

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



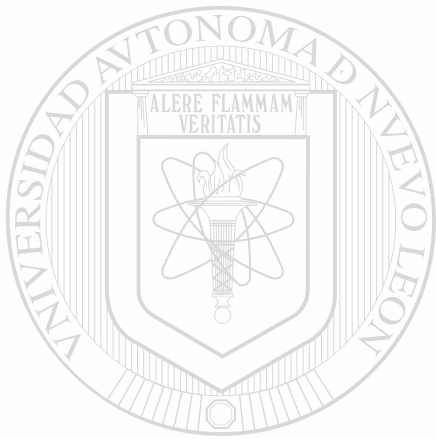
**PRODUCCION DE TREHALOSA POR CEPAS DE  
*Rhizobium* spp. Y SU RELACION CON EL  
COMPORTAMIENTO SAPROFITICO**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA  
BEATRIZ FLORES SAMANIEGO**

**San Nicolás de los Garza, Nuevo León  
Febrero 2000**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

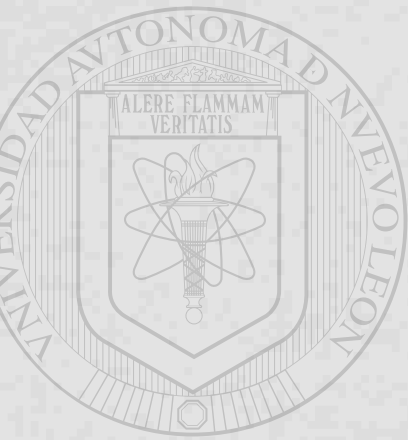
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
S652  
.F5  
2000  
c.1



1080124471



# UANL

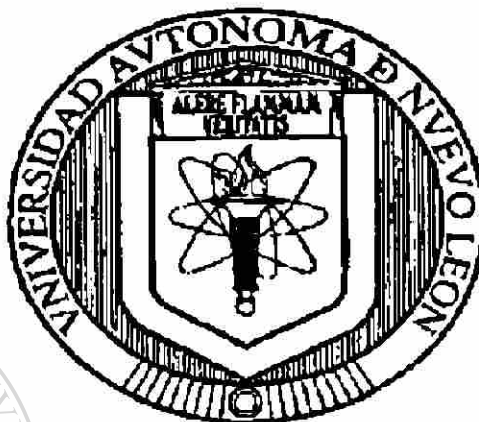
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**FACULTAD DE CIENCIA BIOLOGICAS**



**PRODUCCION DE TREHALOSA POR CEPAS DE  
*Rhizobium* spp. Y SU RELACION CON EL  
COMPORTAMIENTO SAPROFITICO**

**TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA**

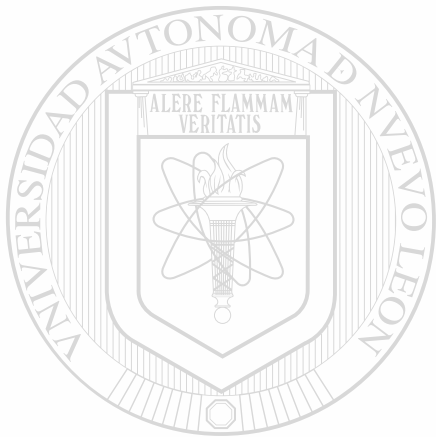
Presenta

**BEATRIZ FLORES SAMANIEGO**

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Febrero 2000

TD  
S652  
• F5  
2000



# UANL

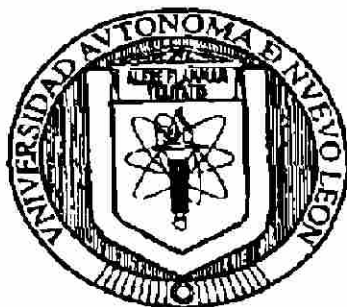
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**  
**FACULTAD DE CIENCIA BIOLOGICAS**



**PRODUCCION DE TREHALOSA POR CEPAS DE**  
***Rhizobium* spp. Y SU RELACION CON EL**  
**COMPORTAMIENTO SAPROFITICO**

**TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

Presenta

**BEATRIZ FLORES SAMANIEGO**

**COMISION DE TESIS**

Dr. Luis Jesús Galán Wong  
Presidente

Dr. Juan José Peña Cabriales  
1<sup>er</sup> Vocal

Dra. Marivel Gómez Treviño  
3<sup>er</sup> Vocal

Dra. Katiushka Arevalo Niño  
Secretario

Dra. Lilia H. Morales Ramos  
2<sup>o</sup> Vocal

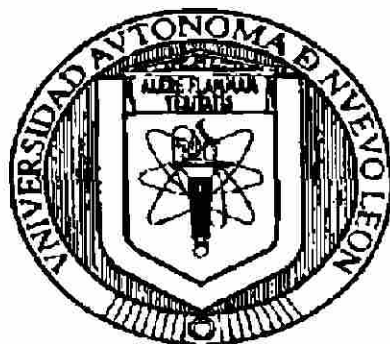
Dr. Rodolfo Fariñas Rodríguez  
Profesor invitado

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.  
Febrero 2000

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**FACULTAD DE CIENCIA BIOLOGICAS**



**PRODUCCION DE TREHALOSA POR CEPAS DE *Rhizobium* spp. Y  
SU RELACION CON EL COMPORTAMIENTO SAPROFITICO**

**TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA**

Presenta

**BEATRIZ FLORES SAMANIEGO**

**Dr. Luis Jesús Galán Wong.**

**Director Interno**

**Dr. Juan José Peña Cabriales**

**Director Externo**

**San Nicolás de los Garza, Nuevo León.**

**Febrero 2000**

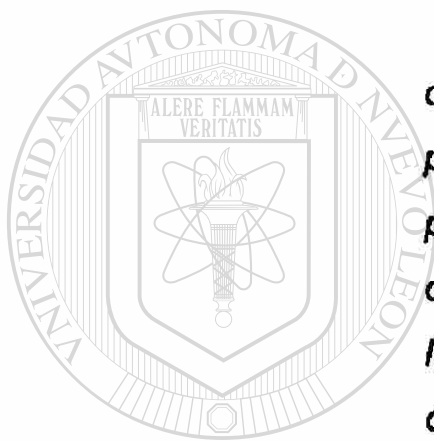
El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo "Dr. Howard T. Dulmage" del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Luis Jesús Galán Wong y en el laboratorio de Microbiología Ambiental del departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Juan José Peña Cabriales, dentro del proyecto financiado por CONACyT "Trehalosa y tolerancia a agobio hídrico en leguminosas noduladas" con clave no. 28781N.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





*Si el hombre estuviera completamente desprovisto de la facultad de soñar, si no pudiera de tiempo en tiempo adelantarse al presente y contemplar con su imaginación el cuadro coherente y enteramente terminado de la obra que se esboza apenas entre sus manos, decididamente no podría imaginar qué motivo haría emprender al hombre a llevar a término los grandes y fatigantes trabajos del arte, la ciencia y la vida práctica....El desacuerdo entre el sueño y la realidad no tiene nada de nocivo, siempre que el hombre que sueña crea seriamente en su sueño, que observe atentamente la vida, compare sus observaciones con sus castillos en el aire y, de manera general, trabaje a conciencia por la realización de su sueño. V. I. Lenin.*

## **DEDICATORIAS**

**A MIS PADRES Y HERMANOS, CON AMOR Y AGRADECIMIENTO  
POR SU APOYO INCONDICIONAL.**

**A MIS SOBRINOS: SOFIA, JACINTO Y EMILIANO, POR LA ALEGRIA  
DE SUS SONRISAS.**

**A GUADALUPE Y CLAUDIA VERONICA, PORQUE LA AMISTAD ES  
LLUVIA DE FLORES PRECIOSAS, REGALO DIVINO QUE HEMOS  
ENGRANDECIDO A LO LARGO DE MUCHOS AÑOS.**

**AL DR. JUAN JOSE PEÑA CABRIALES, CON MI MAS PROFUNDO  
AGRADECIMIENTO PORQUE SUS PALABRAS ME AYUDARON A  
RECUPERAR LA FE.**

---

**A DANIEL, MI COMPAÑERO DE JUEGOS Y ESPERANZAS.**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental del CINVESTAV-IPN, U. Irapuato: Rodolfo Farías Rodríguez, Oscar A. Grageda Cabrera, José Antonio Vera Nuñez, Jesús Vásquez Arroyo, Pedro E. Moreno Zacarías, Simón Rodríguez Castellanos, Rosalinda Serrato Flores, Carlos Bucio Villalobos, Juan Llovera Lozano, Ricardo Torres Martínez, Eduardo Valencia Cantero y Juan José Jiménez Zacarías. Muchas gracias por su apoyo y solidaridad durante la realización del trabajo experimental, así como por sus acertadas críticas. Gracias también por los agradables momentos que compartimos.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología del Suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL: Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos, Dra. Katiushka Arévalo Niño, Dr. Benito Pereyra Alférez, Dra. Marivel Gómez Treviño, Nadia Monsivais Lara, Carlos Francisco Sandoval Coronado y Ma. Guadalupe Maldonado Blanco. Muchas gracias por los meses que compartimos en el trabajo y porque siempre me apoyaron en todo lo que necesité.

A mis primos Claudia Riojas y Rafael Luengas, que me soportaron en su casa tanto tiempo. Muchas gracias por su amor y comprensión, además de los momentos felices que hemos compartido. Gracias también a Dani y Luis, por ser tan buenos.

A mis tíos Ciro Riojas, Maruca Charles, María Luisa Riojas y Raúl Hernández, porque estuvieron allí cuando me hicieron falta.

Al Dr. Juan José Peña Cabriales y su familia, Dra. Doralinda Guzmán y José David Peña, por su constante hospitalidad.

A la Dra. Julia Verde Star, Carmelita, Ricardo y el resto del personal de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, porque siempre atendieron rápida y eficientemente todos mis requerimientos.

Al Dr. Luis Jesús Galán Wong, por su invaluable ayuda durante la realización de mis estudios.

A la Sra. Cristina Franco, por su apoyo y solidaridad en todo momento.

A Daniel, porque siempre me esperó pacientemente y me empujó para que siguiera adelante.

Al CONACyT, por otorgarme la beca-manutención que me permitió realizar mis estudios de doctorado.

A todas las personas que indirectamente participaron en la realización de este sueño.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
INDICE DE TABLAS	2
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	7
I.- INTRODUCCION	8
I.1.- LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i> -LEGUMINOSA	8
I.2.- FACTORES QUE LIMITAN LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO	12
II.- ECOLOGIA DE <i>Rhizobium</i>	13
II.1.- FACTORES ABIOTICOS	14
II.2.- FACTORES MICROBIOTICOS	17
II.3.- FACTORES BIOTICOS PROVENIENTES DEL SISTEMA RADICAL DE LAS PLANTAS	19
II.4.- EL USO DE INOCULANTES	19
II.5.- COMPORTAMIENTO SAPROFITICO	22
III.- MECANISMOS DE RESISTENCIA	25
III.1.- TREHALOSA EN LA NATURALEZA	26
III.2.- HIDROLISIS DE TREHALOSA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	28
III.3.- TREHALOSA EN MICROORGANISMOS	29
III.4.- TREHALOSA EN SISTEMAS SIMBIOTICOS	31
IV.- HIPOTESIS	35
V.- OBJETIVOS	35

V.1.- GENERALES	35
V.2.- PARTICULARES	35
VI.- METODOLOGIA	36
VII.- RESULTADOS Y DISCUSION	46
VIII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	67
IX.- BIBLIOGRAFIA	69

## INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
-------	--------

TABLA 1. Supervivencia de <i>Rhizobium</i> spp. sometidas a un choque térmico de 50°C.	47
--	----

TABLA 2. Tiempo de duplicación de <i>Rhizobium</i> spp. en medio líquido a diferentes temperaturas.	51
---	----

TABLA 3. Tiempo de duplicación de <i>Rhizobium</i> spp. en medio líquido con diferentes concentraciones de NaCl.	54
--	----

TABLA 4. Tiempo de duplicación al someter las células de <i>Rhizobium</i> spp. al ensayo de osmotolerancia.	57
---	----

**TABLA 5.** Contenido de trehalosa intracelular  
de *Rhizobium* spp. sometidas a pre-tratamientos  
con temperatura y NaCl. 60

**TABLA 6.** Tiempo de duplicación de  
*Rhizobium* spp. incubadas en suelo  
estéril a 30°C y humedad constante. 62

**TABLA 7.** Tiempo de duplicación de  
*Rhizobium* spp. incubadas en suelo  
estéril a 39°C y humedad constante. 63

**TABLA 8.** Tiempo de duplicación de  
*Rhizobium* spp. incubadas en suelo  
estéril a 42°C y humedad constante. 64

**TABLA 9.** Índice de mortalidad de  
*Rhizobium* spp. incubadas en suelo  
estéril sometido a desecación a diferentes  
temperaturas. 66

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

La trehalosa es un disacárido poco común que se ha detectado en algunos sistemas biológicos, tanto de vida libre como en organismos que establecen simbiosis planta-microorganismo. Este carbohidrato, aparentemente juega un papel de protección contra condiciones adversas (temperaturas extremas, estrés osmótico, falta de nutrientes, estrés por metales pesados y otros). En estas condiciones, un aumento en la producción de trehalosa por los organismos, se correlaciona con la adquisición de tolerancia al estrés, efecto que ha sido demostrado tanto en bacterias como en levaduras, sin embargo, el efecto protector de este compuesto no ha sido determinado con precisión en el caso de sistemas simbióticos planta-microorganismo, ya que se desconoce si es ejercido a nivel del microorganismo, la estructura simbiótica (el nódulo, en el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa) o la planta hospedera. En este trabajo, hemos estudiado seis cepas de *Rhizobium* spp. aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, las cuales acumulan diferentes cantidades de trehalosa tanto en el nódulo como al ser incubadas por varios días en medio 20E, formulación que contiene glicerol. Estas cepas fueron sometidas a estrés por altas temperaturas y a estrés osmótico, con altas concentraciones de NaCl; además se evaluó la capacidad de desarrollo de tolerancia a ambos tipos de estrés, mediante pre-tratamientos de mediana intensidad y fue evaluada la producción de trehalosa durante estos pre-tratamientos. Nuestros resultados muestran que las cepas de *Rhizobium* spp. en estudio no presentaron una relación directa entre la producción de trehalosa y la capacidad de desarrollo de tolerancia frente a ambos tipos de estrés. Así, se caracterizó una cepa que no fue capaz de producir trehalosa en cantidades



significativas (FMB-3, la cual produjo entre 0.33 y 10.3  $\mu\text{g}$  de trehalosa por mg de proteína) y sin embargo, presentó un alto nivel de desarrollo de tolerancia y resistencia a ambos tipos de estrés. Por otro lado, la cepa F38-6, fue capaz de desarrollar altos niveles de tolerancia, a pesar de ser extremadamente sensible al estrés y de producir cantidades bajas de trehalosa (entre 3.32 y 76.6  $\mu\text{g}$  de trehalosa por mg de proteína). Finalmente, las cepas que sintetizaron trehalosa en grandes cantidades (FMB-10, CAN-6, CAN-15 y F38-3, que produjeron entre 5.19 y 181.8  $\mu\text{g}$  de trehalosa por mg de proteína), mostraron poca o ninguna inducción de tolerancia, así como una mayor sensibilidad a ambos tipos de estrés, que la presentada por la cepa FMB-3.

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran que la producción de trehalosa no está asociada a la protección de la bacteria en condiciones adversas *in vitro*, por lo que es muy probable que el papel de la trehalosa producida por *Rhizobium*, esté relacionado con la protección del nódulo o de la planta hospedera, más que con la protección de la bacteria en vida libre.

## ABSTRACT

Trehalose is a non-reducing disaccharide that has been isolated from many organisms, both eukaryotic and procaryotic and it appears to play a role in stress tolerance of many organisms including yeasts and bacteria. During heat, freezing and osmotic stress, intracellular trehalose concentration increases in parallel to tolerance acquisition. We show in this work that, in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodulating *Rhizobium* strains, trehalose accumulation and increase in thermotolerance and salt tolerance do not go in parallel. Six native strains of *Rhizobium* spp. isolated from agronomic soils were analysed, and we found that trehalose accumulated in vitro, ranged from 0.33 to 181.8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of protein. Trehalose accumulation is larger on those conditions where tolerance induction is lesser or null.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ABREVIATURAS

bv. = Bio-variedad.

cm = centímetros.

D.O. = densidad óptica.

g = gramos.

h = horas.

mg = miligramos.

mL = mililitros.

mM = mili molar.

$\mu$ L = microlitros.

$\mu$ m = micrómetros (micras).

NAGGN = N-acetil-glutaminil-glutamina.

N.D. = no detectable.

~~nmoles = nanomoles.~~

PMSF = fenil-metano-sulfonil-fluoruro.

pSym = plásmido simbiótico.

PY = Peptona de caseína, extracto de levadura.

rpm = revoluciones por minuto.

spp. = especies.

UFC = unidades formadoras de colonias.

vol = volumen.

# I.- INTRODUCCION

## I.1.- LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Una de las interacciones entre plantas y microorganismos que más se ha estudiado, es aquella que ocurre entre las bacterias del(os) género(s) *Brady*(*Rhizobium*) y las plantas de la familia Leguminosae. Las mencionadas bacterias pertenecen a la familia Rhizobiaceae y son microorganismos Gram (-), móviles y aerobios obligados, cuyo hábitat natural es el suelo. Dicha familia agrupa a cuatro géneros: *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*; aunque Jarvis *et al.*, (1992) han planteado que éste último es indistinguible de *R. meliloti*. El análisis de las secuencias ribosomales 16S ha revelado que los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* no se encuentran filogenéticamente relacionados y que cada uno de éstos se relaciona a grupos bacterianos que no establecen relaciones simbióticas con plantas: el género *Bradyrhizobium* está muy cercano a *Rhodopseudomonas*, *Azospira* y *Blastobacter denitrificans* (Willems y Collins, 1992; Young *et al.*, 1991), mientras que *Rhizobium* está relacionado a *Agrobacterium*, *Brucella*, *Rochalimea* y *Bartonella* (Yanagi y Yamasato, 1993). Se ha sugerido que las líneas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* divergieron antes del origen de las leguminosas (Ochman y Wilson, 1987) y posteriormente, la información genética requerida para la formación de los nódulos fué transferida de un género al otro (Young, 1993). Es importante mencionar que en *Rhizobium*, la gran mayoría de la información genética necesaria para el establecimiento de la simbiosis se encuentra

en elementos extracromosomales, denominados plásmidos simbióticos (pSym) (Martínez *et al.*, 1990); de manera que es muy importante distinguir entre la historia evolutiva de los plásmidos y la historia evolutiva de los cromosomas cuando se realizan estudios filogenéticos en estas bacterias.

Por otra parte, las plantas de la familia Leguminosae, la cual agrupa a tres sub-familias (Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae), incluyen aproximadamente 750 géneros con más de 19,000 especies descritas, cuya característica principal es la producción de alcaloides específicos y alrededor de 300 aminoácidos no proteínogénicos (Werner, 1992). En lo que se refiere a la capacidad de formación de nódulos, la sub-familia Caesalpinioideae tiene el menor número de especies con potencial de formación de nódulos, ya que menos del 19% de las especies estudiadas desarrolla este tipo de estructuras. En la sub-familia Mimosoideae se ha determinado que hay una mayor capacidad de formación de nódulos en las especies estudiadas, con un 66% de especies capaces de nodular, mientras que en la sub-familia Papilionoideae, la más ampliamente estudiada, se han detectado aproximadamente 2,800 especies capaces de nodular (Faria *et al.*, 1989; Allen y Allen, 1981), las cuales representan un 98% de las especies que han sido estudiadas.

La infección de la raíz de una leguminosa con la especie apropiada de *Brady(Rhizobium)*, conduce a la formación de nódulos; organelos especializados en cuyo interior las bacterias se multiplican rápidamente y donde son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado, proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. Este proceso, involucra la de-represión de la

actividad de la enzima dinitrogenasa, proteína sensible al oxígeno, cuyos substratos naturales son  $N_2$  y  $H^+$  y cuya actividad depende de las condiciones climatológicas y del suelo, así como del estadio de desarrollo de la planta (Graham, 1984).

La fijación biológica de nitrógeno mediante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, tiene una gran importancia agronómica, ya que puede conducir a un enriquecimiento significativamente importante en términos de presencia de nitrógeno combinado en el suelo, además del efecto positivo sobre el crecimiento y calidad de las plantas infectadas. Sin embargo, la fijación de nitrógeno en sistemas agronómicos se encuentra muy limitada, no solamente debido a la ausencia de organismos con una alta efectividad fijadora de nitrógeno, sino también a causa de los factores ecológicos intrínsecos a estos microorganismos, tales como susceptibilidad a predación y poca capacidad de competencia por los nutrientes, que no les permiten sobrevivir y proliferar activamente.

En las últimas décadas, las prácticas agronómicas han ejercido un importante efecto sobre la diversidad genética de las poblaciones de *Rhizobium*, como resultado de un proceso de selección de las cepas que nodulan específicamente a las leguminosas cultivadas en grandes extensiones de suelo; de manera que algunas de las simbiosis que se establecen son sumamente específicas; siendo un caso de extrema especificidad la simbiosis establecida entre *Galega orientalis* y *Rhizobium galegae* (Lipsanen y Lindström, 1986). Por otra parte, la actividad agrícola también ha favorecido una dispersión mundial de las cepas de *Rhizobium*, de manera que algunas veces no es fácil determinar si una población de

*Rhizobium* es nativa de un sitio en particular o si fué introducida (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996).

En México, el frijol anual *Phaseolus vulgaris* y una especie perene relacionada a éste, *P. coccineus*, se encuentran normalmente nodulados por cepas de *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (Souza et al., 1994; Segovia et al., 1993); sin embargo, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y otras especies de *Rhizobium*, tales como *R. fredii* y *R. meliloti*, son capaces de nodular y fijar nitrógeno en asociación con *P. vulgaris* (Eardly et al., 1995; Hungria et al., 1993; Bromfiel y Barran, 1990; Piñero et al., 1988; Sadowsky et al., 1988; Martínez et al., 1985). La nodulación de *P. vulgaris* por un amplio rango de rizobia había sido reportada hace algunos años (Lange, 1961; Wilson, 1939) y más recientemente, se han aislados cepas capaces de nodular frijol a partir de *Leucaena* spp., *Dalea leporina*, *Clitoria ternatea* y otras leguminosas tropicales (Thomas et al., 1994; Herrera et al., 1985; Martínez et al., 1985; Bal et al., 1982). Estos reportes, han generado la idea de que el frijol es un hospedero capaz de elegir entre las estrategias de nodulación presentadas por rizobia filogenéticamente distintos (Hernández-Lucas et al., 1995).

Dado que el nitrógeno es uno de los factores limitantes en la producción agronómica y considerando su alto costo en forma de fertilizante, esta habilidad especial de los cultivos de leguminosas para trabajar simbióticamente con las bacterias del género *Rhizobium*, resulta de excepcional importancia en términos económicos. Se ha estimado que a nivel mundial, las leguminosas fijan aproximadamente  $7 \times 10^7$  toneladas de nitrógeno al año (Burns y Hardy, 1975); proveniente la mitad de las zonas frías y templadas y la otra mitad de las zonas

tropicales. En contraste, los productores de fertilizantes sólo producen de 50 a 60 X10<sup>7</sup> toneladas de nitrógeno anuales, a un alto costo. Además, se ha estimado que del total de fertilizante nitrogenado que se añade a los cultivos, solamente un máximo de 50% de éste es incorporado a la planta en condiciones óptimas, ya este valor puede variar desde el 20 hasta el 50% (Grageda-Cabrera *et al.*, 1999; Matson *et al.*, 1998; Pilbeam *et al.*, 1997). El nitrógeno restante, se pierde en diferentes formas, provocando problemas de contaminación tanto del aire como de los mantos acuíferos. Esta pérdida representa grandes cantidades de dinero aplicado en forma de fertilizante, tal que, en estos términos, la eficientización de la fijación biológica de nitrógeno se traduciría en un ahorro significativo en términos monetarios y en una disminución importante de la contaminación, de manera que los científicos del área tienen la responsabilidad de desarrollar estrategias de cultivo de las leguminosas que optimicen la fijación de nitrógeno y conserven y/o aumenten el contenido de este nutrimento en el suelo.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **I.2.- FACTORES QUE LIMITAN LA FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO**

En la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, la fijación del nitrógeno está fuertemente relacionada al estado fisiológico de la planta hospedera, así como a las condiciones del suelo, de manera que aunque una cepa de *Rhizobium* sea altamente efectiva, competitiva y persistente; su capacidad de fijación de nitrógeno estará limitada por factores tales como enfermedades infecciosas en las plantas,



deficiencia de nutrimentos, presencia de metales (principalmente Mn y Al), salinidad o acidez, fotosíntesis inadecuada, temperaturas extremas, falta o exceso de humedad en el suelo, presencia de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el suelo y los problemas derivados por el uso de fertilizantes y las diferentes prácticas agrícolas (Peoples *et al.*, 1995; Brockwell *et al.*, 1995; Thies *et al.*, 1991). Entre éstos, el efecto negativo producido por altas temperaturas sobre la capacidad infectiva de *Rhizobium* y la actividad de fijación de nitrógeno, ha sido ampliamente documentado en soya (Munevar y Wollum, 1982), trébol (Possingham *et al.*, 1965), chícharo (Frings, 1976), cacahuete (Kishinevsky *et al.*, 1992), frijol (Michiels *et al.*, 1994; Hungria y Franco, 1993; Piha y Munns, 1987), judía (*Vigna sinensis*) (Rainbird *et al.*, 1983; Philpotts, 1976) y *Casuarina* (Arayankoon *et al.*, 1990). Aunque se han realizado esfuerzos considerables para entender el efecto que provocan las elevadas temperaturas sobre el desarrollo del nódulo y su funcionamiento, a nivel del microsimbionte es prácticamente nulo el conocimiento en esta rama.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## II.- ECOLOGIA DE *Rhizobium*

Diversos estudios, muestran que el número de rhizobia en campos cultivados puede variar desde 1,000 hasta 10<sup>6</sup>/gramo de suelo, dependiendo del tipo de suelo, tipo de cultivo, contenido de calcio intercambiable e historia de uso de fertilizantes; de tal forma que se ha encontrado que *Rhizobium leguminosarum*, *R. lupini*, *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. trifolii*, fueron capaces de sobrevivir de 10 a 125 años

después de que habían sido cultivados sus respectivos hospederos (Nutman, 1975; de Escuder, 1972; Jensen, 1969; Norman, 1942).

El estudio de las poblaciones de *Rhizobium* tanto en el campo como en invernadero y laboratorio, ha permitido establecer que las diferentes especies de *Rhizobium* tienen comportamientos diferentes en el suelo. Algunos rizobia son escasos mientras que otros son numerosos; algunos mueren rápidamente en condiciones de estrés, mientras que otros sobreviven largos períodos de tiempo aún bajo condiciones de agobio; algunos colonizan fácilmente las raíces de las leguminosas, mientras que otros sólo colonizan débilmente la rizósfera y no pueden competir con otros organismos antagonistas. Es importante destacar que, la mayoría de los estudios, se han enfocado principalmente a la descripción y entendimiento de la relación simbiótica y las limitantes metodológicas de su manejo, dejándose en un plano inferior los estudios sobre la bacteria en vida libre.

En cuanto a la capacidad de sobrevivencia, existen tres grandes grupos de factores que influyen sobre las poblaciones de *Brady(Rhizobium)*: abióticos, microbióticos y bióticos provenientes del sistema radical de las plantas.

## II.1.- FACTORES ABIOTICOS

**CONTENIDO DE AGUA:** En muchas áreas del mundo, una parte importante del año transcurre con poca o nula precipitación pluvial, de modo que, en ausencia de riego, los suelos agrícolas se secan. Esta desecación ha sido reconocida como un estrés potencial para la sobrevivencia de *Rhizobium*, especialmente cuando se

encuentra en vida libre. Debido a que la desecación de los suelos normalmente está acompañada de altas temperaturas, frecuentemente se estudian estos parámetros simultáneamente. Experimentos realizados al sur de Francia, demostraron que la cantidad de rhizobia por gramo de suelo, aumentó un orden de magnitud en suelos irrigados, respecto de la cantidad encontrada en suelos no irrigados, esto por un período de seis años (Croizat *et al.*, 1982). Por otro lado, algunas evidencias, muestran que la resistencia de los rhizobia a la desecación, difiere entre suelos que contienen mucha arcilla y limo, respecto de aquéllos que contienen mucha arena (Danso y Alexander, 1974).

**TEMPERATURA:** La sobrevivencia de la mayoría de las cepas de *Brady(Rhizobium)* se ve severamente disminuida arriba de los 40°C. En términos generales, los rhizobia aislados de lugares secos y con temperaturas altas, son más resistentes a la temperatura que aquellos aislados de áreas templadas o frías. La tolerancia a altas temperaturas generalmente está relacionada con la tolerancia a desecación, por lo que los efectos de temperatura están normalmente ligados a las condiciones de humedad en el suelo. Por lo anteriormente mencionado, la sobrevivencia de los rhizobia en suelo a altas temperaturas, está estrechamente ligada con la condición de humedad de éste, de modo que mientras que la sobrevivencia a temperaturas moderadas es mayor cuando el suelo está húmedo, la sobrevivencia a temperaturas mayores de 40°C es mayor cuando el suelo está seco (Danso y Alexander, 1974; Foulds, 1971).

**TIPO DE SUELO:** Algunos componentes del suelo afectan la sobrevivencia y movilidad de *Rhizobium*, por ejemplo, agregados de fitina absorben fuertemente a los rhizobia, mientras que en condiciones de humus ácido, esta absorción es débil. Ciertas arenas protegen a algunas especies de *Rhizobium* contra los efectos de la desecación a temperaturas entre 20 y 30°C. Otras sustancias, tales como polietilenglicol 600, sacarosa, glucosa y maltosa (añadidas al suelo en soluciones al 20%), también protegen o alteran la susceptibilidad a la desecación (Bushby y Marshall, 1977).

**pH:** Se ha encontrado que *Rhizobium* es tolerante a pH ácido, lo cual adquiere importancia en los trópicos, donde los suelos se encuentran generalmente acidificados. Estudios realizados por Fred y Davenport (1918) establecen que *R. meliloti* es menos tolerante a suelos ácidos que otras especies de *Rhizobium*: el más bajo pH en el que pueden sobrevivir las cepas de *R. meliloti* es de 4.9 mientras que *R. japonicum* y *R. lupini* sobreviven a pH de 3.3 y 3.15, respectivamente y *R. phaseoli* sobrevive a un pH de 4.2. Por otra parte, en las regiones áridas, los suelos tienden a la alcalinidad y se ha demostrado que no existe limitación para la proliferación de los rhizobia, sin embargo, las leguminosas normalmente son incapaces de crecer en este tipo de suelos.

**CONTENIDO DE SAL Y METALES PESADOS:** Algunas especies de *Rhizobium* son capaces de tolerar altas concentraciones de sal (Wahab y Zahran, 1979). La selección de asociaciones *Rhizobium*-leguminosa que sean tolerantes a sal es de

gran importancia, debido a la rápida salinización de los suelos irrigados (Ashraf, 1994). Debido a que la gran mayoría de las cepas de *Rhizobium* son extremadamente sensibles al estrés osmótico, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de adaptación osmótica en varias especies de *Rhizobium* (Talibart et al., 1994; Le Rudulier y Bernard, 1986; Botsford, 1984; Yap y Lim, 1983; Hua et al., 1982), estableciéndose que el restablecimiento de la turgencia en células bacterianas cultivadas en presencia de altas concentraciones de sal, coincide con la acumulación de iones potasio y glutamato, como respuesta inicial (Botsford y Lewis, 1990). La acumulación de éstos metabolitos durante un estrés osmótico, también se ha reportado en células de *R. japonicum* (Yellon et al., 1983) y se había descrito antes en otras bacterias no halofílicas (Csonka, 1989; Measures, 1975).

Asimismo, se ha reportado un efecto tóxico ejercido por Mn y Al sobre las poblaciones de *Rhizobium* en suelos ácidos, donde suelen acumularse éstos elementos (Franco y Döbereiner, 1971; Holding y King, 1963). Por otra parte, una alta concentración de metales pesados en el suelo puede favorecer la sobrevivencia de cepas de *Rhizobium* incapaces de fijar nitrógeno (inefectivas) (Giller et al., 1989).

## II.2.- FACTORES MICROBIOTICOS

**BACTERIAS Y HONGOS DEL SUELO:** Algunos hongos comunes del suelo tales como *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* pueden inhibir el crecimiento de *Rhizobium* en el suelo (Chhonkar y Subba-Rao, 1966). Resultados similares se han encontrado con actinomicetos y bacterias del suelo tales como

*Streptomyces*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Arthrobacter* y *Corynebacterium*. Esta inhibición del crecimiento es causada probablemente por la excreción de antibióticos o por competencia por los nutrientes. (Van Schreven, 1964). La nodulación también puede ser inhibida por estos hongos y bacterias.

**PARASITOS Y PREDADORES:** Se ha demostrado que *Rhizobium meliloti* es altamente sensible a bacteriofagos, de manera que se han podido aislar estos virus en todos los campos sembrados con alfalfa en Nueva York, donde son aparentemente muy comunes, no encontrándose en campos donde no se siembra alfalfa (Katznelson y Wilson, 1941). Demolon y Dunez (1935, 1939), aislaron cepas de *Rhizobium* resistentes a bacteriofagos, cuya introducción en campos de alfalfa en Francia, se tradujo en una duplicación del rendimiento de los cultivos, aunque no presentaron ninguna evidencia que indicara que este aumento en la productividad se pudiera atribuir a la presencia de los rhizobia fago-resistentes. Los protozoarios del género *Colpoda* y *Tetrahymena pyriformis*, pueden reducir drásticamente las poblaciones de *Rhizobium* en suelos (Habe y Alexander, 1978), pudiendo recuperarse éstas mediante la inhibición del protozoario con el uso de cicloheximida.

### II.3.- FACTORES BIOTICOS PROVENIENTES DEL SISTEMA RADICULAR DE LAS PLANTAS

Las leguminosas se caracterizan por producir altas concentraciones de exudados de raíz, de modo que pueden ayudar a enriquecer las poblaciones de *Brady(Rhizobium)* y otras bacterias del suelo en su rizósfera. Algunos de estos exudados contienen altas proporciones de aminoácidos, los cuales pueden ser empleados como fuentes de carbono por los rhizobia (Gaworzewska y Carlile, 1982; van Egeraat, 1975). Algunas moléculas aromáticas simples pueden ser también fuente de carbono y energía para *Rhizobium* (Glenn y Dilworth, 1981); habiéndose descrito rutas catabólicas en diferentes especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* para p-hidroxibenzoato (Dilworth *et al.*, 1983), catecol y protocatecuato (Chen *et al.*, 1984) y  $\beta$ -cetoadipato (Parke y Omston, 1984). Por otra parte, Bowen (1961) encontró que exudados provenientes de las semillas germinadas de *Trifolium subterraneum* eran tóxicas para *Rhizobium* y otras bacterias, reduciendo considerablemente el número de rhizobia.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### II.4.- EL USO DE INOCULANTES

Cuando un suelo no contiene naturalmente las bacterias de los géneros *Brady(Rhizobium)* específicos para una leguminosa que se desea cultivar, las cepas bacterianas necesarias deben ser agregadas a ese suelo. Actualmente, existen numerosas cepas de *Rhizobium* cuya capacidad fijadora de nitrógeno las ubica como excelentes cepas para su distribución a los agricultores en forma de

inoculantes, sin embargo, estas bacterias frecuentemente son incapaces de sobrevivir en número suficiente en los acarreadores, los cuales son utilizados para estabilizar lo mejor posible el número de rizobia. Entre los acarreadores, la turba es el más comúnmente usado, debido a que proporciona, generalmente, los mejores resultados. Además, se ha establecido que la utilización de acarreadores estériles proporciona un mayor índice de sobrevivencia de los rizobia que los acarreadores no estériles (Date y Roughley, 1977). Otros tipos de acarreadores son: residuos de cosecha (paja y composta), residuos azucarados, minerales (talco, vermiculita y arcilla), carbón mineral y lignita; entre otros. Por otra parte, el proceso de preparación, almacenamiento, distribución y aplicación del inoculante, involucra algunos tipos de estrés que las bacterias son incapaces de sobrellevar. Entre éstos, el nivel de humedad durante el almacenamiento, debe ser adecuado, ya que tanto el exceso como la limitación de humedad, afectan fuertemente la sobrevivencia de los rizobia. También durante el almacenamiento, los inoculantes son frecuentemente expuestos a altas temperaturas, limitando así la sobrevivencia bacteriana. El número de rizobia disminuye rápidamente cuando la temperatura alcanza los 45°C y puede observarse una disminución hasta de tres órdenes de magnitud, en tiempos muy cortos, a los 55°C (Wilson y Trang, 1980). La inoculación de las semillas, involucra un proceso de desecación, el cual también afecta la sobrevivencia de *Rhizobium*. Se ha observado una disminución en dos órdenes de magnitud en *Rhizobium trifolii* en un lapso de una hora después de la aplicación de la bacteria sobre la semilla (Salema et al., 1982). Keyser et al. (1992) ennumeran las siguientes características que deberá poseer un buen acarreador:



- 1.- Alta capacidad de contención de agua.
- 2.- No toxicidad para los rhizobia.
- 3.- Facilidad de esterilización por autoclave o radiación.
- 4.- Bajo costo y facilidad de obtención.
- 5.- Adhesión suficiente para su aplicación en las semillas.
- 6.- Capacidad de amortiguamiento del pH.
- 7.- Capacidad de intercambio de cationes y aniones.

La cepa ideal para su uso como inoculante debe tener la siguiente lista de características, de acuerdo a consideraciones hechas por Brockwell *et al.*, (1982), Burton (1979), Date (1982) y Howieson y Ewing (1986) y ennumeradas por Keyser *et al.* (1992):

- 1.- Capacidad para formar nódulos y fijar nitrógeno en la planta que se desea.
- 2.- Capacidad para competir en la formación de nódulos, con las poblaciones de rhizobia que se encuentran presentes en el suelo.
- 3.- Posibilidad de fijar nitrógeno en un amplio rango de condiciones.
- 4.- Capacidad para nodulizar y fijar nitrógeno en presencia de nitratos del suelo.
- 5.- Posibilidad de crecer adecuadamente en medios artificiales, acarreadores del inoculante y suelo.
- 6.- Capacidad para persistir en el suelo, particularmente en el caso de suelos donde se sembrarán leguminosas anuales.
- 7.- Capacidad para migrar del sitio de inoculación.
- 8.- Capacidad para colonizar el suelo en ausencia de leguminosas.
- 9.- Alta tolerancia al estrés ambiental.

10.- Capacidad para fijar nitrógeno con un amplio rango de genotipos del hospedero.

11.- Estabilidad genética.

12.- Compatibilidad con los agroquímicos normalmente utilizados.

Las evidencias actuales indican que las cepas altamente eficientes e importantes en la agricultura, son incapaces de crecer bajo las condiciones naturales del suelo. Períodos cortos de proliferación se pueden observar después del humedecimiento de suelo seco, pero son muy limitados. Los substratos orgánicos naturales del suelo y algunos substratos que se integran en forma de residuos de las partes aéreas de las plantas, son incapaces de permitir una adecuada replicación. Bajo condiciones naturales, estas bacterias sólo incrementan significativamente su número, bajo la influencia de sustancias excretadas por raíces (Peña-Cabriales y Alexander, 1983).

Debido a todas las limitantes arriba mencionadas, el uso de inoculantes no ha sido eficiente. En términos económicos, el uso de inoculantes efectivos puede ser benéfico, de modo que resulta importante el estudio de los factores que pueden influir en el mejoramiento de las cepas, con el fin de que puedan sobrevivir y proliferar en los sistemas agrícolas.

## II.5.- COMPORTAMIENTO SAPROFITICO

El término competencia saprofítica (Chatel *et al.*, 1968), engloba las características que deberían tener los rizobia destinados a influir favorablemente en sistemas agrícolas:

**CAPACIDAD DE INCURSION:** Se refiere a la capacidad de migración del *Rhizobium* hacia la raíz, con el fin de infectarla. Se ha medido en el campo el movimiento lateral de cepas de *Rhizobium*, y se ha demostrado que algunas cepas se movieron 5cm durante un mes en suelos intermitentemente humedecidos, otras se movieron menos de 2.5cm en el mismo período (Chatel *et al.*, 1968). La dispersión lateral de *R. meliloti*, hasta de 5cm ha sido adjudicada a movimientos en agua libre (Robson y Loneragan, 1970). Hamdi (1974) examinó la capacidad de incursión de *R. trifolii* en suelo, encontrando que el movimiento disminuyó conforme la presión de turgencia del suelo aumentó. La capacidad de incursión cesó totalmente en suelos con la humedad suficiente como para permitir la germinación de la semilla. Así, podemos establecer que la germinación a altos niveles de humedad, puede disminuir la nodulación, mediante la inhibición de la capacidad de incursión. Además del movimiento lateral, se ha reportado la influencia de la mesofauna en la migración de rizobia. Stephens *et al.* (1993), reportaron que el gusano de tierra *Microscolex dubius* incrementó la distribución de una cepa de *Rhizobium* en al menos 9cm en el suelo.

**COLONIZACION:** Se refiere a la capacidad de los rhizobia para ocupar nuevos hábitats. La habilidad para colonizar la rizósfera en altos números es esencial y la estimulación de los rhizobia por las leguminosas es importante. Estas bacterias son consideradas simbioses facultativas, que viven en el suelo como parte de la microflora habitual (Nutman, 1965; Allen y Allen, 1958). Sin embargo, generalmente

se encuentran pobremente adaptados a la vida del suelo en ausencia de plantas hospederas, lo que se refleja en una rápida disminución de la población de rizobia, después de la remoción de un cultivo de leguminosas (Nutman, 1963; Tuzimura y Watanabe, 1961). El establecimiento y persistencia en suelo no rizosférico, dependerá de la temperatura, humedad, salinidad o acidez y textura o tipo de suelo.

**CAPACIDAD PARA SOBREVIVIR EN CONDICIONES ADVERSAS:** Se refiere a la

capacidad de *Rhizobium* para soportar condiciones extremas de temperatura, acidez, salinidad, humedad y desecación en el suelo. Por muchos años, ha habido una intensa búsqueda de aislamiento de cepas de los géneros *Brady*(*Rhizobium*), que sean tolerantes a diferentes tipos de estrés, habiéndose reportado diferencias en la capacidad de tolerancia a la acidez, exceso de aluminio, altas temperaturas, bajos contenidos de fosfato y desbalances de humedad (Fuhrman *et al.*, 1986; Munevar y Wollum, 1981; Cassman *et al.*, 1981; Mahler y Wollum, 1980; Date y Halliday, 1979; Keyser y Munns, 1979; Keyser *et al.*, 1979). Sin embargo, no ha sido posible concluir si estas diferencias correlacionan con una alta capacidad de nodulación o con una buena capacidad saprofítica de las cepas en el campo. Cepas tolerantes al pH ácido, pueden o no sobrevivir mejor en suelos ácidos, que aquellas que son menos tolerantes (Gemell y Roughley, 1993; Howieson y Ewing, 1989; Hartel y Alexander, 1983; Graham *et al.*, 1982), esto es, la respuesta puede ser variable dependiendo del tipo de suelo y el nivel de acidez de éste. Richardson y Simpson (1989) observaron que la proporción de aislados que pueden crecer en un medio ácido no se relacionó a la acidez del suelo del cual habían sido obtenidos los

rizobia, de tal manera que, hasta ahora, no es posible obtener conclusiones acerca de las relaciones entre las características fisiológicas de aislados de nódulos y la capacidad saprofítica que desempeñarán en el campo.

Hasta este punto, hemos descrito las principales características de la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, así como las limitaciones y condicionantes de la efectividad de ésta. En el siguiente apartado haremos una descripción de la importancia del metabolito trehalosa y su posible papel en el desempeño de la relación simbiótica y en la adaptación de la bacteria al suelo como su hábitat natural.

## **MECANISMOS DE RESISTENCIA**

De manera general, los diferentes sistemas biológicos presentan ciertos límites de resistencia al estrés, los cuales se encuentran genéticamente determinados y son especie-específicos. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, algunos organismos son capaces de desarrollar niveles de tolerancia al estrés que sobrepasan estos límites. Este desarrollo de tolerancia es transitorio y presenta cinéticas definidas de inducción y decadencia. El estudio de los mecanismos de tolerancia a estrés ha llevado a la conclusión de que existen una serie de metabolitos relacionados a este fenómeno, aunque no se sabe ha ciencia cierta cuál es su papel, entre estos metabolitos podemos mencionar algunos carbohidratos como sacarosa, trehalosa,

glucógeno, glutatión y glucosilglicerol y algunos aminoácidos como el glutamato y la N-acetil-glutaminil-glutamina (Smith y Smith, 1989; Reed *et al.*, 1984).

### III.- IMPORTANCIA DE LA TREHALOSA

#### III.1.- TREHALOSA EN LA NATURALEZA

Trehalosa es el nombre común utilizado para los D-glucósidos-D-glucosilos, de los que se conocen tres isómeros que contienen formas piranosas. El isómero más común es la  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -glucopiranosido, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Este disacárido fue aislado por primera vez en 1832 por Wigger, y desde entonces ha sido identificado en una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, cianobacterias, algas, plantas vasculares inferiores, hongos, insectos, crustáceos, nemátodos y anélidos (Elbein, 1974). En la gran mayoría de los sistemas estudiados, la síntesis de trehalosa intracelular, se ha relacionado con la protección celular en situaciones adversas, tales como alta osmolaridad, deshidratación, congelamiento y altas temperaturas (Lewis *et al.* 1995; Nakata *et al.* 1995; Strom y Kaasen, 1993; Attfield *et al.*, 1992). Sin embargo, el papel del metabolismo de trehalosa durante la tolerancia al estrés, no está aún completamente entendido, e incluso se han descrito experimentos en células de levaduras, en los cuales la acumulación de trehalosa intracelular no coincide con el desarrollo de termotolerancia (Nwaka *et al.*, 1994).

En las plantas vasculares superiores, la trehalosa es considerado un azúcar raro, pero se ha encontrado en las hojas de algunos helechos, pteridofitas y en los frutos maduros de miembros del género *Apiaceae* (Kandler y Hopf, 1980). Hasta hace poco tiempo, la trehalosa no había sido detectada en angiospermas (Broklebank y Hendry, 1989; Gussin, 1972), sin embargo; en un estudio reciente la caracterización de la composición de carbohidratos de las hojas de *Myrothamnus flabellifolia*, permitió identificar a la trehalosa como un componente representativo del 14 al 19% del total de azúcares (Bianchi *et al.*, 1993), y posteriormente, se determinó que este contenido se incrementó al someter las plantas a sequía (Drennan *et al.*, 1993). La acción de la trehalosa sobre las células vegetales no se conoce con precisión, Wagner *et al.* (1986), reportaron que la trehalosa induce a la enzima sacarosa:sacarosa-fructosil-transferasa en hojas de cebada, pero la síntesis de fructosa no se lleva a cabo y la planta muere rápidamente. Por otra parte, Veluthambi *et al.* (1981), correlacionaron la habilidad de las plantas para sobrevivir al tratamiento de trehalosa con la actividad inducible de trehalasa. Las plantas incapaces de alcanzar niveles enzimáticos suficientes, se oscurecen y mueren. Por otra parte, en un esfuerzo por entender el papel de la trehalosa en plantas, se construyeron por ingeniería genética plantas de tabaco y papa que expresaban los genes de biosíntesis de trehalosa (trehalosa-6-fosfato-sintasa y trehalosa-6-fosfato-fosfatasa) provenientes de *E. coli* o de levadura (Goddijn *et al.*, 1997; Romero, *et al.*, 1997; Holmström *et al.*, 1996), encontrándose que las plantas transgénicas acumulaban pequeñas cantidades del disacárido además de un incremento en la resistencia a sequía en estas plantas (Romero, *et al.*, 1997; Holmström *et al.*, 1996).

Posteriormente, Blázquez *et al.* (1998) y Vogel *et al.* (1998), demostraron en *Arabidopsis thaliana* la presencia de los genes de biosíntesis de trehalosa, los cuales pudieron complementar la función de síntesis del disacárido en mutantes de levadura.

### III.2.- HIDROLISIS DE TREHALOSA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

La trehalosa en la naturaleza es hidrolizada por la enzima  $\alpha$ -glucosidasa- $\alpha$ -trehalasa (E.C.3.2.1.28). Con algunas excepciones, todos los organismos que producen trehalosa pueden inducir actividad trehalasa (Mellor, 1992). En *Escherichia coli* no se ha detectado actividad trehalasa, sin embargo, se sabe que la trehalosa es incorporada por un sistema de transporte mediado por una fosfotransferasa, sufriendo hidrólisis inmediata hasta glucosa y glucosa-6-fosfato (Boss *et al.*, 1987). En *Agrobacterium tumefaciens*, la actividad trehalasa se ve

incrementada por los cationes monovalentes  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Rb^+$  (Hoelzle y Streeter, 1990b). Se ha detectado actividad trehalasa en una variedad de hongos, tales como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Aurobasidium pullulans*, *Humicola languginosa*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus* y *Streptomyces hygroscopicus* (Jahagirdar y Seligy, 1992; Hey y Elbein, 1968; Horikoshi y Ikeda, 1966). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado dos actividades trehalasa inteconvertibles, cuyo mecanismo de activación parece estar controlado mediante una fosforilación dependiente de cAMP (Dellamora Ortiz *et al.*, 1986; Londesborough y Varimo, 1984). Se ha documentado también un incremento de



actividad trehalasa durante la germinación de esporas en *Schizosaccharomyces pombe* (Inoue y Shimoda, 1981).

Se han reportado actividades trehalasa asociadas a membrana en una variedad de fuentes animales tan diversas como conejos, glándulas labiales de hormigas, abejas, cucarachas y camarones (Mellor, 1992). En cuanto a plantas superiores, la actividad trehalasa ha sido reportada en caña de azúcar (Glasziou y Gayler, 1969) y en los géneros *Lemna*, *Nicotiana*, *Datura*, *Daucus*, *Glycine*, *Zea*, *Raphanus* y *Quamoclit*. En el género *Phaseolus* se detectó baja actividad trehalasa y no fue encontrada en *Cuscuta* (Veluthambi *et al.*, 1981). Sin embargo, el papel de la catálisis de este disacárido aún no ha sido estudiado.

### III.3.- TREHALOSA EN MICROORGANISMOS

En muchas cianobacterias, a pesar de que se desconocen los mecanismos de captación y síntesis de trehalosa, se ha considerado a este disacárido como un osmoprotector (Mackay *et al.*, 1984). Reed *et al.* (1984), identificaron los carbohidratos trehalosa, sacarosa y glucosilglicerol, como solutos osmoregulatorios en 71 cepas de cianobacterias marinas y de agua dulce. De los 22 aislados marinos, 23% acumularon trehalosa, mientras que sólo el 18% de los 22 aislados de agua dulce acumularon el carbohidrato después de un tratamiento con NaCl (Yelton *et al.*, 1983). En *Escherichia coli*, la trehalosa se sintetiza en respuesta a desequilibrios osmóticos (Giaever *et al.*, 1988; Kaasen *et al.*, 1992) y en *Rhizobium meliloti*, Smith y Smith (1989), reportaron la acumulación de N-acetil-glutaminil-

glutamina (NAGGN), glutamato y trehalosa, cuando sometían a las células bacterianas a estrés osmótico con diferentes concentraciones de NaCl, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sacarosa. En este estudio, se analizaron cinco cepas, encontrándose una respuesta ampliamente variada, con una cepa que no producía trehalosa, tres cepas que producían entre 10 y 50 nmoles/mg de proteína y una cepa que producía diez veces más que estas últimas. En las cinco cepas, se detectaron persistentemente altas concentraciones de NAGGN y glutamato, excepto en la cepa que había acumulado la más elevada concentración de trehalosa, la cual presentó diez veces menos concentración de glutamato y NAGGN que el resto. La producción de trehalosa por rizobia crecidos en condiciones aerobias en medio líquido, resultó ampliamente variable (Streeter, 1985), dependiendo de la fuente de carbono y de nitrógeno: cuatro diferentes cepas de *Rhizobium japonicum*, mostraron una producción de trehalosa despreciable en algunos casos, mientras que en otros acumularon cantidades elevadas, correspondientes a casi el 90% del total de mono y disacáridos. En todos los casos, sin embargo, la trehalosa representó alrededor del 85% del total de mono y disacáridos acumulados durante el cultivo.

En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (De Virgilio *et al.*, 1994) y *Candida albicans* (Arguelles, 1997), se ha reportado la presencia de trehalosa intracelular acumulada en cantidades mayores al 6% del peso seco, bajo condiciones de estrés por calor o congelación. En estos organismos se demostró que la presencia de trehalosa acumulada permitía que las células tuvieran un mayor margen de sobrevivencia después de los tratamientos con calor o por congelación. En *Streptomyces antibioticus*, las colonias crecidas en medio sólido acumularon

trehalosa y glucógeno, al igual que las esporas (Braña *et al.*, 1986). También se ha reportado que la trehalosa protege contra efectos por congelación en *Torulospora delbrueckii* (Yokoigawa *et al.*, 1995), protección de las membranas y proteínas en *Escherichia coli* (Leslie *et al.*, 1995) y protección contra estrés osmótico en *Pseudomonas mendocina* (Pocard *et al.*, 1994) y en *Pseudomonas aeruginosa* (D'Sousa *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha reportado que la trehalosa protege contra los efectos del etanol, en *Saccharomyces cerevisiae* (Mansure *et al.*, 1994).

En cuanto a la respuesta fisiológica de los rhizobia en vida libre, se ha reportado que estas bacterias tienden a acumular trehalosa cuando son expuestas a estrés hídrico (Breedveld *et al.*, 1991) y se ha descrito el sistema enzimático de biosíntesis de trehalosa en *Rhizobium* sp. M-11 (Maruta *et al.*, 1996), el cual es diferente del sistema de biosíntesis del disacárido descrito en levadura e involucra las siguientes reacciones:



### III.4.- TREHALOSA EN SISTEMAS SIMBIOTICOS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### ACTINORRIZAS

*Frankia* es un actinomiceto capaz de formar nódulos con más de 200 especies de plantas y almacena carbohidratos en forma de glucógeno y trehalosa (López *et al.*, 1983). La cantidad de trehalosa acumulada en *Frankia*, se relaciona inversamente con los niveles de fijación biológica de nitrógeno, posiblemente debido a una disminución en la síntesis del carbohidrato durante la máxima actividad

nitrogenasa (López y Torrey, 1985). En estudios recientes (Burleigh y Dawson, 1994), se ha demostrado que la concentración intracelular de trehalosa en *Frankia* se relacionó de manera directa con la capacidad de sobrevivir a la desecación. Los nódulos actinorrhizales contienen grandes cantidades de sacarosa, que junto con la fructosa pueden mantener el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

## MICORRIZAS

Se ha podido observar en cortes de ectomicorizas que la glucosa y la fructosa pueden ser convertidas a trehalosa y manitol. Niederer *et al.* (1989), han observado que la concentración de trehalosa en raíces es proporcional al grado de micorrización. Asimismo, cuando las raíces de soya son infectadas con *Glomus mosseae*, que forma una micorriza vesículo-arbuscular, se incrementan significativamente los niveles de trehalosa, así como la actividad trehalasa. En estos casos, la trehalosa de origen fúngico puede entrar a los tejidos de la planta como resultado de la endosimbiosis. Martin *et al.* (1988), demostraron que en el micelio de hongos ectomicorrízicos, el carbono es primero incorporado hacia manitol y luego dirigido a la síntesis de trehalosa. Estos autores proponen que el ciclo del manitol juega un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa y en el almacenamiento de carbono, en muchos hongos micorrízicos. Estudios previos con hongos basidiomicetos ectomicorrízicos, han demostrado la existencia de diferentes sistemas de almacenamiento que involucran la biosíntesis de trehalosa. El carbono

absorbido puede ser acumulado como manitol o trehalosa, las ventajas de estas rutas son desconocidas (Martin *et al.*, 1985).

## RHIZOBIACEAE

Aunque los estudios previos sugieren que la trehalosa es sintetizada por *Bradyrhizobium japonicum*, se ha reportado que este disacárido probablemente sea el principal carbohidrato en todas las especies de *Rhizobium* (Mellor, 1992; Streeter, 1987a). La composición del medio de cultivo, el estadio de crecimiento de la bacteria y la cepa, tienen influencia en la concentración intracelular de trehalosa, alcanzando concentraciones mayores al 90% del total de mono y disacáridos (Streeter, 1985). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que en *Rhizobium leguminosarum* con 1% de O<sub>2</sub>, la concentración de trehalosa fue independiente del medio de cultivo (Hoelsle y Streeter, 1990a).

Aunque el mecanismo bioquímico para la acumulación de trehalosa bajo condiciones limitantes de O<sub>2</sub> no es claro, se piensa que puede ser debida a un incremento en la síntesis o a una disminución en la degradación de la trehalosa. En nódulos, la trehalosa se encuentra únicamente en el tejido nodular (Streeter, 1980), habiéndose detectado en nódulos de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Arachis hypogea*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus*, *Glycine max* y *Sesbania rostrata*, en cantidades de 2 a 14 mg de trehalosa por g de nódulo fresco (Streeter, 1985; Streeter, 1987). En los nódulos de soya, los carbohidratos predominantes son trehalosa y sacarosa (Kouchi y Yoneyama, 1986), mientras que

en raíz y nódulos de *Medicago sativa* se han detectado concentraciones muy bajas de trehalosa (Fougere *et al.*, 1991). A través de la familia Leguminosae, los nódulos de los miembros de las sub-familias Papilionaceae y Caesalpinaceae contienen trehalosa y no se han analizado miembros de la sub-familia Mimosaceae. Estudios desde el punto de vista bacteriano, demuestran que en los miembros de la familia Rhizobiaceae, la trehalosa se acumula en las asociaciones que involucran *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. El carbono para la síntesis de trehalosa en los nódulos se obtiene de los fotosintatos de la planta y llegan al tejido nodular en forma de sacarosa (Salminen y Streeter, 1986; Streeter, 1985). La síntesis de trehalosa se lleva a cabo únicamente por los bacteroides y el mayor porcentaje de trehalosa es liberado al espacio peribacteroidal, de modo que puede ser detectada en el citoplasma de las células vegetales (Streeter, 1985). Es importante hacer notar que los nódulos también contienen grandes cantidades de la enzima trehalasa (Salminen y Streeter, 1986; Streeter, 1982). Esta enzima probablemente se sintetiza en el huésped, dado que sólo se ha encontrado en la fracción soluble de las células vegetales, mientras que los bacteroides contienen poca o nula actividad (Mellor, 1988; Salminen y Streeter, 1986). Se ha observado que se puede inducir la actividad trehalasa en ausencia de rhizobia cuando las células son expuestas a concentraciones variables de trehalosa (Veluthambi *et al.*, 1981).

Como ya ha sido señalado (Mellor, 1982), la trehalosa desempeña un papel hasta ahora desconocido en la simbiosis. Las evidencias existentes no permiten aún asignar una función clara en esta compleja interacción. La información disponible señala que la trehalosa es un disacárido común en los microorganismos y puede

estar involucrada en la tolerancia a condiciones adversas. Por otra parte, se ha reportado que existe una correlación entre la acumulación de trehalosa en nódulos formados por *Rhizobium* en plantas de frijol y la resistencia a sequía por parte de las plantas (Farias et al., 1998).

#### **IV.- HIPOTESIS**

LA ACUMULACION DE TREHALOSA INTRACELULAR, CONFIERE A *Rhizobium* VENTAJAS EN TÉRMINOS DE COMPETENCIA SAPROFÍTICA.

#### **V.- OBJETIVOS**

##### **V.1.- GENERAL**

Evaluar la producción de trehalosa por cepas de *Rhizobium* spp. y su relación con la competencia saprofítica.

##### **V.2.- PARTICULARES**

- 1.- Evaluar el comportamiento saprofítico de seis aislados de *Rhizobium* que nodulan frijol, en términos de:
  - a) resistencia y desarrollo de tolerancia al estrés por temperatura y osmótico,
  - b) capacidad de crecimiento y sobrevivencia en dos diferentes tipos de suelo (arcilloso y arenoso), sometido a desecación por temperatura y

c) capacidad de crecimiento a altas temperaturas en medio líquido.

2.-Relacionar la capacidad saprofítica con el contenido de trehalosa intracelular producida durante los diferentes pre-tratamientos.

## VI.- METODOLOGIA

### CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

**CEPAS:** Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio, fueron previamente aisladas de nódulos provenientes de diferentes cultivares de frijol, en la zona del Bajío Guanajuatense (Farfás *et al.*, 1998). Se utilizaron dos cepas aisladas del cultivar "Flor de Mayo, Bajío": FMB-3 (*R. etli*) y FMB-10 (*R. etli*); dos cepas aisladas del cultivar "Flor de Mayo, 38": FM38-3 (*R. etli*) y FM38-6 (*R. tropici*) y dos cepas aisladas del cultivar "Canario": CAN-6 (*R. etli*) y CAN-15 (*R. tropici*).

**MEDIOS DE CULTIVO:** Los cultivos fueron incubados en medio PY, que contenía

Peptona de Caseína al 0.5%, extracto de levadura al 0.3%, CaCl<sub>2</sub> 7mM y agar bacteriológico al 2% en el caso de los medios sólidos. Para la determinación de resistencia y tolerancia a estrés osmótico, se utilizó medio PY suplementado con las concentraciones de NaCl que se indican.

**CONDICIONES DE CRECIMIENTO:** Las cepas fueron incubadas a 30°C y, en el caso de los cultivos líquidos, con agitación orbital de 120 rpm.



**DETERMINACION DEL PERFIL DE RESPUESTA A ESTRÉS:** Esta serie de experimentos, se realizaron con la finalidad de evaluar el nivel límite de resistencia a choque térmico y osmótico que presentaban nuestras cepas, con el propósito de definir la competencia saprofítica en términos de la capacidad para sobrevivir en condiciones adversas.

**DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A CHOQUE TÉRMICO:** La resistencia a choque térmico se determinó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de cultivos de *Rhizobium* sometidos a un choque térmico de 50°C. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo bacteriano incubado a 30°C y en la fase logarítmica-media del crecimiento, correspondiente a una  $D_{0.500nm}$  de 0.6-0.8, dependiendo de la cepa. Se sometió la alícuota a choque térmico de 50°C, colocándola en un tubo pre-calentado, dentro de un termo-reactor. Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L cada diez minutos, a los tiempos de 10, 20 y 30 minutos. Se sembraron diluciones de la alícuota en medio PY y se contaron las colonias aisladas, después de incubar a 30°C durante 72 h. Se sembraron tres cajas de petri por cada dilución y se manejaron dos diluciones, de modo que se obtuvieron entre 30 y 300 colonias por caja. Esta determinación se hizo por triplicado, en experimentos independientes y se calculó la media y la desviación estándar. Se calculó el porcentaje de células sobrevivientes en cada intervalo de tiempo, tomándose como 100% las unidades formadoras de colonias presentes justo antes de someter la muestra al choque térmico.

**DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A ESTRES OSMOTICO:** La resistencia a estrés osmótico se determinó mediante la evaluación del efecto de concentraciones crecientes de NaCl sobre la velocidad de crecimiento. Se determinó el tiempo de duplicación de las cepas crecidas en PY que contenía concentraciones de 200, 300 y 400mM de NaCl, mediante la evaluación de la D.O.<sub>600nm</sub> cada 2 h, de cultivos bacterianos incubados durante 24 h. Se graficó la absorbancia contra el tiempo y se calculó el tiempo de duplicación en la fase logarítmica de crecimiento. Se utilizó como referencia el tiempo de duplicación de cultivos de *Rhizobium* en PY sin NaCl para cada experimento. Las determinaciones se realizaron por triplicado en experimentos independientes y se reportó la media y la desviación estándar de las tres repeticiones.

### **DETERMINACION DEL DESARROLLO DE TOLERANCIA A ESTRÉS:**

La evaluación de la capacidad de desarrollo de tolerancia directa y cruzada tanto para estrés térmico como para estrés osmótico, se llevó a cabo con la finalidad de correlacionar esta capacidad con los niveles de trehalosa producida por las cepas en estudio durante los diferentes tratamientos.

**DESARROLLO DE TOLERANCIA A ESTRES POR TEMPERATURA:** El desarrollo de tolerancia a choque térmico se realizó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de cultivos sometidos a un choque térmico de 50°C, que recibieron un tratamiento previo a 40°C durante 30 minutos, a fin de promover el desarrollo de tolerancia. Se realizó el análisis de la misma manera que la

determinación de resistencia, tomándose como 100% el total de las UFC existentes después del tratamiento previo. Las determinaciones se realizaron por triplicado en experimentos independientes y se reportó la media y su desviación estándar.

**DESARROLLO DE TOLERANCIA A ESTRES OSMOTICO:** La resistencia a estrés osmótico se determinó mediante la evaluación del efecto de concentraciones crecientes de NaCl sobre la velocidad de crecimiento, de cultivos bacterianos que fueron sometidos a un tratamiento previo de 175mM NaCl por 2 h. Se determinó el tiempo de duplicación de las cepas crecidas en PY que contenía concentraciones de 300 y 400mM de NaCl, mediante la evaluación de la D.O.<sub>600nm</sub> cada 2 h, de cultivos de *Rhizobium* incubados durante 24 h. Se graficó la absorbancia contra el tiempo y se calculó el tiempo de duplicación en la fase logarítmica de crecimiento. Se comparó el tiempo de duplicación de cepas cultivadas directamente en PY suplementado con NaCl (300 y 400mM), con el de aquéllas que recibieron el tratamiento previo y que fueron incubadas en las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado en experimentos independientes y se reportó la media y la desviación estándar de las tres repeticiones.

## **DETERMINACION DEL DESARROLLO DE TOLERANCIA CRUZADA ENTRE AMBOS TIPOS DE ESTRES**

**DESARROLLO DE TOLERANCIA TEMPERATURA-SAL:** La determinación del desarrollo de tolerancia cruzada temperatura-sal, se llevó a cabo mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de cultivos sometidos a un choque

térmico de 50°C, que recibieron un tratamiento previo de 2 h en presencia de 175mM NaCl, a fin de promover el desarrollo de tolerancia. Se realizó el análisis de la misma manera que la determinación de resistencia, tomándose como 100% el total de las UFC existentes después del tratamiento previo. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se reportó la media y su desviación estándar.

**DESARROLLO DE TOLERANCIA SAL-TEMPERATURA:** La evaluación del desarrollo de tolerancia cruzada sal-temperatura, se llevó a cabo mediante la determinación del efecto de concentraciones crecientes de NaCl sobre la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa, de cultivos que fueron sometidos a un tratamiento previo de 40°C por 30 minutos. Se determinó el tiempo de duplicación de las cepas crecidas en PY que contenía concentraciones de 200, 300 y 400mM de NaCl, mediante la evaluación de la D.O.<sub>600nm</sub> cada 2 h, de cultivos incubados durante 24 h. Se graficó la absorbancia contra el tiempo y se calculó el tiempo de duplicación en la fase logarítmica de crecimiento. Se comparó el tiempo de duplicación de cepas cultivadas directamente en PY suplementado con NaCl (200, 300 y 400mM), con el de aquellas que recibieron el tratamiento previo y fueron incubadas en las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado en experimentos independientes y se reportó la media y la desviación estándar de las tres repeticiones.

## **DETERMINACION DEL TIEMPO DE DUPLICACION EN DOS TIPOS DE SUELO:**

Esta serie de experimentos se realizó con el propósito de evaluar la capacidad de las cepas en estudio para sobrevivir en condiciones de humedad en diferentes tipos de suelo, a fin de definir la persistencia. La colecta de suelo se llevó a cabo en el CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, siendo éste de tipo arcilloso, con un pH = 7.87 y una capacidad de almacenaje de agua del 90.36%. Para los experimentos en suelo arenoso, se realizó una mezcla del suelo arcilloso descrito anteriormente con arena, en una relación 1:1. El tiempo de duplicación en los dos tipos de suelo (arcilloso y arenoso), se determinó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de las diferentes cepas bacterianas, inoculadas en 10 g de suelo estéril a una concentración inicial de  $10^9$  células/g de suelo e incubadas a las temperaturas de 30, 39 y 42°C. La humedad correspondiente a un 80% de la capacidad de campo para cada tipo de suelo, se mantuvo constante mediante la adición diaria de agua estéril, evaluándose la evaporación de ésta por diferencia de peso. Se inocularon de manera simultánea un total de 10 botellas de dilución "lecheras", con un número igual de células cada una. Posteriormente, se evaluó la cantidad de UFC en cada muestra durante los siguientes diez días (una muestra cada día) y se calculó el tiempo de duplicación de las diferentes cepas, haciéndose el ensayo a cada una de las temperaturas arriba mencionadas. La evaluación se realizó por triplicado en experimentos independientes y se reportó la media y la desviación estándar de las tres repeticiones.

## **DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE SOBREVIVENCIA EN DOS TIPOS DE SUELO SOMETIDO A DESECACION A ALTAS TEMPERATURAS:**

Estos experimentos se llevaron a cabo con la finalidad de determinar la capacidad de sobrevivencia en suelo en condiciones adversas, como parte de la evaluación de la capacidad saprofítica de las cepas en estudio. La capacidad de sobrevivencia a desecación en suelo, se evaluó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de las diferentes cepas bacterianas, inoculadas en 10 g de suelo estéril a una concentración inicial de  $10^9$  células/g de suelo e incubadas a las temperaturas de 30, 39 y 42°C, sin adición de agua estéril, para permitir la desecación del suelo. Se inocularon de manera simultánea un total de 10 botellas de dilución "lecheras", con un número igual de células cada una y con una capacidad de campo inicial del 80%. La pérdida de agua del suelo (desecación), se evaluó mediante la determinación de la diferencia en peso. Posteriormente, se evaluó la cantidad de UFC en cada muestra durante los siguientes diez días (una muestra cada día) y se calculó el "índice de mortalidad", de las diferentes cepas, *definido como el tiempo necesario para que la población disminuya en un orden de magnitud, haciéndose el ensayo a cada una de las temperaturas arriba mencionadas. La evaluación de la sobrevivencia en suelo se realizó por triplicado en experimentos independientes y se reportó la media y su desviación estándar.*

**DETERMINACION DEL TIEMPO DE DUPLICACION EN MEDIO LIQUIDO A ALTAS TEMPERATURAS:** Estos experimentos se realizaron con el fin de evaluar el comportamiento *in vitro* de las cepas en estudio, al ser sometidas a temperaturas altas; como parte de los parámetros para definir la competencia saprofítica. El tiempo de duplicación en medio líquido se determinó mediante la evaluación de la D.O.<sub>600nm</sub> cada 2 h, de cultivos incubados durante 24 h, en medio PY. Se graficó la absorbancia contra el tiempo y se calculó el tiempo de duplicación en la fase logarítmica de crecimiento. Los cultivos fueron incubados a las temperaturas de 30, 37, 40 y 42°C, realizándose por triplicado en experimentos independientes y reportándose la media y la desviación estándar de las tres repeticiones.

## **DETERMINACION DEL CONTENIDO DE TREHALOSA**

**INTRACELULAR:** La determinación del contenido de trehalosa se llevó a cabo con el fin de establecer una correlación entre los niveles de acumulación del disacárido y la capacidad de sobrevivencia de *Rhizobium* a condiciones adversas. Es importante señalar que el método enzimático de determinación de trehalosa que se describirá más adelante, fue desarrollado durante la realización de este trabajo, ya que anteriormente se llevaba a cabo la determinación por medio de análisis cromatográfico en HPLC.

**PREPARACION DE LOS EXTRACTOS:** Los extractos crudos para la determinación de trehalosa intracelular, se prepararon de la siguiente manera:

- 1.- Se colectaron las células por centrifugación a 10,000 rpm durante cinco minutos.
- 2.- Se lavaron las células con agua destilada estéril.
- 3.- Se resuspendieron las células en 5 mL de etanol al 80% (vol/vol) y se sometieron a agitación vigorosa (en un agitador tipo vortex) por cinco minutos, repitiendo el pulso tres veces.
- 4.- Se centrifugó el extracto a 10,000 rpm por cinco minutos, para descartar el residuo sólido y recuperar, en el sobrenadante, la fracción celular soluble en etanol.
- 5.- Se filtró la fracción soluble a través de membranas de celulosa-acetato con un tamaño del poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- 6.- Se evaporaron las muestras hasta sequedad manteniéndolas a 40°C por un periodo de 6 h.
- 7.- Se resuspendió el liofilizado en un buffer de ácido málico 50mM a pH=6.0, que contenía 0.1mM de benzamidina, 0.5mM de PMSF y 0.5Mm de  $\beta$ -mercapto-etanol.

**ENSAYO DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE TREHALOSA:** El contenido de trehalosa intracelular se determinó mediante un ensayo enzimático en el que se sometió a la fracción soluble en etanol, resuspendida en un buffer de ácido málico, a la acción de la enzima trehalasa ácida (preparación comercial de SIGMA), la cual rompe a la molécula de trehalosa en dos moléculas de glucosa, en el siguiente coctel de reacción:



### **COCTEL 1:**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD</b>
Extracto crudo	100 $\mu\text{L}$
Trehalasa	25 $\mu\text{L}$ , equivalente a 5 unidades
Buffer ácido málico	375 $\mu\text{L}$

### **COCTEL 2:**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD</b>
Extracto crudo	200 $\mu\text{L}$
Trehalasa	50 $\mu\text{L}$ , equivalente a 10 unidades
Buffer ácido málico	250 $\mu\text{L}$

La reacción se incubó durante 1 h en un baño de agua a 37°C y se detuvo la reacción hirviendo por cinco minutos. Se incubaron dos cocteles control, uno que no contenía trehalasa, para cada alícuota de extracto y otro que no contenía extracto crudo. Una vez detenida la reacción, se evaluó la cantidad de glucosa producida mediante el uso de un kit para determinación de glucosa en sangre. En todos los casos, los cocteles de control no presentaron algún valor detectable de glucosa. La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Lowry y se reporta el contenido intracelular de trehalosa en  $\mu\text{g}$  de trehalosa/mg de proteína. En todos los casos, se demostró que la manipulación de las células durante su recolección y lavado, no provocaba un aumento en el contenido intracelular de trehalosa.

## VII.- RESULTADOS Y DISCUSION

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio, fueron aisladas de nódulos encontrados en diferentes cultivares de frijol, en la zona del Bajío Guanajuatense. Estas cepas fueron capaces de producir diferentes niveles de trehalosa intracelular al ser cultivadas en medio 20E, el cual contiene glicerol en su formulación, además de producir diferentes niveles de trehalosa en los nódulos formados al infectar plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (Farias et al., 1998).

### PERFIL DE RESPUESTA A ESTRES POR TEMPERATURA Y DESARROLLO DE TERMOTOLERANCIA

La evaluación del comportamiento de las seis cepas de *Rhizobium* frente a un choque térmico de 50°C, reveló una alta variabilidad en la respuesta (tabla 1).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 1.-** Supervivencia de cepas de *Rhizobium* spp. frente a un choque térmico de 50°C durante 10, 20 y 30 minutos. Los valores iniciales se expresan como tiempo cero.

CEPA	TIEMPO (minutos)			
	0	10	20	30
FMB-3	158±10	29±6	2±0.6	0.13±0.01
	(168±12)	(80±8)	(10±2)	(0.19±0.01)
FMB-10	165±10	10±3	0.7±0.1	0.07±0.02
	(154±10)	(21±2)	(1.2±0.1)	(0.07±0.01)
CAN-6	159±10	7±1.7	0.6±0.09	0.07±0.01
	(160±10)	(16±2)	(1.4±0.06)	(0.1±0.01)
CAN-15	168±12	8±1.3	0.5±0.12	0.07±0.01
	(160±10)	(11±1.1)	(0.90±0.11)	(0.1±0.01)
F38-3	150±9	82±11	5±1	0.11±0.02
	(168±10)	(101±13)	(7±0.8)	(0.13±0.01)
F38-6	168±10	2±0.8	0.1±0.01	0.02±0.004
	(165±10)	(79±8)	(5±1)	(0.16±0.01)

Se muestran los promedios de tres experimentos y su desviación estándar. Los valores que se muestran entre paréntesis, corresponden a los datos de supervivencia de *Rhizobium* a un choque térmico de 50°C, después de recibir un tratamiento previo a 40°C durante 30 minutos.

En términos generales, podemos afirmar que la cepa F38-3 fue resistente, la cepa F38-6 fue sensible y las restantes cepas FMB-3, FMB-10, CAN-6 y CAN-15 fueron medianamente resistentes, sobresaliendo la cepa FMB-3, que presentó consistentemente un nivel de resistencia al choque térmico, significativamente mayor al de las tres cepas restantes. Es importante destacar que sólo fue posible observar diferencias de comportamiento estadísticamente significativas entre las cepas, cuando el tiempo de duración del tratamiento no excedió los 20 minutos, ya que a los 30 minutos de tratamiento, la respuesta fue estadísticamente igual para todas las cepas, excepto para la cepa F38-6, que permaneció sensible, respecto de las demás. Estos resultados, confirman observaciones anteriores, en lo referente a la variabilidad de respuesta fisiológica de las cepas nativas de *Rhizobium* (Smith y Smith, 1989; Streeter, 1985), quedando establecido que esta propiedad persistió ante un choque térmico de 50°C. Es importante destacar que el fenotipo sensible de la cepa F38-6 es altamente persistente, lo cual es de llamar la atención, ya que se trata de una cepa de la especie *tropicum*, por lo que esperaríamos que presentara una mayor resistencia a altas temperaturas y no la extrema sensibilidad que presentó en estos ensayos. Del mismo modo, la cepa CAN-15 también perteneciente a la especie *tropicum*, no mostró una alta resistencia a temperaturas elevadas, aunque no fue extremadamente sensible como la cepa F38-6. Una intensa búsqueda de información, reveló que prácticamente no se han realizado estudios similares a los que se desarrollaron en el presente trabajo con *Rhizobium*, ya que la gran mayoría de los estudios de choque térmico en estas bacterias, están encaminados a la caracterización de las proteínas de choque térmico, más que a la evaluación de la

sobrevivencia. Sin embargo, en un reporte reciente (Thorne y Williams, 1997), se encontró que una cepa de *R. leguminosarum* presentó una sobrevivencia del 10% frente a un choque térmico de 55°C por un lapso de tiempo de 10 minutos. Este resultado es similar a los que se obtuvieron en el presente trabajo, ya que las cepas en estudio presentaron una sobrevivencia entre 4.4 y 18.3% cuando se aplicó el choque térmico de 50°C durante diez minutos, exceptuando a la cepa resistente (F38-3), que presentó una sobrevivencia del 54.7% y a la cepa sensible (F38-6), que presentó una sobrevivencia del 1.2%. Otro estudio reciente, reportó la sobrevivencia de tres cepas de *Rhizobium* spp. frente a un choque térmico de 46.4°C durante 3 h, la cual varió del 0.001 al 0.02% (Cloutier, et al., 1992). Estos valores tan bajos de sobrevivencia se explican por el periodo tan largo de exposición al choque térmico (3 h).

El ensayo de desarrollo de tolerancia al choque térmico de 50°C, también dio como resultado una respuesta variable entre las seis cepas analizadas (tabla 1). En este caso, se caracterizaron dos cepas con elevada capacidad de desarrollo de termotolerancia: FMB-3 y F38-6; una cepa incapaz de desarrollar termotolerancia: F38-3 y tres cepas con mediana capacidad de desarrollo de termotolerancia: FMB-10, CAN-6 y CAN-15; aunque, una vez más, las diferencias estadísticamente significativas sólo se observaron hasta los 20 minutos de tratamiento, ya que a los 30 minutos de choque térmico, solamente permaneció el fenotipo termotolerante de las cepas FMB-3 y F38-6, mientras que en el resto de las cepas ya no fue posible observar desarrollo de tolerancia. Es de llamar la atención que las dos cepas que

presentaron capacidad de desarrollo de termotolerancia, son muy diferentes en cuanto a la capacidad de resistencia, ya que la cepa F38-6 fue altamente sensible, mientras que la cepa FMB-3 fue medianamente resistente; de modo que no es posible establecer una relación entre resistencia y capacidad de desarrollo de tolerancia para este grupo de cepas bacterianas. Por otra parte, si comparamos la capacidad de desarrollo de tolerancia de las dos cepas que fueron resistentes (FMB-3 y F38-3), solamente la cepa FMB-3 fue capaz de desarrollar tolerancia, mientras que la cepa F38-3 no desarrollo tolerancia en absoluto. Actualmente, no existen reportes de estudios de desarrollo de termotolerancia en *Rhizobium* spp.

## CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN MEDIO LIQUIDO A ALTAS TEMPERATURAS

La evaluación de la velocidad de crecimiento *in vitro*, puede reflejar el comportamiento bacteriológico en el hábitat natural de los diferentes organismos, aunque es importante destacar que las velocidades de crecimiento en medios definidos, de ninguna manera son iguales a las velocidades de crecimiento en la naturaleza. Los resultados en la tabla dos, muestran el efecto del aumento en la temperatura de cultivo, sobre el tiempo de duplicación de las cepas en estudio.

**Tabla 2.-** Tiempo de duplicación de cepas de *Rhizobium* spp. incubadas en medio líquido PY a diferentes temperaturas.

CEPA	TEMPERATURA (grados Centígrados)			
	30	39	41	43
	TIEMPO DE DUPLICACION (horas)			
FMB-3	1.7±0.3	2.4±0.5	4.6±0.5	6.0±0.3
FMB-10	1.9±0.3	2.7±0.5	6.6±0.5	N.D.
CAN-6	2.4±0.6	2.7±0.6	6.1±0.7	N.D.
CAN-15	2.2±0.4	3.0±0.6	5.2±0.7	N.D.
F38-3	2.0±0.2	2.4±0.1	2.8±0.2	4.2±0.2
F38-6	2.1±0.5	2.8±0.4	5.8±0.3	N.D.

Las determinaciones fueron por triplicado en experimentos independientes y se muestra el promedio con su desviación estándar. N.D.: No detectable.

Los resultados de este ensayo, mostraron que no hay diferencia significativa en el tiempo de duplicación de las seis cepas bacterianas en estudio a las temperaturas de 30 y 39°C, ya que solamente fue posible observar diferencias significativas en tiempo de duplicación a las temperaturas de 41 y 43°C. Como se observa en la tabla 2, las cepa F38-3 es capaz de duplicarse a 41°C prácticamente a la misma velocidad que lo hace a la temperatura de 30°C, además de poder crecer a 43°C con un tiempo de duplicación de solamente el doble del que presenta a 30°C. Por otra parte, la cepa FMB-3, también fue capaz de duplicarse a las

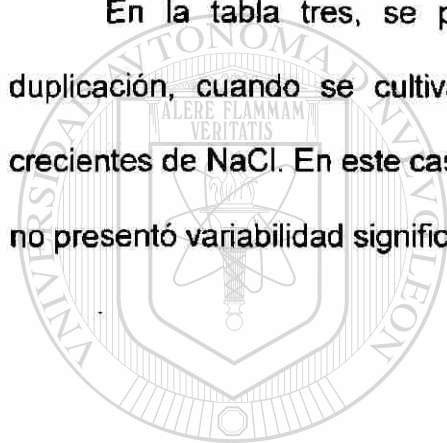
temperaturas de 41 y 43°C, con un tiempo de duplicación 2.7 y 3.5 veces mayor al que presenta al ser incubada a 30°C, respectivamente. Estudios anteriores, mostraron que la cepa *R. leguminosarum* CFN42 pudo crecer en medio líquido (PY) a una temperatura máxima de 39°C (Tao *et al.*, 1992), mientras que la cepa *R. meliloti* A2 y dos cepas de *Rhizobium* spp. aisladas de las leguminosas *Oxytropis riparia* y *O. viciifolia* pudieron crecer a temperaturas máximas entre 36.4 y 38.7°C en cultivos líquidos (Cloutier *et al.*, 1992). En otro reporte, se encontró que una cepa de *R. trifolii* era incapaz de crecer en medio líquido a 38°C (Zelazna-Kowalska, 1977). Estos resultados, nos permiten afirmar que las cepas FMB-3 y F38-3 son altamente resistentes a temperatura, si comparamos su comportamiento con el de otras cepas sometidas a condiciones similares. El resto de las cepas, presentaron tiempos de duplicación elevados a la temperatura de 41°C, ya que fueron entre 2.4 y 3.5 veces mayores a los tiempos de duplicación que presentaron a los 30°C y fueron incapaces de duplicarse a 43°C; por lo que podemos caracterizarlas como cepas sensibles a la temperatura. Como se puede observar, las dos cepas bacterianas capaces de crecer a temperaturas elevadas, son las mismas que presentaron alta resistencia al choque térmico, por lo que los resultados del ensayo de capacidad de crecimiento a altas temperaturas (no letales), son consistentes con los resultados de resistencia a choque térmico. En este sentido, podemos asumir que la selección para su posible uso como inoculante de alguna de estas cepas (FMB-3 y F38-3), garantiza la capacidad de duplicación a temperaturas elevadas (41 y 43°C), que caen dentro del rango de temperaturas máximas encontradas en la superficie de los



suelos agrícolas del bajo ( $42^{\circ}\text{C}$ ), durante los meses más calientes del año; además de una alta resistencia a temperaturas letales ( $50^{\circ}\text{C}$ ), aunque vale la pena recordar que la cepa F38-3 no fue capaz de desarrollar termotolerancia.

## **PERFIL DE RESPUESTA A ESTRES CON NaCl Y DESARROLLO DE OSMOTOLERANCIA**

En la tabla tres, se presenta el efecto producido sobre el tiempo de duplicación, cuando se cultivaron las cepas en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. En este caso, la respuesta general de las seis cepas en estudio, no presentó variabilidad significativa.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 3.-** Tiempo de duplicación de cepas de *Rhizobium* incubadas en medio PY, suplementado con las concentraciones (mM) de NaCl que se indican.

CEPA	CONCENTRACION NaCl (mM)			
	0	200	300	400
TIEMPO DE DUPLICACION (horas)				
FMB-3	2.2	2.3	2.4	4.8
FMB-10	2.4	3.4	6.6	8.7
CAN-6	2.6	3.4	5.8	8.7
CAN-15	2.5	3.3	5.4	8.5
F-38-3	2.5	2.7	4.3	5.6
F38-6	2.6	3.6	7.7	9.8

Las determinaciones se realizaron por triplicado y se muestra el promedio. La desviación estándar en todos los casos, no fue mayor al 10%, datos no mostrados.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como se observa en la tabla tres, solamente a partir de 300mM NaCl fue posible observar un efecto significativo de la presencia de la sal sobre el tiempo de duplicación. En términos generales, podemos afirmar que las cepas FMB-3 y F38-3, presentaron resistencia a estrés osmótico, mientras que las cuatro cepas restantes: FMB-10, CAN-6, CAN-15 y F38-6, fueron sensibles al estrés, reflejándose en un aumento significativo en el tiempo de duplicación cuando fueron incubadas en presencia de NaCl, destacando la cepa F38-6, la cual presentó una sensibilidad

significativamente mayor a las restantes tres cepas bacterianas. Estudios anteriores, muestran una gran variabilidad en la respuesta de cultivos de *Rhizobium* sometidos a la presencia de NaCl, de modo que algunas cepas de *Bradyrhizobium japonicum* fueron incapaces de crecer en presencia de concentraciones menores o iguales a 100mM de NaCl (Yang *et al.*, 1993; Elsheikh y Wood, 1990), mientras que algunas cepas de *Sinorhizobium meliloti* fueron capaces de crecer en presencia de concentraciones mayores a 300mM de NaCl (Bernard *et al.*, 1986) y cepas de *Rhizobium* spp. aisladas de algunas leguminosas arbóreas (*Hedysarum*, *Acacia*, *Prosopis* y *Leucaena*), pudieron crecer en presencia de concentraciones de NaCl mayores a 500mM (Zhangx *et al.*, 1991), al igual que una cepa de *R. meliloti* reportada en otro estudio (Smith *et al.*, 1998). Por otra parte, una variedad de especies de *Rhizobium* analizadas en otro estudio (*R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* y *phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. galegae* y *Bradyrhizobium japonicum*), fueron incapaces de crecer en medios suplementados con 200mM de NaCl (Boncompagni *et al.*, 1999). De manera general, podemos afirmar que existen algunas cepas de *Brady(rhizobium)* que son capaces de crecer en presencia de concentraciones de NaCl muy elevadas, hasta de 500mM (resistentes) y cepas incapaces de crecer a concentraciones de NaCl bajas, entre 100 y 200mM (sensibles). Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que las cepas de *Rhizobium* que se estudiaron, caen en el rango de las resistentes a NaCl, ya que fueron capaces de crecer en concentraciones de NaCl hasta de 400mM, aunque hubo variabilidad en la respuesta entre las seis cepas en estudio. Estos resultados son comparables a los obtenidos durante el choque de calor, por lo que podemos agregar a los

atributos ya mencionados de las cepas FMB-3 y F38-3, el de la capacidad de resistencia a estrés osmótico, ya que son capaces de continuar propagándose con tiempos de duplicación relativamente cortos, en presencia de concentraciones mayores al 2% de NaCl.

Los resultados del ensayo de desarrollo de osmotolerancia se muestran en la tabla cuatro, donde se puede observar que, en términos generales, la respuesta al ensayo de inducción de osmotolerancia, no mostró variabilidad entre las cepas en estudio.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 4.-** Tiempo de duplicación de *Rhizobium* spp. incubadas en medio PY, suplementado con 300 y 400mM NaCl y el efecto sobre el tiempo de duplicación al someter las células bacterianas a un pre-tratamiento con 175mM NaCl por dos horas y posteriormente incubarlas en presencia de 300 y 400mM NaCl.

CEPA	TRATAMIENTO		PRE-TRATAMIENTO	
	300	400	300	400
mM NaCl				
TIEMPO DE DUPLICACION (horas)				
FMB-3	2.5	4.8	1.9	4.1
FMB-10	6.6	8.8	7.4	10.2
CAN-6	5.7	8.5	6.7	9.8
CAN-15	5.2	8.0	6.3	9.6
F38-3	4.5	5.6	5.8	6.9
F38-6	7.7	9.6	6.0	8.7

Las determinaciones se realizaron por triplicado y se muestra el promedio. La desviación estándar en todos los casos, no fue mayor al 10%, datos no mostrados.

Como puede observarse en la tabla cuatro, el ensayo de osmotolerancia mostró un efecto negativo sobre la mayoría de las cepas en estudio, ya que las cepas FMB-10, CAN-6, CAN-15 y F38-3, incrementaron su tiempo de duplicación cuando fueron sometidas a la presencia de las diferentes concentraciones de NaCl después de recibir un pre-tratamiento con 175mM de NaCl por dos horas, respecto

del que tenían al ser cultivadas en las mismas condiciones de sal, sin recibir el tratamiento previo. Únicamente las cepas FMB-3 y F38-6, presentaron un ligero aumento (estadísticamente significativo) en la tolerancia al estrés osmótico, reflejado en una disminución del tiempo de duplicación en presencia de las diferentes concentraciones de NaCl, respecto del que tenían al ser cultivadas en las mismas condiciones sin recibir el tratamiento previo. Este resultado coincide parcialmente con el obtenido durante el ensayo de inducción de termotolerancia, en el sentido de que las dos cepas que resultaron termotolerantes, son las mismas que presentaron una ligera inducción de osmotolerancia; pero podemos afirmar que esta respuesta fue mucho menos intensa en el segundo caso. Sin embargo, para el resto de las cepas, no podemos afirmar la existencia de esta coincidencia, ya que en ningún caso el tratamiento de inducción de termotolerancia resultó en un efecto negativo sobre la resistencia al choque térmico, lo cual ocurrió en el caso del tratamiento con NaCl, para las cepas FMB-10, CAN-6, CAN-15 y F38-3. Estudios similares a éstos, donde se haya estudiado el desarrollo de osmotolerancia mediante exposiciones a concentraciones bajas de sal, no se han llevado a cabo hasta ahora.

En lo que se refiere a la posible selección y uso de alguna de estas cepas, la cepa FMB-3 resulta interesante, ya que presenta, además de los atributos mencionados en párrafos anteriores, la ventaja de poder inducir niveles adecuados de tolerancia a los dos tipos de estrés descritos en este estudio.

## INDUCCION DE TOLERANCIA CRUZADA ENTRE AMBOS TIPOS DE ESTRÉS

Se realizaron los dos ensayos de inducción de tolerancia cruzada descritos en la metodología, con el fin de determinar si los pre-tratamientos con un tipo de inductor de estrés (choque térmico), protegían contra el estrés provocado por otro inductor diferente (NaCl), obteniéndose como resultado que, en ninguno de los casos hubo desarrollo de tolerancia cruzada entre el estrés por calor y el estrés osmótico, esto es, un pre-tratamiento con calor no permitió a las células bacterianas el desarrollo de tolerancia al estrés osmótico y un pre-tratamiento con sal, tampoco permitió a las células bacterianas el desarrollo de tolerancia al choque térmico (datos no mostrados). Estos resultados son interesantes debido a que se había encontrado, en la mayoría de los sistemas estudiados, que al menos los pre-tratamientos con calor, indujeron el desarrollo de tolerancia a otros tipos de estrés.

Por otra parte, un estudio realizado con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, mostró que cultivos sometidos a estrés por falta de nutrientes, lograron desarrollar tolerancia a otros tipos de estrés, tales como estrés osmótico (evaluado como capacidad de sobrevivencia en presencia de 2.5M de NaCl), estrés oxidativo (evaluado como la capacidad de sobrevivencia en presencia de 5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), choque ácido (cambio de pH de 7.0 a 3.5) y choque térmico de 30 a 55°C (Thorne y Williams, 1997). En este caso, la inducción de osmotolerancia no se presentó con pre-tratamientos con NaCl, por lo que era difícil esperar un efecto de protección al estrés osmótico, mediante pre-tratamientos con choque térmico.

Como se observa en la tabla cinco, las seis cepas en estudio presentaron rangos variables de producción de trehalosa intracelular, además de presentar una producción del disacárido diez veces mayor cuando fueron sometidas a estrés osmótico, respecto de la producción que presentaron al ser sometidas a choque térmico. Sin embargo, pudimos distinguir cuatro cepas que presentaron una producción intracelular de trehalosa significativamente elevada en ambas condiciones: FMB-10, CAN-6, CAN-15 y F38-3; una cepa que produjo cantidades intermedias de trehalosa: F38-6 y una cepa que produjo bajas cantidades de trehalosa intracelular: FMB-3. Dado que el interés de este estudio se centró en relacionar la cantidad de trehalosa intracelular producida con la intensidad del desarrollo de tolerancia al estrés, cabe destacar que los resultados revelan que no existe una relación directa entre éstos dos parámetros. Es importante destacar dos aspectos importantes, primero: las cepas en estudio produjeron cantidades diez veces mayores de trehalosa intracelular, en aquellas condiciones donde su capacidad de inducción de tolerancia fue nula en la mayoría y muy limitada en dos de las cepas (estrés osmótico); respecto de las acumuladas cuando hubo una capacidad de desarrollo de tolerancia cuantificable para todas las cepas (estrés térmico). Segundo: en ambos tipos de estrés, aquellas cepas que produjeron las menores cantidades de trehalosa intracelular, fueron las que desarrollaron tolerancia al estrés: FMB-3 y F38-36. Desafortunadamente, los resultados de producción de trehalosa obtenidos en este estudio, no son comparables a otros estudios reportados, ya que, en todos los casos, se han reportado cantidades de trehalosa producida por peso húmedo y no por mg de proteína.



## CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN DOS TIPOS DE SUELO, A ALTAS TEMPERATURAS

Los resultados del ensayo de tiempo de duplicación, fueron estadísticamente iguales en ambos tipos de suelo (arcilloso y arenoso), por lo que se presentan en tablas únicas, sin hacer distinción entre los dos tipos de suelo (tablas 6, 7 y 8).

**Tabla 6.-** Crecimiento de *Rhizobium*-spp. incubadas en suelo estéril, mantenido a una humedad del 80% de su capacidad de campo, a 30°C.

DIAS DE INCUBACION	CEPA					
	FMB-3	FMB-10	CAN-6	CAN-15	F38-3	F38-6
	UFCX10 <sup>9</sup> /g de suelo					
0	0.87	0.90	0.95	0.85	0.97	1.00
1	1.92	1.85	1.90	1.80	1.90	1.90
2	4.80	3.70	3.80	3.70	3.85	3.85
3	9.60	7.40	7.40	7.40	7.50	7.60
4	19.30	14.50	14.60	14.70	14.90	15.00
5	38.50	28.50	29.00	29.00	29.00	29.00
7	70.00	62.00	61.00	61.00	60.00	58.5.00
10	68.00	60.00	60.00	60.00	59.00	57.00

Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar en ningún caso excedieron el 10%, datos no mostrados. Los valores iniciales se expresan como tiempo cero

**Tabla 7.-** Crecimiento de *Rhizobium* spp. incubadas en suelo estéril, mantenido a una humedad del 80% de su capacidad de campo, a 39°C.

DIAS DE INCUBA- CION	CEPA					
	FMB-3	FMB-10	CAN-6	CAN-15	F38-3	F38-6
	UFCX10 <sup>9</sup> /g de suelo					
0	1.00	0.90	0.95	0.85	0.90	1.00
1	2.20	1.00	1.10	1.00	2.20	1.30
2	4.50	1.40	1.40	1.30	4.20	1.40
3	10.00	1.90	2.00	1.90	9.60	1.30
4	22.00	2.20	2.30	2.20	18.00	1.30
5	45.00	2.70	2.90	2.60	39.00	1.10
7	88.00	4.50	5.20	4.30	75.00	1.10
10	85.00	9.40	9.8.00	9.3.00	75.00	1.00

Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar en ningún caso excedieron el 10%, datos no mostrados. Los valores iniciales se muestran como tiempo cero.

**Tabla 8.-** Crecimiento de *Rhizobium* spp. incubadas en suelo estéril, mantenido a una humedad del 80% de su capacidad de campo, a 42°C.

DIAS DE INCUBA- CION	CEPA					
	FMB-3	FMB-10	CAN-6	CAN-15	F38-3	F38-6
	UFCX10 <sup>9</sup> /g de suelo					
0	1.10	0.90	0.85	0.90	0.86	0.90
1	1.60	0.80	0.90	0.80	0.90	0.90
2	1.90	0.90	0.95	0.80	0.90	0.80
3	2.20	1.20	1.10	0.95	1.10	0.85
4	2.80	1.50	1.30	1.30	1.80	0.80
5	3.30	1.90	1.60	1.80	2.50	0.80
7	5.10	2.90	2.10	2.70	3.40	0.80
10	11.00	4.00	3.40	3.80	5.60	0.80 <sup>®</sup>

Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar en ningún caso excedieron el 10%, datos no mostrados. Los valores iniciales se muestran como tiempo cero.

Los resultados de este ensayo, revelaron que existe una variabilidad en el tiempo de duplicación en suelo a las diferentes temperaturas, de las cepas en estudio; ya que las seis cepas bacterianas presentaron una respuesta indistinguible a la temperatura de 30°C, pero fue posible observar variabilidad a las temperaturas

de 39 y 42°C, donde pudimos distinguir claramente dos cepas capaces de duplicarse en suelo a elevadas temperaturas: FMB-3 y F38-3, tres cepas con mediana capacidad de crecimiento en suelo a elevadas temperaturas: FMB-10, FCAN-6 y CAN-15 y una cepa con incapacidad de duplicarse en suelo a estas temperaturas. Estas dos cepas bacterianas capaces de crecer a temperaturas elevadas en suelo, son las mismas que presentaron alta resistencia al choque térmico, además de la capacidad de crecimiento a altas temperaturas (no letales); así como la cepa F38-6 es consistentemente sensible al choque térmico e incapaz de crecer a altas temperaturas, tanto en medio líquido como en los diferentes tipos de suelo, por lo que podemos afirmar que los resultados de este ensayo coinciden con los del ensayo en medio líquido y podemos hacer extensivas las conclusiones extraídas de éste. Hasta ahora, no se han realizado otros estudios de la capacidad de crecimiento en suelo estéril a diferentes temperaturas (*in vitro*).

Por otra parte, es importante destacar el hecho de que no se presentaron diferencias en ambos tipos de suelo, ya que en otros sistemas se había reportado la influencia del tipo de suelo sobre la sobrevivencia de *Rhizobium*.

## **CAPACIDAD DE SOBREVIVENCIA EN DOS TIPOS DE SUELO SOMETIDO A DESECACIÓN A ALTAS TEMPERATURAS**

Los resultados de capacidad de sobrevivencia en suelo sometido a desecación a altas temperaturas, fueron estadísticamente iguales en ambos tipos de suelo (arcilloso y arenoso), de modo que se presentan en una sola tabla (nueve), sin hacer distinción entre los dos tipos de suelo.

**Tabla 9.-** Índice de mortalidad<sup>a</sup> de *Rhizobium*, spp. incubadas en suelo (arcilloso y/o arenoso) estéril sometido a desecación a altas temperaturas.

CEPA	TEMPERATURA (grados centígrados)		
	30	39	42
INDICE DE MORTALIDAD (días)			
FMB-3	5	5	4
FMB-10	5	4	2
CAN-6	5	4	2
CAN-15	5	4	2
F38-3	5	5	3
F38-6	5	3	1

<sup>a</sup>: número de días que tarda en disminuir la población un orden de magnitud. Las determinaciones se realizaron por triplicado en experimentos independientes y se muestra el promedio. La desviación estándar en todos los casos, no fue mayor al 10%, datos no mostrados.

Los resultados de este ensayo revelaron variabilidad en la respuesta, con un comportamiento de las cepas muy similar al que presentaron frente al choque térmico, de manera que pudimos distinguir claramente dos cepas resistentes a la desecación en suelo: FMB-3 y F38-3, tres cepas medianamente resistentes a la desecación en suelo: FMB-10, CAN-6 y CAN-15 y una cepa sensible a la desecación en suelo: F38-6. Una vez más, no fueron encontradas diferencias de

comportamiento de las cepas en ambos tipos de suelo. Por otra parte, tampoco se han reportado estudios de sobrevivencia de *Rhizobium* spp. en suelo estéril sometido a desecación por temperatura (*in vitro*).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La más importante conclusión de este trabajo, es que nuestra hipótesis fue rechazada, esto es, hemos demostrado que la producción de trehalosa intracelular no le confiere a las cepas de *Rhizobium* spp. analizadas en este estudio, ninguna ventaja en términos de competencia saprofítica, al menos en lo que se refiere a soportar condiciones adversas, como son altas temperaturas y alta osmolaridad. Esta evidencia induce a preguntarse cuál es el papel de la trehalosa en este sistema biológico, ya que sí existe de hecho una producción de trehalosa bajo las diferentes condiciones de estrés, considerando que se demostró que la manipulación de las células durante su recolección y lavado, no provocaba un aumento en el contenido intracelular de trehalosa (datos no mostrados), además de que no se produjo el disacárido al incubarlas en el medio PY y sin haber recibido los mencionados pre-tratamientos (datos no mostrados). A este respecto, en un estudio realizado con las mismas cepas, Farías *et al.* (1998), demostraron que la producción de trehalosa por cepas de *Rhizobium*, spp. tiene un papel importante durante la relación simbiótica. En este estudio, se analizó el efecto de la producción de trehalosa por estas mismas seis cepas bacterianas sobre los diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris*, encontrándose que aquellos cultivares que exhibían mayor

contenido de trehalosa en los nódulos, indujeron un aumento en el turgor de las hojas cuando las plantas se sometían a estrés por sequía. Esto sugiere que la acumulación de trehalosa puede tener un papel durante la respuesta a estrés de la planta hospedera y no de la bacteria en vida libre. De hecho, se había ya demostrado que la trehalosa presente en nódulos, es sintetizada por los bacteroides (Reibach & Streeter, 1983) donde permanece confinada al espacio del nódulo. Es necesario estudiar más cepas y tratar de aislar mutantes tanto sobre-productoras como no productoras de trehalosa para entender mejor esta relación.

Otra conclusión importante de este trabajo, fue la caracterización de la cepa FMB-3, como resistente y capaz de desarrollar tolerancia, ya que en el estudio con la planta, se encontró que era altamente inductora de la producción de trehalosa en nódulos (al igual que la CAN-6), además de que su presencia en nódulos lograba restaurar adecuadamente los niveles de turgor en la planta sometida a sequía (junto con las cepas CAN-6 y F38-3), por lo que esta cepa acumula una serie de atributos que hacen que valga la pena analizar más a fondo su posible efecto benéfico al ser usada como inoculante en cultivos de *P. vulgaris.*, independientemente de sus capacidades como fijadora de nitrógeno.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen, E. K., & Allen, O. N. (1958). *In Nitrogen Metabolism (Handbuch der Pflanzenphysiologie)* Vol. 8, W. Ruhland editor. Pp.: 48-118.
- 2.- Allen, O. N., & Allen, E. K. (1981). *The Leguminosae*. University of Wisconsin Press. Madison. Macmillan Publishing Company, London. Pp.: 812.
- 3.- Attfield, P. V., Raman, A. & Northcott, C. J. (1992). Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* 94: 271-276.
- 4.- Arayankoon, T. H., Schomberg, H. & Weaver, R. W. (1990). Nodulation and N<sub>2</sub> fixation of guar at high root temperature. *Plant and Soil.* 126: 209-213.
- 5.- Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17-42.

---

- 6.- Bal, A. K., Shantharam, S. & Wong, P. P. (1982). Nodulation of pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Rhizobium* species of two cross-inoculation groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 965-971.
- 7.- Bernard, T., Pocard, J. A., Perroud, B. & Le Rudulier, D. (1986). Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* 143: 359-369.
- 8.- Bianchi, G., Gamba, A., Limioli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salamini, F. & Bartels, D. (1993). The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamum flabellifolia*. *Physiol. Plant.* 87: 223-226.



9.- Blázquez, M. A., Santos, E., Flores, C. L., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J. & Gancedo, C. (1998). Isolation and characterisation of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate-synthase. *Plant J.* **13**: 685-689.

10.- Boncompagni, E., Osteras, M., Poggi, M. C. & LeRudulier, D. (1999). Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family Rizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(5)**: 2072-2077.

11.- Boos, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A. & Postma, P. (1987). Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J. Biol. Chem.* **262**: 13212-13218.

12.- Botsford, J. L. (1984). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. *Arch. Microbiol.* **137**: 124-127.

13.- Botsford, J. L. & Lewis, T. A. (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 488-494.

14.- Bowen, G. D. (1961). The toxicity of legume seed diffusates towards rhizobia and other bacteria. *Plant and Soil* **15**: 155-165.

15.- Braña, A. F., Mendez, L., Díaz, L., Manzanal, M. B. & Hardisson, H. (1986). Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1319-1326.

16.- Breedveld, M., Zevenhuizen, L. & Zehnder, A. (1991). Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic beta-(1,2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1. Arch. Microbiol. 156: 501-506.

17.- Brocklebank, K. J. & Hendry, G. A. F. (1989). Characteristics of plant species which store different types of reserve carbohydrates. New Phytol. 112: 255-260.

18.- Brockwell, J. (1982). Inoculation methods for field experimenters and farmers. In Nitrogen Fixation in Legumes. Ed. J. M. Vincent. Academic Press, Sydney. Pp.: 211-227.

19.- Brockwell, J., Bottomley, P. J. & Thies, J. E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. Plant and Soil 174: 143-180.

20.- Bromfield, E. S. P. & Barran, L. R. (1990). Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. Can. J. Microbiol. 36: 369-372.

21.- Burleigh, S. H. & Dawson, J. O. (1994). Dessication tolerance and trehalose production in *Frankia hyphae*. Soil Biol. Biochem. 26: 593-598.

22.- Burns, R. C. & Hardy, R. W. F. (1975). Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer Verlag, New York, pp.: 189-190.

23.- Burton, J. C. (1979). *Rhizobium* species. In Microbial Technology. 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1. Eds. H. J. Peppler and D. Perlman. Academic Press, New York. Pp.: 29-58.

24.- Bushby, H. V. A. & Marshall, K. C. (1977). Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on dessication. Soil Biol. Biochem. 9: 143-147.

25.- Caseman, K. G. Munns, D. N. & Beck, D. P. (1981). Growth of *Rhizobium* strains at low concentrations of phosphate. *Soil Sci. Am. J.* **45**: 520-523.

26.- Chatel, D. L., Greenwood, R. M. & Parker, C. A. (1968). *Trans. Int. Congr. Soil Sci.*, 9th, vol.2, pp.: 65-73.

27.- Chen, Y. P., Glenn A. R. & Dilworth, M. J. (1984). Uptake and oxidation of aromatic substrates by *Rhizobium leguminosarum* MNF3841 and *Rhizobium trifolii* TA1. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**: 201-205.

28.- Chhonkar, P. K. & Subba-Rao, N. S. (1966). Fungi associated with legume root nodules and their effect on rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **12**: 1253-1261.

29.- Cloutier, J., Prévost, D., Nadeau, P. & Antoun, H. (1992). Heat and cold shock protein synthesis in Arctic and temperate strains of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(9): 2846-2853.

30.- Crozat, Y., Cleyet-Marel, K. C., Giraud, J. J. & Obaton, M. (1982). Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. *Soil Biol. Biochem.* **14**: 401-405.

31.- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-127.

32.- Danso, S. K. A. & Alexander, M. (1974). Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **38**: 86-89.

33.- Date, R. A. & Roughley, R. J. (1977). Preparation of legume seed inoculants. *In A treatise of Dinitrogen Fixation. Section IV. Agronomy and Ecology.* Eds. R. W. F. Hardy and A. H. Gibson. John Wiley and Sons. New York. Pp.: 243-275.

- 34.- Date, R. A. & Halliday, J. (1979).** Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. *Nature*, London **277**: 62-64.
- 35.- Date, R. A. (1982).** Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*. In *Nitrogen Fixation in Legumes*. Ed. J. M. Vincent. Academic Press, Sydney. Pp.: 95-109.
- 36.- de Escuder, A. M. Q. (1972).** A Survey of rhizobia in farm soils at Wye College, Kent., *J. Appl. Bacteriol.* **35**: 109-118.
- 37.- Dellamora-Ortiz, G. M., Ortiz, C. H. D., Maia, J. C. C. & Panek, A. D. (1986).** Partial purification and characterization of the interconvertible forms of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 205-214.
- 38.- Demolon, A. & Dunez, A. (1935).** Recherche su le rôle du bacériophage dans la fatigue des luzérnières. *Ann. Agron.* **5**: 89-111.
- 39.- Demolon, A. & Dunez, A. (1939).** Sur la lyso-résistance du *B. radiciola* et son importance pratique. *Trans. 3<sup>rd</sup> Comm. Int. Soc. Soil New Brunswick* **A**: 39-42.
- 40.- deVirgilio, C., Hottiger, T., Domínguez, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1994).** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectan. *Eur. J. Biochem.* **219**: 179-186.
- 41.- Dilworth, M. J., McKay, I., Franklin, M. & Glenn, A. R. (1983).** Catabolite effects on enzyme induction and substrate utilization in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 359-366.

42.- Drennan, P. M., Smith, M. T., Goldsworthy, D. & van Staden, J. (1993). The occurrence of trehalose on the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *J. Plant Physiol.* **142**: 493-496.

43.- D'Souza, M. R., Smith, L. T. & Smith, G. M. (1993). Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 473-478.

44.- Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S. & Selander, R. K. (1995). Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 507-512.

45.- Elbein, A. D. (1974). The metabolism of  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**: 227-256.

46.- Elsheikh, E. A. E. & Wood, M. (1990). Rhizobia and Bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**: 127-129.

47.- Faria, S. M. de, Lewis, G. P., Sprent, J. I. & Sutherland, J. M. (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607-619.

48.- Farías-Rodríguez, R., Mellor, R. B., Arias, C. & Peña-Cabriales, J. J. (1998). The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum* **102**: 353-359.

49.- Foulds, W. (1971). Effect of drought on three species of *Rhizobium*. *Plant and Soil* **35**: 665-667.

- 50.- Franco, A. A. & Döbereiner, J. (1971). Toxidez de manganes de un solo ácido na simbiose soja-*Rhizobium*. Pesq. Agropec. Bras. Sér. Agron. 6: 57-66.
- 51.- Fred, E. B. & Davenport, A. (1918). Influence of reaction on nitrogen-assmilating bacteria. J. Agric. Res. 14: 317-336.
- 52.- Frings, J. F. J. (1976). The *Rhizobium*-pea symbiosis as affected by high temperatures. Meded. Landbouwhogesch. Wageningen 76: 1-76.
- 53.- Fuhrman, J., Davey, C. B. & Wollum, A. G. II (1986). Desiccation tolerance of clover rhizobia in sterile soils. Soil Sci. Am. J. 50: 639-644.
- 54.- Gaworzewska, E. T. & Carlile, M. J. (1982). Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J. Gen. Microbiol. 128: 1179-1188.
- 55.- Germell, L. G. & Roughley, R. J. (1993). Field evaluation in acids soils of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. Soil Biol. Biochem. 25: 1447-1452.
- 56.- Giller, K. E., McGrath, S. P. & Hirsch, P. R. (1989). Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. Soil. Biol. Biochem. 21: 841-848.
- 57.- Glasziou, K. T. & Gayler, K. R. (1969). Sugar transport: occurrence of trehalase activity in sugar cane. Planta 85: 299-302.
- 58.- Glenn, A. R. & Dilworth, M. J. (1981). Oxidation of substrates by isolated bacteroids and free living cells of *Rhizobium leguminosarum* 3841. J. Gen. Microbiol. 126: 243-247.

- 59.- Goddijn, O. J. M., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, P. W. H. H., deGraaf, P. T. H. M., Poels, J. vanDun, K., Ponstein, A. S., Damm, B. & Pen, J. (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* **113**: 181-190.
- 60.- Giaever, H. M., Styrvoid, O. B., Kaasen, J. & Strom, A. R. (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **170**: 2841-2849.
- 61.- Grageda-Cabrera, O. A., Esparza-García, F., Zapata, F. & Peña-Cabriales, J. J. (1999). Influence of sorghum crop residue management on the recovery of  $^{15}\text{N}$  labelled fertilizer by wheat in Mexico. *J. Sust. Agric.* En prensa.
- 62.- Graham, P. H., Viteri, S. E., Mackie, F., Vargas, A. T. & Palacios, A. (1982). Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* **5**: 121-128.
- 63.- Graham, P. H. (1984). Plant factors affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixing legumes. *In* Biological Nitrogen Fixation Ecology, technology and Physiology. Ed. Martin Alexander, Plenum Press New York and London. Pp.: 75-80.
- 64.- Gussin, A. E. S. (1972). Does the trehalose occur in Angiospermae?. *Phytochemistry* **11**: 1827-1828.
- 65.- Habte, M. & Alexander, M. (1978). Mechanisms of persistence of low numbers of bacteria preyed upon by protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **10**: 1-6.
- 66.- Hamdi, Y. A. (1974). Vertical movement of rhizobia in soil. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg.* **129**(3-4): 373-377.

- 67.- Hartel, P. G. & Alexander, M. (1983). Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Sci. Am. J.* **47**: 502-506.
- 68.- Hernández-Lucas, I., Segovia, L., Martínez-Romero, E. & Pueppke S. G. (1995). Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(7): 2775-2779.
- 69.- Herrera, M. A., Bedmar, E. J. & Olivares, J. (1985). Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. *Plant Sci.* **42**: 177-182.
- 70.- Hey, A. N. & Elbein, A. D. (1968). Partial purification and properties of a trehalase from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bact.* **96**: 105-110.
- 71.- Hoelzle, I. & Streeter, J. G. (1990a). Increased accumulation of trehalose in rhizobia cultured under 1% oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3213-3215.
- 72.- Hoelzle, I. & Streeter, J. G. (1990b). Stimulation of  $\alpha$ -glucosidase from fast-growing rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* by  $K^+$ ,  $NH_4^+$  and  $Rb^+$ . *Can. J. Microbiol.* **36**: 223-227.
- 73.- Holding, A. J. & King, J. (1963). The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors. *Plant and Soil* **18**: 191-198.
- 74.- Holmström, K. O., Mantyla, E., Welin, B., Mandal, A. & Palva, E. T. (1996). Drought tolerance in tobacco. *Nature, London* **379**: 683-684.
- 75.- Horikoshi, K. & Ikeda, Y. (1966). Trehalase in conidia of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* **91**: 1883-1887.
- 76.- Howieson, J. G. & Ewing, M. A. (1986). Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Aust. J. Agric. Res.* **37**: 55-64.



- 77.- Howieson, J. G. & Ewing, M. A. (1989). Annual species of *Medicago* differ greatly in their ability to nodulate on acid soils. *Austr. J. Agric. Res.* **40**: 843-850.
- 78.- Hua, S. S. T., Tsai, V. Y., Lichens, G. M. & Noma, A. T. (1992). Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 135-140.
- 79.- Hungria, M. & Franco, A. A. (1993). Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris*. *Plant and Soil.* **149**: 95-102.
- 80.- Hungria, M., Franco, A. A. & Sprent, J. L. (1993). New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* **149**: 103-109.
- 81.- Inoue, H. & Shimoda, C. (1981). Changes in trehalose content and trehalase activity durin spore germination in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Microbiol.* **129**: 19-22.
- 82.- Jahagirdar, A. P. & Seligy, V. L. (1992). A transfer membrane method for in situ detection and quantification of trehalase. *Anal. Biochem.* **202**: 96-99.
- 83.- Jarvis, B. D. W., Downer, H. L. & Young, J. P. W. (1992). Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 93-96.
- 84.- Jensen, H. L. (1969). The distribution of lucerne and clover rhizobia in agricultural soils in denmark. *Tidsskr. Planteavl.* **73**: 61-72.
- 85.- Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O. B. & Strom, A. R. (1992). Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes, which encode the osmorregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by KatF(AppR). *J. Bacteriol.* **174**: 889-898.

- 86.- Kandler, O. & Hopf, H. (1980). Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. *In: The Biochemistry of plants 3*. Preiss J. (eds.). Academic Press, New York.
- 87.- Katznelson, H. & Wilson, J. K. (1941). Occurrence of *Rhizobium meliloti* bacteriophage in soils. *Soil Sci.* **51**: 59-63.
- 88.- Keyser, H. H. & Munns, D. N. (1979). Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. *Soil. Sci. Am. J.* **43**: 519-523.
- 89.- Keyser, H. H., Munns, D. N. & Hohenberg, J. S. (1979). Acid tolerance of rhizobia in culture and symbiosis with cowpea. *Soil. Sci. Am. J.* **43**: 719-722.
- 90.- Keyser, H. H., Somasegaran, P. & Bohlool, B. B. (1992). Rhizobial ecology and technology. *In Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management*. Ed. F. B. Meeting Jr. Marcel Dekker, New York. Pp.: 205-226.
- 91.- Kishinevsky, B. D., Sen, D. & Weaver, R. W. (1992). Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. *Plant Soil* **143**: 275-282.
- 92.- Kouchi, H. & Yoneyama, T. (1986). Metabolism of (<sup>13</sup>C)-labelled photosynthate in plant cytosol and bacteroids of root nodules of *Glycine max*. *Physiol. Plant* **68**: 238-244.
- 93.- Lange, R. T. (1961). Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of south-western Australia. *J. Gen. Microbiol.* **26**: 351-359.
- 94.- Le Rudulier, D., & Bernard, T. (1986). Salt tolerance in *Rhizobium*: a possible role for betaines. *FEMS Microbiol Rev.* **39**: 67-72.

95.- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crove, J. H. & Crove, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3592-3597.

96.- Lewis, J. G., Learmonth, R. P. & Watson, K. (1995). Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141**: 687-694.

97.- Lipsanen, P. & Lindström, K. (1986). Specificity of *Rhizobium (Galega)-Galega* interaction. In Recognition in Microbe-Plant symbiotic and pathogenic interactions. Ed. by B. Lugtenber. NATO ASI series, vol. H4. Springer-Verlag, Berlin. Pp.: 113-114.

98.- Londesborough, J. & Varimo, K. (1984). Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* **219**: 511-518.

99.- López, M. F., Whalin, C. S. & Torrey, J. G. (1983). The polar lipids and free sugars of *Frankia* in culture. *Can. J. Bot.* **61**: 2834-2842.

100.- López, M. F. & Torrey, J. G. (1985). Purification and properties of trehalase in *Frankia* Ar13. *Arch. Microbiol.* **143**: 209-215.

101.- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

102.- Mackay, M. A., Norton, R. S. & Borowitzka, L. J. (1984). Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2177-2191.

103.- Mahler, R. L. & Wollum, A. G. II (1980). Influence of water potential on the survival of rhizobia in a Goldsboro loamy sand. *Soil Sci. Am. J.* **44**: 988-992.

104.- Mansure, J. J., Panek, A. D., Grove, L. M. & Grove J. H. (1994). Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1191: 309-316.

105.- Martin, F., Canet, D. & Marchal, J. P. (1985).  $^{13}\text{C}$  nuclearmagnetic resonance study of mannitol cycle and trehalose synthesis during glucose utilization by the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum graniforme*. *Plant Physiol.* 77: 499-502.

106.- Martin, F., Ramstedt, M., Soderhall, K. & Canet, D. (1988). Carbohydrate and amino acid metabolism in the ectomycorrhizal ascomycete *Sphaerospora brunnea* during glucose utilization. *Plant Physiol.* 86: 935-940.

107.- Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. & Cevallos, M. A. (1985). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1779-1786.

108.- Martínez, E., Romero, D. & Palacios, R. (1990). The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9: 59-93.

109.- Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. *Crit. Rev. In Plant Sci.* 15(2): 113-140.

110.- Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T. & Kurimoto, M. (1996). Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11 Biosci. Biotech. *Biochem.* 60: 717-720.

111.- Matson, P. A., Naylor, R. & Ortiz-Monasterio, I. (1998). Integration of environmental, agronomic and economic aspects of fertilizer management. *Science* 280: 112-115.

112.- Measures, J. C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. *Nature (London)* **257**: 398-400.

113.- Mellor, R. B. (1988). Distribution of trehalase in soybean root nodules cells: implications for trehalose metabolism. *J. Plant Physiol.* **133**: 173-177.

114.- Mellor, R. B. (1992). Is trehalose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganisms?. *Symbiosis* **12**: 113-119.

115.- Michiels, J., Verrath, C. & Vanderleyden, J. (1994). Effects of temperature stress on Bean-nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1206-1212.

116.- Munevar, F., & Wollum, A. G. II (1981). Growth of *Rhizobium japonicum* strains at temperatures above 27°C. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 272-276.

117.- Munevar, F., & Wollum, A. G. (1982). Response of soybean plants to high root temperature as affected by plant cultivar and *Rhizobium* strain. *Agron. J.* **74**: 138-142.

118.- Nakata, K., Hasegawa, J. & Okamura, K. (1995). Accumulation and role of Trehalose in *Torulasporea delbrueckii* No. 3110. *Bisoci. Biotech. Biochem.* **59**: 986-989.

119.- Niederer, M., Pankow, W. & Wieknken, A. (1989). Trehalose synthesis in mycorrhiza of Norway spruce: an indicator of vitality. *Eur. J. For Phatol.* **19**: 14-20.

120.- Norman, A. G. (1942). Persistence of *Rhizobium japonicum* in soil, *J. Am. Soc. Agron.* **34**: 499-503.

121.- Nutman, P.S. (1963). *In Symbiotic Associations*, Symp. Soc. Gen. Microbiol. P.S. Nutman and B. Mosse eds. Pp.: 51-71.

122.- Nutman, P. S. (1965), *in Ecology of Soil-borne Plant Pathogens*. K.F. Baker and W.C. Snyder eds. Hohn Murray, London. Pp.: 231-247.

123.- Nutman, P. S. (1975). *Rhizobium in the soil*. *In Soil Microbiology, a critical Review*. Ed. N. Walker. Butterworths, London. Pp.: 111-131.

124.- Nwaka, S., Koop, M., Burgert, M., Deuchler, I., Kienle, L. & Holzer, H. (1994). Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation?. *FEBS Lett.* **344**: 225-228.

125.- Ochman, H. & Wilson, A. C. (1987). Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* **26**: 74-86.

126.- Parke, D. & Ornston, N. L. (1984). Nutritional diversity of Rhizobiaceae revealed by auxanography. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1743-1750.

127.- Peña-Cabriales, J. J. & Alexander, M. (1983). Growth of *Rhizobium* in unamended soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**: 81-84.

128.- Peoples, M. B., Herridge, D. F. & Ladha, J. K. (1995). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. *Plant and Soil* **174**

129.- Philpotts, H. (1967). The effect of soil temperature on nodulation of cowpeas (*Vigna sinensis*). *Aus. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* **7**: 372-376.

130.- Piha, M. I. & Munns, D. N. (1987). Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant and Soil* **98**: 183-194.

131.- Pilbeam, C. J., McNeill, A. M., Harris, H. C. & Swift, R. S. (1997). Effect of fertilizer rate and form on the recovery of  $^{15}\text{N}$ -labelled fertilizer applied to wheat in Syria. *J. Agric. Sci.* **128**: 415-424.

132.- Piñero, D., Martínez, E. & Selander, R. K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2825-2832.

133.- Pocard, J. A., Smith, L. T., Smith, G. M. & LeRudulier, D. (1994). A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bact.* **176**: 6877-6884.

134.- Possingham, J. V., Moyne, D. V. & Anderson, A. J. (1965). Influence of elevated shoot and root temperature on nitrogen fixation. *Plant Physiol.* **39**: 561-563.

135.- Rainbird, R. M., Atkins, C. A. & Pate, J. S. (1983). Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules. *Plant Physiol. (Bethesda)* **73**: 392-394.

136.- Reed, R. H., Richardson, D. L., Warr, S. R. C. & Stewart, W. D. P. (1984). Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1-4.

137.- Reibach, P. H. & Streeter, J. G. (1983). Metabolism of  $^{14}\text{C}$ -labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* **72**: 634-640.

138.- Richardson, A. E. & Simpson, R. J. (1989). Acid-tolerance and symbiotic effectiveness *Rhizobium trifolii* associated with a *Trifolium subterraneum* L.-based pasture growing in an acid soil. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 87-95.

139.- Robson, A. D. & Loneragan, J. F. (1970). Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. I. Effect of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of *Medicago truncatula* on a moderately acid soil. Aust. J. Agric. Res. 21: 427-434.

140.- Romero, C., Bellés, J. M., Vaya, J. L., Serrano, R. & CullianezMacia, F. A. (1997). Expression of the yeast trehalose-6-phosphate-synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. Planta 201: 293-297.

141.- Sadowsky, M. J., Cregan, P. B. & Keyser, H. H. (1988). Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1907-1910.

142.- Salema, M. P., Parker, C. A., Kidby, D. K. & Chatel, D. L. (1982). Death of rhizobia on inoculated seed. Soil Biol. Biochem. 14: 13-14.

143.- Salminen, S. O. & Streeter, J. G. (1986). Enzymes of  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose metabolism in soybean nodules. Plant Physiol. 81: 538-541.

144.- Segovia, L., Young, J. P. W. & Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. Nov. Int. J. of Syst. Bacteriol. 43: 374-377.

145.- Smith, L. T. & Smith, G. M. (1989). An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 171: 4714-4717.

146.- Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. & Le Rudulier, D. (1998). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 170(7): 3142-3149.



147.- Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J. & Piñero, D. (1994). Genetic Structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated beans plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. Appl. Environ. Microbiol. **60**(5): 1260-1268.

148.- Stephens, P. M., Davoren, C. W., Doube, B. M. & Ryder, M. H. (1993). Influence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* lumbricid on the colonization of wheat roots by *Pseudomonas corrugata* strain 2140R. Soil Biol. Biochem. **25**: 1719-1724.

149.- Streeter, J. G. (1982). Enzymes of sucrose, amytose and  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose catabolism in soybean root nodules. Planta. **155**: 112-115.

150.- Streeter, J.G. (1985). Accumulation of  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. J. Bact. **164**: 78-84.

151.- Streeter, J.G. (1987). Carbohydrate, organic and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. Plant Physiol. **85**: 768-773.

152.- Strom, A. R. & Kaasen, I. (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol. Microbiol. **8**: 205-210.

153.- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdl-Kabbab, S., Wroblewski, H., Blanco, C. & Bernard, T. (1994). Osmoadaptation in Rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. J. Bacteriol. **176**: 5210-5217.

154.- Tao, H., Brewin, N. J. & Noel, K. D. (1992). *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. J. Bacteriol. **174**(7): 2222-2229.

**155.- Thies, J. E., Singleton, P. W. & Bohlool, B. B. (1991).** Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 19-28.

**156.- Thomas, P. M., Golly, K. F., Zyskind, J. W. & Virginia, R. A. (1994).** Variation of clonal mezquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1146-1153.

**157.- Thorne, S. H. & Williams, H. D. (1997).** Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*: Analysis of survival, stress resistance and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase. *J. Bacteriol.* **179(22)**: 6894-6901.

**158.- Tuzimura, K. & Watanabe, I. (1961).** Estimation of root-nodule bacteria by nodulation-dilution frequency method. *Soil Sci. Plant Nutr.* **7**: 61-67.

**159.- van Egeraat, A. W. S. M. (1975).** The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere pea seedlings. *Plant and Soil* **42**: 381-386.

**160.- Van Schreven, D. A. (1964).** The effect of some actinomycetes on rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. *Plant and Soil* **21**: 283-302.

**161.- Veluthambi, K., Mahadevan, S. & Maheshwari, R. (1981).** Trehalose toxicity in *Cuscuta reflexa*. *Plant Physiol.* **68**: 1369-1374.

**162.- Vogel, G., Aeschbacher, R. A., Müller, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1998).** Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J.* **13**: 673-683.

163.- Wagner, W., Wiemken, A. & Matile, P. (1986). Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). *Plant Physiol.* **81**: 444-447.

164.- Wahab, A. A. M. & Zahran, H. H. (1979). Salt tolerance of *Rhizobium* species in broth cultures. *Z. Allg. Mikrobiol* **19**(10): 681-685.

165.- Werner, D. (1992). *In Symbiosis of Plants and microbes*. Chapman and Halles eds. Pp.: 49-50.

166.- Willems, A. & Collins, M. D. (1992). Evidence for a close genealogical relationship between *Afpia*, the casual organism of cat scratch disease, *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 241-246.

167.- Wilson, D. O. & Trang, K. M. (1980). Effects of storage temperature and enumeration methods on *Rhizobium* spp. numbers in peat inoculants. *Trop. Agri. (Trin)*. **57**: 233-238.

---

168.- Wilson, J. K. (1939). *Leguminous plants and their associated organisms*. Cornell University Agricultural Experiment Station, Ithaca, N. Y.

169.- Yanagi, M. & Yamasoto, K. (1993). Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 115-120.

170.- Yang, S., Wu, Z., Gao, W. & Li, J. (1993). Tn5-Mob transposon mediated transfer of salt tolerance and symbiotic characteristics between *Rhizobia* genera. *Chin. J. Biotechnol.* **9**(3): 137-141.

171.- Yap, S. F. & Lim, S. T. (1983). Response of *Rhizobium* sp UMKL 20 to sodium chloride stress. *Arch. Microbiol.* 135: 224-228.

172.- Yelton, M. M., Yang, S. S., Edie, S. A. & Lim, S. T. (1983). Characterization of an effective salt-tolerant, fast growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1537-1547.

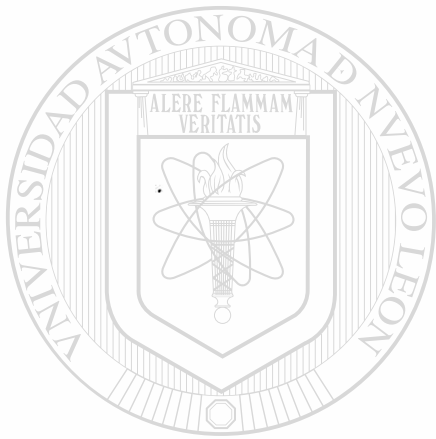
173.- Yokoigawa, K., Murakami, Y. & Kawai, H. (1995). Trehalase activity and trehalose content in a freeze-tolerant yeast, *Torulopsis delbrueckii*, and its freeze-sensitive mutant. *Bisoci. Biotech. Biochem.* 59: 2143-2145.

174.- Young, J. P. W., Downer, H. L. & Eardly, B. D. (1991). Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain Btail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173: 2271-2277.

175.- Young, J. P. W. (1993). Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. *In* New Horizons in Nitrogen Fixation. Eds. R. Palacios, J. Mora & W. E. Newton. Pp.: 587-592.

176.- Zelazna-Kowalska, I. (1977). Correlation between streptomycin resistance and symbiotic properties of *Rhizobium*. I. Conversion of spheroplastizing, effective *R. trifolii* strain B1 to avirulent rods with changed phage and antibiotic patterns after mutation to high level of streptomycin resistance. *Acta Microbiol. Pol.* 26(3): 233-241.

177.- Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M. & Lindstrom, K. (1991). Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 104-113.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



