la combinación de la fase destructiva *Botrytis fabae* y fase agresiva de *Uromyces fabae* en parte de la superficie aún sana de la hoja. Se puede apreciar como la mancha ha necrosado parte de la hoja y en esta zona al mismo tiempo se genera la

ruptura de la epidermis por parte de las urediosporas de la roya (Figura 24 A). Se observa que las estomas aún permanecen abiertas y por el mismo se observa la entrada del tubo germinativo de la urediospora y sus vesículas intrapidermales invadiendo la superficie de la hoja (Figura 24 B). Por último, se observa que la urediospora presenta una morfología ovalada con pequeños picos a su alrededor y con un tamaño promedio de 20  $\mu\text{m}$  (Figura 24 C).



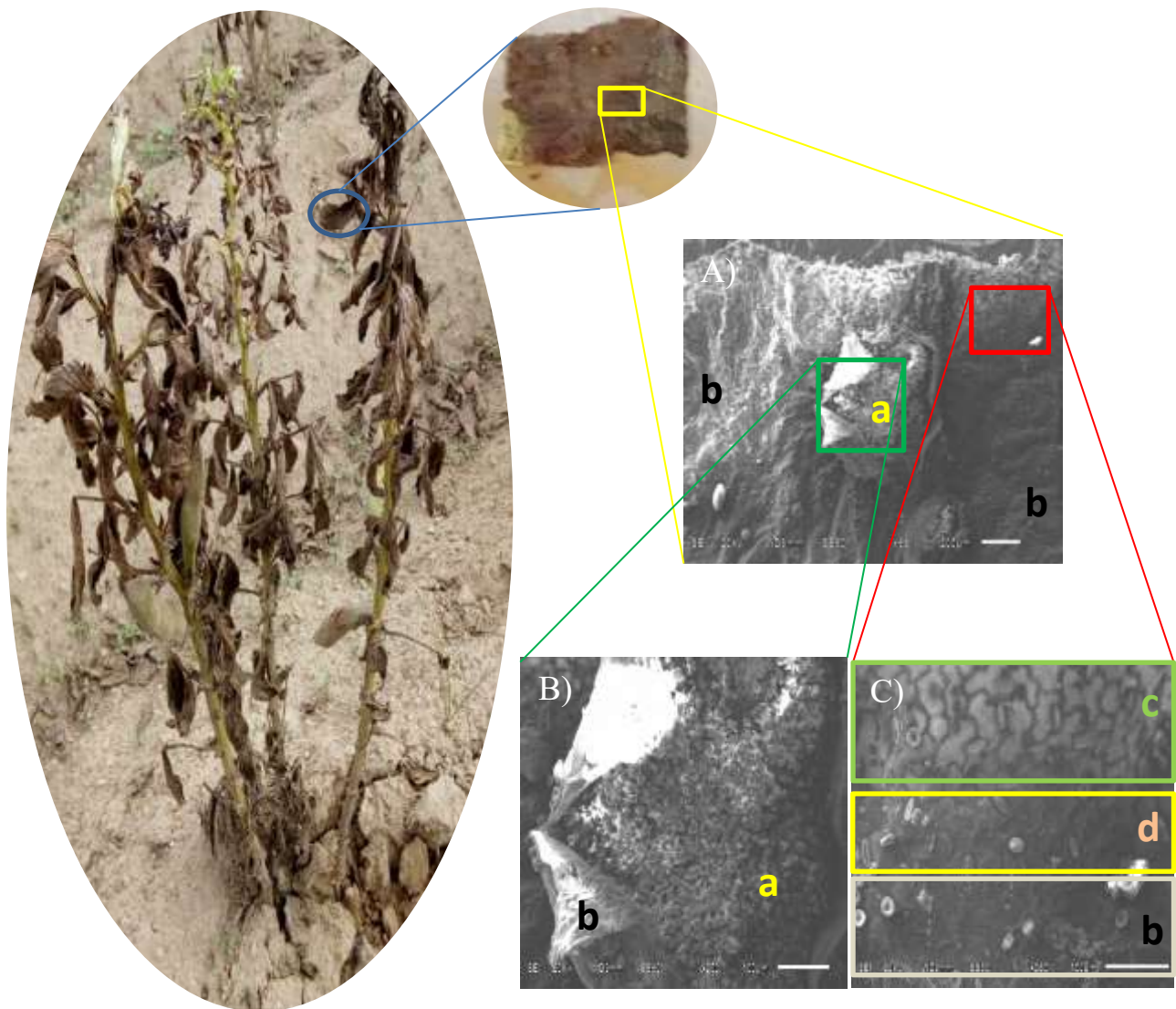
**Figura 22.** Fase agresiva de *Uromyces fabae* P., donde a) corresponde a la ruptura de epidermis y producción de urediosporas y b) corresponde a la superficie de la hoja donde se observa la presencia de vesículas intrapidermales del hongo. Imágenes obtenidas a A) x100 y B) x500 aumentos



**Figura 23.** Interacción de la fase agresiva de *Uromyces fabae* P. y la fase destructiva de *Botrytis fabae* S. donde a) urediosporas, b) estomas, c) vesículas intrapidermales y d) tubo germinativo de la urediospora. Imágenes obtenidas a A) x30, B) x1000 y C) x3300 aumentos.

#### 4.2.2.3 Roya y Mancha de Chocolate en hoja necrosada

En esta se observa el daño provocado por la combinación de la fase destructiva *Botrytis fabae* y fase agresiva de *Uromyces fabae* en parte de la superficie de la hoja totalmente necrosada. Esta se considera como la fase más destructiva provocada por los factores bióticos sobre *Vicia faba* L. Se puede apreciar como la mancha ha necrosado toda la hoja y en esta zona al mismo tiempo se genera la ruptura de la epidermis por parte de las urediosporas de la roya con un tamaño aproximado de 300  $\mu\text{m}$  (Figura 25 A y B). Asimismo, se puede apreciar un cierre estomático total y las zonas que corresponden al proceso de daño provocado por la mancha (Figura 25 C).

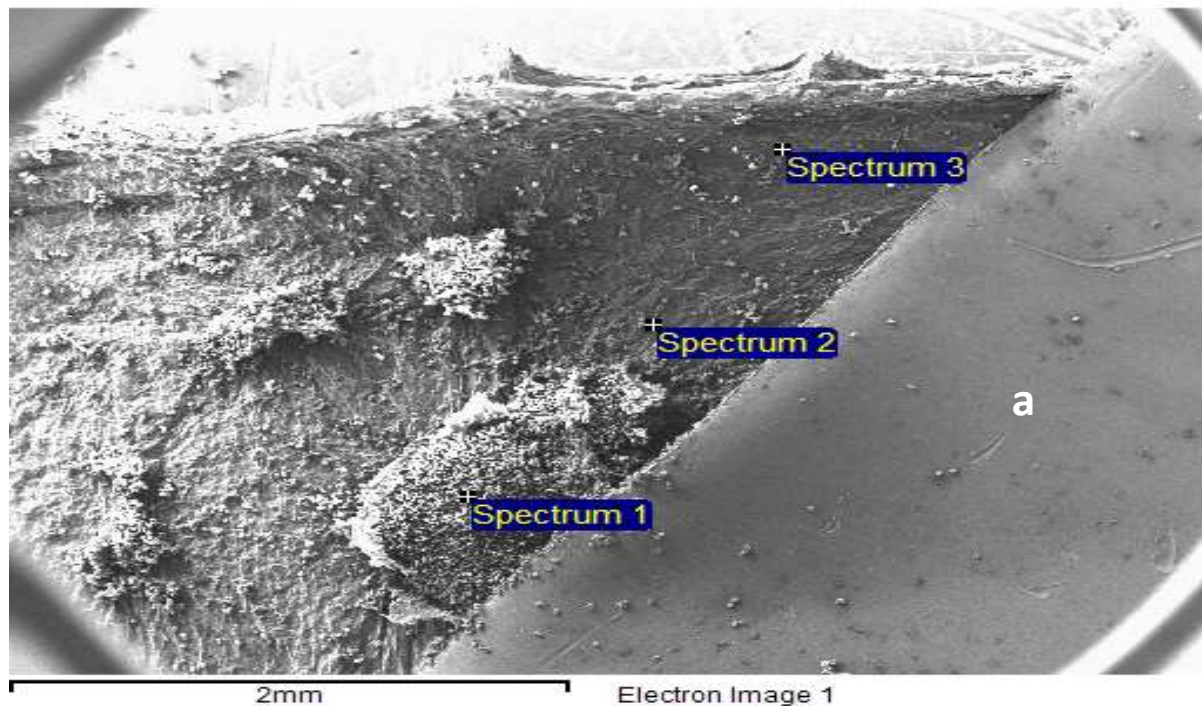


**Figura 24.** Iteración de la fase agresiva de *Uromyces fabae* P. y la fase destructiva de *Botrytis fabae* S. donde a) urediosporas, b) zona necrosada c) estructura celular semi necrosada y d) estructura celular no necrosada. Imágenes obtenidas a A) x65, B) x200 y C) x250 aumentos

### 4.2.3 Análisis Químico Elemental

#### 4.2.3.1 Roya en hoja sana

Se realizaron análisis en tres zonas de la muestra. La parte agresiva de la roya (zona roja) está representado por el *Spectrum 1*, la zona de inicio del daño dado (zona amarilla) por el *Spectrum 2* y la zona sana de la hoja dado por el *Spectrum 3* (Figura 26).



**Figura 25.** Superficie utilizada para análisis EDS donde *Spectrum 1* es la fase agresiva provocada por urediosporas, el *Spectrum 2* es la fase de inicio de la enfermedad y *Spectrum 3* es la zona sana de la hoja, Asimismo a) es la parte de la cinta metálica utilizada para tener una mejor conductividad eléctrica en la muestra

La zona sana de la hoja presentó mayor formación de los elementos cloro, potasio y calcio. La zona amarilla presentó un aumento de los elementos carbono (59.6 %), Oxígeno (17.47 %), magnesio (0.43 %), fósforo (3.43 %), azufre (1.86 %), y potasio (1.31 %) y una disminución de elementos cloro (1.93 %) y calcio (82.18 %). La zona roja presentó un aumento de elementos carbono (66.39 %), oxígeno (30.18 %), magnesio (0.45 %), Silicio (0.35 %), fosforo (0.24 %) y una disminución de elementos cloro (3.32 %), potasio (5.11 %) y calcio (89.18 %); la variación de % fue con respecto a la zona sana (Cuadro 25).



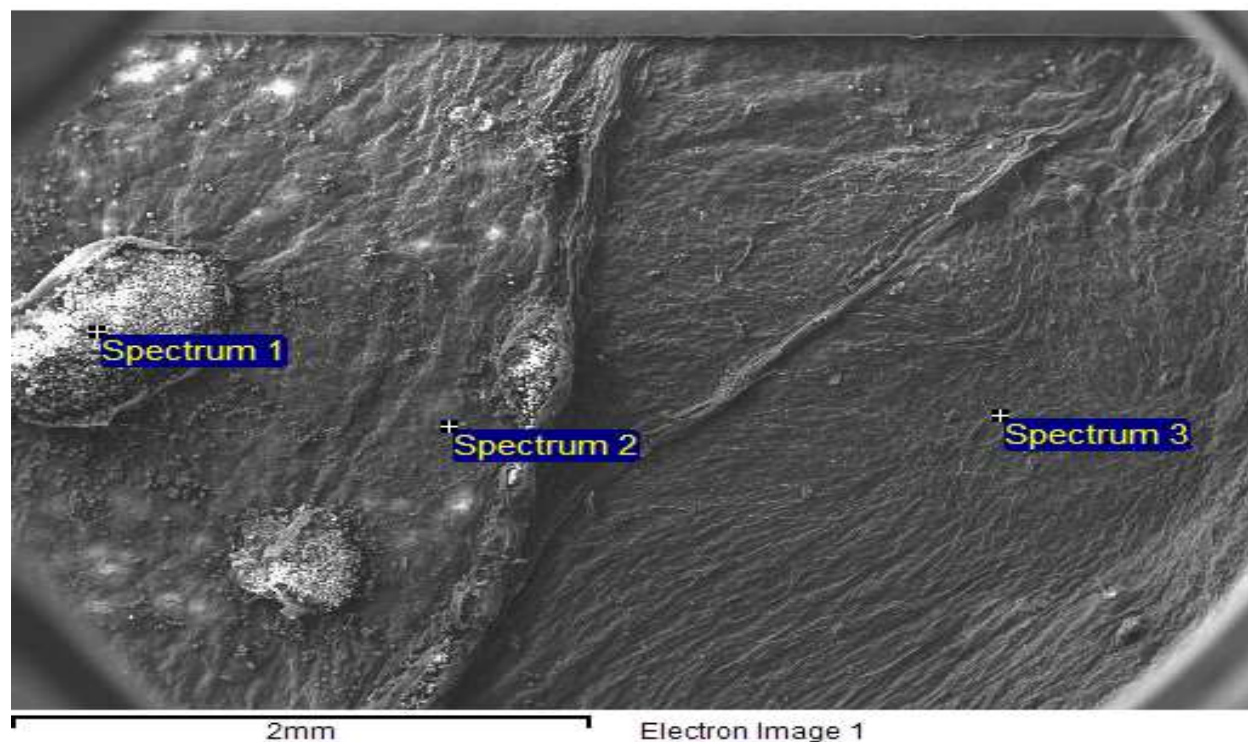
**Cuadro 25.** Principales elementos químicos presentes durante el ataque de *Uromyces fabae* P.

Zona de análisis	C	O	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca
Roja	59.60	17.47	0.43	-	3.43	1.86	1.58	7.38	8.24
Amarilla	66.39	30.18	0.45	0.35	0.24	-	0.19	0.96	1.24
Verde	-	-	-	-	-	-	3.51	6.07	90.42
Promedio	63.00	23.83	0.44	0.35	1.84	1.86	1.76	4.80	33.30

Elementos químicos expresados en unidades de % en Peso

#### 4.2.3.2 Roya y Mancha de Chocolate en hoja sana

Se analizaron tres zonas respectivas de la muestra, un análisis en la fase agresiva de la roya presentada por la ruptura de la epidermis de la hoja por las urediosporas representada por el *Spectrum 1*; la zona de inicio de la enfermedad localizada entre la roya y la mancha de chocolate *Spectrum 2* y la zona necrosada provocada por el hongo *Botrytis fabae* (Figura 27).



**Figura 26.** Superficie utilizada para análisis EDS donde *Spectrum 1* es la fase agresiva provocada por urediosporas, el *Spectrum 2* es la fase de inicio de la enfermedad y *Spectrum 3* es la zona necrosada de la hoja provocada por *Botrytis fabae*

Al inicio de la enfermedad se presentó la formación de los elementos carbono (60.71 %), oxígeno (36.24 %), magnesio (0.55 %), cloro (0.14 %), potasio (0.49 %) y calcio (1.87 %). El daño provocado por *Uromyces* provocó un aumento en la producción de carbono (0.69 %) y calcio (1.81 %), se presentó el elemento fósforo (P) con un 1 % y se presentó una disminución de elementos oxígeno (2.4 %), magnesio (0.11 %), cloro (0.14 %) y calcio (0.85 %). El daño provocado por *Botrytis* generó un aumento en la producción de elementos magnesio (1.09 %), cloro (2.14 %), potasio (3.83 %) y calcio (0.86 %); se presentó la formación de sodio (0.19 %) solo en esta zona de daño y se presentó una disminución de los elementos carbono (5.19 %) y oxígeno (2.43 %); los valores de roya y mancha de chocolate fueron con respecto a la zona amarilla (Cuadro 26).

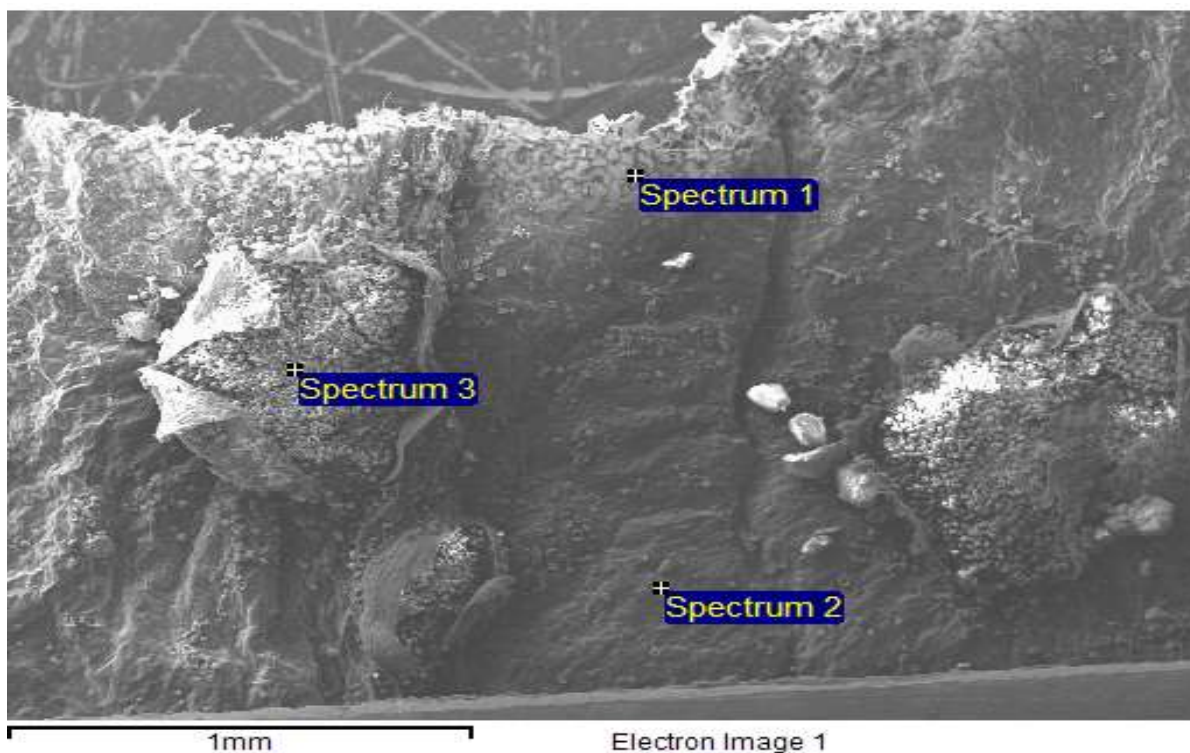
**Cuadro 26.** Elementos químicos presentes durante el ataque de *Botrytis fabae* S. y *Uromyces fabae* P. en hoja sana.

Zona de análisis	C	O	Na	Mg	P	Cl	K	Ca
<b>Zona <i>Uromyces</i></b>	61.40	33.84	-	0.44	1.00	-	2.30	1.02
<b>Zona amarilla</b>	60.71	36.24	-	0.55	-	0.14	0.49	1.87
<b>Zona <i>Botrytis</i></b>	55.52	33.81	0.19	1.64	-	2.28	3.83	2.73
<b>Promedio</b>	59.21	34.63	0.19	0.88	1.00	1.21	2.21	1.87

Elementos químicos expresados en unidades de % en Peso

#### 4.2.3.3 Roya y Mancha de Chocolate en hoja necrosada

Se analizaron tres zonas de la muestra, la zona donde aún se preserva la estructura celular de la hoja durante el necrosamiento provocado por *Botrytis* presentada por el *Spectrum 1*; la zona totalmente necrosada por el ataque de *Botrytis* donde se presenta una estructura triangular-irregular en la estructura celular de la hoja presentada por el *Spectrum 2*; la ruptura de la epidermis provocada por las urediosporas de *Uromyces* presentada por el *Spectrum 3* (Figura 28).



**Figura 27.** Superficie utilizada para análisis EDS donde *Spectrum 1* es la estructura regular presente durante la fase destructiva provocada por *Botrytis*, el *Spectrum 2* es la estructura irregular presente durante la fase destructiva provocada por *Botrytis* y fase agresiva en la epidermis de la hoja provocada por *Uromyces*

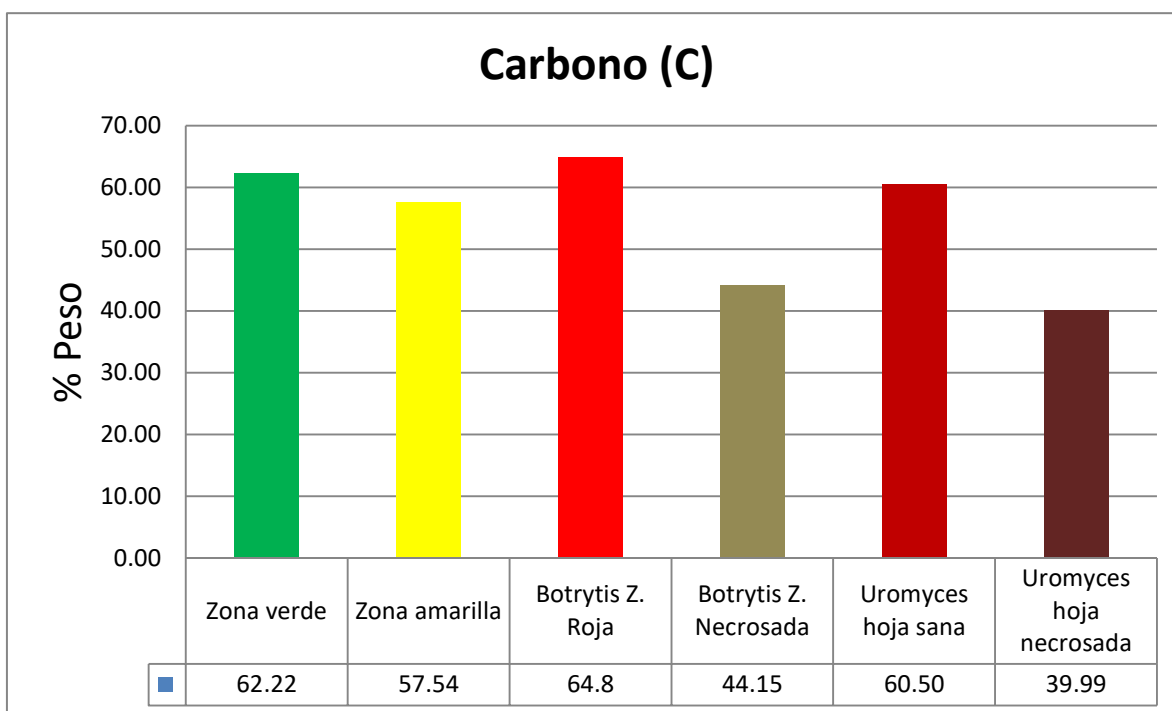
Cuando se presenta una estructura regular en la zona de necrosamiento se presentó la formación de elementos carbono (51.58 %), oxígeno (44.48 %), potasio (1.51 %) y calcio (2.43 %). La zona irregular en la zona de necrosamiento aumento la producción de los elementos carbono (4.59 %), potasio (0.86 %) y calcio (1.65 %), presentó la formación de magnesio (0.38 %) y una disminución de oxígeno (7.57 %). Durante la ruptura de la epidermis por los las urediosporas se presentó un aumento en la producción del potasio (16.35 %) y calcio (3.11 %), se presentó la formación de silicio (0.68 %) y una disminución de carbono (11.59 %) y oxígeno (8.54 %) (Cuadro 27).

**Cuadro 27.** Elementos químicos presentes durante el ataque de *Botrytis fabae* S. y *Uromyces fabae* P. en hoja necrosada.

Zona de análisis	C	O	Mg	Si	K	Ca
Spectrum 1	51.58	44.48	-	-	1.51	2.43
Spectrum 2	56.27	36.91	0.38	-	2.37	4.08
Spectrum 3	39.99	35.94	-	0.68	17.86	5.54
Promedio	49.28	39.11	0.38	0.68	7.25	4.02

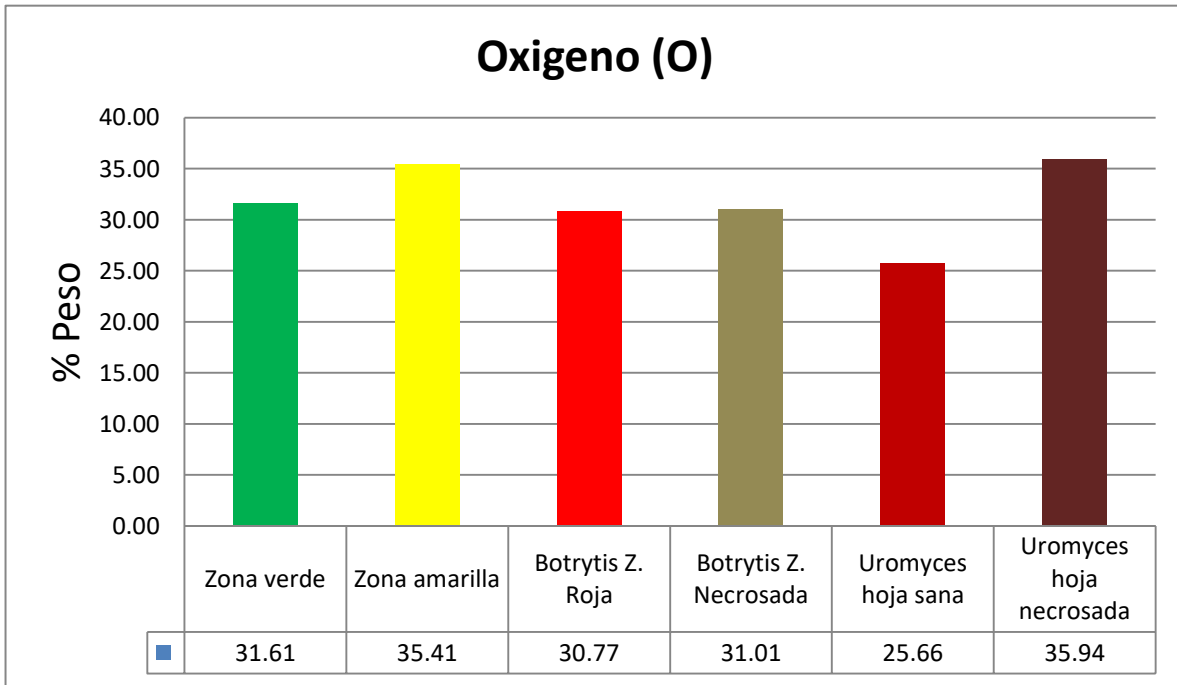
Elementos químicos expresados en unidades de % en Peso

El elemento carbono se presentó en mayor cantidad cuando se presenta la fase agresiva de *Botrytis fabae* con un 64.8 %, seguido por la parte sana de la hoja con un 62.22 % y la fase agresiva de *Uromyces fabae* con 60.5 % (Figura 29).



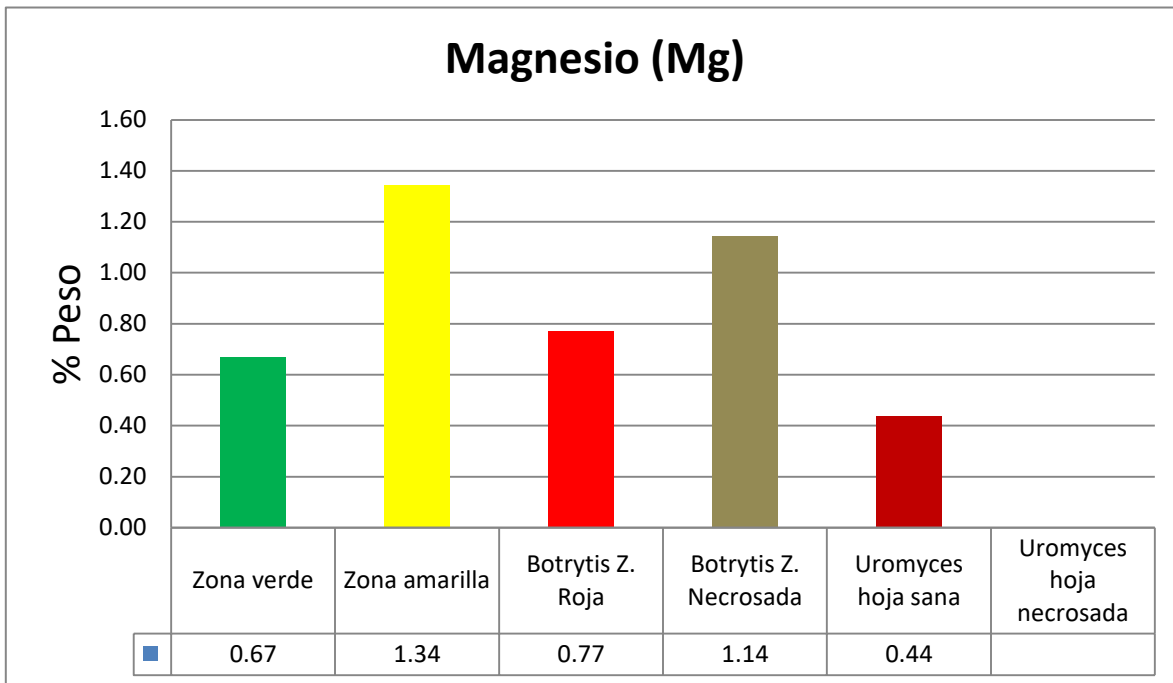
**Figura 28.** Distribución del elemento carbono en distintas zonas de daño

El elemento oxígeno se presentó en mayor cantidad cuando en la fase agresiva de *Uromyces fabae* en hoja necrosada por *Botrytis fabae* con 35.94 %, seguido por la zona amarilla o el inicio de la enfermedad con 35.41 % y la parte sana de la hoja con 31.61 % (Figura 30).



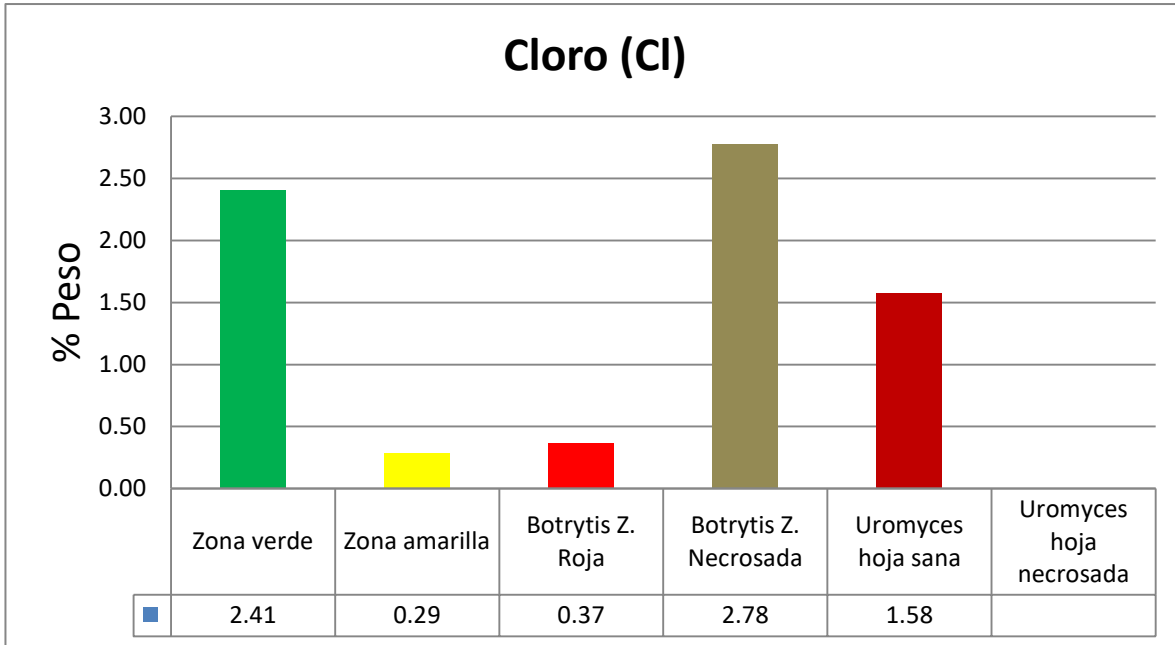
**Figura 29.** Distribución del elemento oxígeno en distintas zonas de daño

El magnesio se presentó en mayor cantidad durante el inicio de la enfermedad con 1.34 %, seguido por la fase destructiva (1.14 %) y agresiva (0.77 %) de *Botrytis fabae* (Figura 31)



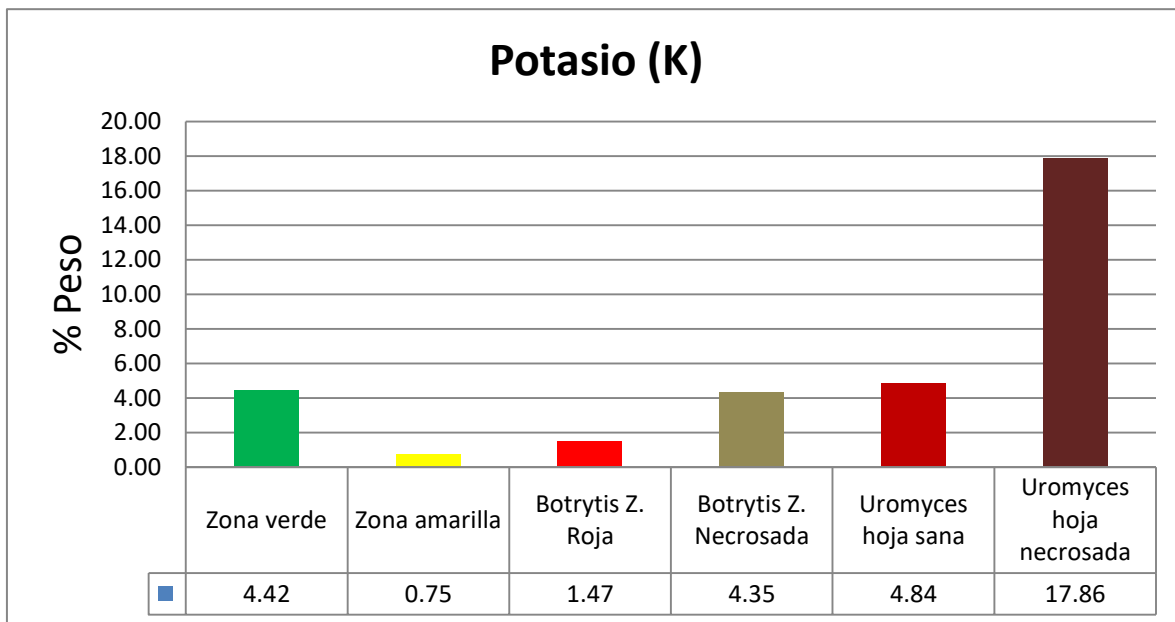
**Figura 30.** Distribución del elemento magnesio en distintas zonas de daño

El elemento cloro se presentó en mayor cantidad en la fase destructiva de *Botrytis fabae* con 2.78 %, seguido por la parte sana de la hoja con 2.41 % y la fase agresiva de *Uromyces* con 1.58 % (Figura 32).



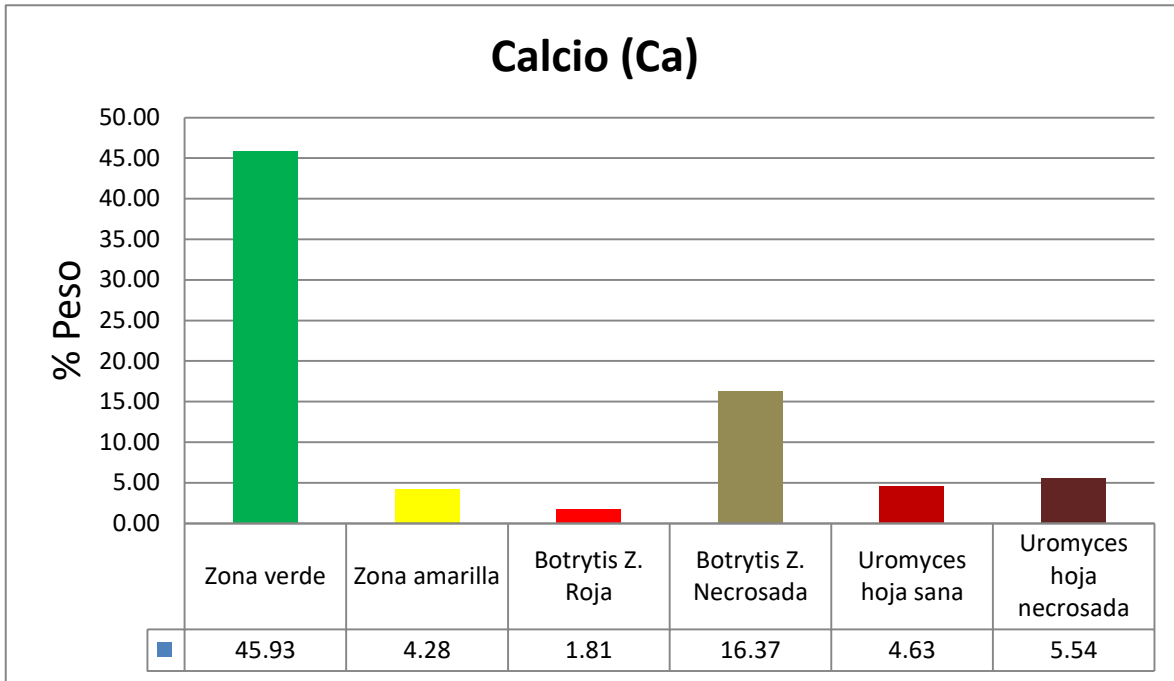
**Figura 31.** Distribución del elemento cloro en distintas zonas de daño

El elemento potasio predominó en la fase agresiva de *Uromyces* en la hoja necrosada con 17.86% y sana con 4.84 %, así como la zona sana de la hoja con 4.42 % (Figura 33).



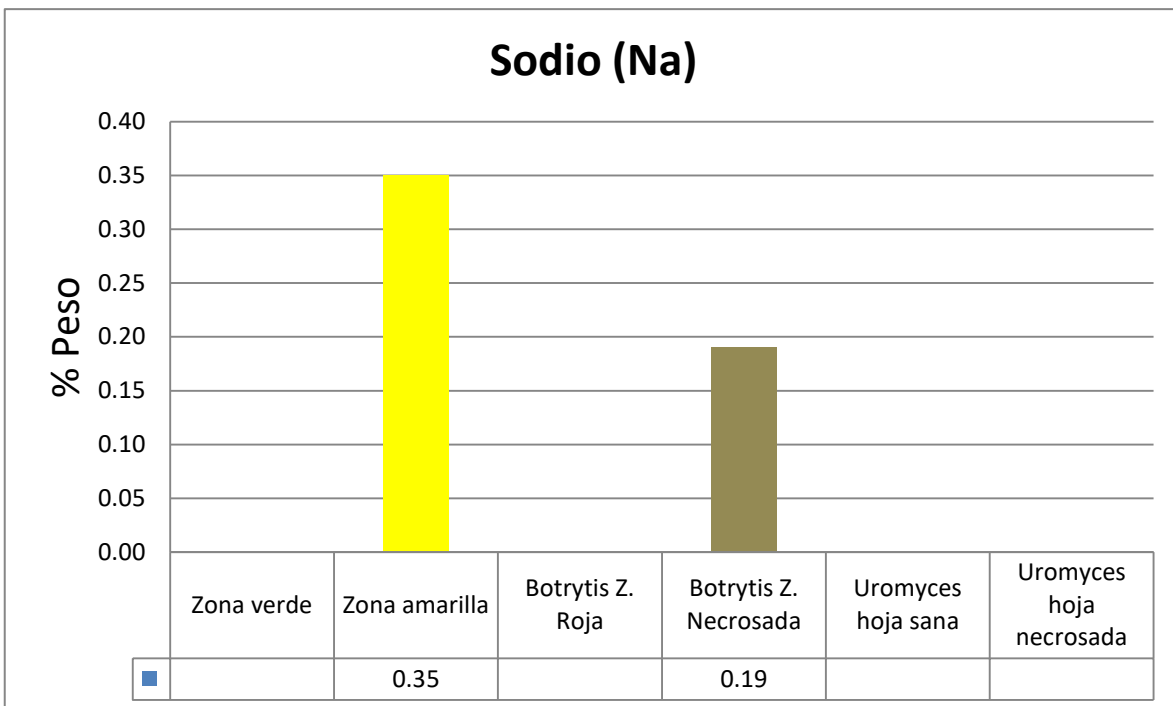
**Figura 32.** Distribución del elemento potasio en distintas zonas de daño

El calcio se predominó en la zona sana de la hoja con 45.93 %, la zona necrosada por *Botrytis fabae* con 16.37 % y la fase agresiva de la roya en hoja necrosada con 5.54 % (Figura 34).



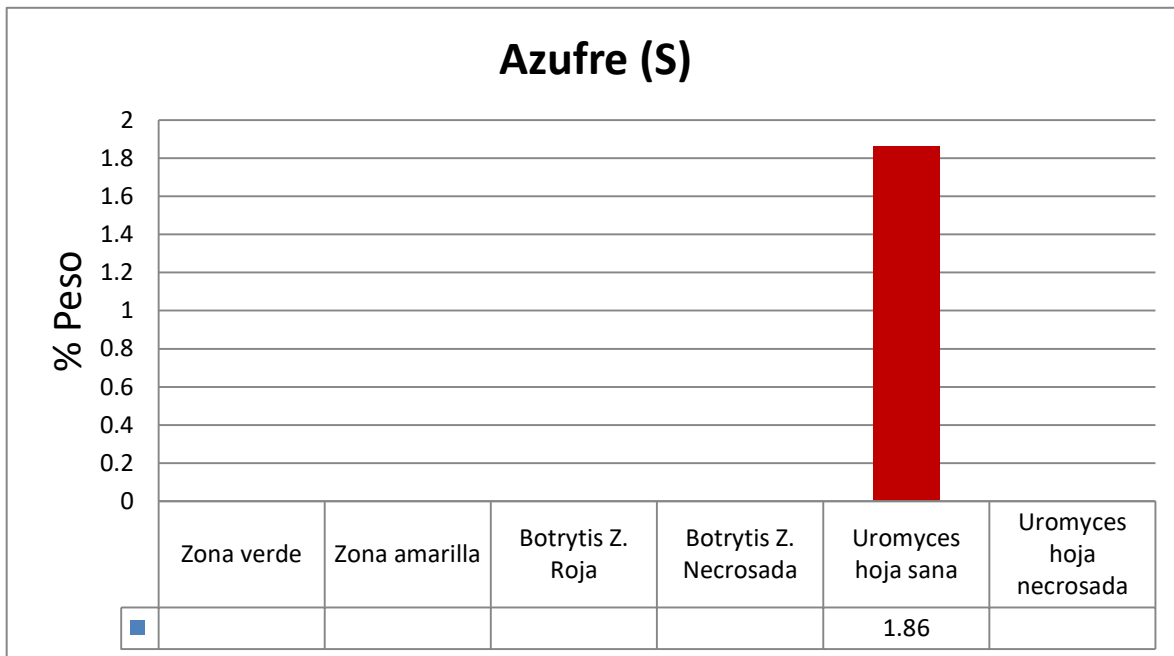
**Figura 33.** Distribución del elemento calcio en distintas zonas de daño

El sodio solo se presentó en la zona amarilla con 0.35 % y en la zona necrosada (Figura 35).



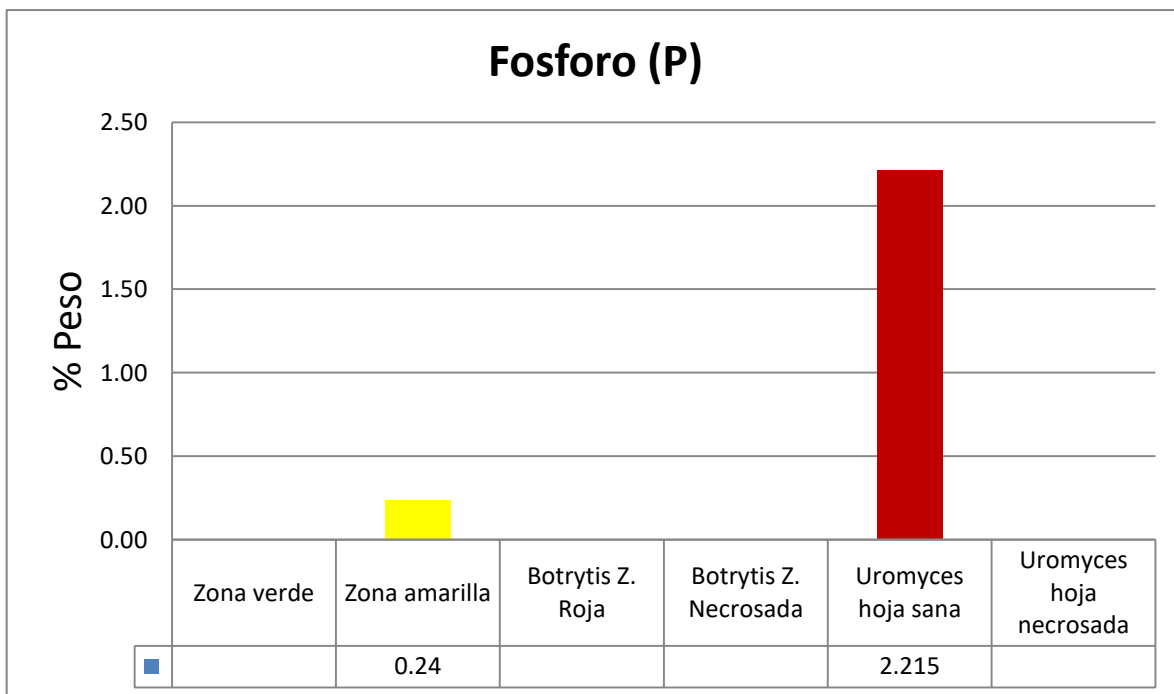
**Figura 34.** Distribución del elemento sodio en distintas zonas de daño

El azufre solo se presentó en la fase agresiva de Uromyces en hoja sana (Figura 36).



**Figura 35.** Distribución del elemento azufre en distintas zonas de daño

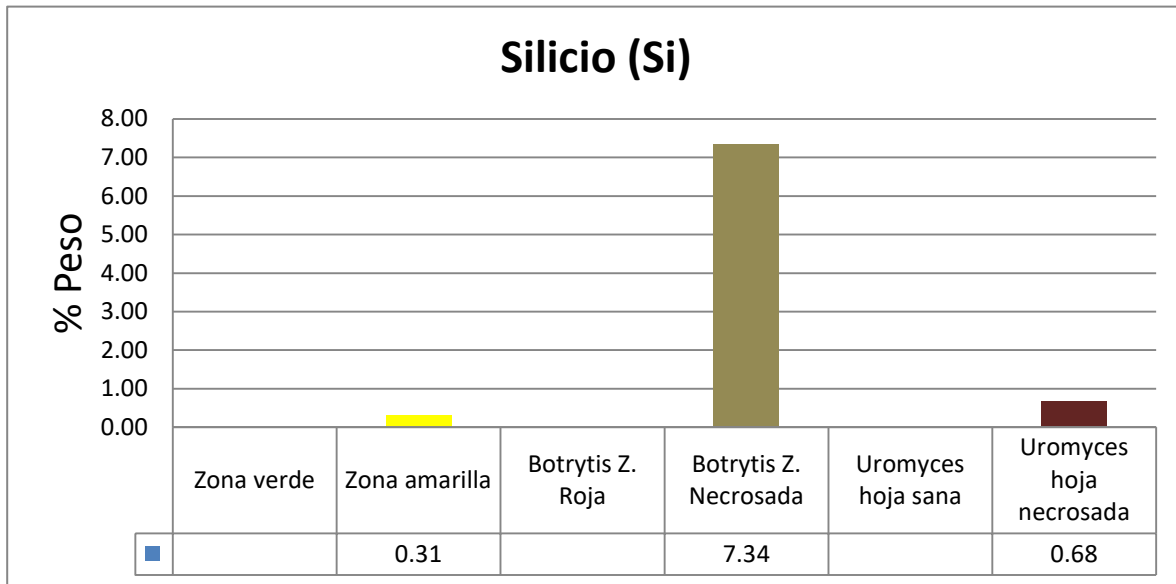
El fosforo predomino en la fase agresiva de uromyces en hoja sana, seguido de la zona amarilla (Figura 37).



**Figura 36.** Distribución del elemento azufre en distintas zonas de daño



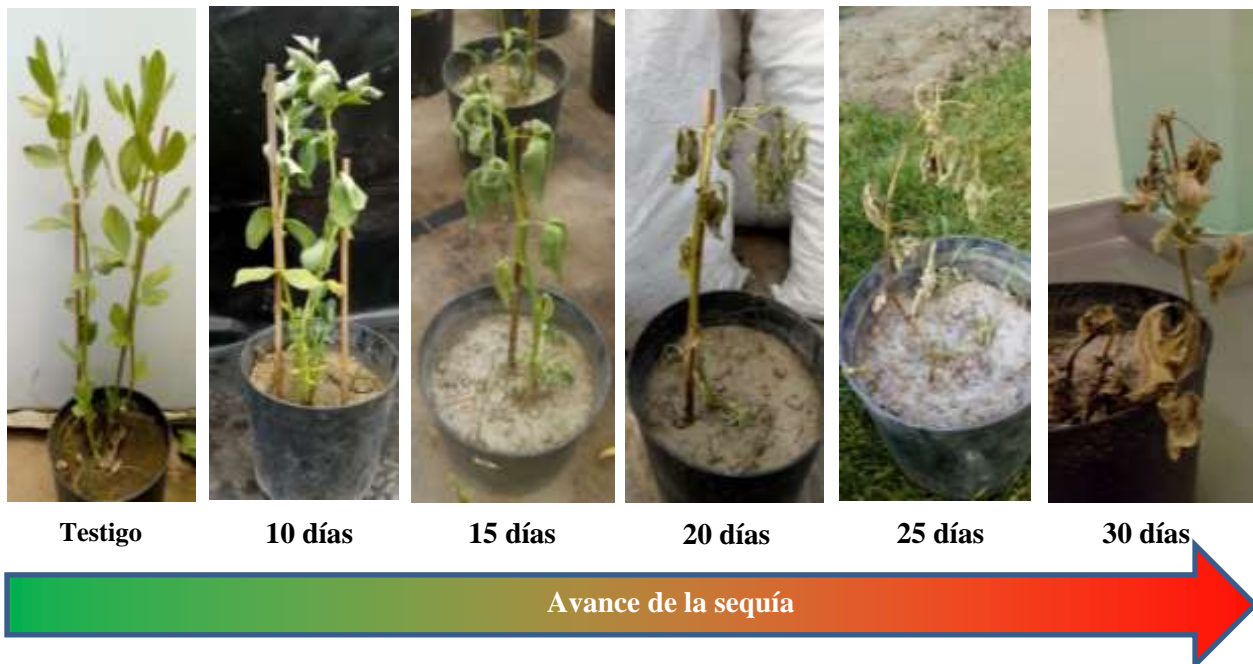
El silicio predominó en la zona necrosada de *Botrytis* con 7.34 % seguido por la roya en hoja necrosada con 0.68 % y la zona amarilla con 0.31 % (Figura 38).



**Figura 37.** Distribución del elemento silicio en distintas zonas de daño

#### 4.3 Sequía

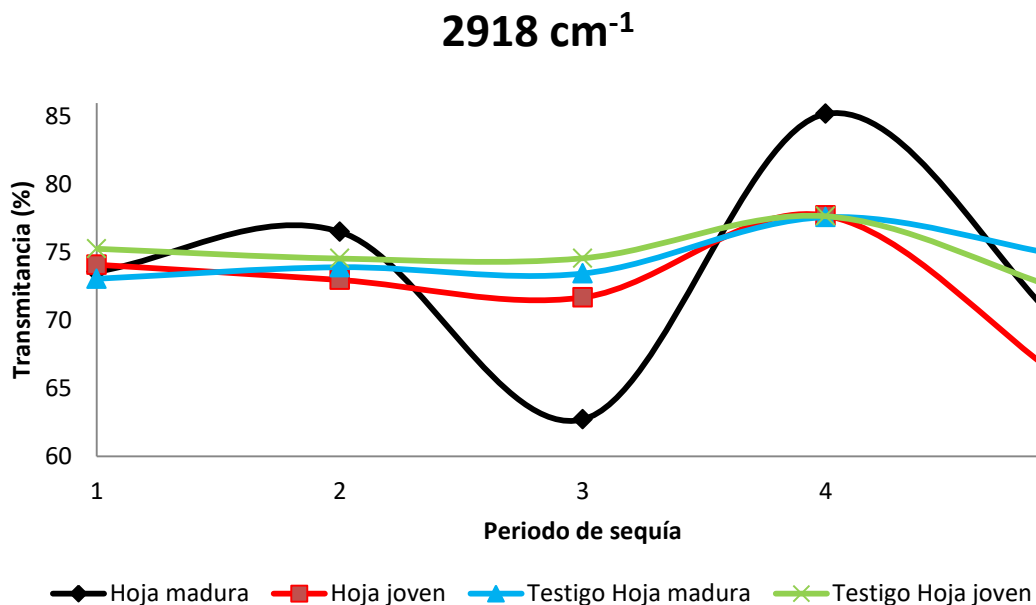
Se realizó el estudio de variación en la composición química de plantas de haba al ser sometidas a cinco periodos de sequía: 10, 15, 20, 25, y 30 días (periodo de sequía 1, 2, 3, 4 y 5), todas con respecto a su testigo (Figura 39).



**Figura 38.** Comportamiento de la planta tras el avance de cinco periodos de la sequía

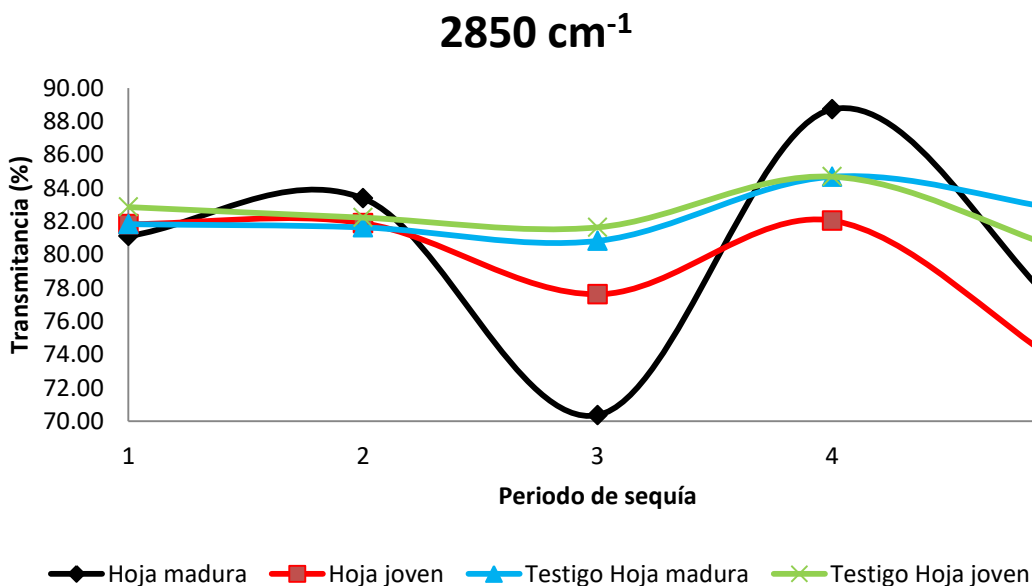
### 4.3.1 Espectroscopía FTIR en hojas

La obtención de los diferentes espectros permitió apreciar distintas frecuencias características de la planta y sus diversas variaciones con cada periodo de sequía. Se encontró una banda de absorción localizada en  $3315\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibración de estiramiento del enlace O-H y N-H; vibraciones atribuidas a la presencia de grupos hidroxilo, moléculas de agua, carbohidratos, proteínas (Amida B) y lípidos (esteroles y ácidos grasos) (Mecozzi *et al.*, 2007). Se localizaron bandas en las frecuencias en  $2918\text{ cm}^{-1}$  (Figura 40) y  $2850\text{ cm}^{-1}$  (Figura 41) correspondientes la vibraciones simétricas y asimétricas de los enlace C-H pertenecientes a grupos metilo ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ) resultado de la formación de lípidos, polisacáridos y carbohidratos (Leite *et al.*, 2018). Para las frecuencias  $2918\text{ cm}^{-1}$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  la hoja madura presentó un comportamiento ondulatorio, donde la disminución del compuesto comenzó a los 15 días de sequía, teniendo un la producción máxima a los 20 días y una perdida máxima a los 25 días de sequía (Cuadro 28). La hoja joven la frecuencia  $2918\text{ cm}^{-1}$  presentó un comportamiento lineal hasta los 20 días de sequía y hasta los 15 días para la frecuencia  $2850\text{ cm}^{-1}$ , siendo a los 25 días la disminución máxima y a los 30 días la formación máxima de lípidos, polisacáridos y carbohidratos (Cuadro 29).



**Figura 390.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

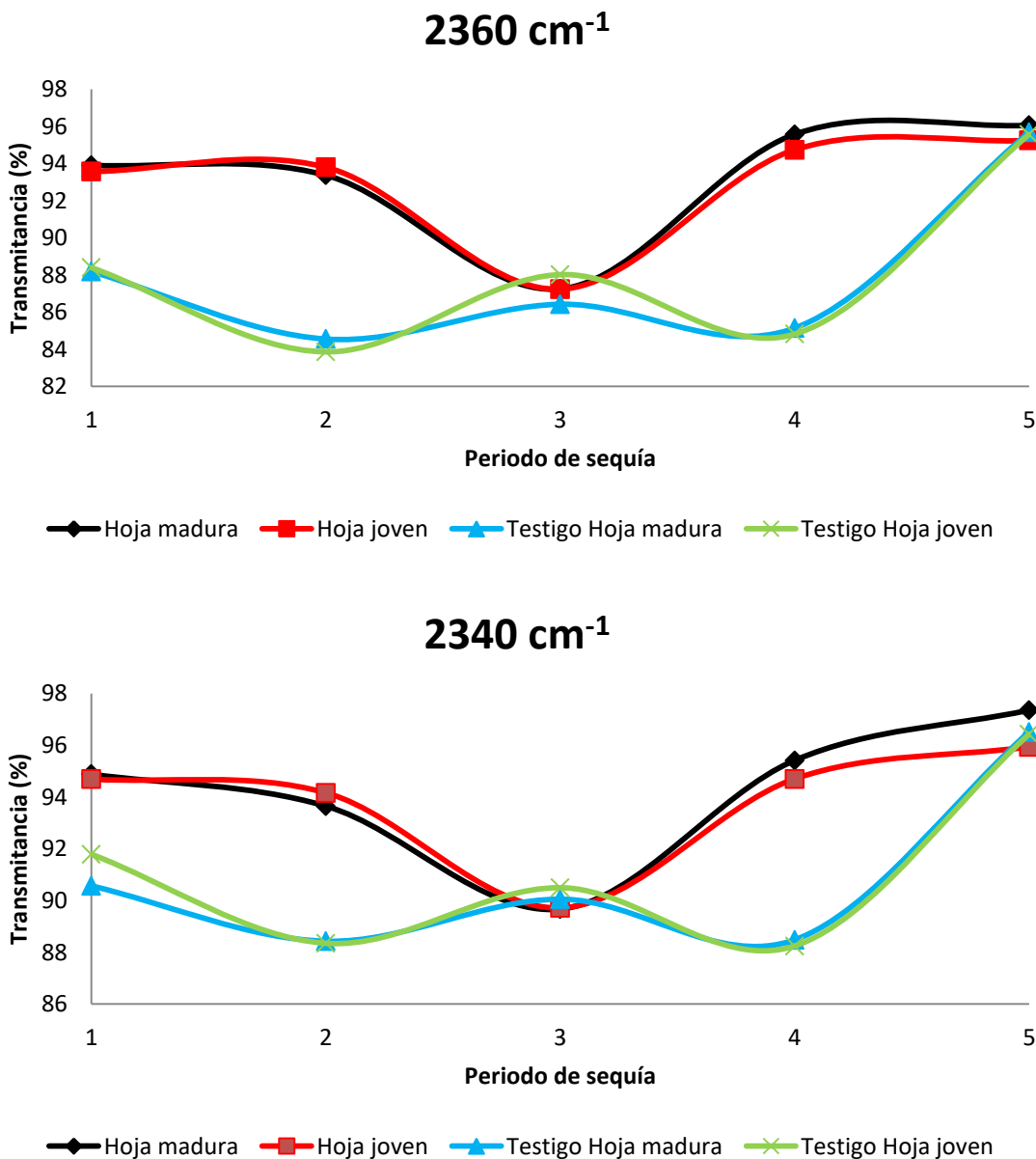
Para la frecuencia  $2850\text{ cm}^{-1}$  la hoja madura presentó un comportamiento ondulatorio, teniendo una producción máxima del 10.45 % de enlaces C-H a los 20 días de sequía y una pérdida máxima del 6.29 % a los 30 días de sequía (Cuadro 28). La hoja joven presentó el inicio de la disminución de compuestos de manera constante hasta alcanzar los 30 días de sequía con un valor de 6.99 % (Cuadro 29).



**Figura 40.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

En la Figura 42, se observa el comportamiento de las frecuencias  $2360$  y  $2340\text{ cm}^{-1}$ , señales que se le atribuyen a la vibración del enlace C=O correspondiente al intercambio de  $\text{CO}_2$  resultado del proceso de fotosíntesis y respiración de la planta. Ambas frecuencias presentaron un comportamiento de campana invertida contraria al testigo. Para la frecuencia  $2360\text{ cm}^{-1}$  la hoja madura solo presentó disminución del compuesto durante todos los periodos de sequía, siendo a los 25 días la pérdida máxima de  $\text{CO}_2$  del 10.43 % (Cuadro 28). La hoja joven presentó una producción máxima a los 20 días y una máxima disminución del a los 15 y 25 días de sequía (Cuadro 29). Para la frecuencia  $2340\text{ cm}^{-1}$  la hoja madura solo presentó disminución del compuesto durante todos los periodos de sequía con excepción a los 20 días, la pérdida máxima de  $\text{CO}_2$  fue del 6.24 % presentándose a los 25 días de sequía (Cuadro 28). La hoja joven presentó

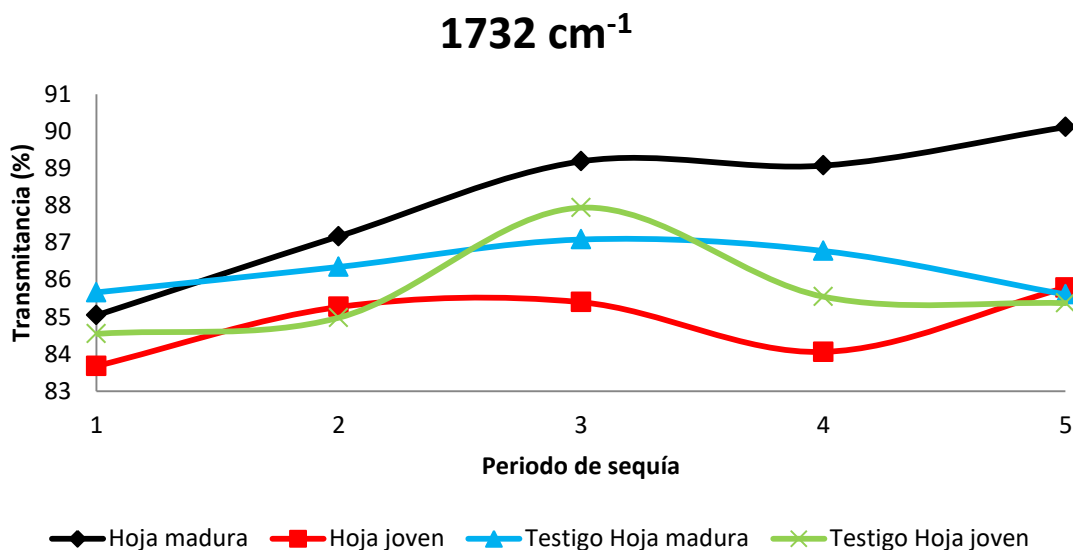
una producción máxima a los 20 días y una máxima disminución del a los 25 días de sequía (Cuadro 29).



**Figura 41.** Variación de producción de grupos C-O durante cinco periodos de sequía

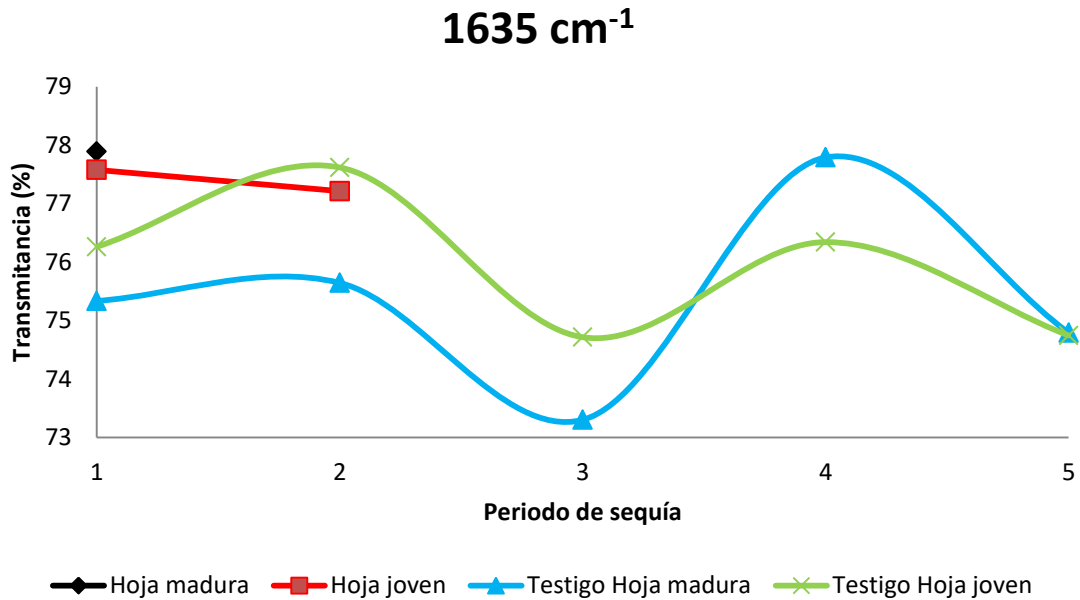
En la Figura 43, se observa el comportamiento de la frecuencia 1732 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la producción de grupos C=O consecuencia de la oxidación en proteínas, formando estructuras como pirrolidonas, aldehídos o ketonas (Mecozii y Sturchio, 2015). La hola madura hubo disminución degradación de proteínas manteniéndose así de manera constante durante el paso de

los periodos de sequía, alcanzando una disminución máxima de 4.51 % a los 30 días (Cuadro 28). La hoja joven tuvo un ligero comportamiento ondulatorio en cuanto a la producción de compuestos, teniendo una máxima producción del 2.54 % a los 20 días de sequía (Cuadro 29).



**Figura 42.** Variación de producción de grupos C=O durante cinco periodos de sequía

En la Figura 44 se observa el comportamiento de las frecuencias 1635 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento del enlace del grupo carbonilo (C=O) del componente lámina β perteneciente a la Amida I (Mecozii y Sturchio, 2017). La hoja madura solo presentó señal a los 10 días de sequía, presentando una pérdida del 2.56 % con respecto al testigo; esto puede ser debido a la sensibilidad del enlace peptídico ante el avance de la sequía (Cuadro 28). Sin embargo, la hoja joven presentó una mayor tolerancia al estrés, estando presente hasta los 15 días de sequía con una diferencia de producción del compuesto del 0.4 % con respecto al testigo (Cuadro 29). Manteniéndose en los testigos un comportamiento ondulatorio constante durante el transcurso de los diferentes periodos de sequía.

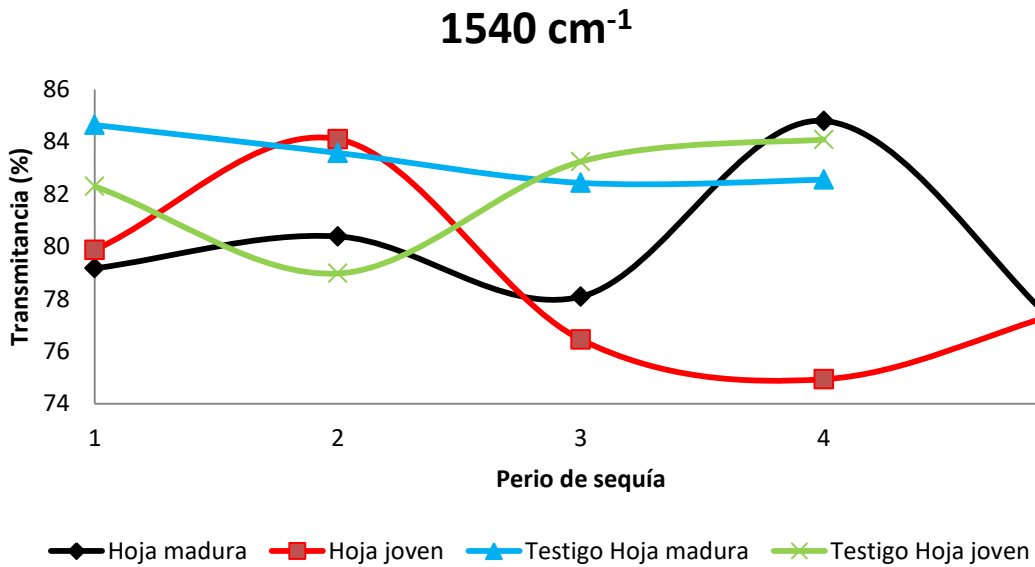


**Figura 43.** Variación de producción de Amida I durante cinco periodos de sequía

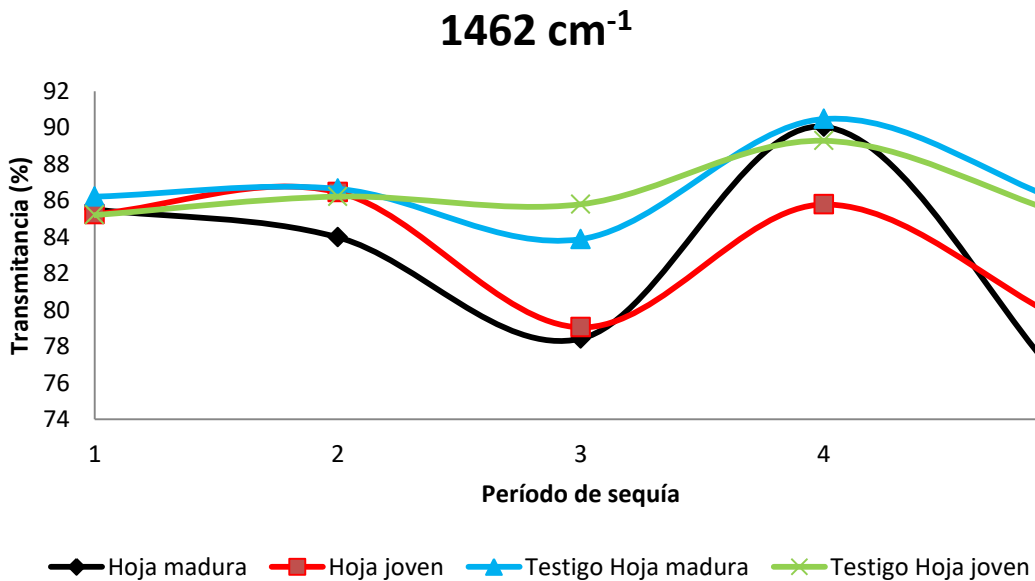
En la Figura 44, se observa el comportamiento de las frecuencias  $1540\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión del enlace N-H perteneciente a la presencia de la Amida II (Mecozii y Sturchio, 2017). La hoja madura presenta un comportamiento ondulatorio, mientras que el testigo lo presenta de manera lineal. La Amida II del testigo al llegar a los 25 días de sequía tiende a desaparecer y la hoja bajo estrés presenta su disminución máxima del compuesto; sin embargo, al llegar los 30 días de sequía, la hoja bajo estrés sigue aumentando la producción hasta alcanzar su producción máxima con un valor del 76.5 % de Transmitancia (Cuadro 28).. En la hoja joven, la producción de Amida II del testigo tiende a desaparecer al llegar a los 25 días de sequía y la hoja bajo estrés presenta su producción máxima del compuesto del 9.16 % (Cuadro 29). Por lo que se comprende, que la producción del compuesto Amida II es un mecanismo de acción que la planta genera para mitigar los efectos provocados por la sequía y así posponer la muerte de la misma.

En la Figura 45, se observa el comportamiento de la frecuencia  $1462\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la flexión asimétrica del enlace C-H correspondiente a la producción de lípidos (Barraza-Garza *et al.* 2013). La hoja madura y su testigo tienden a un comportamiento ondulatorio constante, donde la hoja bajo estrés presenta producción del compuesto durante el transcurso de los diferentes periodos de sequía, presentando una producción máxima de 10.06 % del compuesto a los 30 días

(Cuadro 28). Por lo que se aprecia que la formación del compuesto, debido a que a mayor tiempo de exposición a la sequía, la producción de lípidos es mayor. La hoja joven presento un comportamiento ondulatorio, mientras que el testigo tuvo un comportamiento constante hasta los 25 días de sequía. Donde, la hoja bajo estrés presentó una producción máxima de lípidos a los 20 días de sequía con un valor del 6.75 % (Cuadro 29).

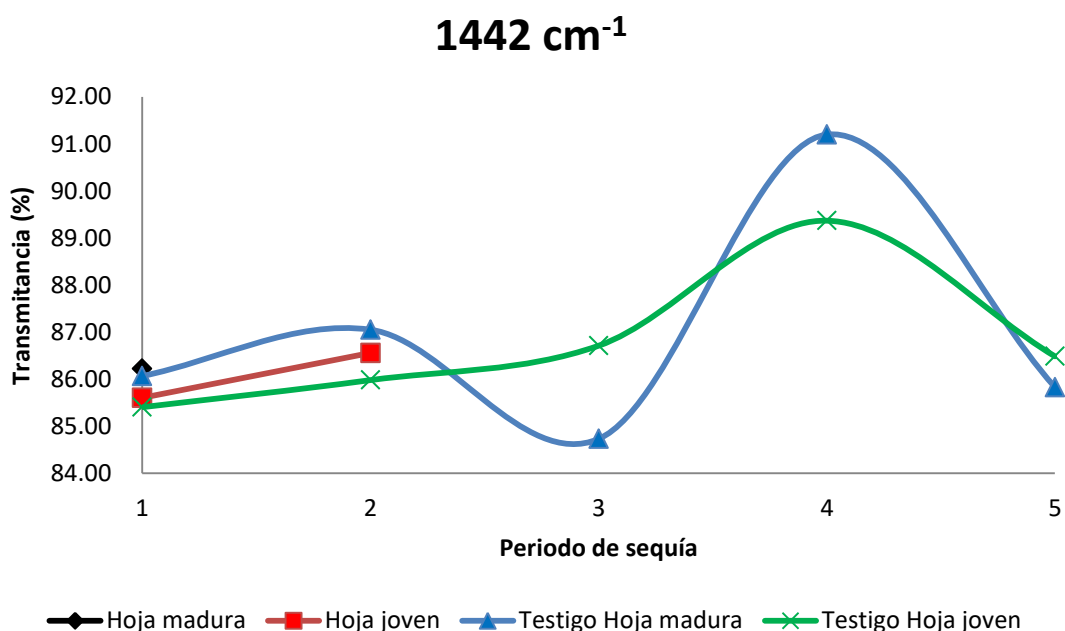


**Figura 44.** Variación de producción de Amida II durante cinco periodos de sequía



**Figura 45.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

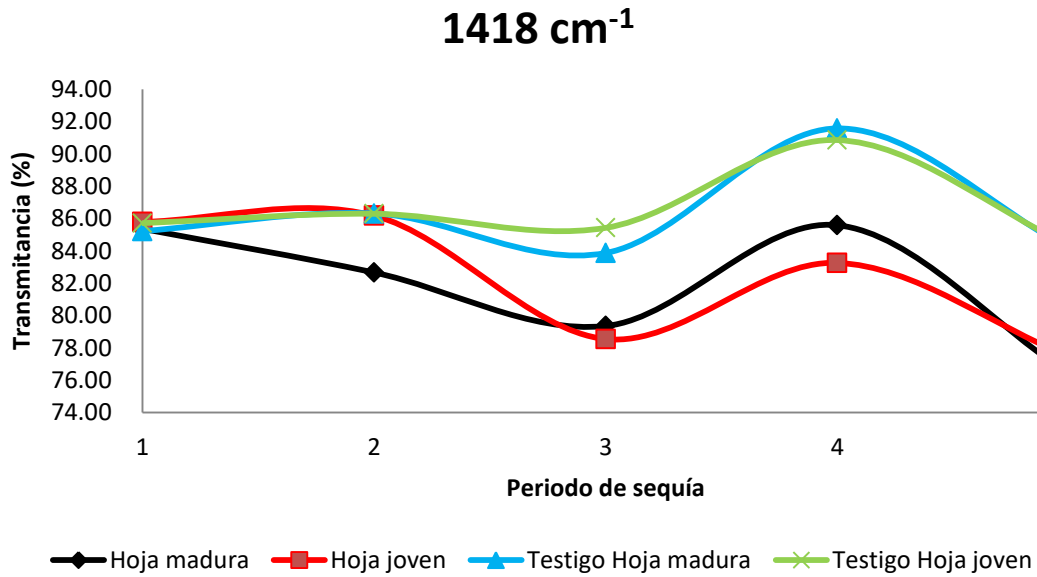
En la Figura 46, se observa el comportamiento de la frecuencia  $1442\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la flexión simétrica del enlace C-H correspondiente a la producción de pectina (Wilson *et al.*, 2000). Para la hoja madura, la producción del compuesto es casi nula ya que solo presenta una disminución del 0.16 % con respecto al testigo (Cuadro 28). La hoja joven presentó mayor tolerancia al estrés, resistiendo la pérdida constante de la pectina hasta los 15 días de sequía (Cuadro 29). Por ende, se comprende que la pectina es un compuesto que es fácilmente afectado al presentarse estrés por sequía en la planta.



**Figura 46.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

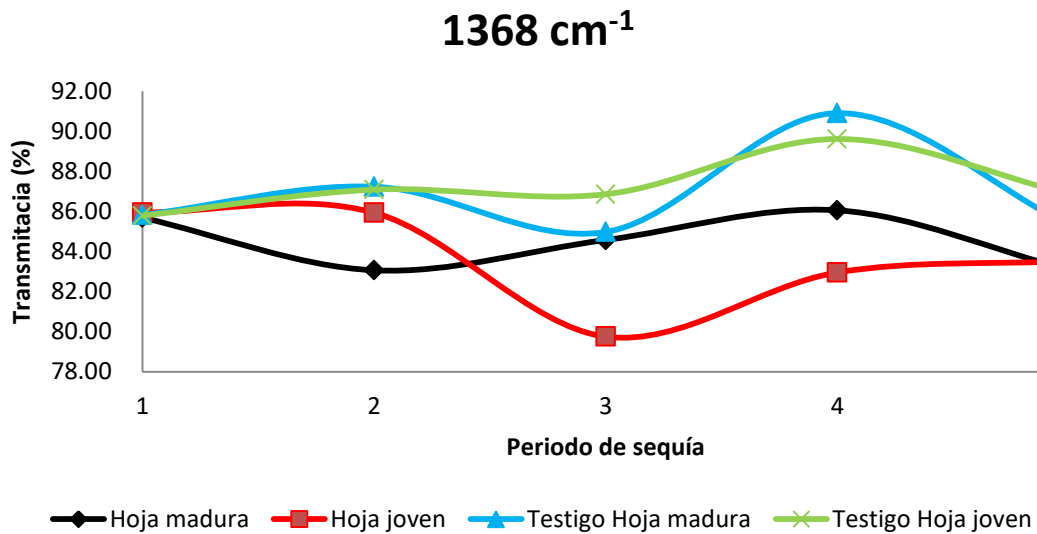
En la Figura 47, se observa el comportamiento de la frecuencia  $1418\text{ cm}^{-1}$ , la cual se le atribuye a la deformación de los enlaces del grupo aldehído (-CHO) y los grupos hidroxilos (-OH) pertenecientes a la glucosa (Mohamed *et al.*, 2011). La hoja madura producción de glucosa tuvo una tendencia constante en cuanto a los periodos de sequía aumentaban, presentando una producción máxima del 7.76 % a los 30 días de sequía (Cuadro 28). La hoja joven al igual que la madura presentó una tendencia constante en la producción de glucosa, tendiendo a aumentar y alcanzando una producción máxima del 6.91 % a los 30 días de sequía (Cuadro 29). Por lo que se puede apreciar que la producción de glucosa es un mecanismo de acción que la planta genera para contrarrestar los efectos negativos provocados por la sequía y así evitar su muerte.





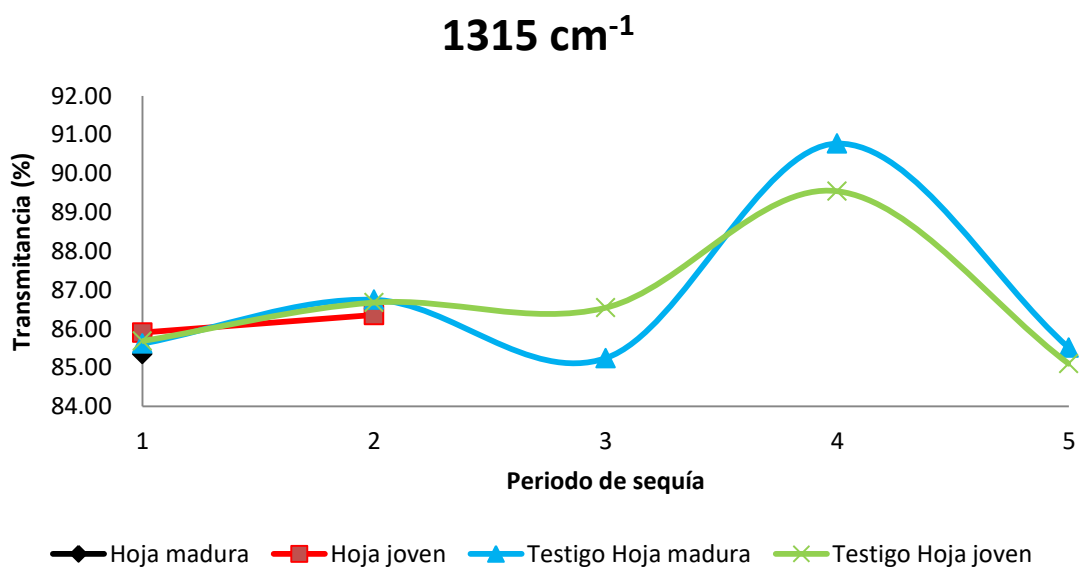
**Figura 47.** Variación de producción de -CHO durante cinco periodos de sequía

En la Figura 48, se observa la frecuencia 1368 cm<sup>-1</sup> atribuida a la deformación del enlace C-H del grupo CH<sub>2</sub> perteneciente al carbohidrato de la celulosa (Jung *et al.*, 2018). La hoja madura y la hoja joven presentaron durante todos los periodos de sequía la producción de carbohidratos, teniendo una producción máxima a los 25 días y 20 días de sequía para la hoja madura y la hoja joven, respectivamente. Por lo que se comprende, que la producción de carbohidratos son mecanismos de acción que la planta genera disminuir los efectos provocados por la sequía.



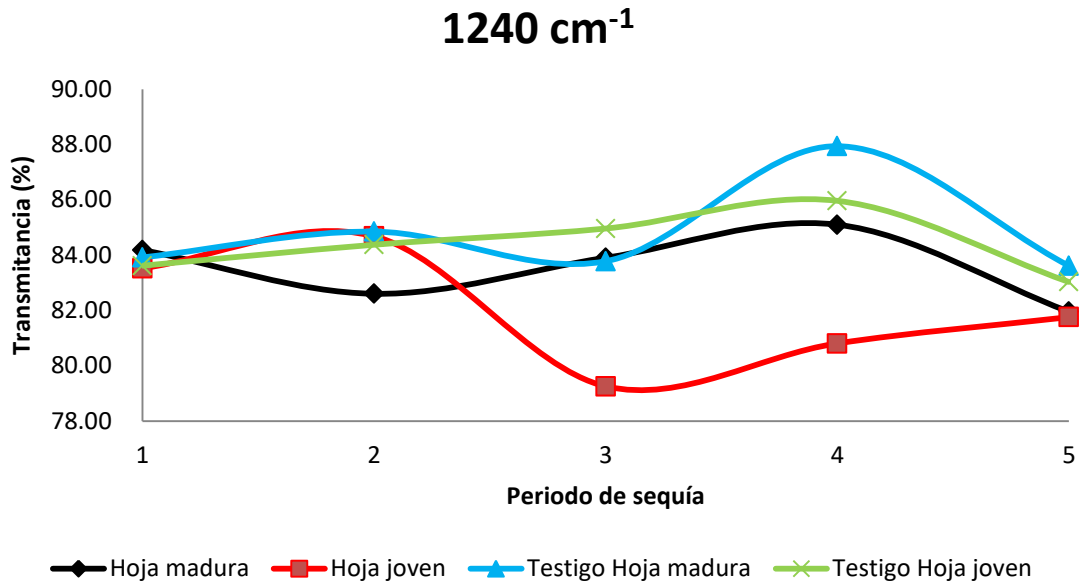
**Figura 48.** Variación de producción de C-H durante cinco periodos de sequía

En la Figura 49, se observa el comportamiento de la frecuencia  $1315\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del estiramiento del enlace C-H perteneciente a la Amida III correspondiente a la estructura secundaria de la pro teína (Al-Kadhemy *et al.*, 2016). Para la hoja madura, la producción del compuesto es casi nula ya que solo presenta un aumento del 0.27 % con respecto al testigo (Cuadro 28). La hoja joven presentó mayor tolerancia al estrés, resistiendo la pérdida constante de la Amida III hasta los 15 días de sequía (Cuadro 29). Por ende, se comprende que la Amida III es un compuesto que es fácilmente afectado al presentarse estrés por sequía en la planta.



**Figura 49.** Variación de producción de C-H durante cinco periodos de sequía

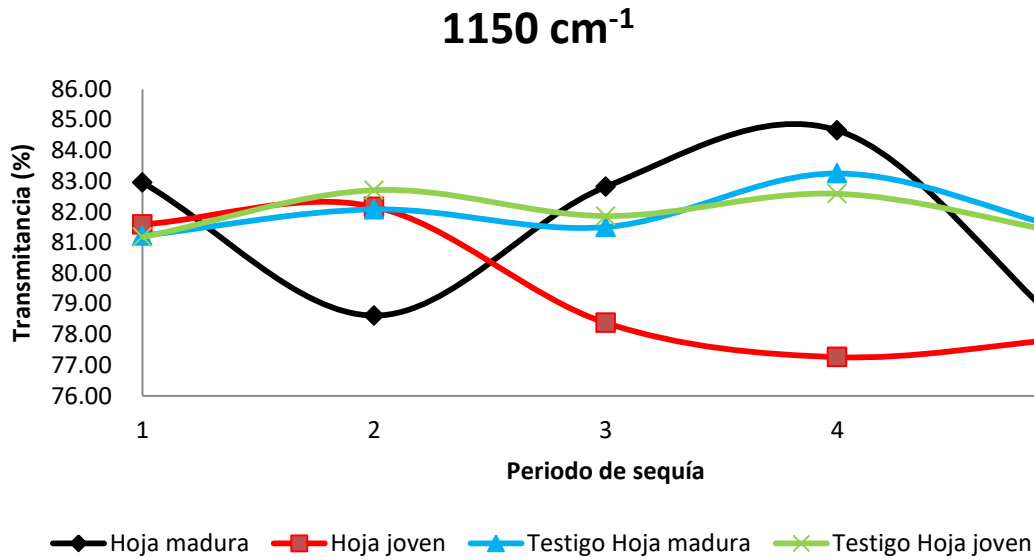
En la Figura 50, se observa el comportamiento de la frecuencia  $1240\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace P=O atribuido a formación de fosfolípidos, ácidos nucleicos (Mecozzi *et al.*, 2007; Pistorius *et al.*, 2008) y producción de lignina (Leite *et al.*, 2018). La hoja madura presentó una máxima producción de compuestos a los 25 días de sequía con una producción del 2.84 % (Cuadro 28). La hoja joven presentó una producción máxima del 5.7 % a los 20 días de sequía y una máxima pérdida a los 15 días de sequía (Cuadro 29).



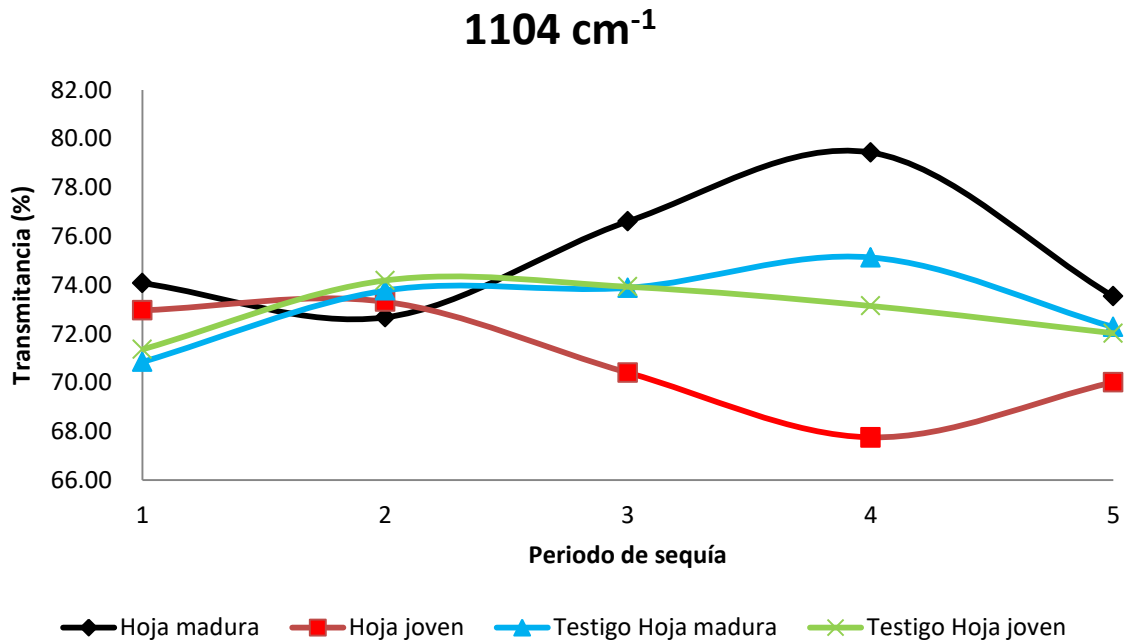
**Figura 50.** Variación de producción de grupos P=O durante cinco periodos de sequía

En la Figura 51, se observa el comportamiento de la frecuencia 1150 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-O perteneciente a la biomasa (Pistorius *et al.*, 2008). Las hojas bajo estrés presentaron un comportamiento ondular, mientras que los testigos presentaron una tendencia más homogénea. La hoja madura presentó una producción máxima de 3.46 % a los 15 días mientras que la pérdida máxima de 1.73 % fue a los 10 días sequía (Cuadro 28). La hoja joven presentó una producción máxima a los 25 días y una pérdida máxima a los 10 días de sequía (Cuadro 29).

En la Figura 52, se observa el comportamiento de la frecuencia localizada en 1104 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración de flexión del enlace C-H o a la vibración de estiramiento del enlace C-O o C-C, atribuidos a la formación de pectina y carbohidratos en la planta (Leite *et al.*, 2018; Lan *et al.*, 2015). La hoja madura presentó una producción máxima de 1.1 % a los 15 días mientras que la pérdida máxima de 4.3 % fue a los 25 días sequía (Cuadro 28). La hoja joven presentó una producción máxima a los 25 días y una pérdida máxima a los 10 días de sequía (Cuadro 29).



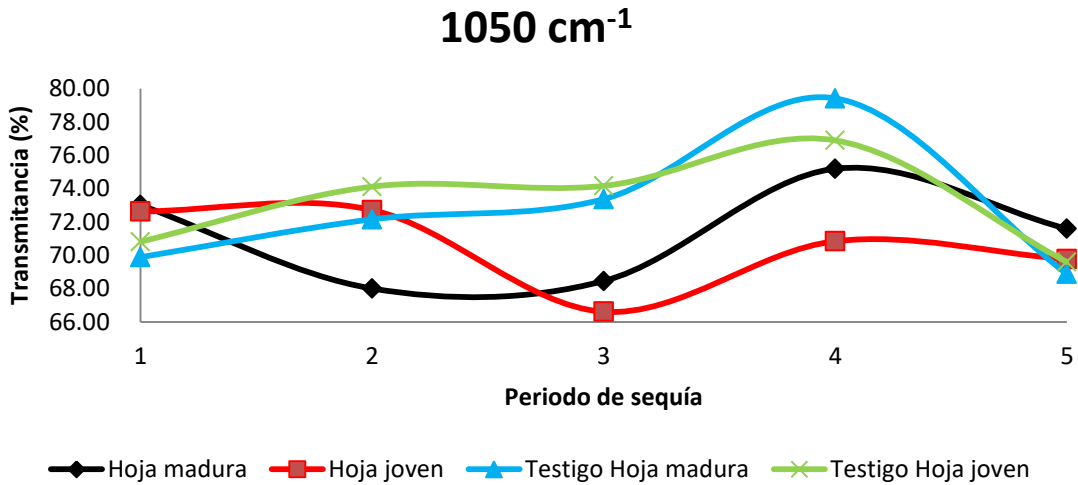
**Figura 51.** Variación de producción de C-O durante cinco periodos de sequía



**Figura 52.** Variación de producción de C-O durante cinco periodos de sequía

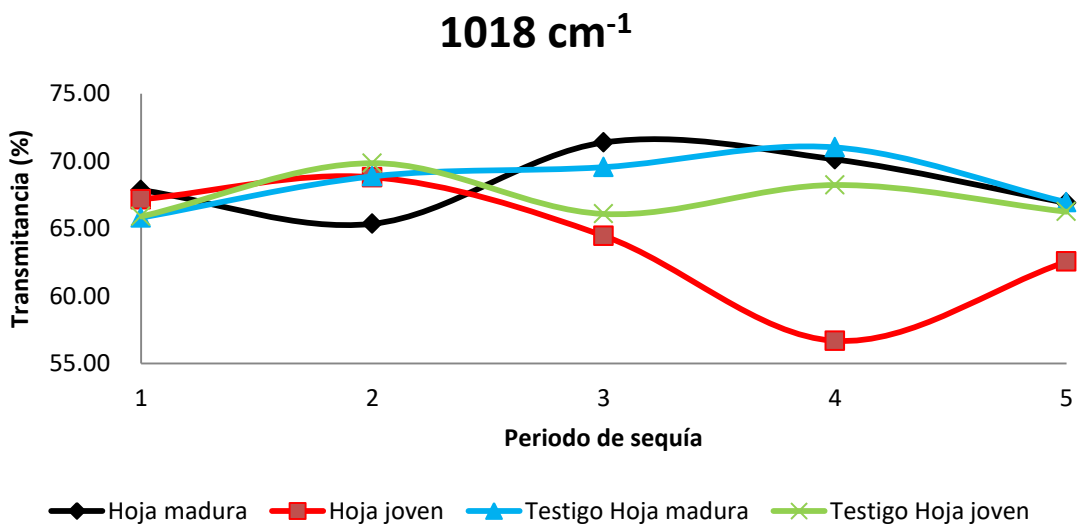
En la Figura 53, se observa el comportamiento de la frecuencia localizada en 1050 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del enlace P=O perteneciente a los fosfolípidos, DNA y RNA de la planta (Mecozzi *et al.*, 2007). Las hojas presentan un patrón ondulatorio, presentando para la hoja madura una producción máxima del 4.92 % a los 20 días y una pérdida máxima de 3.13 % a

los 10 días de sequía (Cuadro 28). La hoja joven presentó un producción máxima de del 7.55 % a los 20 días y una pérdida máxima de 1.81 % a los 10 días de sequía (Cuadro 29).



**Figura 53.** Variación de producción de ARN y ADN durante cinco periodos de sequía

En la Figura 54, se observa el comportamiento de la frecuencia 1018 cm<sup>-1</sup> asignada a la vibración de deformación del enlace C-O perteneciente la producción de ácidos grasos (Sofi et al., 2013). La hoja madura presentó un comportamiento homogéneo con respecto a su testigo, presentando una producción máxima a los 15 días y una pérdida máxima a los 10 días de sequía (Cuadro 28). La hoja joven presentó un aumentó máximo a los 25 días de sequía con un valor de 11.55 % y una pérdida máxima a los 10 días de sequía (Cuadro 29).



**Figura 54.** Variación de producción de C-O durante cinco periodos de sequía

**Cuadro 28.** Variaciones del % de Transmitancia en frecuencias características de hojas maduras de *Vicia faba* L. sometida a distintos periodos de sequía con respecto a su testigo.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
2918	0.51	2.61	-10.74	7.6	-5.56
2850	-0.72	1.74	-10.45	4.04	-6.29
2360	5.72	8.82	0.83	10.43	0.38
2340	4.32	5.23	-0.38	6.94	0.84
1732	-0.62	0.82	2.1	2.3	4.51
1635	2.56	--	--	--	--
1600	--	* 77.61	--	* 80.19	--
1575	* 71.74	* 76.2	-2.75	* 81.58	* 72.48
1540	-5.48	-3.19	-4.35	2.25	* 76.65
1462	-0.7	-2.66	-5.46	-0.43	-10.06
1442	0.16	--	--	--	--
1418	0.14	-3.65	-4.52	-5.98	-7.76
1368	-0.14	-4.17	-0.4	-4.85	-2.23
1315	-0.27	--	--	--	--
1240	0.27	-2.25	0.13	-2.84	-1.66
1150	1.73	-3.46	1.31	1.41	-3.33
1104	3.23	-1.1	2.72	4.3	1.26
1050	3.13	-4.15	-4.92	-4.22	2.71
1018	2.04	-3.52	1.83	-0.89	-0.05

Las variaciones del % de Transmitancia de la raíz se encuentra dada con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a la hoja bajo tratamiento por sequía y que no aparecen en el testigo.

**Cuadro 29.** Variaciones del % de Transmitancia en frecuencias características de hojas jóvenes de *Vicia faba* L. sometida a distintos periodos de sequía con respecto a su testigo.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
2918	-1.17	-1.57	-2.88	0.04	-6.71
2850	-1.03	-0.33	-4.01	-2.63	-6.99
2360	5.16	9.94	-0.78	9.92	-0.33
2340	2.9	5.82	-0.78	6.46	-0.48
1732	-0.87	0.29	-2.54	-1.49	0.41
1635	1.32	-0.41	--	--	--
1600	--	--	--	* 77.6	--
1575	-0.69	2.41	-7.63	* 70.57	* 77.26
1540	-2.43	5.13	-6.79	-9.16	* 77.54
1462	0.05	0.24	-6.75	-3.5	-5.85
1442	0.2	0.58	--	--	--
1418	0.07	-0.12	-6.88	-7.6	-6.91
1368	0.16	-1.15	-7.1	-6.66	-3.35
1315	0.22	-0.32	--	--	--

1240	-0.09	0.31	-5.7	-5.16	-1.27
1150	0.41	-0.54	-3.48	-5.33	-3.41
1104	1.6	-0.87	-3.52	-5.39	-2.01
1050	1.81	-1.4	-7.55	-6.05	0.17
1018	1.27	-1.04	-1.63	-11.55	-3.7

Las variaciones del % de Transmitancia de la raíz se encuentra dada con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad. Asimismo, los valores con \* corresponden a valores en la hoja y que no aparecen en el testigo.

#### **4.3.1.7 Formación al inicio de sequía**

Durante los periodos de sequía la máxima formación de compuestos se genera durante los primeros 10 días de sequía. En la hoja madura los compuestos que cumplen este comportamiento es la oxidación de proteínas, Amida II y Amida III. La hoja joven no presenta formación de compuestos.

#### **4.3.1.8 Formación en sequía intermedia**

Durante los periodos de sequía la máxima formación de compuestos se genera cuando la sequía se pronuncia de manera moderada a los 20 días de sequía. Para la hoja madura los compuestos que tienen dicho comportamiento son la lípidos y los ácidos nucleicos; para la hoja joven las frecuencias que cumplen con este comportamiento son los lípidos, la oxidación proteica, la amida II, los carbohidratos y los ácidos nucleicos.

#### **4.3.1.9 Formación en sequia intensa**

Durante los periodos de sequía existen frecuencias tienen una expresión máxima cuando la sequía se pronuncia de manera intensa a los 30 días de sequía. En la hoja madura los compuestos que tienen este comportamiento son los lípidos y la glucosa; para la hoja joven los compuestos que tienen este comportamiento son los lípidos.

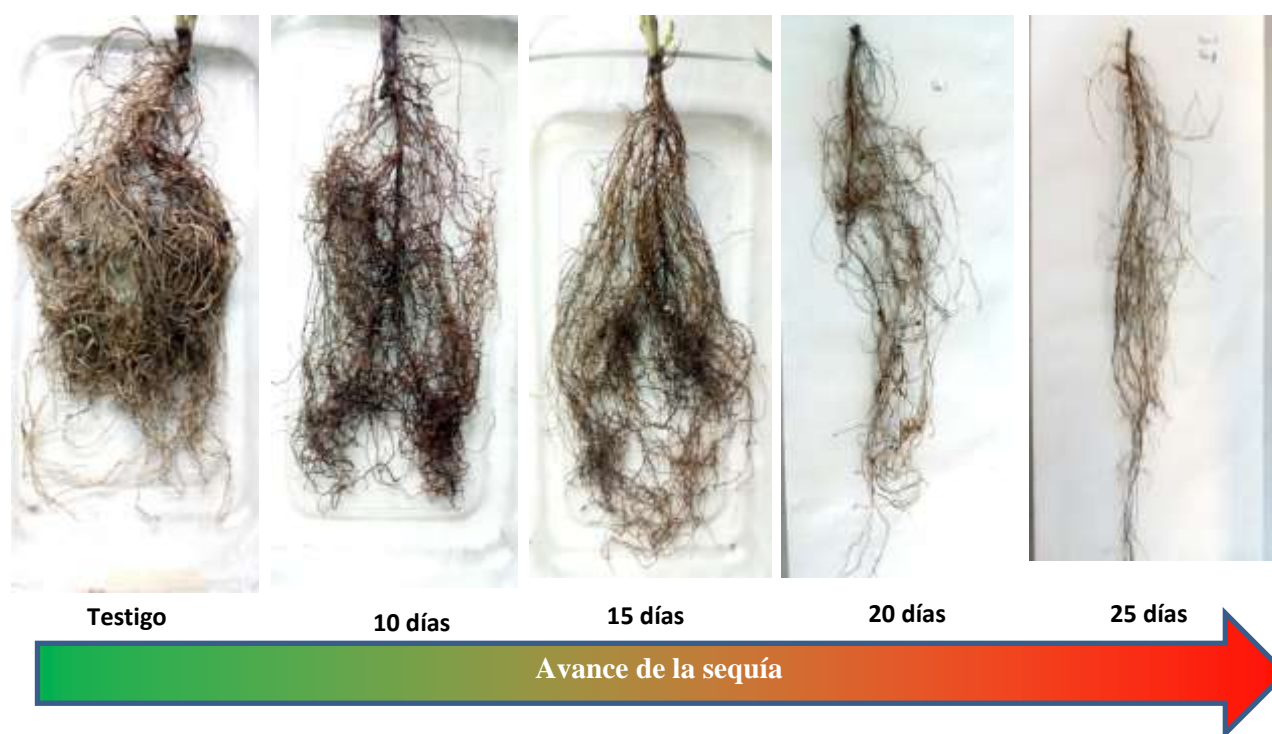
#### **4.3.1.10 Formación en testigos o tratamientos**

Durante los periodos de sequía existen frecuencias que solo se expresan en testigos o en tratamientos de acuerdo al transcurso de los días. Los compuestos que suelen expresarse en ambos testigos durante los periodos 20, 25 y 30 días de sequía son la Amida I, Amida III y pectina. Las frecuencias en la hoja madura son la Amida I en el periodo 15 y 25 días de sequía,

Amida I los 25 y 30 días de sequía; para la hoja joven en la Amida II a los 25 y 30 días de sequía.

#### 4.3.2 Espectroscopía FTIR en raíces

Las raíces permiten el anclaje, almacenamiento, transporte de nutrientes en la planta y ayudan al enriquecimiento de nutrientes al suelo mediante la fijación simbiótica de nitrógeno ( $N_2$ ) a través de su nodulación (Fischer *et al.*, 2019). Sin embargo al igual que el vástago, la raíz se ve afectada por estrés hídrico afectando directamente a su densidad, diámetro y longitud, disminuyendo la capacidad de adquisición de los recursos del suelo (Figura 55). No obstante, la raíz genera distintos mecanismos químicos de defensa para contrarrestar los efectos provocados por la sequía.

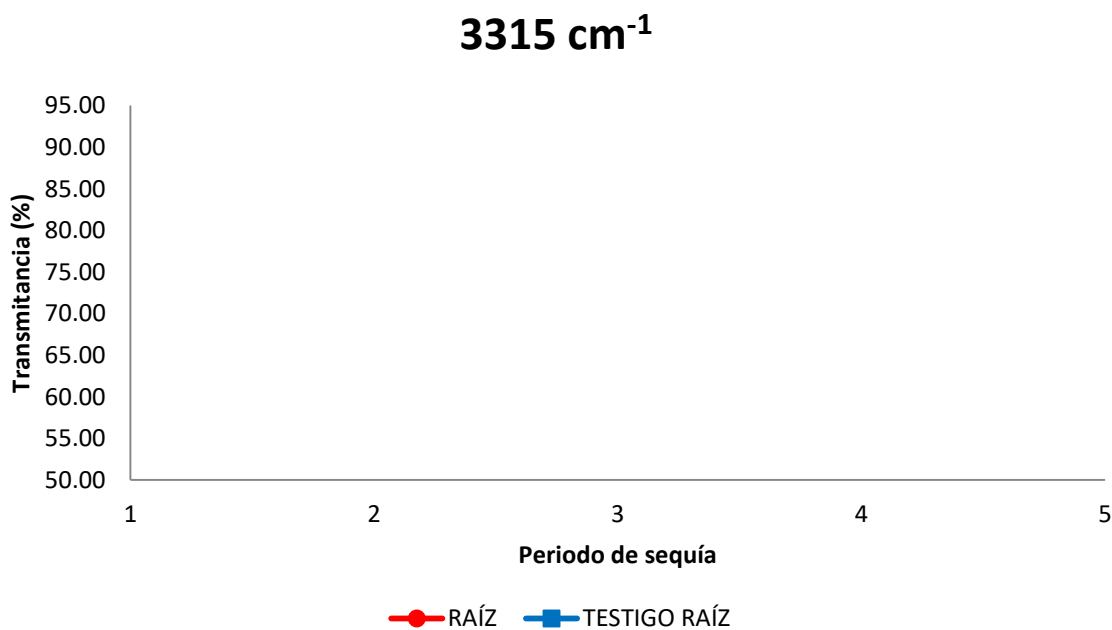


**Figura 55.** Comportamiento de raíces tras el avance de la sequía

Los espectros infrarrojos arrojaron diferentes frecuencias características a la formación o desaparición de grupos funcionales correspondientes a diferentes compuestos dentro de la raíz.

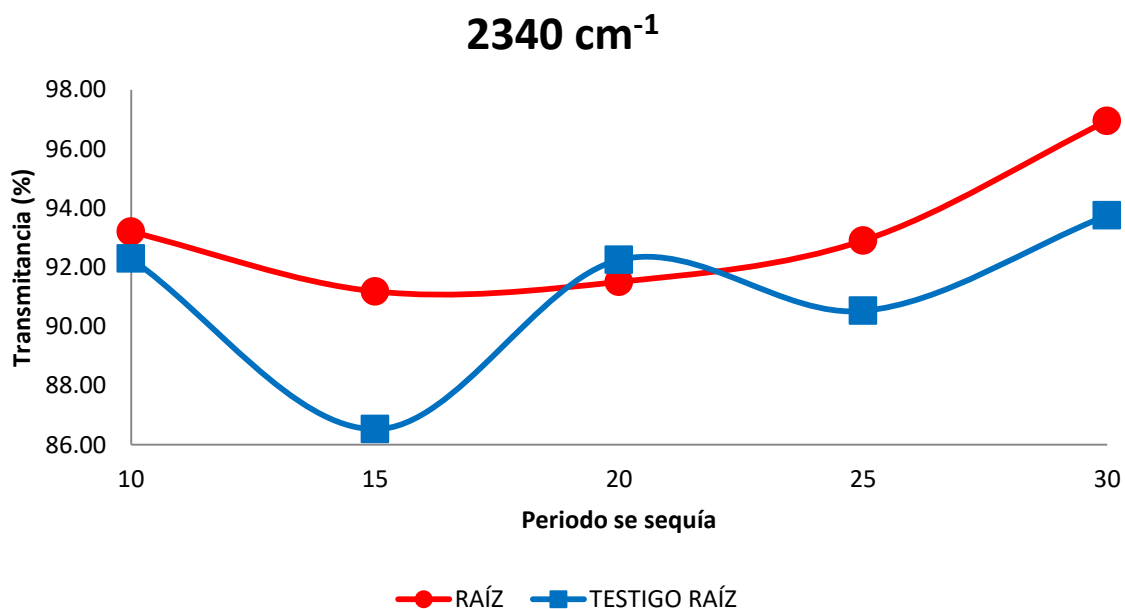
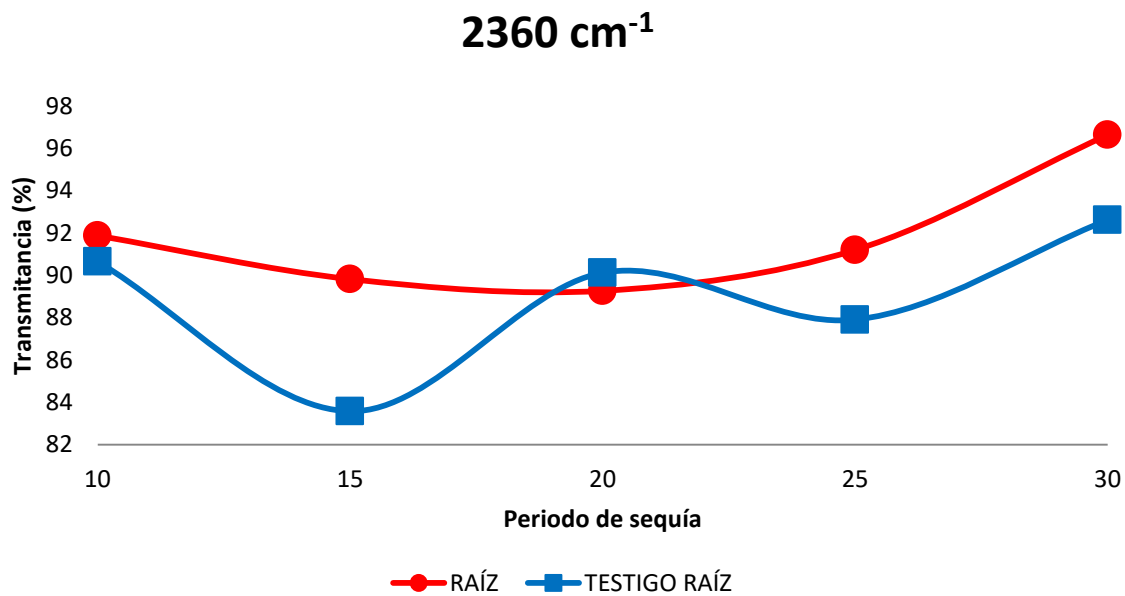


Se encontró la banda de absorción en la frecuencia  $3315\text{ cm}^{-1}$  (Figura 56) correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace O-H atribuido a las moléculas de agua (Mecozzi *et al.*, 2007). Asimismo, se observa que a los 10 y 15 días de sequía no hay diferencia en la presencia de agua con respecto al testigo, empezando su disminución a los 20 días. Sin embargo, existe una pérdida máxima de alrededor de 29 % cuando se alcanza el periodo de 30 días de sequía (Cuadro 30). La presencia de esta frecuencia fue reportada anteriormente bajo estrés por sequía en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) (Ogbaga *et al.*, 2017), sorgo (*Sorghum* spp.) (Ogbaga *et al.*, 2016) y chícharo (*Psiumsativum* L.) (Lahlali *et al.*, 2014); asimismo, se ha detectado también en raíces de haba bajo presencia de contaminantes como el arsénico (As) (Mecozzi y Sturchio, 2017).



**Figura 56.** Variación de producción de grupos O-H durante cinco periodos de sequía

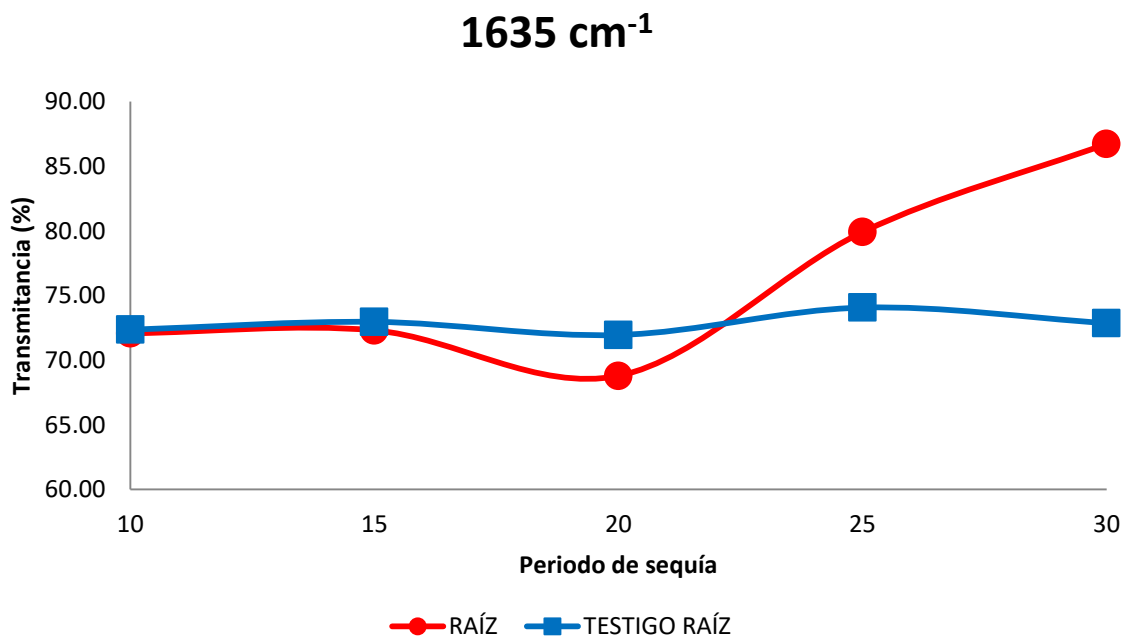
Las bandas en  $2360$  y  $2340\text{ cm}^{-1}$  (Figura 57) corresponden a la vibración de enlace C=O, las cuales fueron atribuidas a la absorción y asimilación de carbono ( $\text{CO}_2$ ) resultado del proceso de fotosíntesis (Leng y Hall, 2019). En ambas frecuencias, no presentan diferencias significativas a los 10 y 20 días de sequía, presentándose una disminución máxima del  $\text{CO}_2$  a los 15 días con un valor aproximado del 6% para  $2360\text{ cm}^{-1}$  y 5% para  $2340\text{ cm}^{-1}$  (Cuadro 30). La pérdida constante de  $\text{CO}_2$  fue a partir de los 25 días de sequía con respecto al testigo. Estas frecuencias han sido reportadas en raíces de *Sesuvium portulacastrum* L. bajo estrés salino (Nikalje *et al.*, 2019) y en raíces de *Coleus blumei* bajo estrés por plomo (Pb) (Hu y Yuan, 2018).



**Figura 57.** Variación de producción de grupos C-O durante cinco periodos de sequía

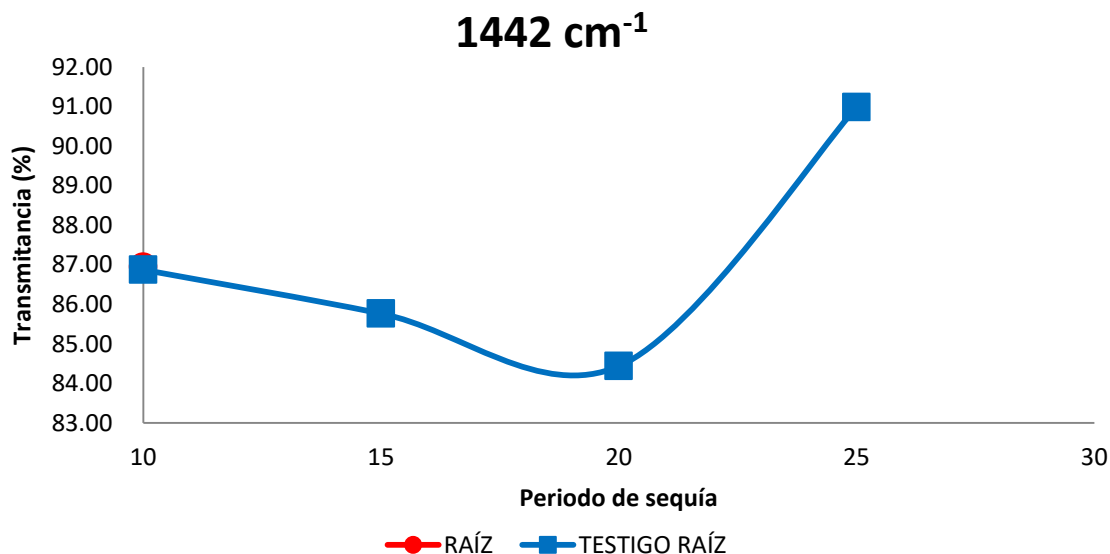
La banda en  $1635 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 58) corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C=O, la cual fue atribuido al enlace peptídico Amida I del componente lámina  $\beta$  perteneciente a la estructura secundaria de la proteína (Mecozzi y Sturchio, 2015), no se detectó diferencia en la producción de este enlace entre los periodos 10 y 15 días. Sin embargo, empezó a disminuir a los 20 días manteniéndose de manera constante hasta alcanzar la máxima disminución a los 30 días

de sequía con un valor aproximado del 14 % de Transmitancia (Cuadro 30). La frecuencia ha sido reportada en raíces de maíz y trigo (Meinen y Rauber, 2015), avena y chicharo (Naumann *et al.*, 2010) en condiciones de estrés por sequía; en raíces de arroz en situación de estrés por Aluminio (Al) (Lu *et al.*, 2019) y Cadmio (Cd) (Xie *et al.*, 2015); en raíces de *Sesuvium portulacastrum* L. bajo estrés salino (Nikalje *et al.*, 2019); en raíces de caña de azúcar bajo estrés por exceso de cadmio (Yu *et al.*, 2018), en raíces de *Mirabilis jalapa* L. (Wang *et al.*, 2018) y *Coleus blumei* (Hu y Yuan, 2018) cuando crecen bajo estrés por plomo.



**Figura 58.** Variación de producción de grupos C=O durante cinco periodos de sequía

La banda en 1442 cm<sup>-1</sup> (Figura 59) correspondiente a la flexión simétrica del enlace C-H fue atribuido a la formación de grupos CH<sub>2</sub> pertenecientes a la pectina como lo reporta Wilson *et al.* (2000) en cebolla al estudiar sus hojas bajo hidratación. La frecuencia se presentó en el tratamiento únicamente a los 10 días de sequía con un valor del 87 % de Transmitancia. Sin embargo, en el testigo se registró a los 10, 15, 20 y 25 días. La presencia máxima del compuesto fue a los 20 días y la pérdida máxima a los 25 días de sequía (Cuadro 30). La ausencia del enlace a partir de los 15 días de sequía es probable que se deba al efecto de la intensidad de la sequía. Asimismo, esta frecuencia ha sido reportada en raíces de *Abelmoschus esculentus* cuando es dañada por nematodos (Sharma *et al.*, 2018), sin embargo presentó sensibilidad a la sequía.

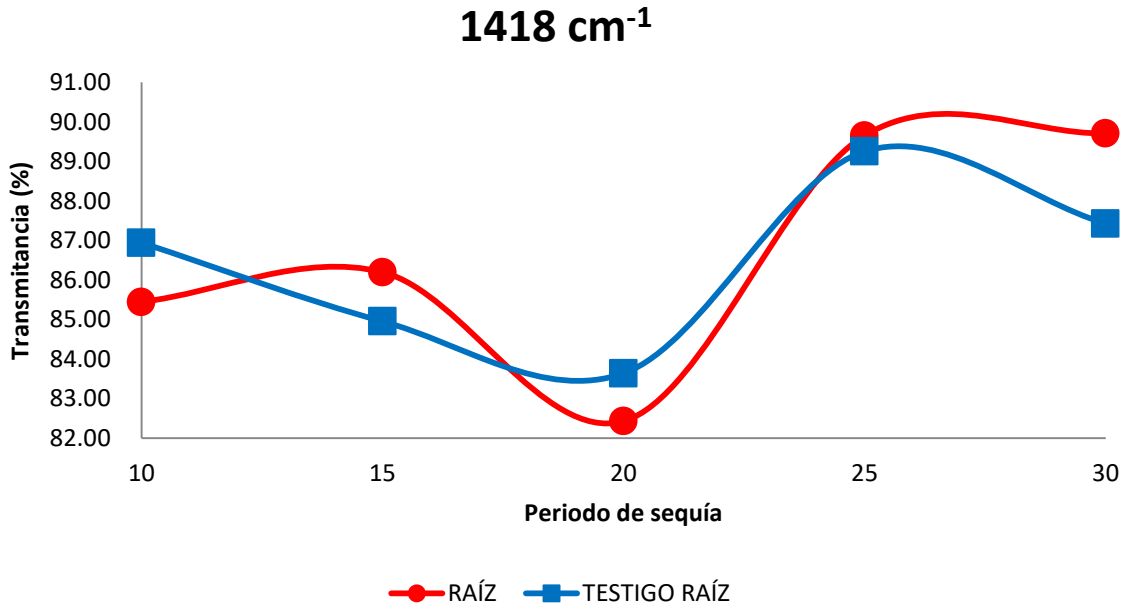


**Figura 59.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

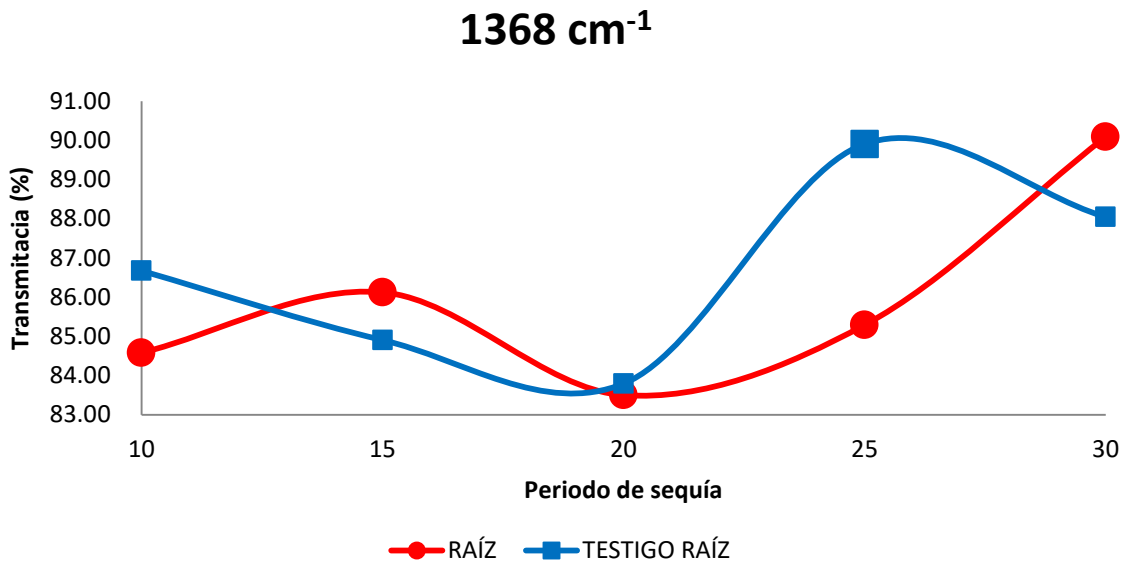
La banda en  $1418\text{ cm}^{-1}$  (Figura 60) correspondiente a la deformación de los enlaces del grupo aldehído (-CHO) fue atribuido a la presencia de glucosa como lo cataloga Mohamed *et al.* (2011). El compuesto tuvo mayor presencia a los 10 días con un aumento del 1.5 % y una disminución máxima del 2.28 % a los 30 días de sequía con respecto al testigo (Cuadro 30). De igual manera, esta frecuencia ha sido reportada en raíces de arroz bajo condiciones de estrés por Aluminio (Lu *et al.*, 2019), en raíces de *Abelmoschus esculentus* bajo estrés por nematodos (Sharma *et al.*, 2018) y en raíces de *Coleus blumei* cuando está en estrés por plomo (Hu y Yuan, 2018).

La banda en  $1368\text{ cm}^{-1}$  (Figura 61) correspondiente a la deformación del enlace C-H fue atribuido a la formación de grupos  $\text{CH}_2$  pertenecientes a las moléculas de carbohidratos de la celulosa (Jung *et al.*, 2018). Los cambios de producción del compuesto empezaron a diferenciar desde los primeros 10 días, presentándose un aumento máximo de 4.62 % a los 25 días y una disminución máxima a los 30 días de sequía (Cuadro 30). De igual manera, esta frecuencia ha sido encontrada en raíces de arroz bajo condiciones de estrés por Aluminio (Lu *et al.*, 2019), en raíces de plantas medicinales como *Physalis peruviana* y *Physalis angulata* (Leite *et al.*, 2018), en raíces de *Abelmoschus esculentus* bajo estrés por nematodos (Sharma *et al.*, 2018), en raíces de caña cuando está en estrés por exceso de cadmio (Yu *et al.*, 2018), en raíces de *Mirabilis jalapa*

*L.* (Wang *et al.*, 2018) y *Coleus blumei* (Hu y Yuan, 2018) cuando crecen en presencia de plomo y en las raíces de arroz bajo estrés por cadmio (Xie *et al.*, 2015).



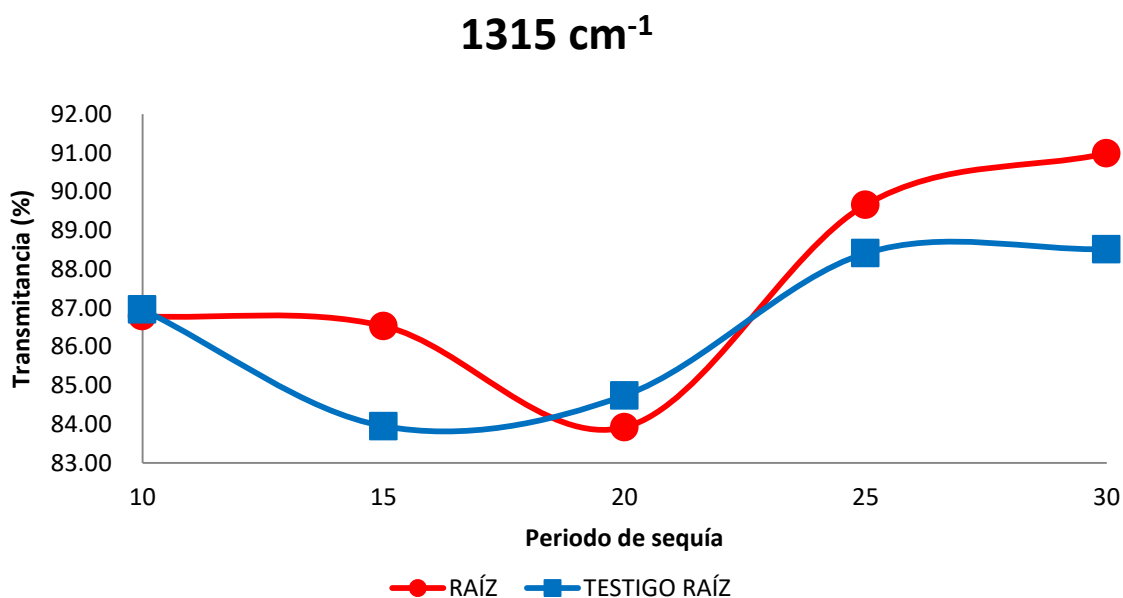
**Figura 60.** Variación de producción de grupos -CHO durante cinco periodos de sequía



**Figura 61.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

La banda en 1315 cm<sup>-1</sup> (Figura 62) correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-H fue atribuido al enlace peptídico Amida III perteneciente a la estructura secundaria (Al-Kadhemy

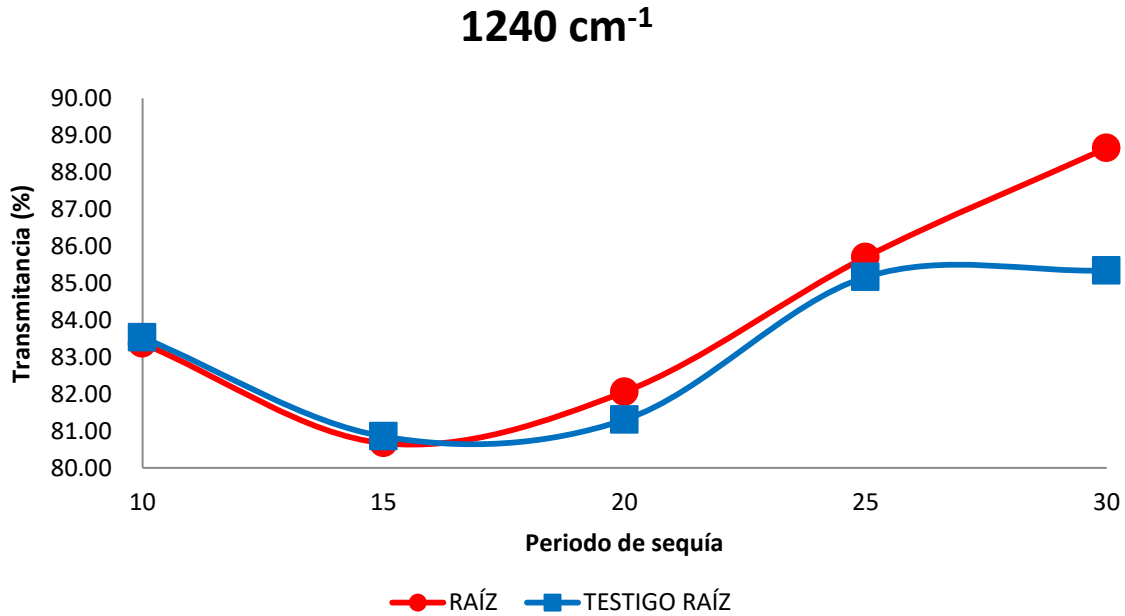
*et al.*, 2016). La formación de Amida III no tuvo diferencia significativa a los 10 y 20 días con respecto al testigo, teniendo una pérdida máxima a los 15 días de sequía (Cuadro 30). De igual manera, esta frecuencia ha sido detectada en raíces de arroz bajo condiciones de estrés por Aluminio (Lu *et al.*, 2019), en raíces de plantas medicinales *Physalis peruviana* y *Physalis angulata* (Leite *et al.*, 2018), en raíces de *Abelmoschus esculentus* cuando es dañada por nematodos (Sharma *et al.*, 2018), en raíces de *Coleus blumei* bajo estrés por plomo (Hu y Yuan, 2018) y en raíces de arroz bajo estrés por cadmio (Xie *et al.*, 2015).



**Figura 62.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía

La banda en 1240 cm<sup>-1</sup> (Figura 63) correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace P=O fue atribuido a la formación de ácidos nucleicos (Pistorius *et al.*, 2008) y/o producción de lignina (Leite *et al.*, 2018). Se puede observar que la presencia de los compuestos no presenta diferencias significativas durante los primeros cuatro periodos de sequía. Sin embargo, la raíz presentó una pérdida constante hasta alcanzar los 30 días con respecto al testigo, presentándose una pérdida máxima del 3 % (Cuadro 30). De igual manera, esta frecuencia ha sido reportada en raíces de arroz bajo condiciones de estrés por Aluminio (Lu *et al.*, 2019), en *Sesuvium portulacastrum* L. bajo estrés salino (Nikalje *et al.*, 2019), plantas medicinales como *Physalis peruviana* y *Physalis angulata* (Leite *et al.*, 2018), en *Abelmoschus esculentus* cuando es

atacada por nematodos (Sharma *et al.*, 2018) y en *Coleus blumei* bajo estrés por plomo (Hu y Yuan, 2018).

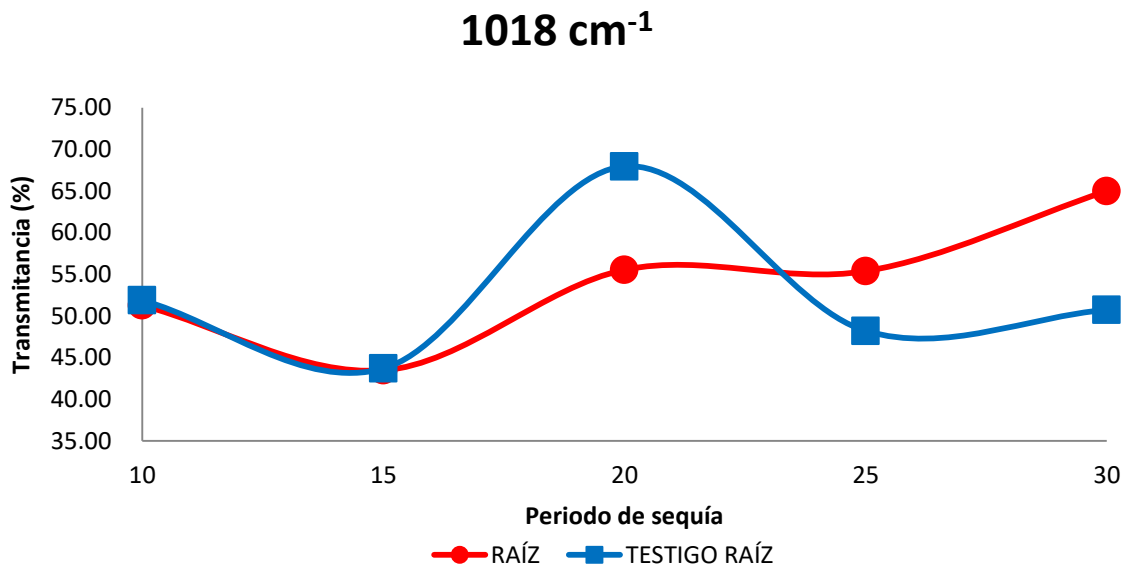


**Figura 63.** Variación de producción de grupos P=O durante cinco periodos de sequía

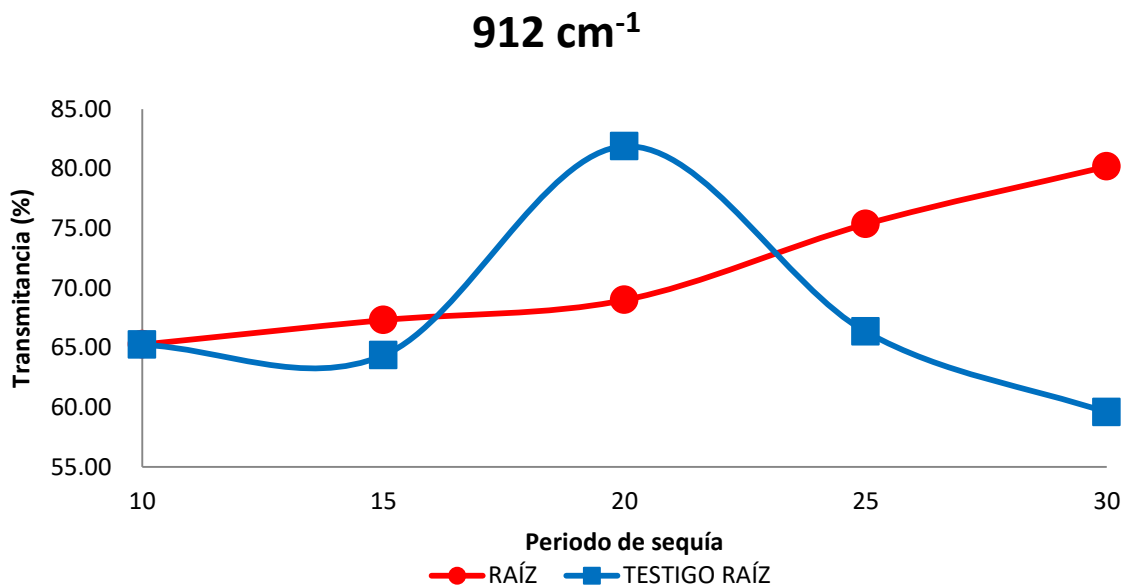
La banda en 1018 cm<sup>-1</sup> (Figura 64) correspondiente a la deformación del enlace C-O fue atribuido a la formación de ácidos grasos (Sofi *et al.*, 2013). La presencia del compuesto fue la misma a los 10 y 15 días tanto en sequía como en el testigo, empezando en la raíz un aumento aproximadamente del 13 % en la formación de ácidos grasos a los 20 días y presentándose una pérdida máxima de la misma a los 30 días (Cuadro 30). A partir de que la sequía fue más intensa (25 y 30 días) el tratamiento tendió a aumentar los ácidos grasos. La frecuencia ha sido reportada en raíces de plantas medicinales como *Physalis peruviana* y *Physalis angulata* (Leite *et al.*, 2018) y en raíces de *Abelmoschus esculentus* bajo estrés por nematodos (Sharma *et al.*, 2018).

La banda 912 cm<sup>-1</sup> (Figura 65) correspondiente a la vibración del enlace C-H fue atribuido a la formación de carbohidratos (Vodnar *et al.*, 2012). Se puede observar que la formación del compuesto se mantuvo de manera constante durante los periodos de sequía, donde la producción máxima fue a los 20 días y la pérdida máxima a los 30 días con un valor de 12.9 y 20.6 % respectivamente (Cuadro 30). Asimismo, esta frecuencia ha sido reportada en raíces de *Sesuvium*

*portulacastrum* L. bajo estrés salino (Nikalje *et al.*, 2019), en raíces de *Abelmoschus esculentus* bajo estrés por nematodos (Sharma *et al.*, 2018) y en raíces de *Coleus blumei* bajo estrés por plomo (Hu y Yuan, 2018).



**Figura 64.** Variación de producción de grupos C-O durante cinco periodos de sequía



**Figura 65.** Variación de producción de grupos C-H durante cinco periodos de sequía



**Cuadro 30.** Variaciones del % de Transmitancia en frecuencias características de la raíz de *Vicia faba* L. sometida a distintos periodos de sequía con respecto a su testigo.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
3315	0.26	0.36	13.09	18.97	28.55
2360	1.22	6.25	-0.85	3.29	4.02
2340	0.91	4.66	-0.74	2.38	3.2
1635	-0.28	-0.66	-3.16	5.84	13.85
1442	0.07	--	--	--	--
1418	-1.5	1.24	-1.21	0.4	2.28
1368	-2.09	1.22	-0.29	-4.62	2.05
1315	-0.17	2.58	-0.82	1.25	2.47
1240	-0.16	-0.18	0.76	0.54	3.31
1018	-0.61	-0.22	-12.42	7.16	14.26
912	0.01	2.96	-12.89	9.01	20.61

Las variaciones del % de Transmitancia de la raíz se encuentra dada con respecto a su testigo, donde los signos negativos (-) representan aumento y (+) disminución de la intensidad

## V. CONCLUSIONES

Con relación a los objetivos planteados en este trabajo de investigación se concluye que estos fueron alcanzados, ya que se identificaron los compuestos químicos de defensa de las habas ante el daño provocado por enfermedades y factores ambientales a nivel químico y estructural mediante las técnicas de espectroscopía y microscopía.

De igual manera, se identificaron y describieron los compuestos químicos generados por las plantas de haba durante la infección de la mancha de chocolate y roya mediante la espectroscopía FTIR. Asimismo, se identificaron las variaciones morfológicas y cambios químicos elementales en las plantas de haba cuando fueron infectadas por la mancha de chocolate y la roya utilizando microscopía electrónica de barrido. Además, de haber sido identificados los compuestos químicos presentes en las plantas de haba bajo estrés por sequía en hojas y raíces mediante la técnica de espectroscopía FTIR.

Por otro lado, con relación a las hipótesis planteadas se concluye que estas no son rechazadas debido las plantas de haba generaron distintos compuestos químicos a diferentes concentraciones y variaciones morfológicas ante los diferentes grados de daño provocado por enfermedades y por la sequía.

Se identificó que las plantas de haba generan diferentes compuestos químicos cuando son infectadas por los hongos de la mancha de chocolate y roya en concentraciones distintas en los diferentes grados de infección. Para *Botrytis fabae* S. mediante FTIR se identificó que durante el inicio de la enfermedad, la planta tuvo una disminución en la producción de glucosa, lípidos y enlaces peptídicos Amida III; durante la fase agresiva del patógeno se generó la producción de ácido aspártico, prolina, citosina, purinas y pectina. Para *Uromyces fabae* P. se identificó que durante el inicio de la enfermedad, la planta tuvo una disminución en la producción de lípidos, carbohidratos, polisacáridos, glucosa, polisacáridos y citosina, afectando a su vez en la absorción de CO<sub>2</sub> y a la degradación proteica; sin embargo, se generó la producción de Amida III y ribosas. Durante la fase agresiva de la enfermedad se aumentó la producción en los fosfolípidos y en la pectina

Se identificó que las plantas de haba presentan variaciones morfológicas y cambios químicos elementales cuando son atacadas por la mancha de chocolate y la roya. Para *Botrytis fabae* S. mediante SEM-EDS se observó que las plantas generan el cierre de estomas y conforme al avance del daño la pared celular de la hoja tiende a corrugarse. Así mismo, durante el inicio de la enfermedad predominó la producción de elementos químicos Oxígeno, Magnesio y Sodio; durante la fase agresiva predominó el elemento Carbono. Para *Uromyces fabae* P. se observó que las plantas generan el cierre de estomas y durante el ataque de la enfermedad las partes infectadas en la hoja tienden a desgarrarse. Además, durante el inicio de la enfermedad predominó la producción de elementos químicos Magnesio y Sodio; durante la fase agresiva predominó la producción de Oxígeno, Potasio, Fósforo, Silicio, y se generó Azufre.

Se identificó que las hojas y raíces de haba bajo estrés por sequía forman compuestos químicos a diferentes concentraciones al ser sometidas a distintos periodos de sequía. En hojas los compuestos más afectados por la sequía fueron la Amida I, Amida III, pectina y el agua. Sin embargo, los compuestos Amida II, lípidos y glucosa son los compuestos que aumentan su concentración al aumentar el cada periodo de sequía. Por otro lado, en las raíces los compuestos más afectados fueron los lípidos, la celulosa, la pectina, los carbohidratos, la glucosa, la lignina, los ácidos nucleicos, los ácidos grasos y el agua.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abd-Alla M.H., K. Hans-Werner, F. Yan, S. Schubert y E. Peiter. 2000.** Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: implications for metabolite transport. *Journal Plant Physiology*. 157: 335-343.
- Abbas O., G. Compère, Y. Larondelle, D. Pompeu, H. Rogez y V. Baeten. 2017.** Phenolic compound explorer: A mid-infrared spectroscopy database. *Vibrational Spectroscopy* 92: 111-118, doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.05.008.
- Abidi N., E. Hequet, L. Cebralles, J. Gammaway, T. Wilkins y L.W. Wells. 2008.** Evaluating Cell Wall Structure and Composition of Developing Cotton Fibers Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Thermogravimetric Analysis. *Jornal of Applied Polymer Science* 107: 476-486, doi: 10.1002/app.27100.
- Aghababaei A., N. Maftoonazad, A. Elhamirad y F. Badii. 2017.** Accelerated ageing of wheat grains: Part II-influence on thermal characteristics of wheat starch and FTIR spectroscopy of gluten. *Journal of Cereal Science* 77: 157-165, doi.org/10.1016/j.jcs.2017.08.010
- Alamri S.A, M.H. Saddiqui, M.Y. Al-Khaishany, M.N. Khan, H.M. Ali y K.A. Alakeel. 2018.** Nitric oxide-mediated cross-talk of proline and heat shock proteins induce thermotolerance in *Vicia faba* L. *Environmental and Experimental Botany* 23: doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.012.
- Ighamdi S.S., A.M. Al-Shameri, H.M. Migdadi, M.H. Ammar, E.H. El-Harty, M.A. Khan y M. Farooq. 2015.** Physiological and Molecular Characterization of Faba bean (*Vicia faba* L.) Genotypes for Adaptation to Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201: 401-409, doi:10.1111/jac.12110.
- Al-Kadhemy M.F.H, Z.S. Rasheed y S.R. Salim. 2016.** Fourier transform infrared spectroscopy for irradiation coumarin doped polystyrene polymer films by alpha ray. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 9: 321 – 331. doi.org/10.1016/j.jrras.2016.02.004
- Alvarez-Ordóñez A. y M. Prieto. 2012.** Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology. Springer, Boston, MA. 58 p. doi.org/10.1007/978-1-4614-3813-7.
- Ammar M.H., F. Anwar, E.H. El-Harty, H.M. Migdadi, S.M. Abdel-Khalik, S.A Al-Faifi ... S.S Alghamdi. 2015.** Physiological and Yield Responses of Faba bean (*Vicia faba* L.) to Drought Stress in Managed and Open Field Environments. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201: 280-287, doi.org/10.1111/jac.12112.
- Ammar M.H., A. M. Khan, H.M. Migbadi, S.M. Abdelkhalek y S.S. Alghamdi. 2017.** Faba bean drought responsive gene identification and validation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24: 80-89, doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.011.

- ASERCA. 2001.** La producción de haba en nuestro país. Revista mensual producida y editada por Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, Órgano Desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- Aziz, S.B., O.G. Abdullah, A.M. Hussein y H.M. Ahmed. 2017.** From Insulating PMMA Polymer to Conjugated Double Bond Behavior: Green Chemistry as a Novel Approach to Fabricate Small Band Gap Polymers. *Polymers* (9): 626, doi.org/10.3390/polym9110626
- Barraza-Garza G., L.A. de la Rosa, A. Martínez-Martínez, H. Castillo-Michel, M. Cotte y E. Álvarez-Parrilla. 2013.** La Microespectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Química* 41 (3) 125-148.
- Bleiholder H., L. Buhr, C. Feller, H. Hack, M. Hess, R. Klose ... E. Weber. 1996.** Compendio para la identificación de los estadios fenológicos de especies mono- y dicotiledóneas cultivadas. BASF Aktiengesellschaft, Postfach 120, D-67114 Limburgerhof, Alemania.
- Cai S. y B.R. Singh. 1999.** Identification of  $\beta$ -turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophysical Chemistry* 80: 7-20.
- Chávez-Rivas F., I. Rodríguez-Iznaga y V. Petranocskii. 2014.** Caracterización por SEM, EDS y micro-Raman de la influencia de la relación molar  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$  y temperatura de reducción sobre el sistema CuZSM5. *Revista Mexicana de Física* 60: 340-349.
- Chen J., L. Zhang, Q. Geng, B. Jing, X. Yu. 2018.** Determination of Total Polar Compounds in Frying Oils by PE-Film-Based FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Tecnology* 120: 1800250, doi.org/10.1002/ejlt.201800250.
- Cimmino A., A.M. Villegas-Fernández, A. Andolfi, D. Melck, D. Rubiales y A. Evidente. 2011.** Botrytone, a New Naphthalenone Pentaketide Produced by *Botrytis fabae*, the Causal Agent of Chocolate Spot Disease on *Vicia faba*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (17): 9201-9206.
- Clavijo J. 2013.** Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista elementos* (3): 133-146.
- Cominelli E., L. Conti, C. Tonelli y M. Galbiati. 2013.** Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology* 30 (4): 355-361, doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.001.
- Cornet I., N. Wittner, G. Tofani y S. Tavernier. 2018.** FTIR as an easy and fast analytical approach to follow up microbial growth during fungal pretreatment of poplar wood with *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Microbiological Methods* 145: 82-86, doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.004.

- Cruz J.L., A.A.C. Alves, D.R LeCain, D.D. Dellis y J.A Morgan. 2016.** Elevated CO<sub>2</sub> concentrations alleviate the inhibitory effect of drought on physiology and growth of cassava plants. *Scientia Horticulturae* 210: 122–129, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.07.012>
- Cubero J. I. 1974.** On the evolution of *Vicia faba* L. Theoretical and Applied Genetics. 51: 45-47.
- Dai y Fan. 2011.** Investigation of the dislocation of natural fibres by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 55(2): 300-306, [doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.12.009](https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.12.009).
- Daryanto S., L. Wang y P.A. Jacinthe. 2017.** Global synthesis of drought effects on cereal, legume, tuber and root crops production: A review. *Agricultural Water Management* 179: 18–33, [doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.022](https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.022).
- Davidson J.A., S. Pande, T.W. Bretag, K.D. Lindbeck y G. Krishna-Kishore. 2007.** Biology and management of Botrytis Spp. in legume crops *In: Botrytis: Biology, Pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski y Delen (Eds.). Springer. pp: 295-318.
- Díaz-Ruiz R. 2010.** Mancha de chocolate y roya principales enfermedades que dañan las habas en el estado de Puebla *In: Cultivos sanos (manejo de plagas y enfermedades con bajo impacto ambiental)*. A. Huerta-de la peña, R. Díaz-Ruiz (Eds.). Colegio de Postgraduados. México. pp: 182-202.
- Dudek M., Zajac G., Snafraniec E., Wiercigroch E., Torr S., Malek s., A. Kaczor y Baranska M. 2019.** Raman Optical Activity and Raman spectroscopy of carbohydrates in solution. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 206: 597-612, [doi.org/10.1016/j.saa.2018.08.017](https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.08.017).
- El-Sayed, A. Sahar, R.Z. El-Shennawy y A.I. Ismail. 2011.** Fungicidal management of chocolate spot of faba bean and assessment of yield losses due to the disease. *Annals of Agricultural Science* 56: 27-35, [doi:10.1016/j.aoas.2011.05.004](https://doi.org/10.1016/j.aoas.2011.05.004).
- Emeran A.A., J.C. Sillero, M. Fernández-Aparicio y D. Rubiales. 2011.** Chemical control of faba bean rust (*Uromyces viciae-fabae*). *Crop Protection* 30 (7): 907-912, [doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.004).
- Espinal-Churata C., M. Huanca, E. Terrazas-Siles y A. Giménez-Turba. 2010.** Evaluación de la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). *Biofarbo* 18: 13-30.
- FAO. 2017.** Seminario internacional sobre sequía y agricultura (pronosticar, planificar, preparar; cómo evitar que la sequía se convierta en hambruna). Agenda borrador y nota conceptual. Italia.

- Farkas V., Csordás B., Hegyi O., Tóth G.K. y Perczel A. 2013.** Foldamer Stability Coupled to Aggregation Propensity of Elongated Trp-Cage Miniproteins. *European Journal of Organic Chemistry*: 3513-3522, doi.org/10.1002/ejoc.201300071
- Fernández-Aparicio M., M.J.Y. Shtaya, A.A. Emeran, M.B. Allagui, M. Kharrat y D. Rubiales. 2011.** Effects of crop mixtures on chocolate spot development on faba bean grown in mediterranean climates. *Crop Protection* 30 (8): 1015-1023, doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.016.
- Fischer S., T. Hilger, H.P. Piepho, I. Jordan y J. Cadisch. 2019.** Do we need more drought for better nutrition? The effect of precipitation on nutrient concentration in East African food crops. *Science of the Total Environment* 658: 405–415. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.181.
- Genkawa T., T. Ahamed, R. Noguchi, T. Takigawa, Y. Ozaki. 2016.** Simple and rapid determination of free fatty acids in brown rice by FTIR spectroscopy in conjunction with a second-derivative treatment. *Food Chemistry* 191: 7-11, doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.014.
- Heredia-Guerrero J.A., J.J. Benítez, E. Domínguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou y A. Heredia. 2014.** Infraed and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Frontiers in Plant Science* 5(305): 1-14.
- Hidayat S., P. Aediaksa, N. Riveli y I. Rahayu. 2018.** Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose (CMC) from salak-fruit seeds as anode binder for lithium-ion battery. *Journal of Physics: Conf. Series* 1080: 012017, doi:10.1088/1742-6596/1080/1/012017
- Hlavinka P., M. Trnka, D. Semerádová, M. Dubrovský, Z. Zalud y M. Mozný. 2009.** Effect of drought on yield variability of key crops in Czech Republic. *Agricultural and forest meteorology* 149: 431–442, doi:10.1016/j.agrformet.2008.09.004.
- Hu M., J. Yuan. 2018.** Responses of Chemical Functional Groups in *Coleus Blumei* Roots under Lead Stress with Exogenous Selenium Treatment Using 2-dimensional Correlation FTIR Spectra. *Polish Journal of Environmental Studies* 27: 2561-2572, https://doi.org/10.15244/pjoes/83613.
- INIA. 2004.** Cultivo del Haba. *Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria*. Manual RI N° 01-04. Perú. Pag.
- Jean-Joseph y Chapados. 2004.** Infraed Spectroscopy of Aqueous Carboxylic Acids: Comparison between Different Acids and Their Salts. *Journal of Physical Chemistry* 108 (16): 3324-3337, doi: 10.1021/jp036401t.

- Jian.Hua Y., X. Yang, N. Ramakrishnan. 2011.** Depth-dependent anisotropy of proteoglycan in articular cartilage by Fourier transform infrared imaging. *Vibrational Spectroscopy* 57: 338-341, doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.12.009.
- Jung M.R., D. Horgen, S.V. Orski, V. Rodriguez, K.L. Beers, G.H. Balazs, T.T Jones, T.M. Work, K.C. Brignac, S.J. Royer, K.D Hyrenbach, B.A Jensen y J.M Lynch. 2018.** Validation of ATR FT-IR o identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin* 127: 704-716, doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.061.
- Kher A., P. Ubadage, I. McKinnon, D. McNauthon y M.A. Augustin. 2007.** FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. *Vibrational Spectroscopy* 44: 375-381, doi:10.1016/j.vibspec.2007.03.006.
- Kabbadj A., B. Makoudi, M. Mouradi., N. Pauly, P. Frendo y C. Ghoulam. 2017.** Physiological and biochemical responses involved in water deficit tolerance of nitrogen-fixing *Vicia faba*. *PLoS ONE* 12: 1-19, doi.org/10.1371/journal.pone.0190284.
- Khan H.R., J.G. Paull, K.H.M. Siddique y F.L. Stoddard. 2010.** Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crops Research* 115: 279–286, doi:10.1016/j.fcr.2009.09.003.
- Kumari M., R.K. Mittal., R.K. Chahota, K. Thakur, S. Lata y D. Gupta. 2018.** Assessing genetic potential of elite interspecific and intraspecific advanced lentil lines for agronomic traits and their reaction to rust (*Uromyces viciae-fabae*). *Crop and Pasture Science* 69(10): 999-1008, doi.org/10.1071/CP17145.
- Lahlali R., Y. Jiang, S. Kumar, C. Karunakaran, X. Liu, F. Borendics ... R. Bueckert. 2014.** ATR–FTIR spectroscopy reveals involvement of lipids and proteins of intact pea pollen grains to heat stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-10, https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00747.
- Lan F., D. Kong, Y. Li y R. Huang. 2015.** Studies on the changes of protein secondary structure and carbohydrate contents in seedling-stage of *Abrus Cantoniensis* hance in drought stress based on FTIR and chemometrics. *Pakistan Journal of Botany* 47: 1311-1316.
- Leite R., S. Hernández-Navarro, M. N. Nascimento, N.M. Ruiz-Postome, P. Carrión-Prieto y E. Souza. 2018.** Nitrogen fertilization affects Fourier Transform Infrared spectra (FTIR) in *Physalis L.* species. *Computers and Electronics in Agriculture* 150: 411-417, doi.org/10.1016/j.compag.2018.05.021.
- Leng G. y J. Hall. 2019.** Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future. *Science of the Total Environment* 654: 811-821, doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.434.



- Liu N., C. Karunakaran, R. Lahlali, T. Warkentin y R.A. Buerckert. 2019.** Genotypic and heat stress effects on leaf cuticles of field pea using ATR-FTIR spectroscopy. *Planta*: 249 (2): 601-613, doi.org/10.1007/s00425-018-3025-4.
- Loubna E.F., Z. Mohamed, E.A. Abdelghani y H. Mohamed. 2014.** Assessment of biotransformation of organic matter during co-composting of sewage sludge-lignocelulosic waste by chemical, FTIR analyses, and phytotoxicity tests. *International Biodeterioration & Biodegradation* 87: 128-137, doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.024.
- Lu H.L., G. Dong, H. Hua, W.R. Zhao, J.Y Li y R.K. Xu. 2019.** Method for initially selecting Al-tolerant rice varieties based on the charge characteristics of their roots 187: 109813, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109813>
- Mecozzi M. y E. Sturchio. 2017.** Computer Assisted Examination of Infrared and Near Infrared Spectra to Assess Structural and Molecular Changes in Biological Samples Exposed to Pollutants: A Case of Study. *Journal of Imaging* 3 (11): 1-13, doi.org/10.3390/jimaging3010011.
- Mecozzi M. y E. Sturchio. 2015.** Effects of essential oil treatments on the secondary protein structure of *Vicia faba*: A mid-infrared spectroscopic study supported by two-dimensional correlation analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 137: 90-98, doi.org/10.1016/j.saa.2014.08.020.
- Mecozzi M., M. Pietroletti y R. Di-Mento. 2007.** Application of FTIR spectroscopy in ecotoxicological studies supported by multivariate analysis and 2D correlation spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 44: 228–235, doi:10.1016/j.vibspec.2006.11.006.
- Meinen C. y R. Rauber. 2015.** Root discrimination of closely related crop and weed species using FTMIR-ATR spectroscopy. *Frontiers in Plant Science* 6: 765, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00765>
- Mohamed G.F, M.S. Shaheen, S.K.H Khalil, A.M.S. Hussein y M.M Kamil. 2011.** Application of FT-IR Spectroscopy for Rapid and Simultaneous Quality Determination of Some Fruit Products. *Nature and Science* 9(11): 21-31.
- Motoyama M., A. Vénien, O. Loison, C. Sandt, G. Watanabe, J. Sicard, K. Sasaki y T. Astruc. 2018.** In situ characterization of acidic and thermal protein denaturation by infrared microspectroscopy. *Food Chemistry* 248 (15): 322-329, doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.031.
- Movasaghi Z., S. Rehman y I.U. Rehman. 2008.** Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 43: 134-179, doi.org/10.1080/05704920701829043.

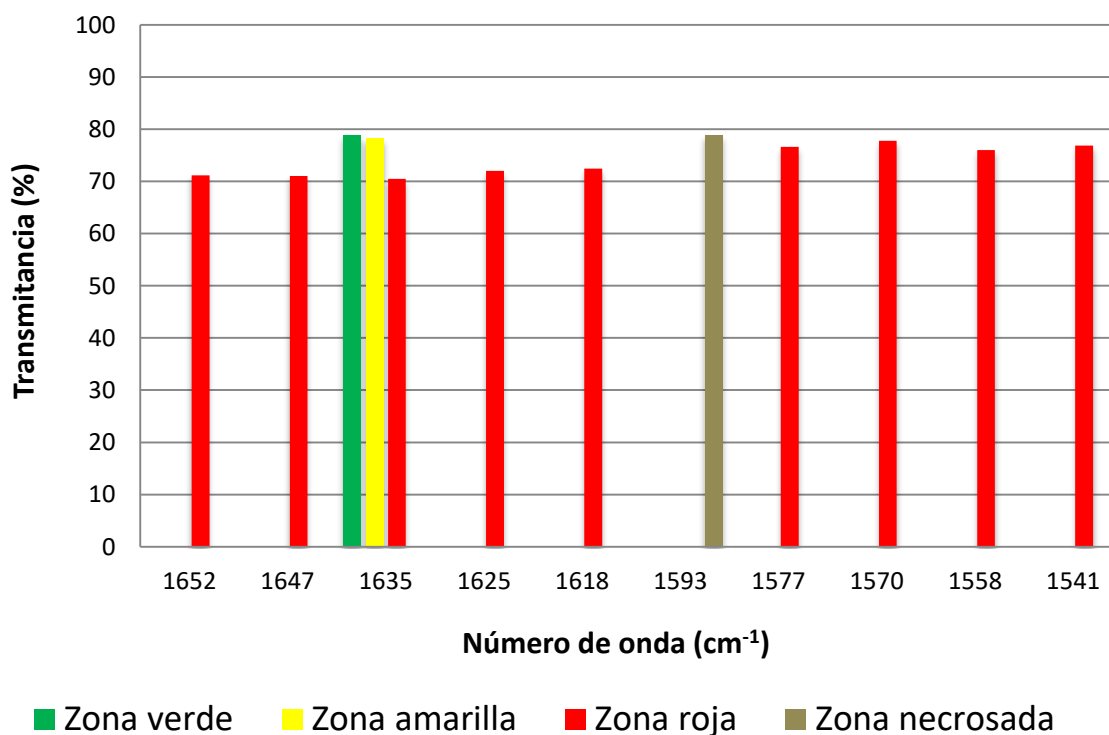
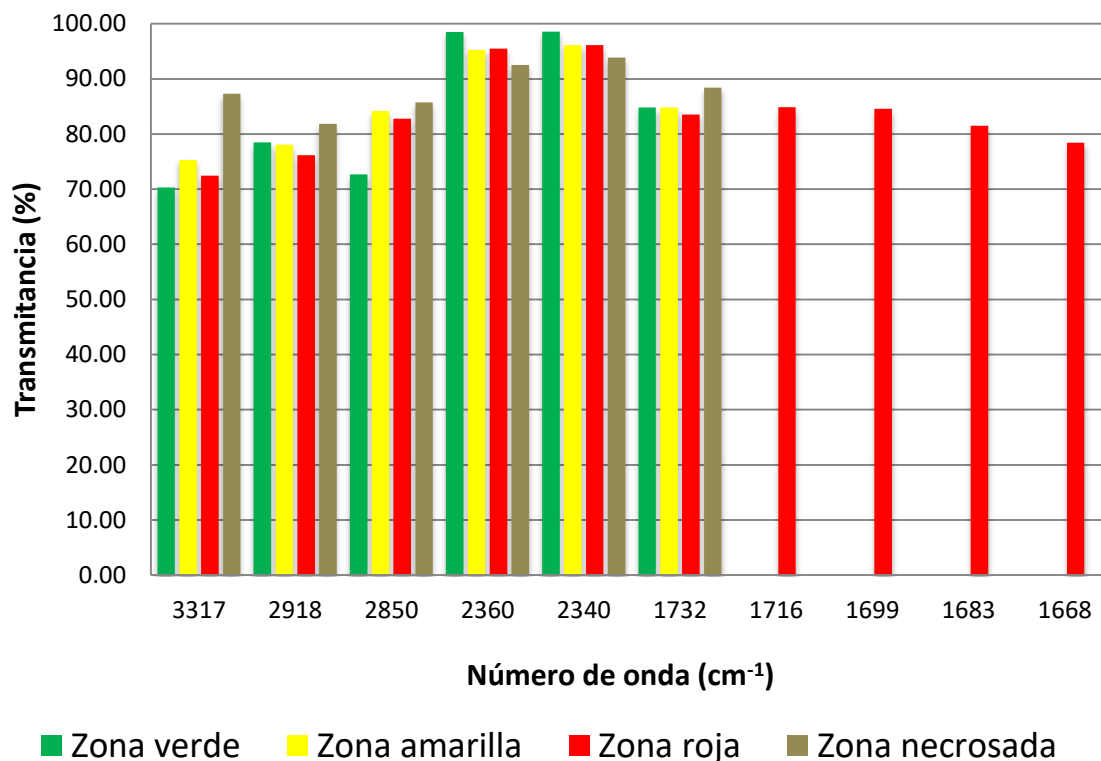
- Naumann A., G. Heine y R. Rauber. 2010.** Efficient discrimination of oat and pea roots by cluster analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Field Crops Research* 119: 78–84, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.06.017>.
- Nikalje G.C., J. Kumar, T.D. Nikan y P. Suprasanna. 2019.** FT-IR profiling reveals differential response of roots and leaves to salt stress in a halophyte *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Biotechnology Reports* 23: e00352, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00352>.
- Obbaga C.C., M.A.E. Miller, H.R. Athar y G.N. Johnson. 2017.** Fourier transform infrared spectroscopic analysis of maize (*Zea mays*) subjected to progressive drought reveals involvement of lipids, amides and carbohydrates. *African Journal of Biotechnology* 16: 1061-1066, <https://doi.org/10.5897/AJB2017.15918>.
- Ogbaga C.C., P. Stepien, B.C., Dyson, N.J.W. Rattray, D. Ellis, R. Goodacre y G.N. Johnson. 2016.** Biochemical Analyses of Sorghum Varieties Reveal Differential Responses to Drought. *PLOS ONE* 11: e0154423, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154423>
- Peña-Gallardo M., S.M. Vicente-Serrano, S. Quiring, M. Svoboda, J. Hannaford, M. Tomas-Burguera, N. Martín – Hernández F. Domínguez – Castro y A. El-Kenawy. 2019.** Response of crop yield to different time-scales of drought in the United States: Spatio-temporal patterns and climatic and environmental drivers. *Agricultural and Forest Meteorology* 264: 40–55, [doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.09.019](https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.09.019).
- Pistorius A.M.A., Willem J. DeGrip y Tatjana A. Egorova-Zachernyuk. 2008.** Monitoring of Biomass Composition From Microbiological Sources by Means of FT-IR Spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 103: 123-129, [doi.org/10.1002/bit.22220](https://doi.org/10.1002/bit.22220).
- Prabhat K.R., S.L. Sang, Z. Ming, F.T. Yiu y K. Ki-Hyun. 2019.** Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International* 125: 365-385, [doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067).
- Quintana-García. 2011.** Exposición sobre la Microscopía Electrónica de Barrido y el Microanálisis EDX, y el servicio que se proporciona en el edificio Severo Ochoa, de la Universidad de Oviedo, con los microscopios *JEOL JSM-6100 con microanálisis EDX Inca energy-200* y *JEOL JSM-6610 LV con microanálisis EDX Inca energy-350*. España.
- Rojas-Tiempo J., R. Díaz-Ruiz, F. Álvarez-Gaxiola, J. Ocampo-Mendoza y A. Escalante-Estrada. 2012.** Tecnología de producción de haba y características socioeconómicas de productores en Puebla y Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (1): 35-49.

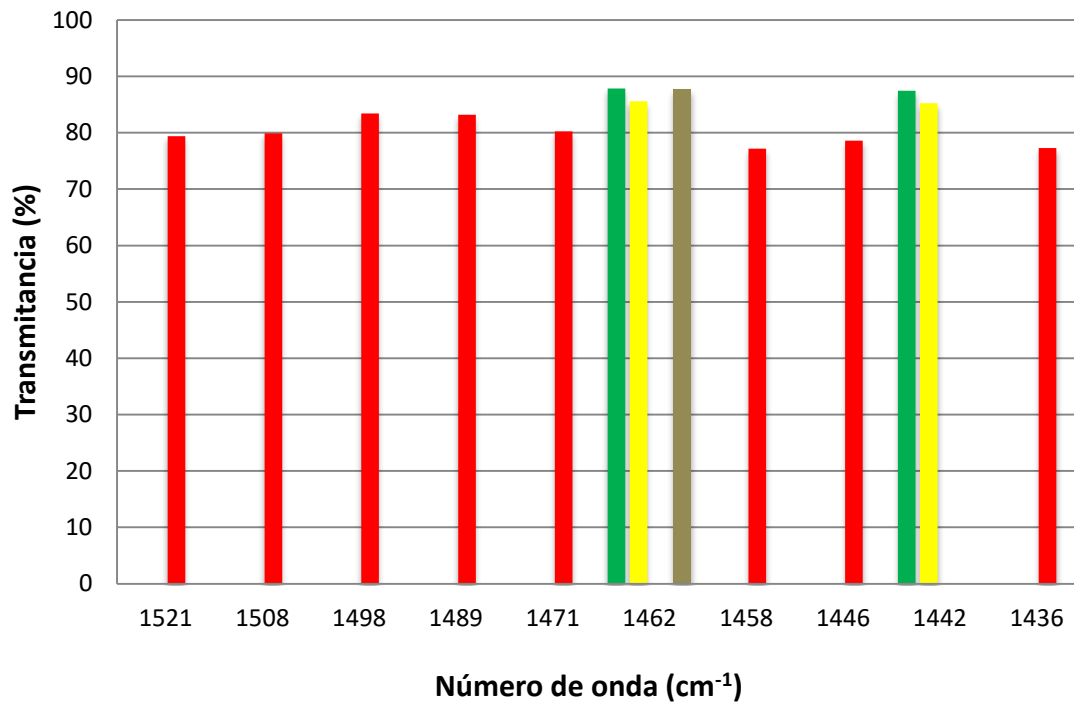
- Sahile S., S. Ahmed, C. Fininsa, M.M. Abang y P.K. Sakhuja. 2008.** Survey of chocolate spot (*Botrytis fabae*) disease of faba bean (*Vicia faba* L.) and assessment of factors influencing disease epidemics in northern Ethiopia. *Crop Protection* 27 (11): 1457-1463, doi.org/10.1016/j.cropro.2008.07.011.
- Sánchez-Yupangui V.M. 2019.** Efecto de tres residuos industriales de quinua sobre *Alternaria* sp. y *Botrytis fabae* en haba (*vicia faba*). Escuela superior politécnica de Chimborazo. Ecuador. pp. 1-77.
- Schatten H. y J.B. Pawley. 2008.** Biological Low-Voltage Scanning Electron Microscopy. Springer, New York, NY. 323 p. doi.org/10.1007/978-0-387-72972-5.
- Sgriccia N., M.C. Hawley y M. Misra. 2008.** Characterization of natural fiber surfaces y natural fibers composites. *Composites: Part A* 39: 1632-1637, doi:10.1016/j.compositesa.2008.07.007
- Shan-Shan Y., C. Yi-di, Ye Zhang, Z. Hui-Min, J. Xin-Yu, Lei He ...W. Wei-Min. 2019.** A novel clean production approach to utilize crop waste residues as co-diet for mealworm (*Tenebrio molitor*) biomass production with biochar as byproduct for heavy metal removal. *Environmental Pollution* 252 (B): 1142-1153, doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.028
- Sharma y Uttam. 2017.** Rapid analyses of stress of copper oxide nanoparticles on wheat plants at an early stage by laser induced fluorescence and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 92: 135-150, doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.06.004.
- SIAP. 2019.** Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. México.
- Siddiqui M.H, M.Y. Al-Khaishany, M.A. Al-Qutami, M.H. Al-Whaibi, A. Grover, H.M. Ali, M.S. Al – Wahibi y N.A Bukhari. 2015.** Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 10214-10227, doi.org/10.3390/ijms160510214.
- Sillero J.C., M.M. Rojas-Molina, A.A. Emeran, M. Kharrat, J. Winkler, H.R. Khan, F. Flores y D. Rubiales. 2017.** Identification and multi-environment validation of resistance to rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba*. *Crop and Pasture Science* 68 (11): 1013-1023, doi.org/10.1071/CP17099.
- Sillero J.C., A.M. Villegas-Fernández, J. Thomas, M.M. Rojas-Molina, A.A. Emeran, M. Fernández-Aparicio y. Rubiales. 2010.** Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115: 297-307, doi:10.1016/j.fcr.2009.09.012.
- Singh R., A.K Upadhyay y D.P. Singh. 2018.** Regulation of oxidative stress and mineral nutrient status by selenium in arsenic treated crop plant *Oryza sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 105-113. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.008

- SNIIM. 2019.** Precio al mayoreo de Frutas y Hortalizas. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. México.
- Sofi B.A., I. A. Wani, F.A. Masoodi, I. Saba y S. Muzaffar. 2013.** Effect of gamma irradiation on physicochemical properties of broad vean (*Vicia faba* L.) starch. *LWT - Food Science and Technology* 54: 63-72. doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.021.
- Stoddard F.L., A.H. Nicholas, D. Rubiales, J. Thomas y A.M. Villegas-Fernández. 2010.** Integrated pest management in faba bean. *Field Crops Research* 115 (3): 308-318, doi.org/10.1016/j.fcr.2009.07.002.
- Streit J., C. Meinen y R. Rauber. 2019.** Intercropping effects on root distribution of eight novel winter faba bean genotypes mixed with winter wheat. *Field Crops Research* 235: 1–10, https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.02.014.
- Sun J., Lian F., Z. Liu, L. Zhu y Z. Song. 2014.** Biochars derived from various crop straws: Characterization and Cd (II) removal potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106: 226-231, doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.042.
- Sureka W.E., C. Siu-Mei y M. Ching-Yung. 2005.** Conformational study of globulin of rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy (2005). *International Journal of Biological Macromolecules* 37: 12-20, doi:10.1016/j.ijbiomac.2005.07.008
- Tesar A., Kopecký Jr V., Kocisová E. y Bednářová L. 2017.** Dynamics of lipid layers with/without bounded antimicrobial peptide halictine-1. *Vibrational Spectroscopy* 93: 42-51, doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.10.002.
- Timar M.C., A. Varodi, M. Hacibektasoglu y M. Campean. 2016.** Color and FTIR Analysis of Chemical Changes in Beech Wood (*Fagus sylvatica* L.) after Light Steaming and Heat Treatment in Two Different Environments. *BioResources* 11(4): 8325-8343.
- Trivedi M.K., A. Braton, D. Trivedi, H. Shettigar, K. Bairwa y S. Jana. 2015.** Fourier Transform Infrared and Ultraviolet-Visible Spectroscopic Characterization of Biofield Treated Salicylic Acid and Sparfloxacin. *Natural Products Chemistry and Research* 3(5): 186, doi:10.4172/2329-6836.1000186.
- UPO. 2019.** Detección de contaminantes atmosféricos mediante espectroscopía infrarroja. Ciencias ambientales. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.
- Venekamp J.H. y T.M. Koot. 1998.** The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water withholding. *Journal of Plant Physiology* 132: 102-109
- Veronezi G.MB., M.B. Felisbino, M.S.V. Gatti y M.L.S. Mello. 2017.** DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis,

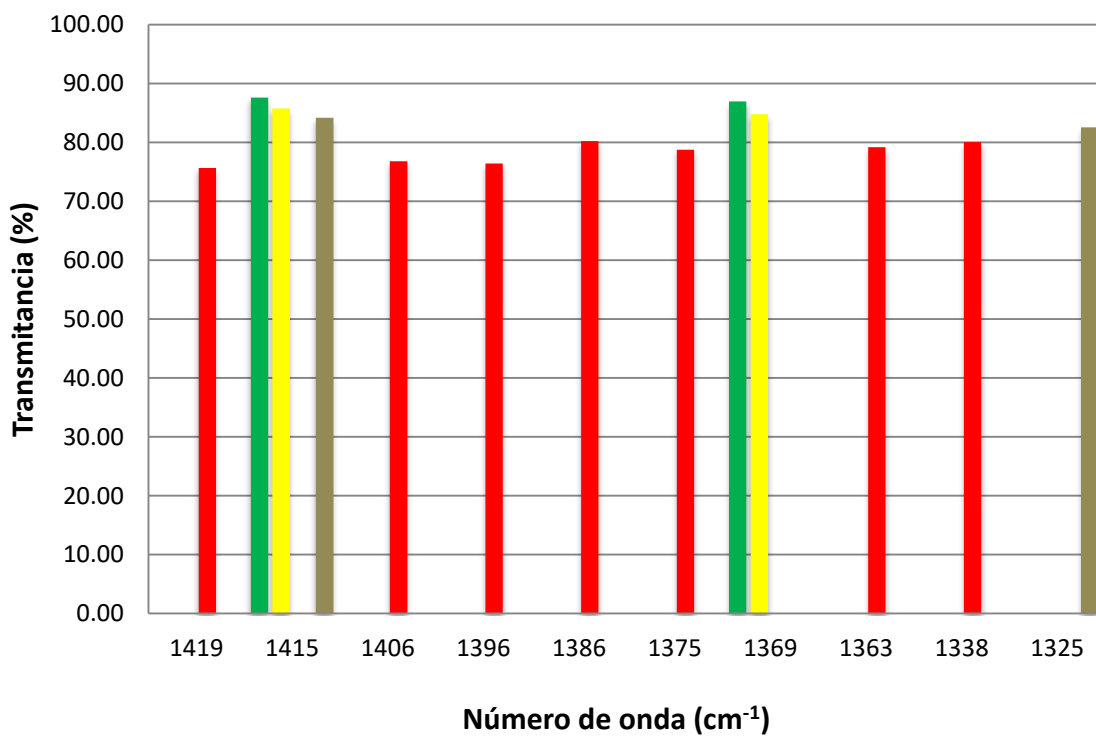
- Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. *PLoS ONE* 12(1): e0170740. doi.org/10.1371/journal.pone.0170740.
- Villegas-Fernández A.M., J.C. Sillero, A.A. Emeran, J. Winkler, B. Raffiot, J. Tay, F. Flores y D.Rubiales (2009)** Identification and multi-environment validation of resistance to *Botrytis fabae* in *Vicia faba*. *Field Crops Research* 114 (1): 84-90, doi.org/10.1016/j.fcr.2009.07.005
- Vodnar D.C., O. L. Pop y C. Socaciu. 2012.** Monitoring Lactic Acid Fermentation in Media Containing Dandelion (*Taraxacum officinale*) by FTIR Spectroscopy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*.40(1): 65-68. doi: 10.15835/nbha4016653.
- Voegelé. 2006.** *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiol Lett* 259: 165-173, doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00248.
- Wagner G., S. Dunker, Z. Liu y C. Wilhelm. 2013.** Subcommunity FTIR-spectroscopy to determine physiological cell states. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 88-94, doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.008.
- Wang J., S. Ye, S. Xue, W. Hartley, H. Wu y L. Shi. 2018.** The physiological response of *Mirabilis jalapa* Linn. to lead stress and accumulation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 128: 11-14, doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.030.
- Wilson R. H., A. C. Smith, M. Kacurakova, P. K. Saunders, N. Wellner y K. W. Waldron. 2000.** The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Plant Physiology* 124: 397-405.
- Xie P.P, J.W. Deng, H.M. Zhang, Y.H. Ma, D.J. Cao, R.X. Ma. ...Y.G Liang. 2015.** Effects of cadmium on bioaccumulation and biochemical stress response in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 392-298, https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.007.
- Yu S., L. Sheng, C. Zhang y H. Deng. 2018.** Physiological response of *Arundo donax* to cadmium stress by Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 198: 88-91, https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.02.039.
- Wu K., C. Du, F. Ma, Y. Shen, D. Liang y J. Zhou. 2019.** Rapid diagnosis of nitrogen status in rice based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS). *Plants Methods* 15(94) 1-10, doi.org/10.1186/s13007-019-0482-0.
- Zhu F., W.I. Neil, L. Hecht y L.D. Barron. 2005.** Raman Optical Activity: A Tool for protein Structure Analysis. *Structure* 13(10): 1409-1419, doi.org/10.1016/j.str.2005.07.009.
- Zlatev A. y F. Cebola-Lidon. 2012.** An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24: 57-72.

**ANEXO A. Frecuencias correspondientes a *Botrytis fabae* con respecto a cada zona de daño**

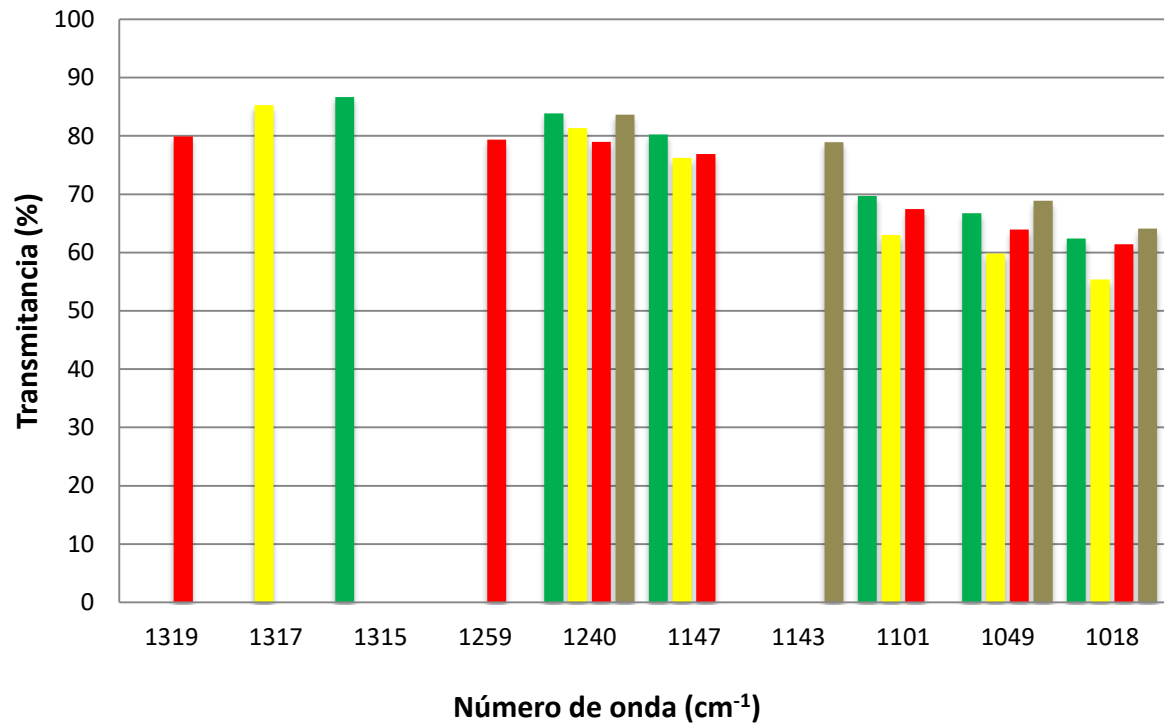




■ Zona verde   
 ■ Zona amarilla   
 ■ Zona roja   
 ■ Zona necrosada



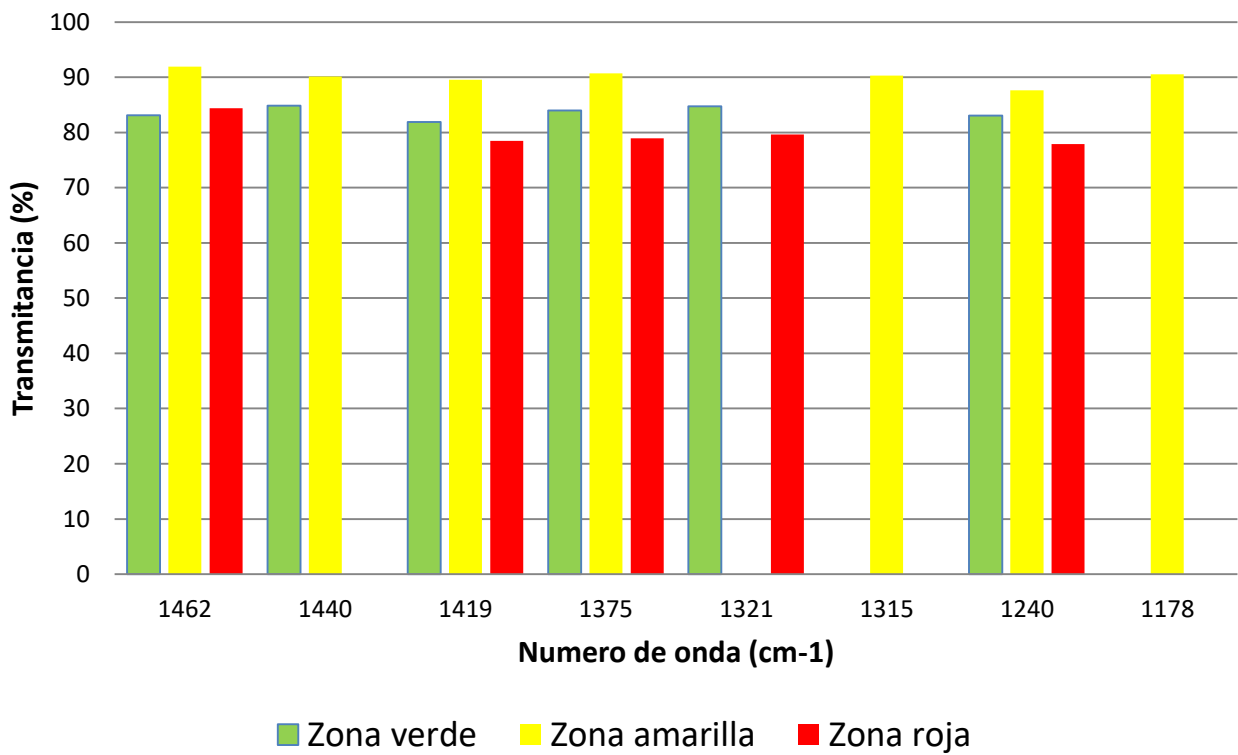
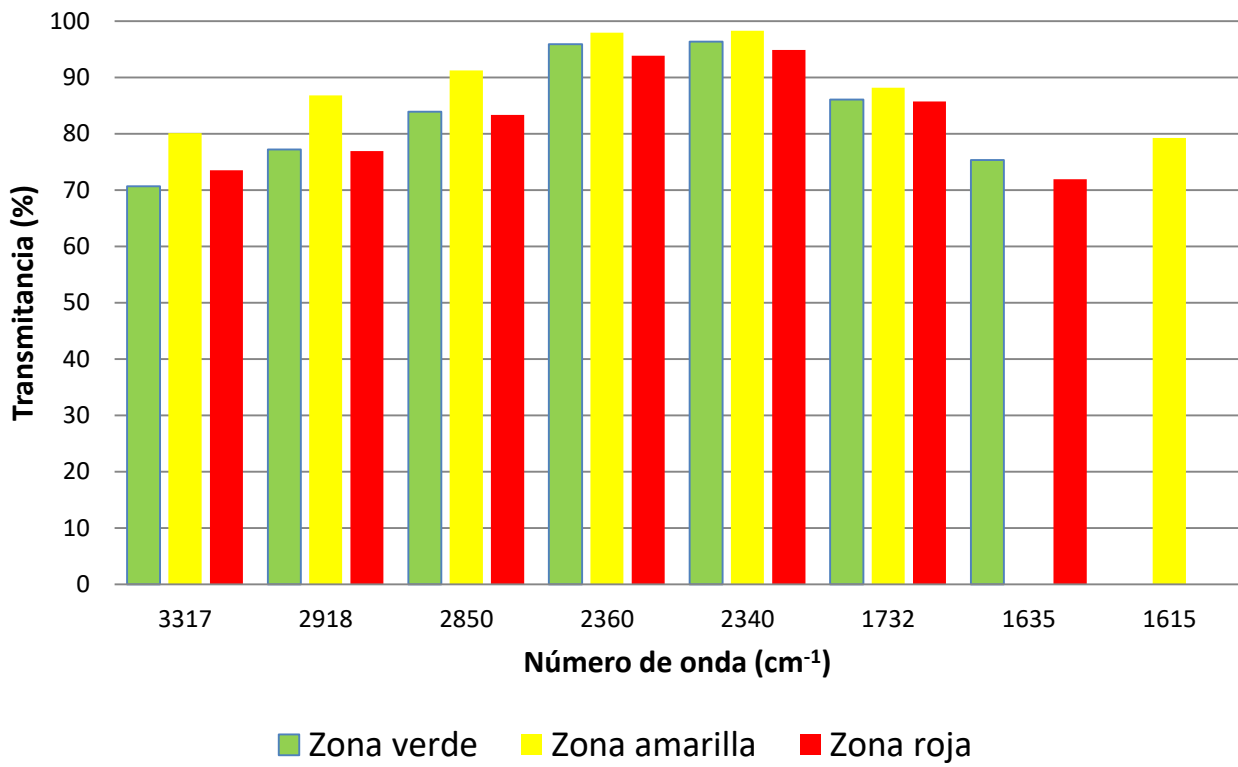
■ Zona verde   
 ■ Zona amarilla   
 ■ Zona roja   
 ■ Zona necrosada

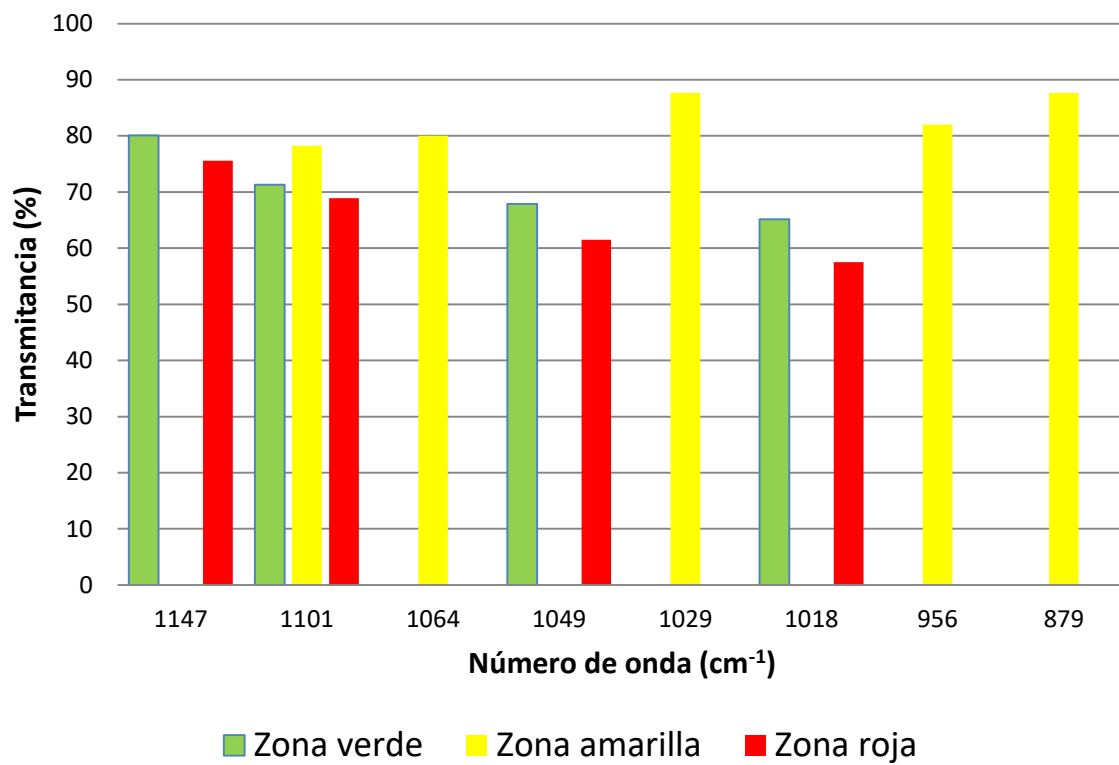


■ Zona verde   
 ■ Zona amarilla   
 ■ Zona roja   
 ■ Zona necrosada



**ANEXO B. Frecuencias correspondientes a *Uromyces fabae* con respecto a cada zona de daño**





**ANEXO C. Fotografías de plantas de haba infectadas con *Botrytis fabae* S.**



**ANEXO D. Fotografías de plantas de haba infectadas con *Uromyces fabae* S.**

