



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico – Biológicas

Programa de doctorado Institucional en

Ciencias Biológicas, Opción en Biología Experimental

TESIS

ACUMULACION DE TREALOSA EN GENOTIPOS DE FRIJOL
SOMETIDOS A SEQUIA

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Presenta:

M.C: MARIA DE LOURDES BALLESTEROS ALMANZA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO FARIAS RODRIGUEZ

CO-DIRECTOR: DR. JUAN JOSE PEÑA CABRIALES

MORELIA, MICH, MEXICO

Mayo, 2010

CONTENIDO

I. RESUMEN	8
ABSTRACT	9
II. INTRODUCCIÓN	10
III. ANTECEDENTES	13
III.1. LEGUMINOSAS	13
III.2. ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL FRIJOL COMÚN: RAZAS Y CLASES COMERCIALES	14
III.2.1. Importancia del frijol	18
III.3. DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS ESPECIES DE <i>Phaseolus</i> EN RELACIÓN CON EL FRIJOL COMÚN	19
III.4. SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>/LEGUMINOSA	21
III.5. MECANISMOS DE LAS PLANTAS A FACTORES ADVERSOS	23
III.6. TREALOSA	24
III.6.1. Propiedades químicas de la trealosa	25
III.6.2. Trealosa en la Naturaleza	26
III.6.3. Trealosa en Microorganismos.....	27
III.6.4. Trealosa en las plantas.....	28
III.6.5. Síntesis de trealosa en sistemas simbióticos	29
III.6.6. Mecanismo de acción de la trealosa.....	34
III.6.7. La trealosa en la tolerancia al estrés hídrico en las plantas de frijol	36
IV. HIPOTESIS	38
V. OBJETIVOS	39
VI. MATERIALES Y METODOS	40
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO	40
VI.2. PREPARACIÓN DE INOCULANTES	40
VI.3. SEMILLAS Y DESINFECCIÓN	41
VI.4. SUSTRATO Y DESINFECCIÓN	41
VI.5. SIEMBRA E INOCULACIÓN DE SEMILLAS	42
VI.6. CONDICIONES DE RIEGO	42
VI.7. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TREALOSA	42

VI.8. EXTRACCIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES	44
VI.9. CUANTIFICACIÓN DE TREALOSA.....	45
VI.10. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS	47
VI.11. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN EN RAÍCES.....	48
VI.12. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	48
VI.13. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
VI.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
VII. RESULTADOS	52
VII.1. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN PLANTAS DE FRIJOL SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO .	52
VII.1.1. Trealosa en nódulos	52
VII.1.1.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> P1325687	52
VII.1.1.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> Flor de Mayo M38	53
VII.1.1.3. <i>Phaseolus acutifolius</i> P40142	54
VII.1.1.4. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo	55
VII.1.1.5. <i>Phaseolus filiformis</i> p1535309	56
VII.1.2. Acumulación de trealosa en raíz	57
VII.1.3. Trealosa en tallo	59
VII.1.4. Trealosa en hojas.....	59
VII.1.5. Acumulación de trealosa en semilla	60
VII.2. ÁREA FOLIAR DE FRIJOL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN Y ESTRÉS HÍDRICO.....	62
VII.3. BIOMASA DE GENOTIPOS DE FRIJOL SOMETIDO A SEQUÍA Y BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN	64
VII.4. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE FRIJOL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN	66
VII.4.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> P132568	66
VII.4.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de Mayo M38	67
VII.4.3. <i>Phaseolus acutifolius</i> G40142.....	68
VII.4.4. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo.....	69
VII.4.5. <i>Phaseolus filiformis</i> P1535309.....	70
VII.5. PESO FRESCO DE NÓDULOS DE GENOTIPOS DE FRIJOL BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN	71
VII.5.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> P132568	71
VII.5.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de Mayo.....	72
VII.5.3. <i>Phaseolus acutifolius</i> G40142.....	73
VII.5.4. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo.....	74
VII.5.5. <i>Phaseolus filiformis</i> P1535309.....	75

VII.6. PESO SECO DE NÓDULO DE FRIJOL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN BAJO ESTRÉS HIDRICO	76
VII.6.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> P132568	76
VII.6.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de Mayo.....	77
VII.6.3. <i>Phaseolus acutifolius</i> P132568	78
VII.6.4. <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo.....	79
VII.6.5. <i>Phaseolus filiformis</i> P1535309.....	80
VII.7. NÚMERO DE NÓDULOS EN FRIJOL SOMETIDO A SEQUÍA EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN	81
VII.8. COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN FRIJOL MANTENIDO BAJO DOS CONDICIONES DE RIEGO.....	83
VIII. DISCUSIÓN	86
IX. CONCLUSIONES.....	932
X. LITERATURA CITADA.....	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RAZAS DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. (SINGH ET AL., 1991C).....	17
FIGURA 2. PROMEDIO ANUAL DE LA SUPERFICIE TOTAL SEMBRADA EN MÉXICO DE DIVERSOS CULTIVOS. ...	18
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA TREALOSA.....	26
FIGURA 4. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN NÓDULOS DE <i>P. VULGARIS</i> P1325687 INOCULADO Y COINOCULADO CON <i>G.INTRARADICCESES</i> Y <i>RHIZOBIUM</i> . A LAS PLANTAS SOMETIDAS A SEQUÍA SE LES SUSPENDIÓ LA APLICACIÓN DE AGUA Y SE CUANTIFICÓ TREALOSA EN LOS NÓDULOS A LOS 8 Y 16 DÍAS. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (TUKEY $P < 0.05$).	53
FIGURA 5. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN NÓDULOS DE <i>P. VULGARIS</i> CV. FLOR DE MAYO M38 INOCULADO Y COINOCULADO CON <i>G.INTRARADICCESES</i> Y <i>RHIZOBIUM</i> . A LAS PLANTAS SOMETIDAS A SEQUÍA SE LES SUSPENDIÓ LA APLICACIÓN DE AGUA Y SE CUANTIFICÓ TREALOSA EN LOS NÓDULOS A LOS 8 Y 16 DÍAS. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (TUKEY $P < 0.05$).	54
FIGURA 6. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN NÓDULOS DE <i>P. ACUTIFOLIUS</i> P40142 INOCULADO Y COINOCULADO CON <i>G.INTRARADICCESES</i> Y <i>RHIZOBIUM</i> . A LAS PLANTAS SOMETIDAS A SEQUÍA SE LES SUSPENDIÓ LA APLICACIÓN DE AGUA Y SE CUANTIFICÓ TREALOSA EN LOS NÓDULOS A LOS 8 Y 16 DÍAS. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (TUKEY $P < 0.05$).	55
FIGURA 7. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN NÓDULOS DE <i>P. VULGARIS</i> CV. PINTO SALTILLO INOCULADO Y COINOCULADO CON <i>G.INTRARADICCESES</i> Y <i>RHIZOBIUM</i> . A LAS PLANTAS SOMETIDAS A SEQUÍA SE LES SUSPENDIÓ LA APLICACIÓN DE AGUA Y SE CUANTIFICÓ TREALOSA EN LOS NÓDULOS A LOS 8 Y 16 DÍAS. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (TUKEY $P < 0.05$).	56
FIGURA 8. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN NÓDULOS DE <i>P. FILIFORMIS</i> P1535309 INOCULADO Y COINOCULADO CON <i>G.INTRARADICCESES</i> Y <i>RHIZOBIUM</i> . A LAS PLANTAS SOMETIDAS A SEQUÍA SE LES SUSPENDIÓ LA APLICACIÓN DE AGUA Y SE CUANTIFICÓ TREALOSA EN LOS NÓDULOS A LOS 8 Y 16 DÍAS. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (TUKEY $P < 0.05$).	57
FIGURA 9. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE <i>P. VULGARIS</i> P132568.	66
FIGURA 10. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE <i>P. VULGARIS</i> CV. FLOR DE MAYO M38.	67
FIGURA 11. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE <i>P. ACUTIFOLIUS</i> G40142.....	68
FIGURA 12. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE <i>P. VULGARIS</i> CV. PINTO SALTILLO	69
FIGURA 13. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE <i>P. FILIFORMIS</i> P1535309	70
FIGURA 14. PESO FRESCO DE NÓDULOS EN <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.	71
FIGURA 15. PESO FRESCO DE NÓDULOS EN <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> CV. FLOR DE MAYO BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.....	72
FIGURA 16. PESO FRESCO DE NÓDULOS DE <i>PHASEOLUS ACUTIFOLIUS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.	73
FIGURA 17. PESO FRESCO DE NÓDULOS DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> C.V. PINTO SALTILLO BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.	74
FIGURA 18. PESO FRESCO DE NÓDULOS DE <i>PHASEOLUS FILIFORMIS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO	75
FIGURA 19. PESO SECO DE NÓDULOS EN <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.	76
FIGURA 20. PESO SECO DE NÓDULO EN <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> CV. FLOR DE MAYO BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.....	77
FIGURA 21. PESO SECO DE NODULOS DE <i>PHASEOLUS ACUTIFOLIUS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO	78
FIGURA 22. PESO SECO DE NODULOS DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> C.V. PINTO SALTILLO	79
FIGURA 23. PESO SECO DE NODULO DE <i>PHASEOLUS FILIFORMIS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO.	80

FIGURA 24. EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE EL NÚMERO DE NÓDULOS EN DIFERENTES CULTIVARES Y GENOTIPOS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE RIEGO NORMAL.	81
FIGURA 25. EFECTO DE LA INOCULACIÓN EN EL NÚMERO DE NÓDULOS EN DIFERENTES CULTIVARES Y GENOTIPOS DE FRIJOL SOMETIDOS A SEQUÍA.	82
FIGURA 26. COLONIZACIÓN POR <i>GLOMUS INTRARADICCES</i> EN DIFERENTES CULTIVARES Y GENOTIPOS DE FRIJOL MANTENIDOS EN DOS REGÍMENES DE RIEGO.	84
FIGURA 27. FOTOMICROGRAFÍA DE LA COLONIZACIÓN POR <i>GLOMUS INTRARADICCES</i> EN <i>P. FILIFORMIS</i> BAJO ESTRÉS HÍDRICO 100X.	84
FIGURA 28. FOTOMICROGRAFÍA POR MEB DE LA COLONIZACIÓN POR <i>GLOMUS INTRARADICCES</i> EN <i>P. FILIFORMIS</i> BAJO ESTRÉS HÍDRICO 1000 X.	85

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES CLASES COMERCIALES DE FRIJOL COMÚN, REGIÓN DE PRODUCCIÓN Y ÁREA CULTIVADA (SINGH, 1999).....	16
TABLA 2. DISEÑO EXPERIMENTAL	49
TABLA 3. DISEÑO EXPERIMENTAL POR GENOTIPO.....	50
TABLA 4. CONTENIDO DE TREALOSA EN RAÍCES DE GENOTIPOS DE FRIJOL PREVIAMENTE INOCULADO CON <i>RHIZOBIUM</i> , BAJO ESTRÉS HÍDRICO	59
TABLA 5. CONTENIDO DE TREALOSA EN HOJAS DE PLANTAS DE FRIJOL INOCULADAS CON <i>RHIZOBIUM</i> Y <i>GLOMUS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE RIEGO	60
TABLA 6. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN SEMILLAS DE GENOTIPOS DE FRIJOL INOCULADOS CON <i>RHIZOBIUM</i> Y COINOCULADOS CON <i>RHIZOBIUM</i> Y <i>GLOMUS</i> DE PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO	62
TABLA 7. ÁREA FOLIAR (CM ²) DE PLANTAS DE FRIJOL INOCULADAS CON <i>RHIZOBIUM</i> Y COINOCULADAS CON <i>RHIZOBIUM</i> Y <i>GLOMUS</i> SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO.	63
TABLA 8. BIOMASA TOTAL AL TÉRMINO DE 16 DÍAS DE ESTRÉS POR SEQUÍA BAJO LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS(G ⁻¹)	65

I. RESUMEN

La trealosa es un disacárido que se acumula en los nódulos de las leguminosas y que se ha relacionado con la resistencia vegetal a la sequía. Se conoce que el disacárido es sintetizado por los bacteroides y que se almacena luego en el citoplasma vegetal. Esta acumulación está en función de la cepa de *Rhizobium*, la especie de leguminosa y las condiciones ambientales, por otra parte existen pocos informes sobre la acumulación de trealosa en la simbiosis micorrícica, donde a diferencia de *Rhizobium* aparentemente no existe un flujo de carbohidratos del micro simbionte a la planta. Actualmente se desconoce la dinámica de la trealosa en la asociación Micorriza-*Rhizobium*-Leguminosa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la coinoculación micorriza-*Rhizobium*, en la acumulación de trealosa en nódulos de genotipos de frijol. Se estudiaron los genotipos Flor de Mayo y Pinto Saltillo y las especies silvestres *Phaseolus vulgaris*, *P. acutifolius* y *P. filiformis* inoculados con *Glomus intraradices* y una mezcla de 8 aislados de *Rhizobium*. Los resultados demostraron que la trealosa se acumuló en los genotipos de frijol previamente inoculados con *Rhizobium* y sometidos a estrés hídrico, destacó el genotipo *P. filiformis* con una acumulación de trealosa de 50 mg/g. de nódulo en riego comparado con 90 mg/g en nódulo, en condiciones de estrés hídrico y Pinto Saltillo, un cultivar caracterizado como tolerante a la sequía, la trealosa se acumuló en cantidades de 40 mg/ g. en riego y 60 mg/g en estrés hídrico. La trealosa en los nódulos fue menor cuando se realizó la inoculación mixta con *Glomus*. En *P. filiformis* solo se detectó 12 mg/g. en riego y 30 mg/g. en estrés hídrico. Mientras que en Pinto Saltillo se acumuló 22 mg/g. en riego y 35 mg/g. en estrés hídrico. No se observó acumulación de trealosa en la raíz en los tratamientos inoculados solo con *Glomus*. Análisis posteriores, permitieron observar que en las plantas inoculadas con *Rhizobium* se detectó trealosa en raíz, hojas y semillas, y que los valores se incrementaron cuando las plantas se sometieron a sequía, en ningún caso se detectó trealosa en tallo. Los resultados indican que la trealosa sintetizada en los nódulos puede desplazarse a los demás órganos de la planta. Así mismo, la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa aparentemente es influenciada por la presencia de otros microorganismos como *Glomus*. Estos aspectos deben ser considerados en los programas de desarrollo sustentable que involucren el uso de sistemas simbióticos

ABSTRACT

The trehalose is a disaccharide that is accumulated on the leguminous nods and had been relates whit the plants resistance to drought. It is known that the disaccharide is synthesized by bacteroids and that it is stored on the cytoplasm; It has been observed that in the leguminous nodules of the ones accumulates trehalose disaccharide, whose concentration apparently this in function of the stump of *Rhizobium*, the leguminous species and the environmental conditions. On the other hand, there are only a few reports about the accumulation of trehalose on the mycorrhizal symbiosis where unlike *Rhizobium* apparently there are no a carbohydrate flux from de micro-symbiont to the plant it seems that in difference with rhizobia, there is not flux of carbohydrates from the microsymbiont to the plant. Today, it is unknown the trehalose dynamics in the tripartite Mycorrhiza-Rhizobia-Legume and the objective of the present work was to observe the effect of on nodule trehalose content by coinoculating mycorrhiza and *Rhizobium* on common bean under well watered and drought conditions. Three wild genotypes (*P. filiformis*, *P. acutifolius* and *P. vulgaris*) and two commercial genotypes of *Phaseolus* (Pinto villa and Flor de Mayo) were used. Coinoculation treatments were done with *Glomus intraradicces* and a mixture of 8 native rhizobial strains quantified. The results showed that the trehalose accumulates only in the genotypes inoculated whit *Rhizobium* and under water stress standing the genotype *P. filiformis* whit accumulated 50 mg/g of trehalose under watering to 90 mg/ g under stress conditions and the genotype Pinto Saltillo characterized to be resistance to drought accumulated 40 mg /g in watering and 60 mg/g in water stress. The trealosa in the nods was fewer whit the coinoculated *Glomus-Rhizobium*. *P. filiformis* only accumulated 12 mg/g in watering and 30 mg/g in stress and Pinto Saltillo accumulated 22 mg/g in watering and 35 mg/g in water stress, it was also demonstrated that coinoculation negatively affects its nodule content on each genotype tested. Founding a relation strength according to inoculate and the water stress condition and between the quantity of trehalose in nodule and the resistance to drought for the species and cultivars evaluated, It was trehalose in roots, leaves and seeds of nodulated plants nether in Shots. The results of the study are in tune with the hypothesis that points that trehalose synthesized in the nods may move to the other organs of the plant. Thus the symbiosis *Rhizobium*-Legume apparently is influenced by the presence of the other microorganism, like *Glomus*. These aspects can be considered in the suitable development programs that involve use of symbiotic systems.

II. INTRODUCCIÓN

Una de las principales características de la mayoría de las leguminosas estriba en su capacidad para asociarse con bacterias rizobiales lo cual da como resultado la formación de nódulos en su sistema radical, en cuyo interior se realiza la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Así, las leguminosas en su asociación con *Rhizobium* tienen una gran importancia agrícola y ecológica debido a que son responsables de una parte sustancial, quizá, de la mayoría, del flujo global de nitrógeno atmosférico a formas "fijadas", tales como el amonio, nitratos y compuestos orgánicos (Young *et al.*, 1977).

Actualmente se ha estimado que la FBN aporta de 139 a 175 M/ton/N, de las cuales las leguminosas aportan 70 M/ton·año⁻¹ (Hussein *et al.*, 1991). El frijol común es capaz de fijar de 10 a 90 kg·N·ha⁻¹·año⁻¹, con un valor promedio bajo, comparado con otras leguminosas, Además, estas cantidades son inadecuadas para obtener rendimientos de semilla económicamente atractivos 1-2 ton·ha⁻¹ (Bliss, 1993).

Siendo el frijol, un cultivo de gran relevancia para los países en desarrollo de América Latina y África, la FAO a través de la Agencia Internacional de Energía Atómica recomiendan en 1983 la realización de diferentes programas de investigación con la finalidad de mejorar las características de FBN en frijol (Hardarson y Lie, 1984).

En este sentido, considerando que en México aproximadamente el 85% de la producción de frijol ocurre bajo condiciones de temporal, en donde es común que la planta sufra de estrés por sequía en alguna etapa de su desarrollo, se podría considerar a este estrés como la causa del bajo rendimiento en FBN.

Así, en haba y en alfalfa se ha establecido que en plantas noduladas sometidas a un estrés hídrico la FBN disminuye (Guerin *et al.*, 1990, Irigoyen *et al.*, 1992), pero por el contrario en frijol y en soya se ha reportado que la sequía no afecta de manera importante a la FBN (Djekoun y Planchon, 1991, Peña-Cabriales y Castellanos, 1993).

Por lo tanto la conclusión, al menos en frijol, es que la baja FBN es debida a características particulares de las cepas de *Rhizobium* nativas del suelo. Se han establecido experimentos de inoculación en campo con diferentes cepas los cuales mostraron un éxito muy bajo (9% en cultivos de riego y 12% en cultivos de temporal) (Castellanos *et al.*, 1995), similar a lo reportado en la asociación *Bradyrhizobium*-soya (Streeter *et al.*, 1994).

En vista a este escaso éxito en el frijol para incrementar la FBN se han desarrollado dos líneas de investigación importantes: 1) El estudio de la ecología de *Rhizobium*, para establecer los factores que contribuyan al éxito en la sobrevivencia y competencia de los inoculantes . 2) El estudio de atributos diferentes a la FBN que las plantas pueden obtener en esta simbiosis.

En esta segunda vertiente, se encontró que en los nódulos de las leguminosas se acumula un disacárido de glucosa llamado trealosa (α -D-glucopiranosíl-(1-1)- α -D-glucopiranosido)(Streeter, 1980, Kouchi y Yoneyama, 1986).

Desde los primeros reportes de este azúcar en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa, la trealosa llamó inmediatamente la atención, ya que su síntesis se ha relacionado con la tolerancia a la desecación en una amplia variedad de organismos como bacterias, levaduras, hongos, nematodos, plantas inferiores, y en plantas vasculares superiores únicamente en las plantas de la resurrección como *Myrothamnus flabellifolia* (Arguelles, 2000, Bianchi *et al.*, 1993, Burleigh y Dawson, 1994, Eleutherio *et al.*, 1997, Fillinger *et al.*, 2001, Goddijn y Smeekens, 1998, Gouffi *et al.*, 1999, Leslie *et al.*, 1995).

En general, se consideraba que las plantas vasculares superiores habían perdido la capacidad de sintetizar trealosa, y que la función de ésta ha sido tomada por la sacarosa, que es el azúcar más abundante en ellas

En el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Unidad Irapuato del CINVESTAV y el Laboratorio de Ecología Microbiana de la UMSNH, se han enfocado al análisis de la función ecofisiológica de la producción simbiótica de trealosa en la interacción *Rhizobium*-frijol, demostrando que el contenido de trealosa en los nódulos se incrementa como respuesta al estrés hídrico (Fariás-Rodríguez *et al.*, 1998).

Lo anterior pudiera explicar las observaciones de Peña-Cabriales y Castellanos (1993) sobre la baja sensibilidad de la FBN al déficit hídrico en frijol. Así mismo, la concentración de trealosa en los nódulos se correlacionó con un incremento en la tolerancia a la sequía en plantas noduladas (Fariás-Rodríguez *et al.*, 1998, Jiménez-Zacarías *et al.*, 2004).

Se ha observado que conforme transcurre el estrés hídrico y se incrementa el contenido de trealosa en los nódulos, es posible detectar la presencia de este azúcar en las

hojas sugiriendo una posible removilización de los nódulos de la raíz hacia los tejidos aéreos de la planta.

Por lo anterior, es de vital importancia conocer los factores que en la naturaleza determinan la dinámica de acumulación de trealosa, para en un futuro esclarecer el papel de la trealosa en la simbiosis y su significado ecológico y su posterior aprovechamiento.

III. ANTECEDENTES

III.1. LEGUMINOSAS

Dentro de la gran diversidad vegetal que existe en nuestro planeta, la familia de las leguminosas o *Fabaceae* consta de aproximadamente 750 géneros y 19000 especies y su característica principal es que el fruto o semilla está envuelto por una vaina, ésta familia se divide en tres subfamilias: *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, a la cual pertenece el género *Phaseolus* (Allen y Allen, 1981). El género *Phaseolus* comprende alrededor de 150 especies, estando presentes en México cerca de 50 especies, destacando las cuatro especies domesticadas, *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol lima) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari). El frijol común representa hasta 85% de la superficie sembrada en México para producción (Singh, 2001). es una de las más sobresalientes, dado que las plantas pueden obtener nitrógeno para su desarrollo a partir de nitrógeno molecular mediante la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) la cual es posible por la estrecha interacción que este grupo de plantas establece con bacterias denominadas Rhizobia, durante la cual en las raíces de las leguminosas se forman órganos altamente especializados llamados nódulos.

Se ha estimado que la FBN aporta de 139 a 175 M/ton/ N, de las cuales las leguminosas aportan 70 M/ton año⁻¹ (Zahran, 1999). El frijol común es capaz de fijar de 10 a 90 kg·N·ha⁻¹·año⁻¹, con un valor promedio bajo comparado con otras leguminosas. Además, estas cantidades son inadecuadas para obtener rendimientos de semilla económicamente atractivos, v. g. 1-2 ton ha⁻¹ (Bliss, 1993). Siendo el frijol un cultivo de gran relevancia para los países en desarrollo de América Latina y África, la FAO a través de la Agencia Internacional de Energía Atómica recomendó en 1983 la realización de diferentes programas de investigación con la finalidad de mejorar las características de FBN en frijol (Hardarson y Lie, 1984).

III.2. ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL FRIJOL COMÚN: RAZAS Y CLASES COMERCIALES

Las variedades de frijol común actualmente cultivadas son el resultado de un proceso de domesticación y evolución (mutación, selección, migración y deriva genética), a partir de una forma silvestre (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) procedente del continente americano, desde donde se extendió a todo el mundo, y en la cual se han ido produciendo cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos (como respuesta a las exigencias humanas o del medio ambiente)(Brücher, 1988, Gepts y Debouck, 1991).

Hasta finales del siglo XIX se consideró que el frijol común tenía su centro de origen en Asia, posteriormente, según datos arqueológicos, botánicos, históricos y lingüísticos, concluyeron que el frijol común se originó en el área comprendida entre el norte de México y el noreste de Argentina (Gepts y Debouck, 1991). Existen restos arqueológicos principalmente de semillas, fragmentos de vaina e incluso plantas enteras hallados en los Andes (Perú, Chile, Ecuador y Argentina), en Mesoamérica (México, América Central) y sureste de Estados Unidos. En la actualidad los restos más antiguos datan de 10,000-8,000 años A.C. Procedentes de los Andes y de 6000 años AC. Procedentes de Mesoamérica. Todos estos restos son de plantas ya domesticadas y fenotípicamente similares a los cultivares de la zona (Kaplan, 1981).

Existe una laguna en cuanto a datos arqueológicos en la transición de formas silvestres a cultivadas, aunque existen formas primitivas intermedias o de transición coincidiendo con la aplicación de los métodos de mejora en la agricultura. Además de la información obtenida por los datos arqueológicos, existen datos botánicos como son las características morfológicas, la distribución geográfica y las relaciones genéticas entre formas silvestres y cultivadas que evidencian el origen americano del frijol común (Kaplan, 1981).

Evans (1973) fue el primero en reconocer los dos grupos de germoplasma, tanto en frijol silvestre como cultivado: Andino y Mesoamericano, lo que apunta que ha existido más de un centro de domesticación. Ambos grupos se pueden distinguir por marcadores morfológicos y agronómicos (tamaño de la semilla, forma de la bractéola y del folíolo, pilosidad del folíolo, etc.), bioquímicos (faseolina e isoenzimas) (Gepts y Bliss, 1986, Koenig y Gepts, 1989, Singh *et al.*, 1991) y moleculares (RFLPs, RAPD) (Khairallah *et al.*, 1992, Freyre *et al.*, 1996). Los

marcadores bioquímicos y moleculares presentan dos ventajas frente a los morfológicos y agronómicos: son un fiel reflejo del genotipo y su variación no se ve afectada por el ambiente. Además son caracteres más complejos y las variaciones observadas son, en su mayoría, únicas (Gepts, 1988).

Singh *et al.* (1991) dividieron los dos grupos de germoplasma en seis razas (Figura 1), de acuerdo con los marcadores mencionados anteriormente: germoplasma Andino (razas Chile, Nueva Granada y Perú) y germoplasma Mesoamericano (razas Durango, Jalisco y Mesoamérica). Las variedades de las razas Durango, Mesoamérica y Nueva Granada son cultivadas en todo el mundo, sin embargo, la raza Jalisco sólo se cultiva en los valles de México, la raza Chile se distribuye en las regiones secas y de bajas altitudes en el sur de los Andes y la raza Perú tiene una distribución limitada a los valles andinos. Las clases comerciales de mayor importancia económica pertenecen a las tres razas mencionadas anteriormente, Durango, Mesoamérica y Nueva Granada, (Tabla 1). Dentro de la raza Mesoamérica, se pueden distinguir regiones en las que predomina más un tipo de grano. Así el grano blanco se cultiva principalmente en México, Venezuela o Cuba mientras que las variedades de grano negro son más apreciadas en Brasil. En cuanto a la raza Durango cabe destacar la variedad "Great Northern" importante en Estados Unidos y Canadá, y exportada a Europa. Las variedades más importantes dentro de la raza Nueva Granada son "Cranberry" y la alubia blanca, cultivadas sobre todo en Argentina y exportadas a Europa España y Portugal).

Tabla 1. Principales clases comerciales de frijol común, región de producción y área cultivada (Singh, 1999)

RAZAS Y TIPOS DE FRIJOL	REGIÓN PRODUCTORA	ÁREA (10³ ha)
Raza Mesoamérica (semilla pequeña)	Argentina, Brasil, Venezuela, Caribe, Mesoamérica y Norteamérica	3500
-Negra		2000
- Carioca (rayas marrón claro) -Jalinho	Brasil y Bolivia Brasil ,Centroamérica y China	500
(crema) - Mulatinho (marrón claro) -	África, China y Norteamérica	500
Roja – Blanca		250
Raza Durango (semilla mediana)	Valles altos de México Valles altos	800
- Bayo (crema) - Flor de Mayo (motas rosas) -	de México Europa, Norteamérica,	250
Great Northern (blanca) - Ojo de cabra (rayas	Oeste de Asia Valles altos de	700
marrón claro) -Rosa - Pinta (marrón claro con	México Norteamérica	150
punteado marrón oscuro) -Roja	Norteamérica	20
		800
Raza Nueva Granada (semilla grande)	Argentina, Europa, Norte de África y Oeste de	250
- Alubia (blanca alargada)	Asia.	150
- Azufrado - Calima (moteada roja) -	Costa del Pacífico de México y Perú África,	1500
Manteca (crema) - Cranberry (crema	Andes y Caribe Andes África, Asia, Europa,	100
punteado rojo) - Alubia roja oscura -	Norteamérica y Sudamérica África, Andes y	800
Alubia roja clara - Radical (oval,	Norteamérica África y Norteamérica Andes	500
redonda, roja)		300

MESOAMERICANO

DURANGO



ÁNDINO

CHILE



JALISCO



PERÚ



MESOAMÉRICA



NUEVA GRANADA



Figura 1. Razas de *Phaseolus vulgaris* L. (Singh *et al.*, 1991c)

III.2.1. Importancia del frijol

Para México, el frijol es un producto estratégico debido a que junto con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad. Su presencia a lo largo de la historia de México, lo ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identidad cultural (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2006a).

El frijol se cultiva en prácticamente todas las regiones del país, bajo todas las condiciones de suelo y clima. La superficie sembrada de frijol registró un promedio anual en la década de 1996–2006, de 2.6×10^{-6} ha, el 14% de la superficie cultivada nacional (Figura 2), con un rendimiento promedio de 1.242Ton-ha (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2006a).

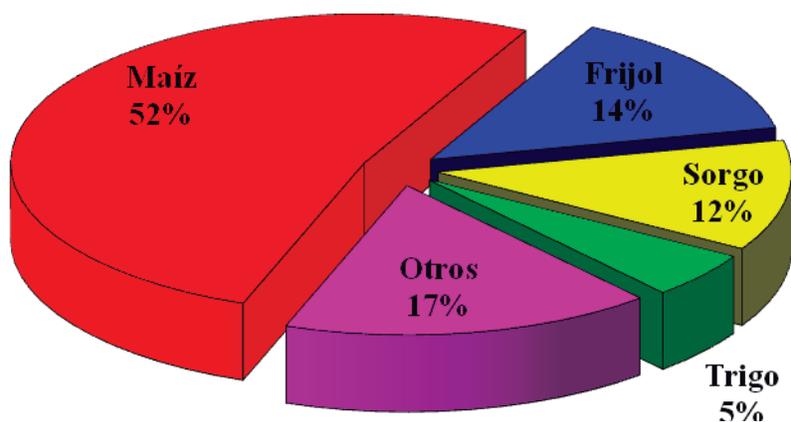


Figura 2. Promedio anual de la superficie total sembrada en México de diversos cultivos.

Las principales cosechas de frijol se obtienen en dos grandes zonas productoras, con condiciones y rendimientos diferentes. La región templada semiárida del Norte-Centro con siembras en Primavera-Verano con el 92% de la superficie bajo condiciones de temporal deficiente y rendimiento bajo de 531 kg/ha^{-1} que representan el 74% de la producción total anual. La otra región se ubica en el Noroeste, con siembras en Otoño-Invierno bajo riego o

humedad residual, con sólo el 52% de la superficie con cultivo de temporal y rendimiento de 1248 kg/ha⁻¹ (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2006b).

En este contexto, la producción del frijol depende de manera predominante de los volúmenes que se puedan obtener bajo cultivo de temporal, en donde una de las principales limitantes para la producción en estas regiones, es la escasa y variable distribución de las lluvias en el ciclo del cultivo. Además, los efectos de la sequía son acentuados por el tipo de suelos predominantes, que son poco profundos, con bajo contenido de materia orgánica, N y P, generando una baja capacidad de retención de humedad. De acuerdo al Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2006a), la productividad del frijol depende básicamente de las condiciones climatológicas prevaecientes; en particular de los niveles de precipitación pluvial (Acosta-Gallegos, 2006).

Se ha reportado que un factor crucial para la obtención de altos rendimientos en diversos cultivos es la utilización de semillas de buena calidad (TeKrony y Egli, 1991, Finch-Savage, 1995, Pill, 1995, Boe, 2003). Sin embargo, en frijol se describen comportamientos variables a este respecto (Spilde, 1987), dependiendo del tipo de genotipo utilizado y su relación con el microsimbionte así como las condiciones hídricas del sitio de siembra y la temperatura imperante.

III.3. DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS ESPECIES DE *Phaseolus* EN RELACIÓN CON EL FRIJOL COMÚN.

El frijol común pertenece al género *Phaseolus* y recibe el nombre científico de *Phaseolus vulgaris* (Linné, 1753). Su enclave taxonómico es (Strasburger *et al.*, 1994):

- Clase: *Dicotyledoneae*
- Subclase: *Rosidae*
- Superorden: *Fabanae*
- Orden: *Fabales*
- Familia: *Fabaceae*
- Subfamilia: *Papilionoideae*

Dentro del género *Phaseolus* existen diferentes grupos naturales o acervos genéticos (Koenig y Gepts, 1989, Gepts y Debouck, 1991). El acervo genético primario del frijol común incluye las variedades silvestres y cultivadas de *P. vulgaris*, y entre ellas se cruzan y se recombinan genes sin ninguna barrera genética. El acervo secundario incluye a *P. coccineus*, *P. costaricensis* y *P. polyanthus* (Smartt, 1984). Esta última especie surgió por un proceso de domesticación a partir de un ancestro silvestre diferente (Schmit y Debouck, 1991). El cruzamiento entre *P. vulgaris* y las especies del acervo secundario se realiza fácilmente sin rescate de embriones, aunque el cruce utilizando *P. coccineus* como parental femenino es más difícil (Bannerot, 1979). El acervo genético terciario incluye a *P. acutifolius* y *P. parvifolius*, y podían ser ancestros en la evolución del frijol común (Debouck, 1999). *P. acutifolius* es resistente a la sequía, a temperaturas altas y a bacteriosis, características importantes para su utilización en programas de mejoramiento de frijol. Los cruces con *P. vulgaris* son más difíciles y necesitan de rescate de embriones. La especie más lejana de *P. vulgaris* es *P. lunatus* que pertenece al acervo genético cuaternario y de momento no hay cruzamientos exitosos entre las dos especies (Smartt, 1979).

Uno de los principales objetivos del desarrollo de cruzamientos interespecíficos es facilitar la incorporación de caracteres deseables en la especie de *P. vulgaris*. Si lo que interesa es introducir genes de resistencia a enfermedades se puede emplear, por ejemplo, *P. acutifolius* que es resistente a la bacteriosis común (Singh y Muñoz, 1999) o *P. coccineus* que es resistente a la antracnosis (Hubbeling, 1957). Si el objetivo del programa de mejora es la resistencia a plagas de insectos es importante *P. coccineus* por ser resistente a la mosca del frijol, plaga que afecta a las variedades cultivadas en África, donde causa grandes pérdidas. También son importantes las poblaciones silvestres por ser resistentes a los gorgojos, extendidos mundialmente. Asimismo, se debe considerar la introducción de genes de resistencia a determinadas condiciones ambientales adversas, como puede ser la tolerancia a la sequía y resistencia a temperaturas elevadas (Parsons y Howe, 1984) que presenta *P. acutifolius*, siendo una característica importante para introducir el cultivo de frijol común en zonas que de otro modo sería imposible acceder.

Actualmente, se tiende al desarrollo de variedades uniformes y más productivas con las cuales sustituir a un enorme mosaico de variedades locales heterogéneas y primitivas.

Sin embargo, estas variedades tradicionales son capaces de soportar condiciones que dañarían seriamente a muchas variedades modernas, con un valor potencial que radica en los genes que contienen como resistencia a enfermedades, y adaptabilidad a condiciones ambientales adversas. Sin el uso de estos recursos en los centros de investigación agrícola aplicada, la mejora de las variedades no sería posible. Por ello, es importante la protección y eficaz utilización de los recursos fitogenéticos, siendo necesaria su recolección, conservación en bancos de germoplasma, evaluación, documentación e intercambio y estudios de las diferentes capacidades por genotipo así como de las posibles relaciones con otros seres vivos como son los simbioses que al parecer han coevolucionado con ellos como es *Rhizobium* y algunas micorrizas (Mosse, 1973).

III.4. SIMBIOSIS *Rhizobium*/LEGUMINOSA

Hace más de cien años Hellrieger y Wilferth publicaron el descubrimiento de la fijación simbiótica de N₂ en leguminosas y desde entonces, debido a factores como la creciente demanda de N en la agricultura, se incrementaron las expectativas de la ingeniería genética para mejorar el desempeño de esta simbiosis (Quispel, 1988).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es un proceso clave en la biósfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el N gaseoso en N combinado. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el N gaseoso es reducido a amonio. Se estima que este proceso contribuye entre 60-80% de la FBN y es responsable de la fijación de por lo menos 35 millones de toneladas de nitrógeno anualmente, lo cual es altamente importante en países de América Tropical, en donde la deficiencia de nitrógeno es uno de los mayores factores limitantes en la producción de cultivos (Allaway *et al.*, 2000).

La FBN por *Rhizobium* se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células vegetales. La nitrogenasa de los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, incluyendo la sensibilidad al O₂ y la capacidad de reducir acetileno y N₂. La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consiste de dos componentes, la proteína homodimérica

que contiene Fe y es codificada por los genes *nifH*, y la proteína tetramérica que contiene Fe y Mo, codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Allaway *et al.*, 2000).

Al ser la simbiosis un fenómeno tan complejo, la nodulación de las leguminosas se ve influida por un gran número de factores, tanto por los ambientales como genéticos. También son importantes el número de nódulos, su tamaño y momento de aparición

El aspecto de la especificidad en la relación *Rhizobium*-leguminosa ha promovido el estudio para identificar las señales implicadas. La primera señal implicada en la interacción la provee la planta. Los rizobios son capaces de notar la presencia de la raíz de la leguminosa por medio de moléculas de bajo peso molecular (flavonoides, isoflavonoides y betaínas) excretadas por la raíz. Este proceso tiene especificidad hasta cierto punto ya que las leguminosas excretan flavonoides específicos para atraer a rizobios específicos. En respuesta a la señal de la planta los rizobios responden sintetizando otras señales específicas, los factores Nod, dirigidos hacia la planta hospedadora. Los genes de la bacteria implicados en la síntesis de los factores Nod son los genes *nod* (nodulación). Estos genes, a excepción de *nodD*, no se expresan si no se encuentra la señal inductora adecuada de la planta (Allaway *et al.*, 2000).

Durante el proceso de simbiosis la planta también expresa proteínas específicas del nódulo, las nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina tiene la función de aportar O₂ a los bacteroides y de controlar los niveles O₂. La leghemoglobina se localiza en el citosól de las células de la planta infectada por bacteroides y es la que da el típico color rosado de los nódulos funcionales, mientras que el interior de estos nódulos es rojizo debido a la presencia de leghemoglobina (Allaway *et al.*, 2000).

En las leguminosas anuales, como la soya y el frijol, la tasa de fijación varía a lo largo del ciclo. Es muy baja en los estadios vegetativos ya que en ese período son más importantes los aportes de N desde el suelo. No obstante, es la etapa crítica para la formación de nódulos, la mayor tasa de fijación biológica en soya se produce a partir del comienzo de las etapas reproductivas (fin de floración y comienzo de llenado de granos) y que coincide con el momento de mayor demanda de nitrógeno por parte de la planta. Luego de la etapa reproductiva la tasa de fijación disminuye hasta hacerse totalmente nula antes de la madurez fisiológica. Este fenómeno ocurre porque la planta destina gran cantidad de hidratos de C, (fuente de energía para el rizobio) hacia los granos, desactivando así la

actividad de la FBN. Aparte de la FBN, en la simbiosis se ha investigado sobre otras actividades que ocurren durante la simbiosis y que pueden incidir en el desarrollo vegetal, como la disponibilidad de otros nutrimentos (Guerinot *et al.*, 1990), antagonismo contra patógenos (Fuhrmann y Wollum, 1989, Hynes y Zhao, 2000), síntesis de reguladores de crecimiento y la resistencia a condiciones adversas (Mellor, 1992).

III.5. MECANISMOS DE LAS PLANTAS A FACTORES ADVERSOS

Los factores abióticos adversos revisten gran importancia en el proceso productivo de las plantas, puesto que en muchos casos son determinantes para la obtención de buenas cosechas, por ello su estudio, identificación de sus mecanismos y mejoramiento para obtener resistencia son fundamentales.

Las condiciones climáticas de un hábitat han sido siempre un filtro selectivo, forzando ajustes en la biodiversidad del ecosistema y favoreciendo a las especies con características más adecuadas a los cambios del hábitat. Entre los factores adversos abióticos más nocivos que afectan los cultivos, está la sequía, las heladas, la salinidad de los suelos y las inundaciones. La sequía, es una de las limitantes más importantes para la sobrevivencia, sin embargo, algunas plantas han desarrollado mecanismos de defensa, morfológicos, anatómicos, fisiológicos, fenológicos y bioquímicos que les permiten enfrentar con relativo éxito esta adversidad. Durante la sequía, la planta sufre la deshidratación de sus células y tejidos, así como de un incremento en la temperatura y no existe un mecanismo universal de adaptación de las plantas a la sequía. Las plantas resistentes a la sequía se pueden definir como aquellas que son capaces de adaptarse al efecto de ésta y pueden desarrollarse y reproducirse gracias a propiedades adquiridas en el proceso de evolución, bajo la influencia de las condiciones ambientales y la selección natural (Henckel, 1964).

Como la sequía al igual que la salinidad, causa un desajuste osmótico se han estudiado diversos metabolitos compatibles que permiten su reajuste. Aminoácidos como la prolina, que se acumulan en leguminosas como soya (*Glicine max*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), encontrándose una correlación directa entre la acumulación del aminoácido y

tolerancia a sequía. Asimismo, se han estudiado otros compuestos orgánicos como inositol, pinitol, que se acumulan en leguminosas tropicales en respuesta a la sequía, regulando la presión osmótica para mantener el estado hídrico.

El estrés hídrico en la planta es el resultado de la reducción en el potencial hídrico del suelo, el cual usualmente ocurre progresivamente y la fluctuación en la velocidad de evaporación, la cual ocurre con cambios diarios en radiación neta y humedad. El mantenimiento de la turgencia ha sido observado como una respuesta a cambios en el potencial hídrico (Ingram y Bartels, 1996).

Existe una acumulación de solutos durante la reducción del potencial hídrico, cuyas concentraciones varían de acuerdo a la especie y el tejido de la planta y tienen un papel importante en la osmoregulación. Los principales constituyentes son los azúcares y los aminoácidos (Morgan y Morgan, 1984). Se ha demostrado que ciertos azúcares tienen un papel central en la protección contra las sequías. La importancia de azúcares solubles en la tolerancia a este tipo de estrés en las plantas, ha sido sugerida por estudios en los cuales la presencia de azúcares particulares se correlaciona con el incremento de la tolerancia a la desecación como es el caso de la trealosa (Ingram y Bartels, 1996).

III.6. TREALOSA

Durante varios años los esfuerzos de investigación sobre resistencia a condiciones adversas se ha concentrado en la trealosa como molécula protectora ya que es un compuesto que se acumula en proporciones de hasta el 20% del peso seco de organismos que sobreviven a la deshidratación (Crowe *et al.*, 2001).

In vitro, la trealosa es un protector efectivo contra el estrés y reduce el daño por congelamiento de células de plantas criopreservadas (Bhandal *et al.*, 1985, Müller *et al.*, 1995). En vista del bien documentado potencial de la trealosa para proteger las proteínas y membranas (Crowe *et al.*, 1992, Mazzobre *et al.*, 1997), y el hecho que muchos grupos de organismos incapaces de mantener un medio interno constante acumulen trealosa bajo condiciones de estrés (Breedveld *et al.*, 1991, Welsh *et al.*, 1991, Potts, 1994), ha despertado el interés el hecho de que plantas vasculares carezcan de trealosa, aún cuando son sujetas a cambios severos de las condiciones externas o a una completa desecación. La

sacarosa, que se cree reemplaza a la trealosa en las plantas superiores, se requiere en cantidades mucho más grandes para tener un efecto similar.

En plantas transgénicas de tabaco, a las cuales se les insertó el gen de la trealosa-6-fosfato sintasa, se observó una acumulación de trealosa (0.17 mg/g^{-1}) en las hojas, dicha acumulación se vio relacionada con un cambio dramático en la resistencia de las plantas a la sequía. Las bajas concentraciones del azúcar condujeron a postular que esta actúa dentro de un mecanismo de transducción de señales hasta ahora no identificado, pero que interviene con el metabolismo de los carbohidratos en la planta (Romero *et al.*, 1997).

III.6.1. Propiedades químicas de la trealosa

La trealosa es un azúcar con propiedades muy particulares constituido por dos subunidades de glucosa, unidas mediante un enlace α -1:1 (Figura 3). Tiene un bajo punto higroscópico, y el contenido de agua en la trealosa permanece estable (9%) hasta una humedad relativa del 92% (Richards *et al.*, 2002). La trealosa puede permanecer estable en pH bajos, así como en elevadas temperaturas. Tiene además, una alta temperatura de transición, que en combinación con su bajo punto higroscópico la hacen un excelente compuesto para la protección de proteínas y membranas. Adicionalmente, este azúcar participa en la formación del estado vítreo en organismos anhidrobióticos, proceso necesario para la estabilización de macromoléculas (Crowe *et al.*, 1998, Crowe *et al.*, 1984c, Kaushik y Bhat, 2003, Wiemken, 1990).

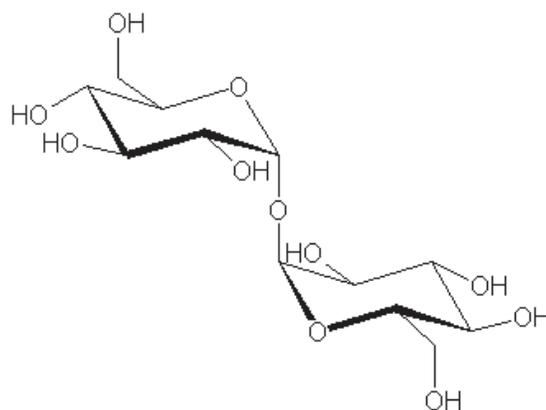


Figura 3. Estructura química de la trealosa.
(α -D-glucopiranosil-(1:1)- α -D-glucopiranosido)

III.6.2. Trealosa en la naturaleza

La biosíntesis de trealosa ha sido estudiada en detalle en *S. cerevisiae* y *E. coli*. Comprende la formación de la trealosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, reacción catalizada por la enzima trealosa-6-fosfato sintasa (TPS), posteriormente este metabolito es desfosforilado por la enzima trealosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) para generar trealosa libre (Elbein, 1974). Adicionalmente, se han reportado los genes *dt*, una nueva ruta en *Rhizobium*. La cual consiste en la utilización de maltoheptosa como sustrato. La reacción es catalizada por la maltoologosil y la trealosa sintasa (MTS) y la maltoologosil trealosa hidrolasa (MTH). La MTS catalizada por una transglucosilación intramolecular la formación de uniones glicosídicas α - α (1-1). La MTH hidroliza el producto de la reacción de la MTSasa en la unión α (1-4)entre el grupo maltoologosil y la trealosa, liberando así el disacárido (De Smet *et al.*, 2000, Maruta *et al.*, 1996).

La hidrólisis de la trealosa puede ocurrir en diferentes formas, por ejemplo en *Euglena gracilis* y *Pichia fermentans* es realizada por la enzima trealosa fosforilasa, en *Escherichia coli* por una fosforilación y seguida de la hidrólisis por acción de la enzima trealosa-6-fosfato hidrolasa. En plantas, hongos, animales y bacterias la hidrólisis se realiza por la enzima trehalasa (α -trealosa 1- D-glucohidrolasa).

La trealosa se ha encontrado en todos los hongos y en muchos animales y bacterias, pero no se ha reportado en plantas. Sin embargo, se encuentra en los nódulos de las leguminosas, por lo general como el carbohidrato principal (Streeter y Bhagwat, 1999). En este rubro la asociación de las leguminosas con *Rhizobium* puede jugar un papel crítico en la adaptación y se ha observado que la simbiosis se realiza con cepas de *Rhizobium* resistentes a las condiciones adversas presentes en el hábitat.

III.6.3. Trealosa en microorganismos

La trealosa se ha detectado en todos los grupos microbianos analizados (Elbein y Mitchell, 1974). En los microorganismos el papel de la trealosa se ha relacionado con la resistencia a la sequía y proviene de una serie de estudios en los que se ha demostrado que organismos tales como hongos, levaduras, bacterias y semillas de plantas son capaces de vivir por largos períodos en condiciones de deshidratación casi completa (Crowe *et al.*, 1984b).

En *S. cerevisiae* se demostró que la sobrevivencia a condiciones de deshidratación se correlaciona con la concentración de trealosa sintetizada por las células (Eleutherio *et al.*, 1993). Por ejemplo, las cepas 1412-4 D y 311 tienen diferente capacidad de síntesis y acumulación de trealosa, siendo de 40 mg·g⁻¹ de células y 75 mg·g⁻¹ de células, respectivamente. La sobrevivencia después de la deshidratación fue de un 40% para la cepa 1412-4D y 90% para la cepa 311. Mediante la sobreexpresión del gen *tps 1* (el cual codifica para la trealosa-6-fosfato sintasa) en *S. pombe*, se observaron resultados similares a los reportados en la literatura (Eleutherio *et al.*, 1993, 1997, Soto *et al.*, 1999). Las cepas de *S. pombe* responden a diferentes tipos de estrés acumulando trealosa. Las cepas recombinantes que sobre expresan *tps 1* acumularon más trealosa, mostrando una mayor sobrevivencia (con diferencias de 2 á 3 unidades logarítmicas). Se demostró que la síntesis de trealosa, y no la síntesis de la enzima trealosa-6-fosfato sintasa, es el principal mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés, como el osmótico, la temperatura y la deshidratación.

En un estudio realizado en las arqueobacterias *Natronococcus* y *Natronobacterium* (las cuales crecen en condiciones de alta salinidad y elevado pH), se encontraron resultados

muy interesantes (Desmarais *et al.*, 1997). Se creía originalmente que este tipo de arqueobacterias usaban iones inorgánicos, por ejemplo: el K, como solutos para balancear la presión osmótica externa, pero al estudiar la estrategia de estas arqueobacterias para sobrevivir al este estrés osmótico, se encontró que el principal soluto era un compuesto orgánico, el cual resultó ser la 2-sulfotrealosa, cuyas concentraciones se incrementan al aumentar las concentraciones de NaCl externas. La sulfotrealosa es el primer (quizás el único) osmolito orgánico detectado en arqueobacterias halofílicas alcalifílicas.

III.6.4. Trealosa en las plantas

En plantas la trealosa es común en plantas inferiores, fue aislada por primera vez en *Selaginella lepidophylla* y subsecuentemente ha sido encontrada en otras pteridofitas. La especie *S. lepidophylla* entra en dormancia durante períodos de sequía y revive cuando el agua es nuevamente disponible. Durante la sequía extrema, los niveles de trealosa alcanzan el 20% del peso seco en las hojas, posiblemente protegiendo las estructuras celulares y sus componentes de la desnaturalización (Goddijn y Smeekens, 1998).

Se ha demostrado claramente que el papel de la trealosa en estas plantas cryptobióticas es la tolerancia al estrés, en particular a la sequía (Goddijn y van Dun, 1999). La ausencia general de trealosa en las semillas y polen resistentes a la desecación ha sugerido que las plantas superiores han perdido la capacidad para producir trealosa (Crowe *et al.*, 1992).

La presencia de trealosa en angiospermas ha sido cuestionada, ya que sólo se ha detectado en hojas de plantas tolerantes a la desecación tales como *Myrothamus flabellifolius* y *Sporobolus stapjianu*. Llamadas plantas de la resurrección (Goddijn y Smeekens, 1998, Müller *et al.*, 1995). En las hojas de *M. flabellifolius* se ha encontrado que representa hasta el 19% de los azúcares después de 4 días de deshidratación (Bianchi *et al.*, 1993).

III.6.5. Síntesis de trealosa en sistemas simbióticos

a) Actinorrizas

Frankia, es un actinomiceto que puede formar nódulos con 22 géneros de plantas entre las que se encuentran: *Casuarinaceae*, *Alloesuarina*, *Casuarina*; *Coriariaceae*, *Coriaria*; *Betulaceae*, *Alnus*; *Dastiscaceae*, *Dastia*; *Myricaceae*, *Myrica*, *Comptonia*; *Rosaceae*, *Rubus*, *Dryas*, *Purshia*, *Cereoearpus*, etc. Económica y ecológicamente las especies más importantes son *Alnus* y *Casuarina* (Mellor y Rosendahl, 1994). *Frankia* almacena carbohidratos en forma de glucógeno y trealosa. La cantidad de trealosa se relaciona inversamente con la FBN. Se cree que esto se debe principalmente a una disminución en la síntesis de trealosa más que a su hidrólisis. Los nódulos actinorrícosos contienen grandes cantidades de sacarosa, que junto con la fructosa son capaces de mantener la fijación de nitrógeno.

El conocimiento de la trealosa y la trealasa en los nódulos es escaso (Mellor *et al.*, 1992). En otros estudios, se demostró que la concentración intracelular de trealosa en *Frankia* se incrementó de 0 hasta $612 \text{ ng}\mu\text{g}^{-1}$ de proteína, cuando se sometió a estas a diferentes condiciones osmóticas. Además, la concentración de trealosa interna se relacionó de manera directa con la habilidad de sobrevivir a la desecación, asumiendo que esta puede ser un agente osmoprotector (Burleigh y Dawson, 1994).

b) Micorrizas

La micorriza es una asociación mutualista que se establece entre la raíz de la planta superior y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, ya que el 95% de las especies vegetales la establecen de forma natural en hábitats muy diversos. El mutualismo supone una relación beneficiosa para ambos simbiosomas: el hongo suministra a la planta nutrientes minerales y agua que extrae del suelo, a través de su red externa de hifas, mientras que la planta proporciona al hongo carbohidratos producidos por la fotosíntesis. Azcon-Aguilar *et al.* (1999) indican que el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, sin causar daño a la planta, llegando a ser fisiológica y morfológicamente, parte integrante de dicho órgano.

Los Hongos Micorrízico Arbusculares (HMA) son un importante grupo de microorganismos del suelo que contribuyen sustancialmente al establecimiento, productividad, y longevidad de ecosistemas, tanto artificiales como naturales, predominan en ecosistemas donde la mineralización de materia orgánica es lo suficientemente rápida para evitar su acumulación y son abundantes bajo cualquier rango de fertilidad del suelo, aunque el grado de colonización micorrízica aumenta cuando la fertilidad declina (Wilcox, 1996). Las hifas penetran las células epidérmicas de raíces jóvenes detrás de la región meristemática. La penetración de pelos radiculares es común en algunas especies de huésped. Luego, la hifa puede crecer por completo intracelularmente o ser principalmente intercelular, lo cual es posible que dependa de la especie hospedera. El hongo crece a lo largo de la corteza, pero no invade la endodermis ni infecta células que contienen cloroplastos. Brevemente después de la infección, el hongo forma arbusculos dentro de las células corticales

La infección primaria involucra interacciones en la rizósfera entre el hongo, huésped, suelo, clima y otros microorganismos. Sumado a las dificultades de observación están la opacidad del suelo, la mezcla de poblaciones de HMA, y los cambios estacionales en la disponibilidad de inóculo.

Una vez alcanzada la superficie de la raíz, el hongo percibe un elevado estímulo químico, suficiente para provocar un cambio local en su patrón de crecimiento original que es ramificado con muchas dominancias apicales a uno nuevo, un patrón irregularmente septado con un reducido espacio inter hifal (Giovannetti *et al.*, 1993, Harris, 2008).

Estos cambios facilitan la búsqueda de lugares adecuados para la adhesión y formación del apresorio. El apresorio es reconocible por su forma globosa y la infección hifal parte de él. Este es capaz de penetrar entre las células epidérmicas o a través de los pelos radicales (Calvet *et al.*, 2001, Hernández-Dorrego, 2000).

Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo exploran un volumen de suelo inaccesible a la raíz a través del micelio externo, aumentando la superficie de absorción y, por lo tanto, la captación de nutrimentos y de agua (Calvet *et al.*, 1999).

Los estudios indican que el hongo y la membrana plasmática constituyen una interface la cual posee rasgos citológicos que indican un activo intercambio de nutrimentos;

ha sido establecido que el hongo recibe carbohidratos, y el huésped recibe principalmente fósforo. Ambas sustancias pasan por la vía del apoplasto previa captación por cada uno de los socios, el flujo en masa desde los arbusculos al citoplasma es bidireccional y la planta aumenta su capacidad fotosintética para compensar el carbono "perdido" en el hongo, un autótrofo en muchas asociaciones simbióticas libera hidratos de C al heterótrofo que los almacena, en forma de polisacáridos o azúcares complejos que el autótrofo no puede metabolizar. Estos hidratos de C complejos son trealosa y manitol (Mosse, 1973).

El papel de la simbiosis es fundamental en la captación de nutrientes minerales de lenta difusión en los suelos, como los fosfatos solubles, el Zn y el Cu y se traduce en crecimiento y desarrollo de la planta hospedera. Así, se acepta que uno de los principales beneficios de los hongos HMA es el de aumentar la absorción de P, las hifas absorben este elemento y lo remobilizan por la planta incrementando directamente, de esta forma, el contenido nutricional de los tejidos (Souza *et al.*, 1996).

La captación de agua también puede ser aumentada por los hongos micorrícicos. De esta forma, los hongos micorrícicos incrementan la eficiencia de fertilización (Menge *et al.*, 1997).

Los hongos micorrícicos pueden interactuar con una amplia gama de organismos en la rizósfera. El resultado puede ser positivo, neutral o negativo en la asociación micorrícica o en un componente en particular de la rizósfera, mencionan que los microorganismos asociados con raíces no micorrizadas pueden ser cualitativa y cuantitativamente diferentes de los encontrados en raíces micorrizadas (micorrizósfera).

Es probable que los exudados de raíces micorrizadas sean distintas de las raíces no micorrizadas, debido al mejor estatus nutricional de la planta o por la acción directa del hongo a los exudados, y esto afecta los microorganismos de la rizósfera y que las micorrizas parecen ser una condición necesaria para la nodulación efectiva de algunas leguminosas. Es conocido que una nodulación efectiva depende de un adecuado nivel de P, ya que la fijación extra de N requiere más P (Mosse, 1973).

Por otro lado, Hernández-Dorrego (2000) indica que los hongos formadores de micorrizas arbusculares producen un efecto positivo sobre las características edáficas. Una planta micorrizada que crece en suelos arenosos es capaz de agregar más partículas de suelo en sus raíces por unidad de masa que una planta no micorrizada.

La formación de agregados del suelo puede ser un factor importante para disminuir la erosión ya que se ha comprobado la importancia de las micorrizas en la vida de la planta, ayudándole a superar situaciones de estrés sobre todo en suelos degradados por procesos erosivos, incendios forestales, laboreo excesivo, contaminación, sequía, salinización, deficiencia de nutrientes, etc.

Una importante cualidad de las leguminosas es su capacidad para fijar N atmosférico y asociarse con bacterias del género *Rhizobium*, razón por la cual se les incluye en rotación con cultivos de cereales y otras no leguminosas como recuperadoras de fertilidad. Además de esta cualidad, las leguminosas también se asocian en forma simbiótica con las micorrizas; son asociaciones simbióticas entre hongos *Zygomycetes* y raíces de las leguminosas. Permiten a éstas una mayor absorción de P, agua y otros nutrientes, además el hongo libera hormonas de crecimiento, colabora en la formación de agregados del suelo, etc.

Se ha propuesto que la concentración de trealosa en raíces es proporcional al grado de micorrización (Niederer *et al.*, 1989). En las raíces de soya infectadas con *Glomus mosseae*, una micorriza vesículo-arbuscular, se incrementaron significativamente los niveles de trealosa, así como la actividad de trealasa. En estos casos, la trealosa de origen fungal puede entrar a los tejidos de la planta debido a la íntima relación de la endosimbiosis, en donde el contacto célula-célula es más estrecho que en las ectomicorrizas, por lo cual las micorrizas vesículo arbusculares son comparadas regularmente con la simbiosis de *Rhizobium* (Mellor, 1992).

En plantas inoculadas (*Glycine max* cv *Maple arrowy* *Tagetes tenuifolia*) el contenido de trealosa en raíces se incrementó a partir del día 10, alcanzando 32 mg/ g⁻¹ de peso fresco al final del experimento. Se propuso que la trealosa fue sintetizada por el hongo a partir del C proveniente de la planta. Por otra parte, en raíces sin inocular no se detectó trealosa (Schubert *et al.*, 1992).

En las micorrizas, el metabolismo de carbohidratos y su flujo entre el huésped y el hongo han recibido considerable atención. Aunque el movimiento de C ha sido demostrado, se conoce poco de la naturaleza de las moléculas que son intercambiadas. El concepto más simple de transporte bidireccional involucra Pi y carbohidratos solubles, con la adición de N orgánico del hongo a la planta. Las moléculas transferidas tienen implicaciones

importantes en el mecanismo de transporte que puede operar y en el movimiento simultáneo de otros iones.

La distribución de ATPasas en las membranas plasmáticas de las células de la raíz y los arbusculos, apoyan el concepto de un transporte controlado en ambas direcciones (Schubert *et al.*, 1992). En esporocarpos, la trealosa fue el principal carbohidrato soluble que se detectó y su concentración fue de 1.42 mg g^{-1} de peso fresco, lo que representó el 94% del total de los carbohidratos. Asimismo, en raíces de otras plantas micorrizadas, el porcentaje de trealosa fue de 4.4% del total de carbohidratos (Mellor, 1992).

c) Simbiosis *Rhizobium*/ LEGUMINOSAS

La trealosa ha sido detectada en la simbiosis entre *Rhizobium* - leguminosa, la mayor parte de la trealosa sintetizada es liberada al espacio peribacteroidal, de tal forma que puede ser encontrada en el citoplasma de las células huésped (Streeter, 1985).

En los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, la trealosa se acumula en las asociaciones que involucran los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*.

A través de la familia *Leguminosae*, los nódulos de los miembros de *Papilionaceae* y *Caeslpinaceae* tienen trealosa, no se han analizado miembros de *Mimosoideae* (Farías-Rodríguez, 1998).

En los nódulos, la trealosa parece no ser una fuente de energía importante para la FBN, ya que hasta el 80% de la trealosa se recupera en la fracción citosólica vegetal. Además, la gran variación en la acumulación de trealosa por las diferentes cepas parece argumentar en contra del uso de este disacárido en el metabolismo energético del nódulo.

Aunque el papel de la trealosa en la simbiosis *Rhizobium*/leguminosa aún no es muy claro, basándose en las evidencias existentes es posible proponer un papel general de la trealosa: como reserva o almacenamiento en forma de C reducido (Elbein, 1974, Inoue y Shimoda, 1981), tolerancia a condiciones adversa como el estrés hídrico (Burleigh y Dawson, 1994, Farías-Rodríguez *et al.*, 1998), la osmoregulación (Breedveld *et al.*, 1991).

III.6.6. Mecanismo de acción de la trealosa

Entre los diferentes tipos de estrés que pueden afrontar los organismos, la deshidratación es el más común y el mejor entendido. Los principios físicos del mecanismo del daño por una extrema deshidratación son los mismos, sin importar que el organismo sea un animal, microbio o planta. Por lo tanto, los mecanismos por los cuales los organismos sobreviven en anhidrobiosis (vida sin agua) tienen características comunes. Una de estas características es la acumulación de azúcares sobresaliendo la trealosa (De Araujo, 1996).

La trealosa es un disacárido encontrado en altas concentraciones (>20% del peso seco) en muchos organismos que naturalmente sobreviven a la deshidratación. Tales organismos incluyen, por ejemplo, levaduras, plantas de la resurrección, quistes de algunos crustáceos, muchas bacterias, y algunos animales microscópicos (Crowe y Crowe, 2000). La acumulación de grandes cantidades de trealosa por las células anhidrobióticas se ha relacionado directamente con esta tolerancia.

El mecanismo por el cual la trealosa media la tolerancia a la desecación no ha sido completamente determinado, pero parece involucrar efectos sobre proteínas y membranas (Guo *et al.*, 2000). La "hipótesis del reemplazo de agua", es la más aceptada para explicar el mecanismo de acción de la trealosa (Crowe y Crowe, 2000).

En general, se cree que la trealosa reemplaza la cubierta de agua alrededor de las macromoléculas, previniendo el daño causado durante la deshidratación. En las membranas, la trealosa reemplaza a las moléculas de agua alrededor de las cabezas polares de los fosfolípidos en el estado de desecación.

Los ocho grupos hidroxilo de la trealosa son capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos carbonil o fosfato de los lípidos, de tal manera, se cree que este azúcar ocupa un espacio entre las moléculas de lípidos (Crowe *et al.*, 1984b, Crowe y Crowe, 1992, Mazzobre *et al.*, 1997, Potts, 1994). La trealosa puede disminuir la temperatura de la fase de transición de la membrana, de tal manera que permanece en un estado cristalino líquido.

Se supone que esto previene el rompimiento de la membrana durante la rehidratación, por lo tanto preservando la viabilidad de las células. Adicionalmente, la trealosa tiene una alta temperatura de transición vítrea, el cual se define cuando la

viscosidad del citosól alcanza un punto en el cual se evita la difusión del agua, y la solución asume las propiedades mecánicas de un plástico sólido.

Los beneficios de la formación de este estado para un organismo que enfrenta condiciones de deshidratación son muchos. Dicho estado excluye las reacciones químicas que requieren difusión. Lo anterior asegura la estabilidad de la célula durante el período de latencia, previene el colapso de las células, permiten la continuidad de los puentes de hidrógeno en la interfase entre el citosól vítreo y la membrana hidrofílica de las células (Williams y Leopold, 1989, Koster y Leopold, 1988, Mazzobre *et al.*, 1997).

La sequía incide directamente en la fusión y en la fase de transición lipídica. Se ha demostrado que la trealosa inhibe la fusión entre vesículas, pero que dicha inhibición aparentemente no es suficiente para preservarlas. Por esta razón, se ha propuesto que la estabilización observada puede ser explicada si se analizan las fases de transición. Cuando las membranas fosfolipídicas están hidratadas, las moléculas de agua se intercalan entre los grupos fosfato.

Posteriormente, cuando el agua es removida se incrementa el contacto entre las cabezas polares, lo cual ocasiona que aumenten las interacciones de Van Der Waals, conduciendo a un incremento de la temperatura de la fase de transición. Bajo estas condiciones, los lípidos se encuentran en una fase de gel, permitiendo que las membranas se dañen al momento de la rehidratación, ya que ocurre separación de ciertos constituyentes de éstas. Se ha demostrado que la trealosa previene este rompimiento al evitar que se incremente la temperatura de la fase de transición, permitiendo así que los lípidos se mantengan en un estado cristalino en ausencia de agua (Crowe *et al.*, 1992, Leslie *et al.*, 1995, Potts, 1994).

Con respecto a las proteínas, se ha demostrado que la trealosa inhibe su desnaturalización mediante la exclusión del agua de la superficie de la proteína cuando las células están deshidratadas, probablemente reemplazando las moléculas de agua que contribuyen al mantenimiento de un plegado adecuado en la estructura de la proteína, interactuando mediante puentes de hidrógeno de sus grupos OH y los residuos polares en las proteínas manteniendo la estructura terciaria de estas y evitando por lo tanto su desnaturalización.

Así, la trealosa preserva las membranas y proteínas en un estado físico similar a las condiciones cuando están completamente hidratadas, sugiriendo que los grupos hidroxilos de la trealosa pueden interactuar físicamente con los residuos polares de estos componentes celulares (Crowe y Crowe, 2000).

III.6.7. La trealosa en la tolerancia al estrés hídrico en las plantas de frijol

La producción de frijol en México se da principalmente bajo condiciones de temporal, donde se tienen altas posibilidades de que el cultivo se encuentre bajo sequía. Adicionalmente, el frijol es una planta C-3 lo cual la ubica como altamente sensible a la sequía. Sin embargo, diferentes estudios en México sugieren que esta planta posee un mecanismo de tolerancia a la sequía (Farías-Rodríguez, 1998).

El frijol en México se cultiva desde hace 6000 á 7000 años y la evolución de esta especie probablemente ha sido paralela a la de su correspondiente microsimbionte, por lo cual existe gran diversidad de cepas nativas de *Rhizobium*. Además, el frijol se cultiva prácticamente en todo el país y la población de cepas nativas es alta en todos los suelos de México, especialmente en las regiones productoras de frijol, donde las poblaciones de rizobios nativos ascienden hasta 10^6 células g^{-1} suelo, con predominio de cepas inefectivas (Castellanos *et al.*, 1995).

Adicionalmente, estudios en donde se propuso la selección de cepas de alta competitividad, indican que solamente en cuatro de cada diez experimentos la inoculación tiene éxito, ya que al introducir al campo cepas de excelente comportamiento en condiciones controladas, no reproducen su alta competitividad y muestran un pobre comportamiento (Castellanos *et al.*, 1995). Una explicación a lo anterior es que la cooperación metabólica entre los simbioses pueda ir más allá de la FBN (Long, 1989, Quispel, 1988).

Así, la indicación de que la nodulación y la acumulación de trealosa en las leguminosas puede tener un papel en la tolerancia a la sequía, proviene de las observaciones de plantas sin inocular de varios cultivares de frijol, las cuales exhiben una pobre tolerancia a la sequía. Sin embargo, los cultivares Canario y F38, al ser nodulados con cepas nativas, mostraron altas concentraciones de trealosa (0.5 y 3.1 $mg \cdot g^{-1}$ nódulo

respectivamente). Las concentraciones de trealosa en los nódulos se incrementaron bajo condiciones de sequía (3.4 y 10.4 mg g⁻¹ nódulo) y estos cultivares mostraron una excelente resistencia a la sequía. Contrariamente, en los nódulos del cultivar Flor de Mayo Bajío la acumulación de trealosa bajo riego fue de 0.9 mg g⁻¹ nódulo, estos niveles no aumentaron significativamente en la sequía (1.6 mg g⁻¹ nódulo) mostrando una alta sensibilidad al estrés. Esta es la mejor prueba hasta ahora, que la producción simbiótica de trealosa puede beneficiar a la planta hospedera incrementando su tolerancia al estrés (Farías-Rodríguez, 1998).

Resulta de especial interés para nuestro país el género *Phaseolus* dada la importancia de este cultivo para un amplio sector de nuestra sociedad donde se ha encontrado que parámetros como el peso seco no son afectados por el agobio hídrico (50 y 30% de capacidad de campo), aunque algunos otros como el número de nódulos y la actividad nitrogenasa si son afectados (Ramos *et al.*, 1999).

Además se ha puntualizado, que algunas especies de *Rhizobium* son efectivas en virtud de su alta capacidad competitiva y de movilidad en suelos áridos.

Estos resultados sugieren que la nodulación, crecimiento y FBN en varias leguminosas de importancia agrícola pueden ser incrementados efectuando inoculaciones con cepas de diferentes especies de *Rhizobium* tolerantes a sequia y altamente competitivas (Vlassak y Vanderleyden, 1997).

De acuerdo a lo antes expuesto dado que no se tiene información de la producción de trealosa en variedades de frijol silvestre y aun no se han explorado la influencia de hongos micorrízico arbusculares en los mismos y su influencia en la cosimbiosis con *Rhizobium*, se ha planteado la idea de aislar cepas efectivas de diferentes especies de *Rhizobium* a partir de leguminosas nativas de zonas áridas y elaborar con ellas un coctel para nodular diferentes cultivares y especies silvestres del genero *Phaseolus* reconocidos por ser tolerantes a sequia y en presencia de un cosimbionte como lo es *Glomus intraradicces* el cual se sabe que en otros géneros favorece la tolerancia al estrés hídrico . Lo anterior podría derivar en una tolerancia mayor en su conjunto, que en cada uno de los factores involucrados de manera individualizada. Por ello planteamos la siguiente hipótesis.

IV. HIPÓTESIS

La acumulación de trealosa en genotipos de frijol nodulado por *Rhizobium* y su tolerancia hídrica, son afectados por la coinoculación con micorrizas

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la coinoculación *Rhizobium* – *Glomus* en el contenido de trealosa en dos variedades cultivadas y 3 especies silvestres de frijol bajo dos regímenes de riego.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Evaluar el efecto de la coinoculación *Rhizobium* – *Glomus* sobre la acumulación de trealosa en nódulos de genotipos de frijol.
2. Determinar el efecto del estrés hídrico sobre la acumulación de trealosa en plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y *Glomus*, bajo dos regímenes de humedad.
3. Correlacionar el efecto de la acumulación de trealosa sobre diferentes parámetros agronómicos, en frijol sometido a estrés hídrico.

VI. MATERIALES Y METODOS

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO

a) Cepas de *Rhizobium*

Las cepas de *Rhizobium* utilizadas fueron obtenidas a partir de plantas de frijol noduladas en campos de cultivo existentes en la ciudad de Irapuato. Estos aislados fueron denominados FCIN-(1-8). Fueron donados por el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV Unidad Irapuato, los cuales fueron colocadas en cajas de Petri conteniendo extracto de levadura manitol (ELMA) g L^{-1} : K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.1, extracto de levadura 1, manitol 10, agar bacteriológico 18 (pH 7). Las placas se incubaron a 30°C por 48 h.

Se realizó un cultivo “stock” de cada una de los aislados mediante la inoculación del rhizobio en 200 mL de medio 20-E líquido g L^{-1} : KH_2PO_4 0.068, K_2HPO_4 0.087, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.37, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.074, KNO_3 0.506, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.007, $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 0.009, Manitol 1.82, Extracto de levadura 2, glicerol 3.6 mL), incubándose a 30°C por 48 h y una agitación orbital constante de 100 rpm. Una vez en fase logarítmica ($\sim 10^9$ células) se tomaran alícuotas de 1 mL para preparar series de 20 tubos (1.5 mL) de cada una de las cepas adicionando 500 μL de glicerol estéril y almacenados hasta su uso.

b) Micorrizas

El inóculo de esporas de *Glomus intraradicces* fueron donados por el Dr. Javier A. Villegas Moreno coordinador del banco de micorrizas del laboratorio Interacción Planta-Suelo-Microorganismo del Instituto de IIQB de la UMSNH.

VI.2. PREPARACIÓN DE INOCULANTES

Los inóculos de *Rhizobium* utilizados se prepararon partiendo del “stock” preparado previamente., primeramente se generó un preinóculo (activación de la bacteria) tomando una alícuota de 50 μL del stock correspondiente, esta se inoculó en un tubo de

ensaye con 10 mL de medio ELMA. Se incubó a 30 °C por 48 h y en agitación de 100 rpm. Para la inoculación de las plantas se adicionó 1 mL del preinoculo a un matraz de 1 L conteniendo 300 mL de medio ELMA. Estos matraces fueron nuevamente incubados a 30 °C por 48 h y agitación de 100 rpm. Transcurrida la incubación se realizó un análisis microscópico y de morfología colonial para comprobar que las características de las bacterias fueran similares a las del “stock”. Posteriormente, los medios fueron centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos (Beckmann. Rotor JA-20), se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 10 mL de “Buffer” de fosfatos estéril, el inóculo se centrifugó y resuspendió de manera similar otras dos veces. Finalmente las semillas y las plantas fueron inoculadas con esta suspensión de bacterias ($\sim 10^9$ células mL⁻¹).

VI.3. SEMILLAS Y DESINFECCIÓN

Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de los cultivares Flor de Mayo M38 y Pinto Saltillo donadas por el Dr. Jorge Acosta del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campo Celaya, Gto. Y las accesiones de *Phaseolus vulgaris* P1325687, *P. acutifolius* G40142, y *P. filiformis* P1535309 las cuales fueron donadas por la Dra. Jeannette Sofía Bayuelo Jiménez del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales (IIAF) de la UMSNH.

Antes de ser sembradas las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10% y posteriormente enjuagadas con agua destilada estéril tres veces.

VI.4. SUSTRATO Y DESINFECCIÓN

Como sustrato se utilizó arena y suelo franco arcilloso en una proporción 3:1 la arena fue previamente lavada y se esterilizó al igual que el suelo por medio de calor húmedo durante intervalos de 1 h por tres repeticiones (120 °C/15 lb) con intervalos de aireación seguido de una permanencia en la estufa con calor seco a 120 °C por 24 h.

Los recipientes utilizados fueron macetas de plástico con capacidad de 1.5 kg desinfectados con hipoclorito de sodio al 10% y enjuagados con agua destilada estéril.

VI.5. SIEMBRA E INOCULACIÓN DE SEMILLAS

En cada maceta con el sustrato estéril se sembraron a una profundidad de 2 cm, 3 semillas de los cultivares y accesiones arriba mencionados con el fin de asegurar la germinación de por lo menos 1 semilla por maceta. Al momento de la siembra, se efectuó la inoculación con un cultivo líquido (PY) de *Rhizobium* utilizando para ello 1 mL⁻¹/semilla a una densidad de 10⁹ ufc/mL⁻¹. En los tratamientos inoculados con micorrizas se realizó adicionando 1.0 mL de una suspensión con esporas de *Glomus intraradices* en el momento de la siembra antes de cubrir la semilla con el sustrato, realizándose una segunda inoculación a la emergencia del epicotilo.

Se realizó un tratamiento sin inóculo al cual se le adicionó al sustrato previamente esterilizado Urea como fuente de N de acuerdo a la dosis recomendada para la fertilización nitrogenada del cultivo de frijol en una proporción de 80 kg/ha, Denominado para este estudio tratamiento fertilizado.

VI.6. CONDICIONES DE RIEGO

Todos los tratamientos fueron regados a partir de la siembra hasta el inicio del agobio con agua de la llave a capacidad de retención del sustrato, de acuerdo a una prueba determinada previamente y cuyo promedio fue de aproximadamente 40 mL de agua/100g de sustrato cada tercer día.

Se les retiró totalmente el riego a partir del inicio de la etapa R7 (floración), en cada uno de los genotipos estudiado y sometidos a estrés hídrico regando únicamente los tratamientos de riego.

VI.7. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TREALOSA

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la nodulación sobre la acumulación de trealosa en nódulos, raíz, tallo, hoja y semilla, para lo cual se realizó el siguiente ensayo:

Las semillas de frijol fueron embebidas por 30 min en agua estéril. Posteriormente, fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (10 %) por 5 min, lavadas repetidamente con agua estéril. Posteriormente, las semillas fueron inoculadas sumergiéndolas 1 h en un solución de *Rhizobium* en fase estacionaria ($\sim 10^9$ células mL⁻¹) en “Buffer” de fosfatos. Las semillas correspondientes al control y al tratamiento fertilizado con N fueron colocadas en “Buffer” de fosfatos.

Una vez inoculadas, las semillas fueron sembradas en macetas de plástico de 1.5 kg conteniendo arena estéril -suelo franco- arcilloso estéril (3:1) (2 semillas por maceta), las cuales fueron preparadas de la siguiente manera: Antes de ser utilizadas, las macetas fueron lavadas en una solución de hipoclorito de sodio 30 %, y enjuagadas con agua destilada estéril. La arena lavada y tamizada fue colocada en autoclave y esterilizada por calor húmedo a 120 °C por 1 h, por tres días consecutivos el suelo fue esterilizado de la misma manera, antes de ser utilizados se dejaron 24 horas en la estufa a 120 °C para secar totalmente.

Las plantas fueron crecidas bajo condiciones de invernadero en donde fueron regadas cada tercer día con agua corriente y 1 semana antes del muestreo inicial con solución nutritiva Jensen. Para los tratamientos inoculados con *Rhizobium* se utilizó solución Jensen libre de N, mientras que para los controles se utilizó solución Jensen adicionada con KNO₃ 0.05%.

Se realizaron dos re-inoculaciones con las cepas correspondientes para cada tratamiento, durante la emergencia y dos semanas después de la emergencia, regando a las plántulas con 10 mL de solución de bacterias en “Buffer” de P. A las tres semanas después de la emergencia se tomaron aleatoriamente muestras de cada uno de los tratamientos (3 plantas c/u) para evaluar la nodulación, así como de los controles.

Al inicio de la fase R7 (inicio de floración) se realizó la primera colecta de planta completa y se dejaron de regar los tratamientos que se sometieron a sequía y se tomaron muestras cada 8 días de planta completa para determinar las variables fisiológicas y agronómicas.

VI.8. EXTRACCIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES

La extracción de azúcares totales solubles se realizó en los diferentes tejidos de las plantas de frijol y en la semilla como se describe a continuación:

Nódulos

Estos fueron cosechados manualmente a partir de plantas de cada uno de los muestreos evaluados, en promedio se procesaron 100 mg de tejido nodular (3 repeticiones) por muestra y se colocaron en recipientes de 2 mL de capacidad (Alltech). Los nódulos fueron molidos adicionando 500 μ L de etanol 80 %. Posteriormente, se adicionó 1 mL de etanol y se homogenizó. Los viales con la muestra fueron incubados a 95 °C por 30 minutos, y centrifugados a 15000 rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 1.5 mL de etanol 80 % y se repitió el proceso otras dos veces. Al final, las tres fracciones se combinaron y fueron evaporadas a sequedad mediante rotavapor. Los sólidos resultantes fueron recuperados en 1 mL de etanol 80 % y almacenados a 4 °C hasta ser procesados.

Raíz, Tallo, Hoja:

La extracción de azúcares solubles en estos tejidos se realizó de manera similar. Al ser colectada la planta se separó en partes y se pesó para posteriormente ponerlo a secar en un estufa a 120 °C se separaron los diferentes tejidos y fueron molidos en seco. A partir del polvo obtenido de cada tejido, se peso 1 g y se procedió a realizar la extracción de azúcares (3 repeticiones). La muestra (1 g) de tejido fue colocada en tubos de ensaye de 50 mL, adicionándoles 20 mL de etanol al 80 %. Se incubaron a 95 °C por 30 min y se centrifugaron 15 min a 15000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 20 mL de etanol 80 % y se repitió la extracción otras dos veces. Al final el extracto se evaporó en rotavapor y los sólidos se recuperaron en 1 mL de etanol 80 %.

Semillas

Para la extracción de trealosa se tomaron 3 semillas de cada uno de los cultivares analizados. Se eliminó la cutícula con una navaja estéril, la cual fue lavada en etanol

absoluto y flameada entre los diferentes cultivares, posteriormente las semillas fueron molidas hasta obtener un polvo fino del cual se pesó 1g en tubos de ensaye a los cuales se les adicionó 20 mL de etanol 80% (3 repeticiones). Se incubaron las muestras 1 h a 90°C, posteriormente se enfriaron y se centrifugaron a 15000 rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y la pastilla se reextrajo de manera similar otras dos veces. Las fracciones colectadas se evaporaron en rotavapor hasta sequedad. Los sólidos se resuspendieron en 1 mL de etanol 80 % y se almacenan a 4°C hasta su análisis.

VI.9. CUANTIFICACIÓN DE TREALOSA

El análisis de trealosa se realizó mediante la técnica de extracción para azúcares totales solubles, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC, HP6850; MS, HP5873), para lo cual los extractos fueron derivatizados para obtener la forma aldonitrilo-peracetilada de los azúcares de acuerdo a Macías *et al.* (2000). La derivatización se realizó en campana de extracción de la siguiente manera: A partir del extracto etanólico obtenido de la fase anterior, se transfirió 100 µL de cada una de las muestras a recipientes de 2 mL (Alltech.). Se adicionaron 25 µg de perseitol (estándar interno) y se evaporó a sequedad a 65°C y flujo de N₂, los sólidos fueron resuspendidos en 1 mL de diclorometano y evaporados a sequedad, nuevamente bajo las mismas condiciones, éste proceso se realizó un total de tres veces. Posteriormente, a la muestra se le adicionó una solución de piridina/cloruro de hidroxilamina (3 mL x 53 mg v/w) preparada al momento del análisis. La muestra fue sonicada por 30 minutos, después se agitó en vortex y se incubó 1 h a 85°C (agitándose nuevamente a los 30 min). Trascurrido este tiempo se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de anhídrido acético y 500 µL de piridina y se incubó 30 min a 85 °C. Una vez enfriadas las muestras fueron transferidas a tubos de ensaye de 50 mL de capacidad, se adicionaron 2 mL de cloroformo y 2mL de agua desionizada. Se agitó en vortex y se dejó reposar hasta la separación de las fases acuosa y orgánica. Posteriormente, se eliminó la fase acuosa y a la muestra se le adicionó 1 mL de agua desionizada y se agitó nuevamente (este proceso de lavado se realizó en total 10 veces). Al eliminarse la última fase acuosa, la fase orgánica fue filtrada a través de una columna con sulfato de sodio anhídrido y diluida con 2 mL de cloroformo (para eliminar por completo el agua de la

muestra). El filtrado resultante se evaporó a sequedad y las muestras fueron almacenadas hasta su análisis. Adicionalmente, el estándar de trealosa fue derivatizado de la misma manera con la finalidad de obtener el espectro de masas y tiempo de retención específico de cada compuesto. Para el análisis por GC-MS, los azúcares derivatizados fueron resuspendidos en 100 μL de cloroformo grado espectrofotométrico. Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

Inyección. 1 μL con split 2:1.

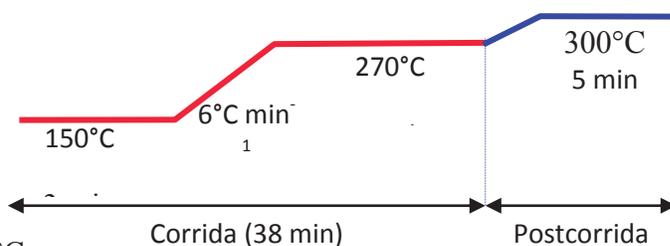
Inyector: 300 $^{\circ}\text{C}$.

Columna: HP-5MS.

Gas acarreador: Helio.

Flujo: constante 1 mL min^{-1} , postcorrida 1.5 mL min^{-1} .

Horno:



Detector: 300 $^{\circ}\text{C}$.

La identificación de trealosa se realizó mediante la comparación con los espectros de masas de los estándares. La cuantificación se realizó en base al área bajo la curva obtenida a partir de los cromatogramas.

VI.10. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS

Área foliar

La totalidad de las hojas de cada planta muestreada fueron cortadas y colocadas en un medidor de área foliar LI-COR, mod. LI-3100, E.U.A. (Cárdenas-Navarro *et al.*, 1998).

Biomasa

A cada planta se le determinó peso fresco y peso seco de cada uno de los órganos, raíz, tallo, hoja y nódulos en una balanza analítica (Mettler Toledo LI-3100). El peso seco de las muestras se obtuvo después de que permanecieron 48 h en la estufa (Felisa mod.FE-293D) a 105°C (Cárdenas-Navarro *et al.*, 1998).

Contenido relativo de agua en hojas (CRA)

El CRA se desarrolló de acuerdo al método descrito por Turner, (1986) tomando con un sacabocados 3 muestras de hoja de 2 mm de diámetro por planta. Los discos fueron pesados en fresco y colocados en agua destilada estéril durante 4 hs. Una vez transcurrido ese tiempo, se midió peso turgente en fresco y fueron secados en un horno a una temperatura de 75 °C durante 4 hs. Posteriormente, se determinó el peso seco de los discos en una balanza analítica. La determinación de CRA se efectuó por medio de la siguiente relación matemática usando 3 repeticiones por tiempo y tres discos por planta:

$$CRA = \frac{(PF - PS) \times 100}{(PT - PS)}$$

Donde: PF = Peso Fresco

PS = Peso Seco

PT = Peso Túrgido

VI.11. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN EN RAÍCES

Las raíces fueron lavadas con agua y cortadas en segmentos de 0.5 a 1 cm. Y se procedió a la determinación del porcentaje de colonización micorrícica, el cual se evaluó mediante el clareo (KOH 10 %), acidificación (HCl) y tinción de raíces con azul de Tripano de acuerdo a la técnica descrita por Phillips y Hayman (1970), en combinación con la técnica de intersección de segmentos colonizados descrita por McGonigle *et al.* (1990), la cual permite evaluar el porcentaje de colonización correspondiente a cada una de las estructuras formadas durante la simbiosis: arbusculos, hifas y vesículas.

VI.12. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Para la observación de muestras en microscopia electrónica de barrido se utilizó la técnica de fijación con glutaraldehído y deshidratación alcohólica a diferentes concentraciones, para posteriormente aplicarle un baño metálico de cobre, oro ó plata y ser entonces las muestras observadas y analizadas en el microscopio electrónico de barrido Jeol 6400 perteneciente al Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la UMSNH.

VI.13. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con diferentes factores de estudio y repeticiones para cada una de las variables experimentales determinadas.

Las variables que se midieron para cada genotipo fueron Acumulación de trealosa, área foliar, biomasa, contenido relativo de Agua (CRA) y % de micorrización (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Diseño experimental

GENOTIPOS	TRATAMIENTOS	FACTORES	REPETICIONES	MACETAS
<i>Phaseolus vulgaris.</i>	<i>Rhizobium</i>	Riego	3	6
	<i>Glomus intraradices</i>		3	6
	<i>Rhizobium/Glomus</i>	Sequía	3	6
	Fertilizado (N)		3	6
	Testigo		3	6
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de mayo	<i>Rhizobium</i>	Riego	3	6
	<i>Glomus intraradices</i>		3	6
	<i>Rhizobium/Glomus</i>	Sequía	3	6
	Fertilizado (N)		3	6
	Testigo-		3	6
<i>Phaseolus acutifolius.</i>	<i>Rhizobium</i>	Riego	3	6
	<i>Glomus intraradices</i>		3	6
	<i>Rhizobium/Glomus</i>	Sequía	3	6
	Fertilizado (N)		3	6
	Testigo		3	6
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto saltillo	<i>Rhizobium</i>	Riego	3	6
	<i>Glomus intraradices</i>		3	6
	<i>Rhizobium/Glomus</i>	Sequía	3	6
	Fertilizado		3	6
	Testigo		3	6
<i>Phaseolus filiformis.</i>	<i>Rhizobium</i>	Riego	3	6
	<i>Glomus intraradices</i>		3	6
	<i>Rhizobium/Glomus</i>	Sequía	3	6
	Fertilizado (N)		3	6
	Testigo		3	6

En la siguiente tabla se describe el diseño experimental utilizado para cada genotipo, los niveles de estudio, así como las repeticiones que se realizaron.

Tabla 3. Diseño experimental por genotipo.

GENOTIPOS	TRATAMIENTO	FACTORES	Muestreo (Días)	No. de Macetas	
<i>Phaseolus vulgaris.</i>	<i>Rhizobium</i>	Riego	0	3	
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de mayo			8	3	
<i>Phaseolus acutifolius.</i>			16	3	
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto saltillo		Sequía	0	3	
<i>Phaseolus filiformis.</i>			8	3	
			16	3	
<i>Phaseolus vulgaris.</i>		<i>Glomus intraradices</i>	Riego	0	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de mayo				8	3
<i>Phaseolus acutifolius.</i>				16	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto saltillo			Sequía	0	3
<i>Phaseolus filiformis.</i>	8			3	
	16			3	
<i>Phaseolus vulgaris.</i>	<i>Rhizobium/Glomus</i>		Riego	0	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de mayo				8	3
<i>Phaseolus acutifolius.</i>				16	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto saltillo			Sequía	0	3
<i>Phaseolus filiformis.</i>		8		3	
		16		3	
<i>Phaseolus vulgaris.</i>		Fertilizado (N)	Riego	0	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de mayo				8	3
<i>Phaseolus acutifolius.</i>				16	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto saltillo			Sequía	0	3
<i>Phaseolus filiformis.</i>	8			3	
	16			3	
<i>Phaseolus vulgaris.</i>	Testigo		Riego	0	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Flor de mayo				8	3
<i>Phaseolus acutifolius.</i>				16	3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto saltillo			Sequía	0	3
<i>Phaseolus filiformis.</i>		8		3	
		16		3	

Diseño	Nivel de Estudio	Repeticiones por Genotipo	Total de plantas
DCA	5 X 3	90	450

VI.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado mediante el programa STATISTICA data analysis software system (versión 7.0, StatSoft Inc. Tulsa.) Evaluados mediante un diseño completamente al azar de significancia ($p < 0.1$, 0.05 , y 0.01). Usando un análisis factorial de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias (Tukey).

VII. RESULTADOS

VII.1. ACUMULACIÓN DE TREALOSA EN PLANTAS DE FRIJOL SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO

VII.1.1. Trealosa en nódulos

VII.1.1.1. *Phaseolus vulgaris* P1325687

En este genotipo, se pudo observar que a los 8 días del estrés por sequía la acumulación de trealosa incrementó de 4.5 g⁻¹ hasta 7.2 g⁻¹, llegando a los 9.3 g⁻¹ a los 16 días de tratamiento (Figura 4). En las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus*, la concentración de trealosa también incrementó a los 8 y 16 días, desde 2.4 hasta 3.0 g⁻¹, en comparación a las plantas control.

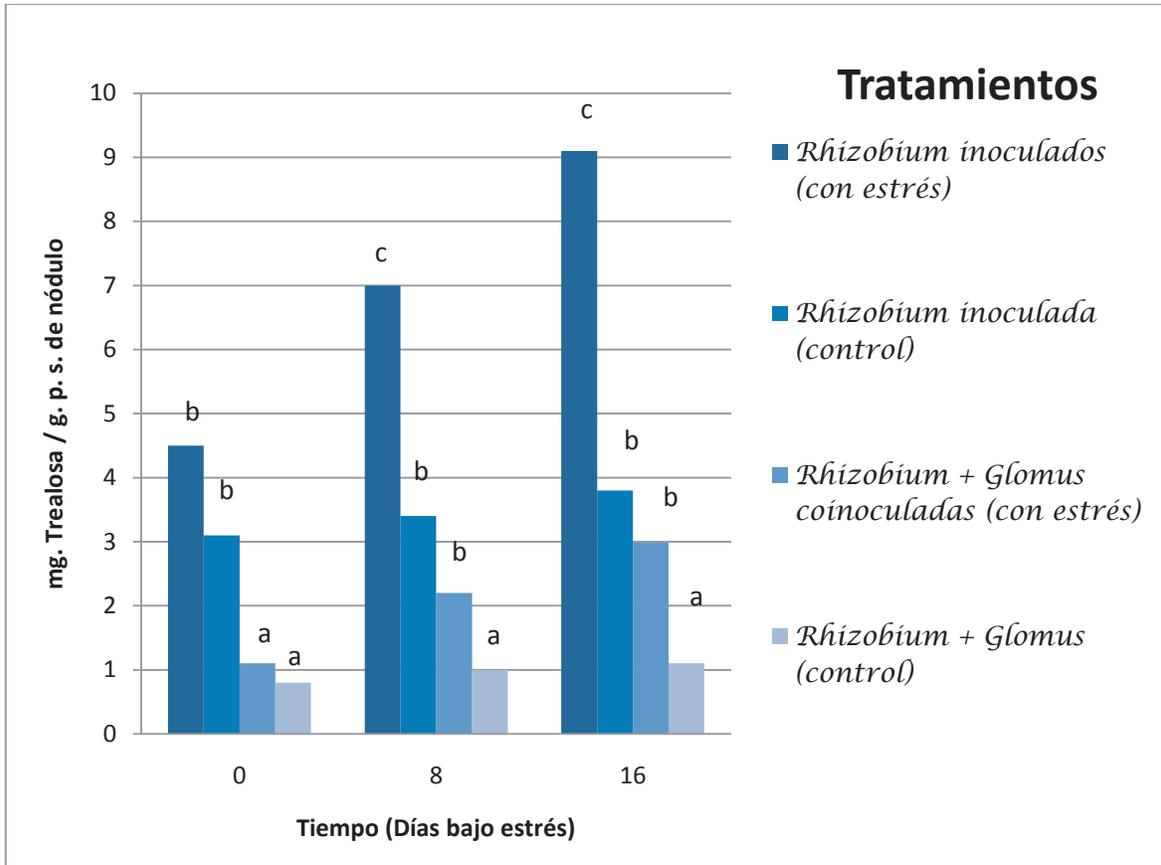


Figura 4. Acumulación de trealosa en nódulos de *P. vulgaris* P1325687 inoculado y coinoculado con *G.intraradicces* y *Rhizobium*. A las plantas sometidas a sequía se les suspendió la aplicación de agua y se cuantificó trealosa en los nódulos a los 8 y 16 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$).

VII.1.1.2. *Phaseolus vulgaris* Flor de Mayo M38

Bajo estrés hídrico los niveles de trealosa en los nódulos de plantas inoculadas con *Rhizobium* se incrementaron de 2.8 g^{-1} a 3.1 mg a los 16 días de tratamiento, comparado con el control donde los niveles de trealosa se mantuvieron constantes, en promedio 2 g^{-1} . (Figura 5). Por otra parte, en los tratamiento coinoculados con *Rhizobium* y *Glomus*, en condiciones de sequia, no se observó incremento en las concentraciones de trealosa ya que los valores se mantuvieron constantes (en promedio 1 g^{-1}) y similares estadísticamente al control.

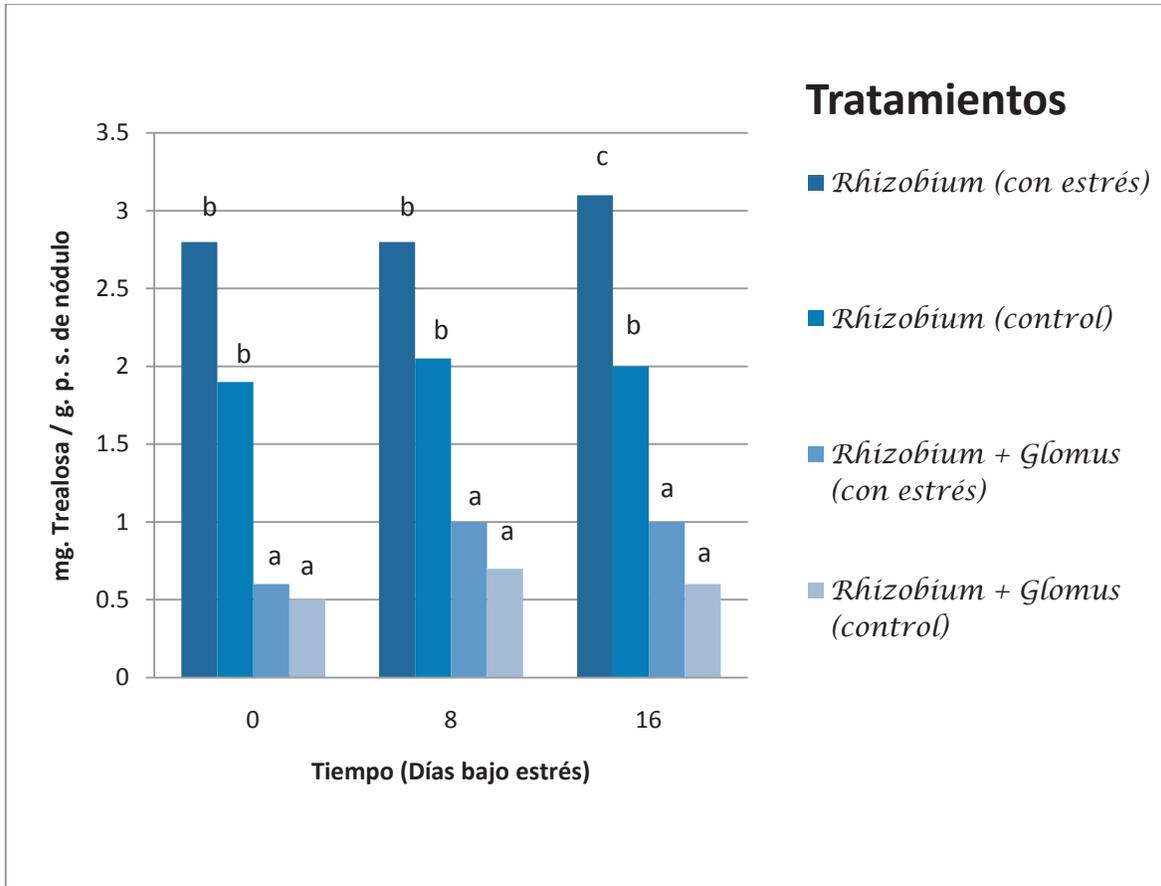


Figura 5. Acumulación de trealosa en nódulos de *P. vulgaris* cv. Flor de Mayo M38 inoculado y coinoculado con *G.intraradicces* y *Rhizobium*. A las plantas sometidas a sequía se les suspendió la aplicación de agua y se cuantificó trealosa en los nódulos a los 8 y 16 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$).

VII.1.1.3. *Phaseolus acutifolius* P40142

Para *P.acutifolius* se obtuvieron valores iniciales de 2.3 g^{-1} trealosa, en el tratamiento inoculado solo con *Rhizobium* y en condiciones de estrés (Figura 6). Sin embargo, a los 8 días de estrés se observaron incrementos hasta de 4 g^{-1} de trealosa y una disminución de 2.3 g^{-1} a los 16 días. El tratamiento coinoculado con *Rhizobium* y *Glomus*, bajo estrés, presentó niveles iniciales de trealosa de 0.8 g^{-1} , observándose después un incremento significativo de 2.5 g^{-1} a los 8 días. Estos niveles se mantuvieron igual a los 16 días de tratamiento. Por otra parte, en los tratamientos control coinoculados, las diferencias observadas en las concentraciones de trealosa, en los nódulos, no fueron estadísticamente significativas.

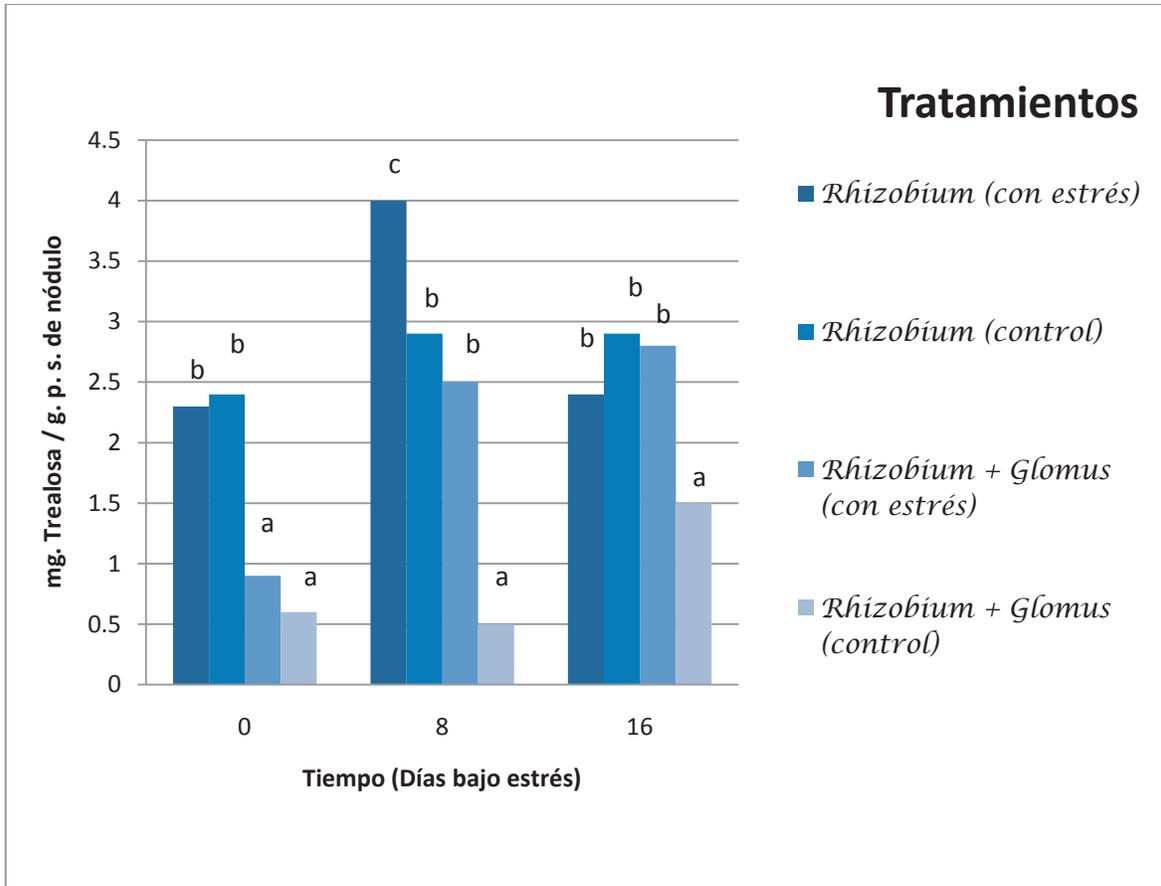


Figura 6. Acumulación de trealosa en nódulos de *P. acutifolius* P40142 inoculado y coinoculado con *G.intraradicceses* y *Rhizobium*. A las plantas sometidas a sequía se les suspendió la aplicación de agua y se cuantificó trealosa en los nódulos a los 8 y 16 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$).

VII.1.1.4. *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto Saltillo

Los valores de trealosa acumulada en los nódulos de *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo en plantas inoculado y coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* se incrementó conforme transcurrió el tiempo, como respuesta al estrés hídrico. (Figura 7). Concentraciones de trealosa de 4.2 mg se elevaron a 6 g⁻¹ a los 8 días y hasta 7 g⁻¹ a los 16 días del tratamiento. En los nódulos de las plantas coinoculadas, con *Rhizobium* y *Glomus*, se observaron valores de trealosa que fluctuaron desde 2 g⁻¹, al inicio del tratamiento, hasta 5 g⁻¹ a los 8 días y 6.5 g⁻¹ de trealosa a los 16 días en los nódulos de las plantas sometidas a estrés hídrico.

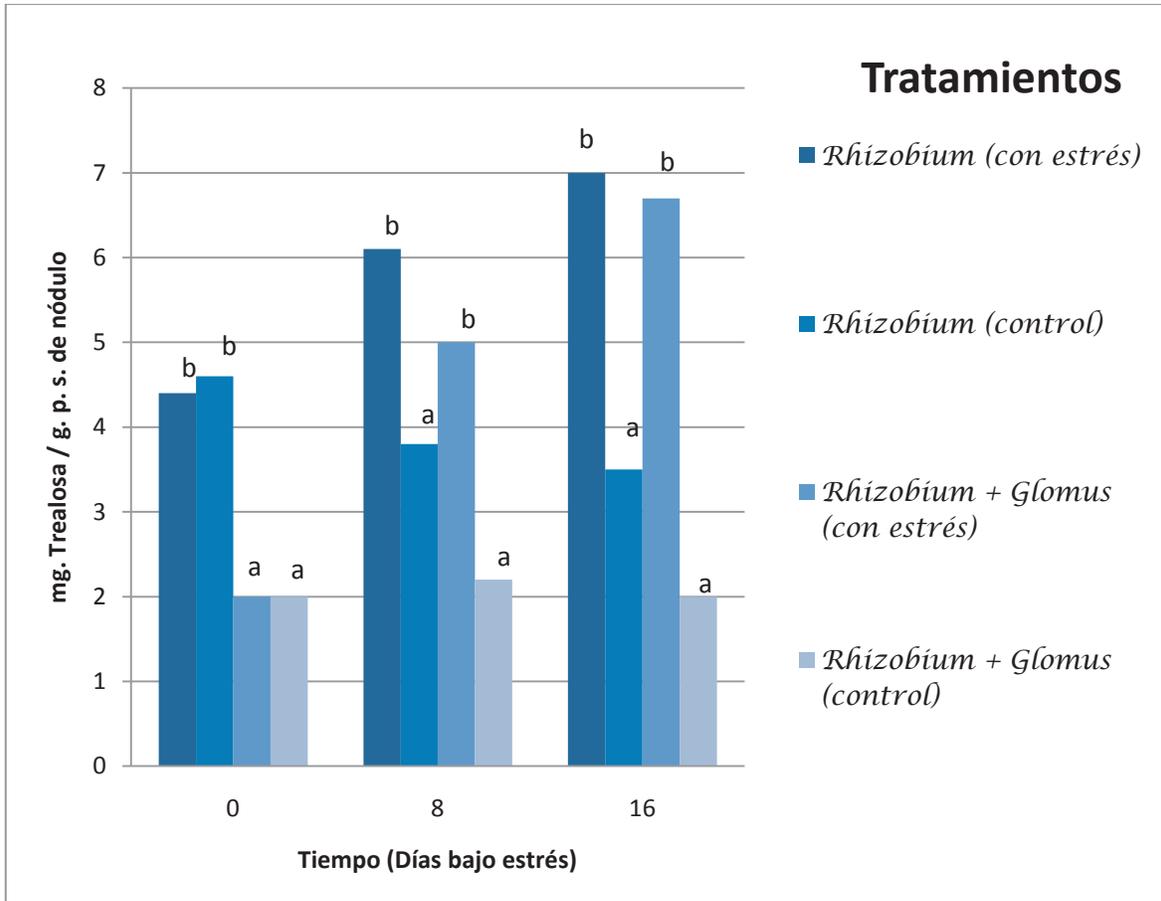


Figura 7. Acumulación de trealosa en nódulos de *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo inoculado y coinoculado con *G.intraradicces* y *Rhizobium*. A las plantas sometidas a sequía se les suspendió la aplicación de agua y se cuantificó trealosa en los nódulos a los 8 y 16 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$).

VII.1.1.5. *Phaseolus filiformis* p1535309

En *P. filiformis* los valores de trealosa en nódulo de las plantas sometidas a estrés hídrico e inoculado con *Rizobium* variaron de 4.2 g^{-1} a 5.7 g^{-1} a los 8 días, llegando hasta 7.3 g^{-1} de trealosa a los 16 días de experimentación. (Figura 8). En el tratamiento sin estrés (control) inoculado con *Rhizobium* las concentraciones de trealosa se mantuvieron sin cambio, con valores de 4 g^{-1} a 5 g^{-1} . Por otra parte, En el tratamiento coinoculado con *Rhizobium* y *Glomus*, bajo estrés hídrico, las concentraciones de trealosa se incrementaron de 0.8 g^{-1} a 2.6 g^{-1} a los 8 días, llegando a 7.2 g^{-1} a los 16 días, mientras que en el tratamiento control no se observaron diferencias significativas en el transcurso del ensayo.

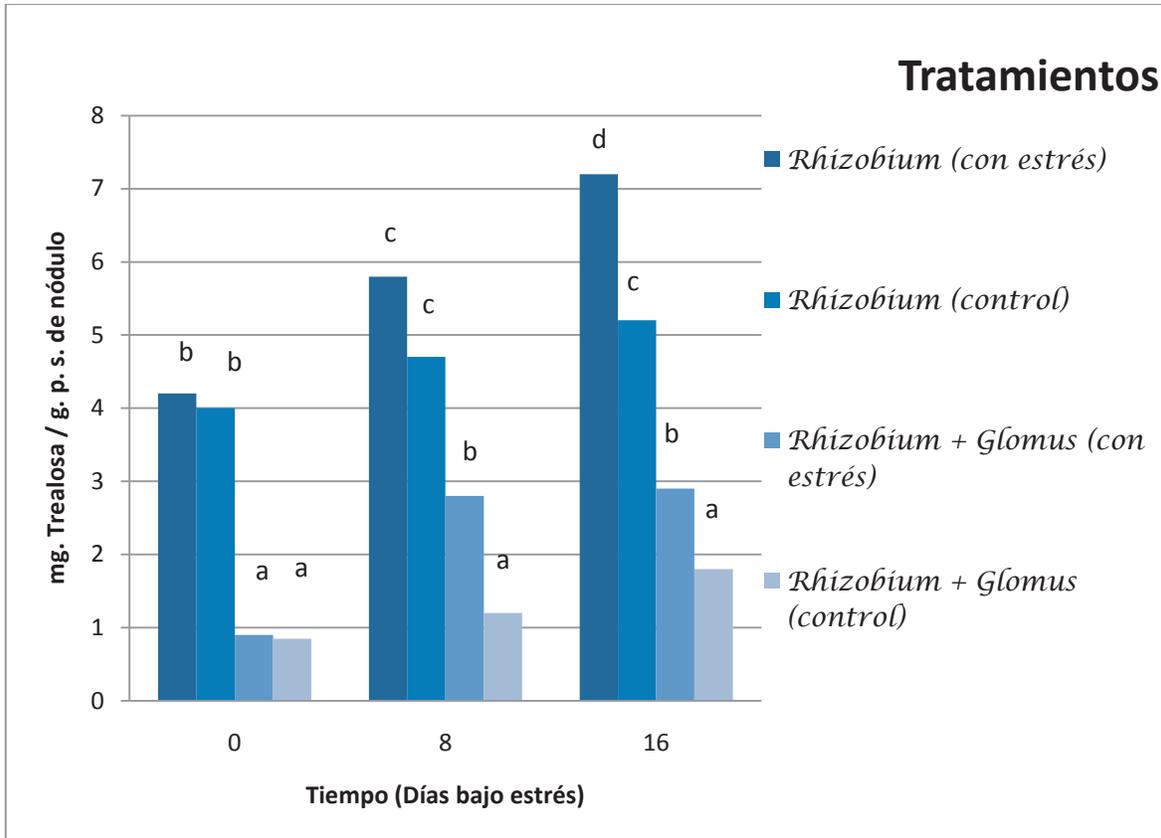


Figura 8. Acumulación de trealosa en nódulos de *P. filiformis* p1535309 inoculado y coinoculado con *G.intraradices* y *Rhizobium*. A las plantas sometidas a sequía se les suspendió la aplicación de agua y se cuantificó trealosa en los nódulos a los 8 y 16 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$).

VII.1.2. Acumulación de trealosa en raíz

La trealosa solamente se detectó en las raíces noduladas, previamente inoculadas con *Rhizobium* bajo condiciones de riego normal y agobio hídrico (Tabla 4). No se detectó trealosa en las raíces inoculadas solo con *Glomus*, fertilizado y testigo ni en la coinoculación con *Rhizobium* y *Glomus*

En condiciones de estrés hídrico, la concentración de trealosa/g.p.s en la raíz de *P.vulgaris* fue de 30 μg al inicio del muestreo, 46 μg a los 8 días y 55 μg a los 16 días.

Para *P.acutifolius* el contenido de trealosa fue de 18 μg al inicio del muestreo, 30 μg a los 8 días y 40 μg a los 16 días.

Para *P. filiformis* la acumulación de trealosa fue de 35 al inicio del muestreo, 44 μg a los 8 días y un máximo de acumulación de 58 μg de trealosa a los 16 días de estrés hídrico

Para el cv. Flor de mayo el contenido de trealosa fue de 10 μg al inicio del muestreo y se incremento a 15 μg a los 8 días manteniéndose así hasta los 16 días no mostrando diferencia significativa entre los tres muestreos, de manera similar en el cv. Pinto Saltillo, se detectó una acumulación de trealosa de 21 μg al inicio, 28 μg a los 8 días y de 32 μg de trealosa a los 16 días, no encontrándose diferencia significativa entre los tres muestreos.

Las concentraciones de trealosa fueron mayores en condiciones de sequía que en riego para todos los genotipos silvestres mientras que para los cultivados no se presentaron diferencias significativas en el contenido de trealosa bajo las dos condiciones.

Tabla 4. Contenido de trealosa en raíces de genotipos de frijol previamente inoculado con *Rhizobium*, bajo estrés hídrico

GENOTIPO		0 días	8 días	16 días
<i>P. vulgaris</i>	C	22 a	22 a	23 a
	S	30 a	46 b	55 b
<i>P. acutifolius</i>	C	19 a	20 a	20 a
	S	18 a	30 b	40 b
<i>P. filiformis</i>	C	33 a	36 a	33 a
	S	35 a	44 a	58 b
<i>P.vulgaris</i> cv. Flor de Mayo	C	9 a	10 a	10 a
	S	10 a	15 a	15 a
<i>P.vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo	C	20 a	20 a	19 a
	S	21a	25 a	32 a

C= CONTROL S= SEQUÍA

Los valores son en μg de trealosa /g.p.s y representan el promedio de 3 repeticiones. Valores con diferente letra, en la misma hilera, son significativamente diferentes (Tuckey, $P < 0.05$)

VII.1.3. Trealosa en tallo

En el análisis de trealosa en tallo, en todos los genotipos de los diferentes tratamientos y bajo las dos condiciones, no se encontró trealosa en ningún genotipo.

VII.1.4. Trealosa en hojas

No se observaron diferencias significativas en los tratamientos y únicamente se detecto trealosa en los tratamientos inoculados con *Rhizobium* y coinoculado con *Rhizobium* y *Glomus* (Tabla 5). Encontrando una mayor cantidad de azúcar en los tratamientos inoculados solo con *Rhizobium* y en condición de sequía.

Tabla 5. Contenido de trealosa en hojas de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* bajo dos regímenes de riego

GENOTIPO		INOCULADO (<i>Rhizobium</i>)	COINOCULADO (<i>Rhizobium</i> y <i>Glomus</i>)
<i>P. vulgaris</i>	C	6 a	3 a
	S	9 a	5 a
<i>P. acutifolius</i>	C	7 a	4 a
	S	9 a	5 a
<i>P. filiformis</i>	C	7 a	6 a
	S	9 a	7 a
<i>P. vulgaris</i> cv. Flor de Mayo	C	5 a	3 a
	S	6 a	5 a
<i>P. vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo	C	5 a	4 a
	S	9 a	6 a

C= CONTROL S= SEQUÍA

Los valores son en μg de trealosa /g.p.s y representan el promedio de 3 repeticiones. Valores con diferente letra, en la misma hilera, son significativamente diferentes (Tuckey, $P < 0.05$)

VII.1.5. Acumulación de trealosa en semilla

Los resultados del experimento mostraron que únicamente en las semillas provenientes de las plantas inoculadas con *Rhizobium* (noduladas) y en las coinoculadas *Rhizobium-Glomus* (nodulado-micorrizado) se acumuló trealosa. (Tabla 6). Siendo mayor la acumulación de trealosa en las semillas de plantas previamente inoculadas con *Rhizobium* y bajo la condición de sequía que la concentración de trealosa detectada en semillas de plantas previamente coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus*.

En *P. vulgaris*, el contenido de trealosa máximo fue de 45 μg en las semillas de plantas inoculadas solo con *Rhizobium* y bajo sequía, mientras que las coinoculadas presentaron una acumulación de trealosa de 22 μg

Las semillas de plantas de *P. acutifolius* inoculadas con *Rhizobium* y bajo estrés mostraron una mayor acumulación de trealosa (36 μg) que las semillas provenientes de plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (19 μg)

Para *P. filiformis* se presentó la mayor acumulación de trealosa en semillas de plantas que fueron crecidas bajo condiciones de estrés hídrico, con valores de 50 μg en los tratamientos previamente inoculación con *Rhizobium*, en comparación a lo observado en los tratamientos previamente coinoculados con *Rhizobium* y *Glomus*, donde se cuantificaron concentraciones de trealosa de 34 μg .

En las semillas de *P. vulgaris* cv. Flor de Mayo no se observó diferencia significativa en el contenido de trealosa. Sin embargo, se observó como tendencia una mayor concentración de trealosa en aquellas semillas provenientes de plantas inoculadas con *Rhizobium*, comparadas con las semillas de plantas coinoculadas.

Finalmente, en *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo las semillas de plantas inoculadas con *Rhizobium* también mostraron contener una mayor concentración de trealosa (45 μg) que las semillas de plantas que fueron coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus*, donde se observaron valores de 25 μg .

Tabla 6. Acumulación de trealosa en semillas de genotipos de frijol inoculados con *Rhizobium* y coinoculados con *Rhizobium* y *Glomus* de plantas sometidas a estrés hídrico

		INOCULADO (<i>Rhizobium</i>)	COINOCULADO (<i>Rhizobium</i> y <i>Glomus</i>)
<i>P. vulgaris</i>	C	22 a	17 a
	S	45 b	22a
<i>P. acutifolius</i>	C	23 a	15 a
	S	36b	19 a
<i>P. filiformis</i>	C	22 a	18 a
	S	50b	34 a
<i>P. vulgaris</i> cv. Flor de Mayo	C	15 a	10 a
	S	10 b	4 a
<i>P. vulgaris</i> cv. Pinto Saltillo	C	26b	13 a
	S	45 b	25 a

C= CONTROL S= SEQUÍA

Los valores son en μg de trealosa /g.p.s y representan el promedio de 3 repeticiones. Valores con diferente letra, en la misma hilera, son significativamente diferentes (Tuckey, $P < 0.05$)

VII.2. ÁREA FOLIAR DE FRIJOL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN Y ESTRÉS HÍDRICO

En *P. vulgaris* el tratamiento micorrizado presentó la mayor área foliar en condiciones de estrés (66 cm^2), lo cual fue similar a lo observado en los tratamientos fertilizados. (Tabla 7). Para *P. vulgaris* cv FM38 la mayor área foliar (155 cm^2) fue observada en las plantas inoculadas con *Rhizobium*. Este valor coincidió con el presentado en las plantas fertilizadas (Control 1).

En *P. acutifolius* ,los tratamientos micorrizados y bajo estrés hídrico mostraron más área foliar (210 cm^2) junto con el tratamiento inoculado con *Rhizobium* (100 cm^2). En relación a *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo se obtuvo el valor de (149 cm^2) en el tratamiento sometido a sequía y que fue previamente coinoculado, cuyo valor fue mayor que los controles y aquellos inoculados con *Rhizobium* (115 cm^2).

Para *P. filiformis* fue interesante observar que el valor más alto se presentó en el tratamiento inoculado con *Rhizobium*, alcanzando valores de 38 cm². En este caso el tratamiento micorrizado y el coinoculado fueron similares al control fertilizado. (20 cm²)

Tabla 7. Área foliar (cm²) de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* sometidas a estrés hídrico.

Genotipos		NODULADO <i>Rhizobium</i>	MICORRIZADO <i>Glomus</i>	NODULADO Y MICORRIZADO <i>Rhizobium-Glomus</i>	CONTROL 1	CONTROL 2
<i>P. vulgaris</i>	C	65 a	91 b	110 c	132 c	81 b
	S	40 a	66 b	53 a	66 b	35 a
cv. Flor de Mayo	C	160 a	162 a	210 b	274 c	210 b
	S	155b	90 a	106 a	152 b	105 a
<i>P. acutifolius</i>	C	180 b	55 a	160 b	310 c	305 c
	S	100 a	210 b	94 a	100 a	76 a
Pinto Saltillo	C	152 a	185 a	180 a	250 b	120 a
	S	115 b	100 a	149 b	86 a	65 a
<i>P. filiformis</i>	C	34 a	24 a	32 a	81 b	28 a
	S	38c	15 b	18 b	20 b	5.8 a

C= CONTROL

S= SEQUIA (Tuckey, p < 0.05)

Valores con diferente letra en la misma hilera son significativamente diferentes (Tuckey, p < 0.05).

CONTROL 1, Tratamiento fertilizado (urea)

CONTROL 2: tratamientos sin inóculo ni fertilizante.

VII.3. BIOMASA DE GENOTIPOS DE FRIJOL SOMETIDO A SEQUÍA Y BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN

Los valores obtenidos para la biomasa total mostraron diferencias en relación al tratamiento y al genotipo (Tabla 8). Para *P. vulgaris* se observó que el tratamiento con mayor biomasa en condiciones de sequía, fue el inoculado con *Rhizobium* con valores de 1.2 g^{-1} . Este valor fue estadísticamente igual al fertilizado, mientras que el tratamiento coinoculado fue el más bajo (0.45 g^{-1}) similar al testigo 0.35 g^{-1} y al micorrizado 0.65 g^{-1} .

Para *P. acutifolius*, en condiciones de sequía, el tratamiento con *Rhizobium* fue el mejor con valores de 1.45 g^{-1} estadísticamente igual a la biomasa obtenida en el tratamiento fertilizado

Para *P. Filiformis* la mayor biomasa en condiciones de sequía fue en el tratamiento inoculado solo con *Rhizobium* con valores de 0.52 g^{-1} , estadísticamente mayor que el resto de los tratamientos.

En Flor de Mayo el tratamiento con *Rhizobium* dio valores de 1.85 g^{-1} estadísticamente igual al valor obtenido para el tratamiento fertilizado que fue de 1.75 g^{-1} . En condiciones de sequía.

Para el cultivar Pinto Saltillo el tratamiento fertilizado fue el mayor con un valor de 2.9 g^{-1} , mientras que de los tratamientos inoculados en *Rhizobium* y *Glomus*, por separado se encontraron valores significativamente similares 1.8 g^{-1} para *Glomus* y 2 g^{-1} , para *Rhizobium* y el tratamiento coinoculado presento la menor biomasa (1 g^{-1}).

Tabla 8. Biomasa total al término de 16 días de estrés por sequía bajo los diferentes tratamientos (g^{-1})

GENOTIPOS		NODULADO <i>Rhizobium</i>	NODULADO Y MICORRIZADO <i>Rhizobium- Glomus</i>	MICORRIZADO <i>Glomus</i>	FERTILIZADO Control 1	TESTIGO Control 2
<i>P. vulgaris</i>	C	1.6a	1.6a	0.96a	2.2b	1.2a
	S	1.2b	0.45a	0.65a	1.25b	0.35a
<i>P. acutifolius</i>	C	2.0a	1.6a	1.7a	3.4b	2.0a
	S	1.45b	1.0a	0.78a	1.3b	0.6a
<i>P. filiformis</i>	C	1.38b	0.72a	0.72a	1.62b	0.6a
	S	0.52b	0.31a	0.37a	0.35a	0.28a
<i>P. vulgaris</i> cv. Flor de mayo	C	2.4b	1.5a	2.0a	2.9b	1.4a
	S	1.85b	1.15a	1.31b	1.75b	0.9a
<i>P. vulgaris</i> . cv. Pinto Saltillo	C	2.7c	1.45b	2.1c	3.4c	0.5a
	S	2.0b	1.0a	1.8b	2.9c	0.9a

C= CONTROL S= SEQUÍA

Valores con diferente letra en la misma hilera son significativamente diferentes (Tuckey, $p < 0.05$).

CONTROL 1, Tratamiento fertilizado (urea)

CONTROL 2: tratamientos sin inóculo ni fertilizante.

VII.4. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA) EN HOJAS DE FRIJOL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN

VII.4.1. *Phaseolus vulgaris* P132568

En las plantas inoculadas el genotipo *P. vulgaris* P132568 inoculado sólo con *Rhizobium* y luego sometidas a sequía, se observó que a los 8 días el contenido relativo de agua en hoja fue de 80 %, (Figura 9). Este valor disminuyó a los 16 días hasta 45 %.

En el caso de las plantas inoculadas sólo con *Glomus*, disminuyó a 63 % a los 8 días y a 22 % a los 16 días. Con la mezcla de *Glomus* y *Rhizobium* el contenido relativo de agua en las hojas mostró un comportamiento similar a los 8 y a los 16 días. Sin embargo, en los tratamientos coinoculados se observaron valores de 30 % al término de los 16 días, 8 % mayor que los que se presentaron en las plantas inoculadas solo con *Glomus*.

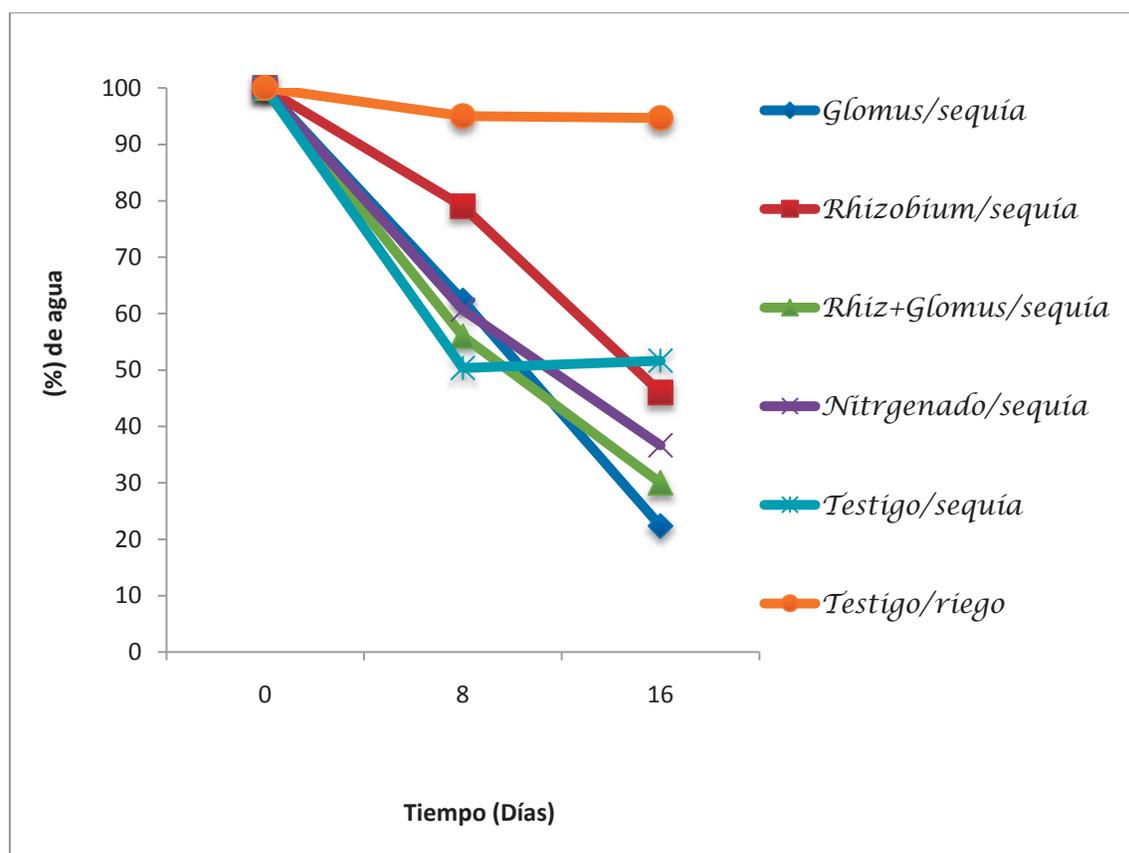


Figura 9. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *P. vulgaris* P132568.

VII.4.2. *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo M38

Para *P. vulgaris* cv. Flor de Mayo en las plantas inoculadas con *Rhizobium* y luego sometidas a sequía, a los 8 días se observó que el contenido de agua en hoja disminuyó a 70 % y 40 % a los 16 días de tratamiento (Figura 10). En las plantas coinoculadas y sometidas a sequía el contenido de agua disminuyó a 42 % a los 8 días y 24 % a los 16 días, el CRA en las plantas inoculadas solo con *Glomus* se observó una disminución de 50 % a los 8 días y de un 33 % a los 16 días, valores estadísticamente similares al tratamiento fertilizado.

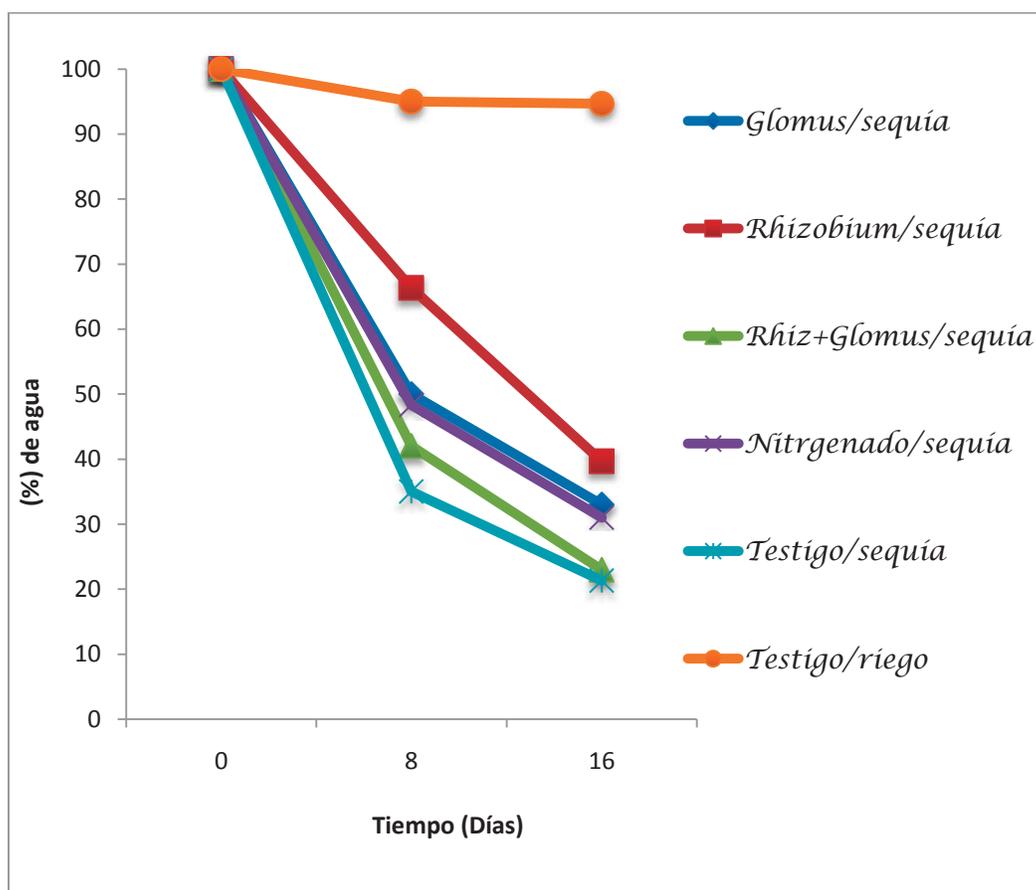


Figura 10. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *P. vulgaris* cv. Flor de Mayo M38.

VII.4.3. *Phaseolus acutifolius* G40142

En relación a las plantas de *P. acutifolius* inoculadas con *Rhizobium* y luego sometidas a sequía, se observó a los 8 días una disminución a 58 % en el CRA y de 42 % a los 16 días de tratamiento. (Figura 11). El tratamiento inoculado sólo con *Glomus* presentó un comportamiento similar al tratamiento fertilizado, disminuyendo a 48 % a los 8 días y 34 % a los 16 días y las plantas coinoculadas y sometidas a sequía el contenido de agua en hoja disminuyó a 42 % a los 8 días y 25 % a los 16 días.

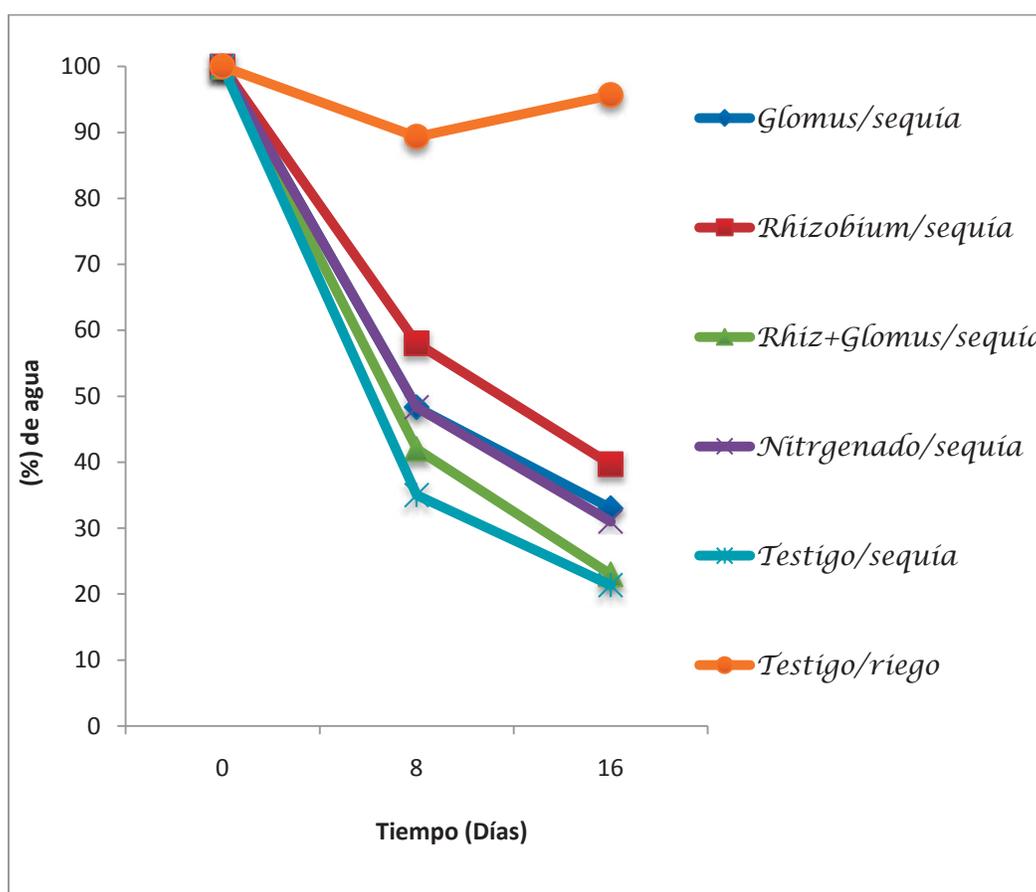


Figura 11. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *P. acutifolius* G40142.

VII.4.4. *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto Saltillo

En relación a las plantas de *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo inoculadas con *Rhizobium* y luego sometidas a sequía, se observó a los 8 días una disminución a 52 % en el CRA y de 38 % a los 16 días de tratamiento (Figura 12). Las plantas inoculadas sólo con *Glomus* mostraron una tendencia de comportamiento similar a las plantas fertilizadas alcanzando valores de 46 % a los 8 días y 35 % a los 16 días. Las plantas coinoculadas presentaron una disminución de 42 % a los 8 días y 24 % a los 16 días, 11 % menos que las plantas inoculadas solo con *Glomus* y 14 % menos en comparación con las plantas inoculadas solo con *Rhizobium*.

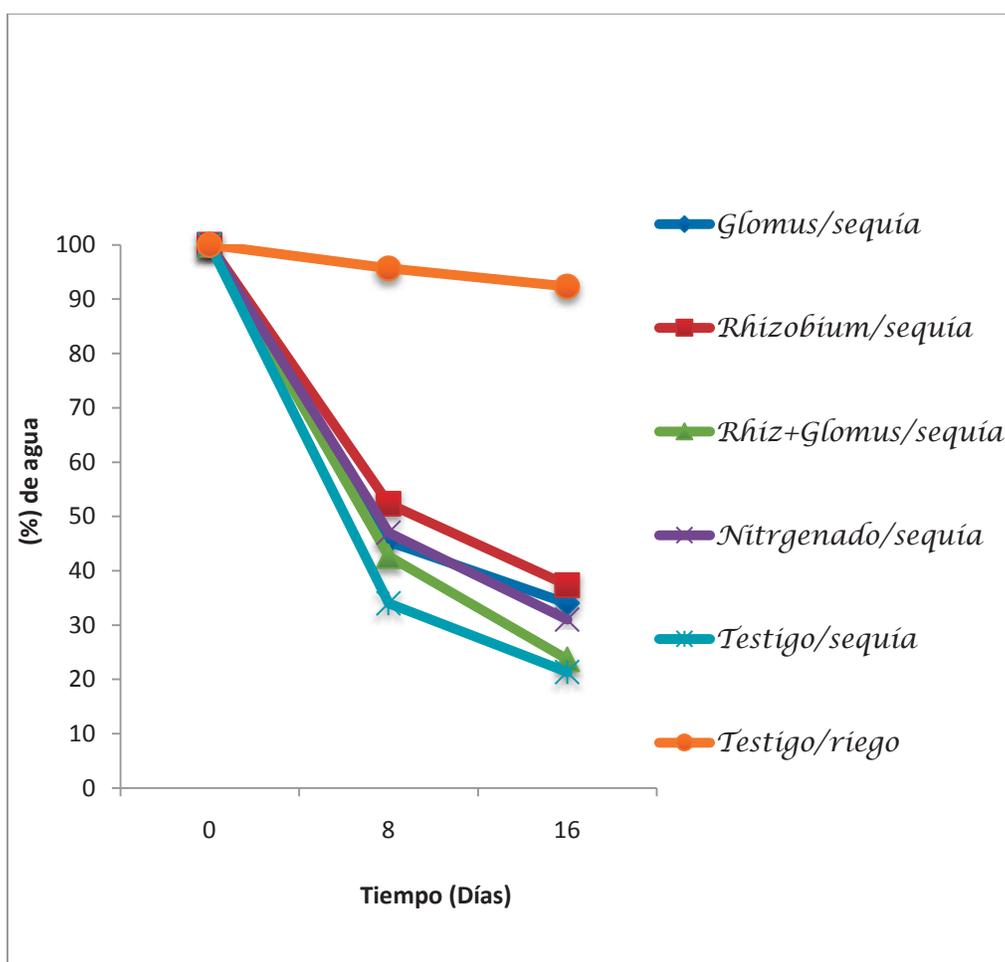


Figura 12. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo

VII.4.5. *Phaseolus filiformis* P1535309

Para *P. filiformis* el CRA en el tratamiento inoculado únicamente con *Rhizobium* disminuyó a los 8 días a 63% y a los 16 días 45%. (Figura 13). Las plantas inoculadas solo con *Glomus* y las fertilizadas presentaron tendencias similares con una disminución de 48% a los 8 días y 28% a los 16 días, Mientras que el coinoculado y sometido a sequía disminuyó a 45% a los 8 días y 22% a los 16 días de tratamiento, 23% menos que el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium*.

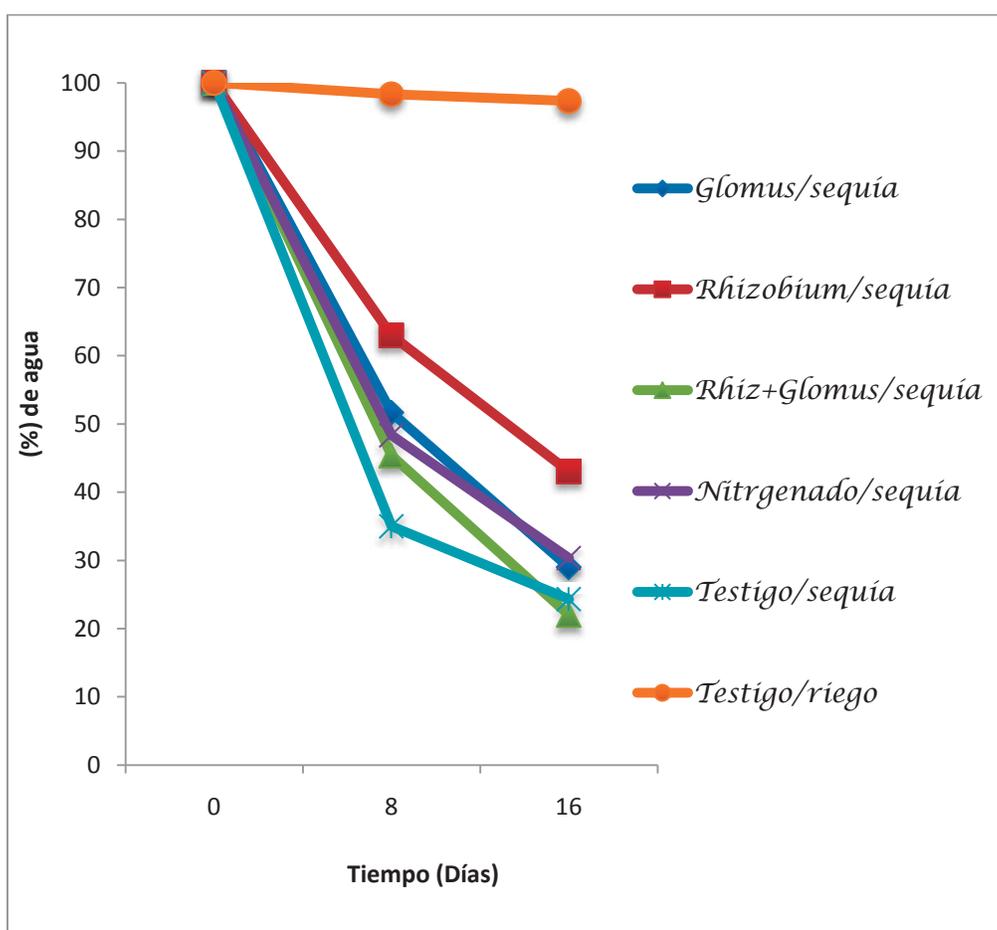


Figura 13. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *P. filiformis* p1535309

VII.5. PESO FRESCO DE NÓDULOS DE GENOTIPOS DE FRIJOL BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN

VII.5.1. *Phaseolus vulgaris* P132568

Para *P. vulgaris* en condiciones normales de humedad, la masa nodular fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 14). Bajo condiciones de estrés, la masa nodular disminuyó en las plantas inoculadas con *Rhizobium* de 0.6 a 0.4 g⁻¹ a los 16 días.

En las plantas coinoculadas y bajo estrés la masa nodular se mantuvo sin cambios durante todo el ensayo, conservando cantidades promedio de 0.2 g⁻¹.

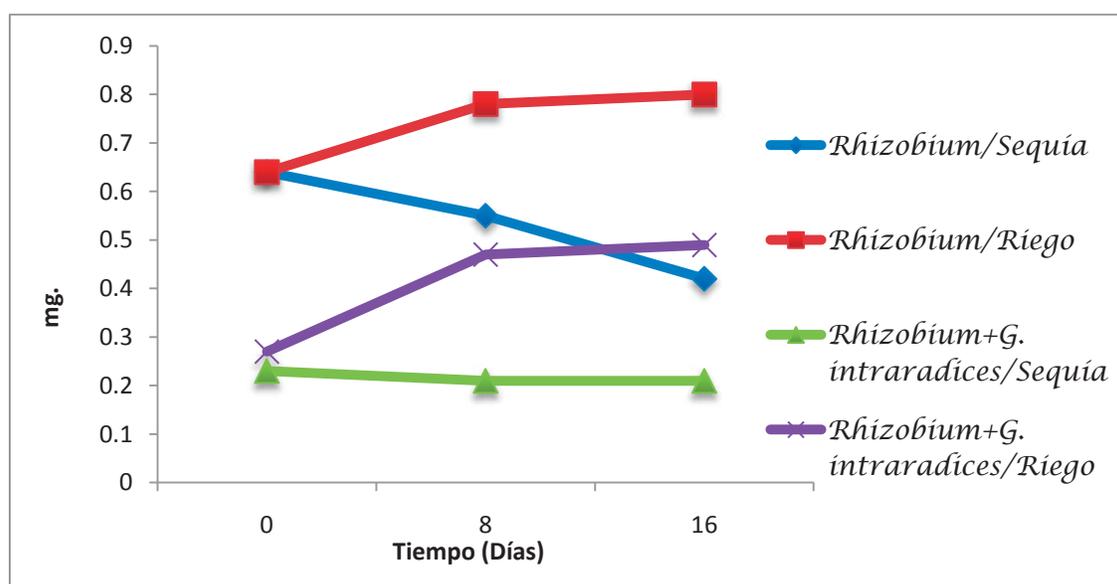


Figura 14. Peso fresco de nódulos en *Phaseolus vulgaris* bajo dos regímenes de riego.

VII.5.2. *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo

Para *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo el peso fresco de nódulo, en condiciones normales de humedad, la masa nodular fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* mostrando una tendencia a aumentar en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus*, que al término de los 16 días se observó una tendencia a la estabilización (Figura 15). Bajo condiciones de estrés, la masa nodular disminuyó en las plantas inoculadas con *Rhizobium* de 0.35 g^{-1} al inicio del experimento a 0.1 g^{-1} a los 16 días. Mientras que en las coinoculadas disminuyó de 0.15 g^{-1} a 0.05 g^{-1} a los 16 días.

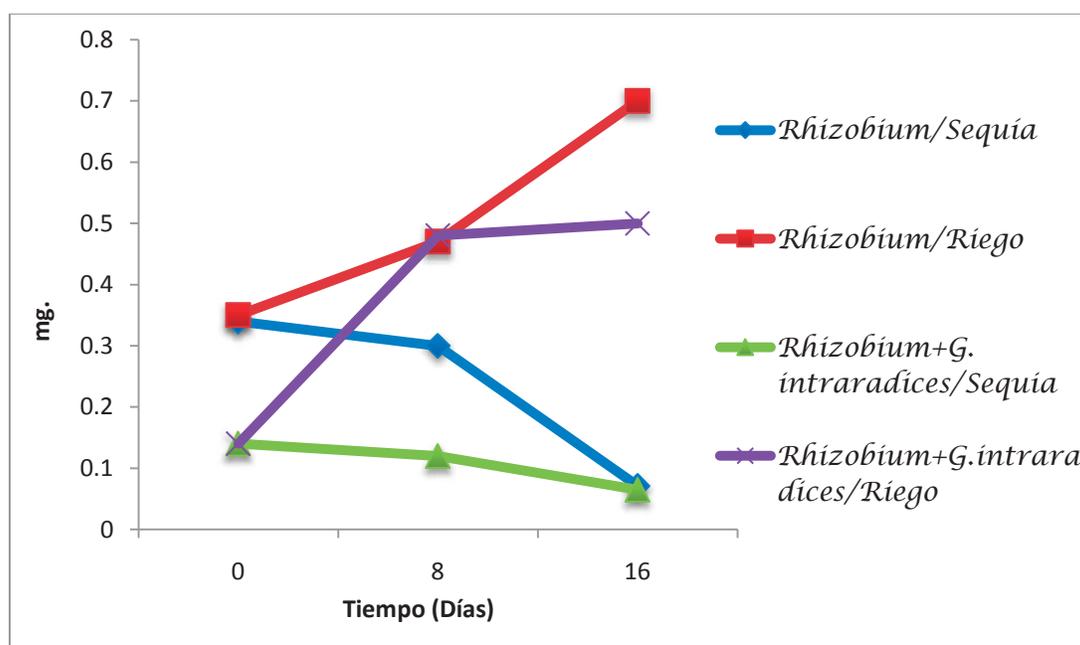


Figura 15. Peso fresco de nódulos en *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo bajo dos regímenes de riego.

VII.5.3. *Phaseolus acutifolius* G40142

Para *P. acutifolius* el peso fresco de nódulo en el tratamiento inoculado con *Rhizobium* bajo condiciones normales de humedad, la masa nodular fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 16). Bajo condiciones de estrés, la masa nodular disminuyó en las plantas inoculadas con *Rhizobium* de 0.25 g^{-1} a 0.1 g^{-1} a los 16 días. No se observaron diferencias significativas con el tratamiento coinoculado.

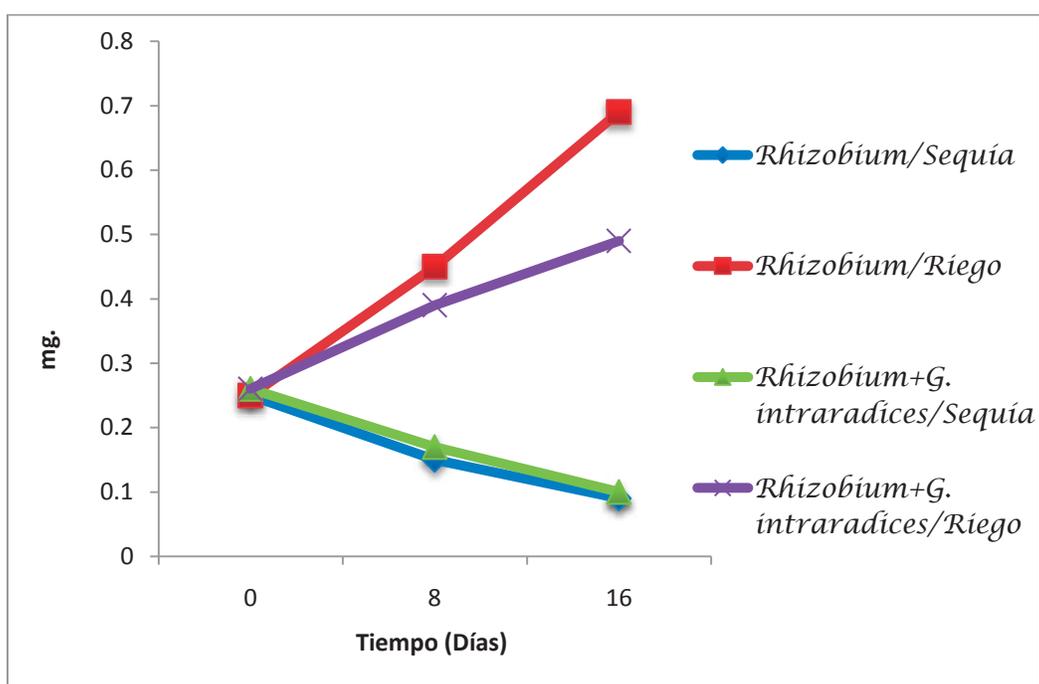


Figura 16. Peso fresco de nódulos de *Phaseolus acutifolius* bajo dos regímenes de riego.

VII.5.4. *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto Saltillo

Para *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo en condiciones normales de humedad, la masa nodular fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 17). Bajo condiciones de estrés, la masa nodular disminuyó en las plantas inoculadas con *Rhizobium* de 0.7 g^{-1} a 0.1 g^{-1} a los 16 días, sin mostrar diferencias significativas con el tratamiento coinoculado, con valores de 0.6 g^{-1} al inicio del experimento, 0.4 g^{-1} a los 8 días y 0.1 g^{-1} a los 16 días.

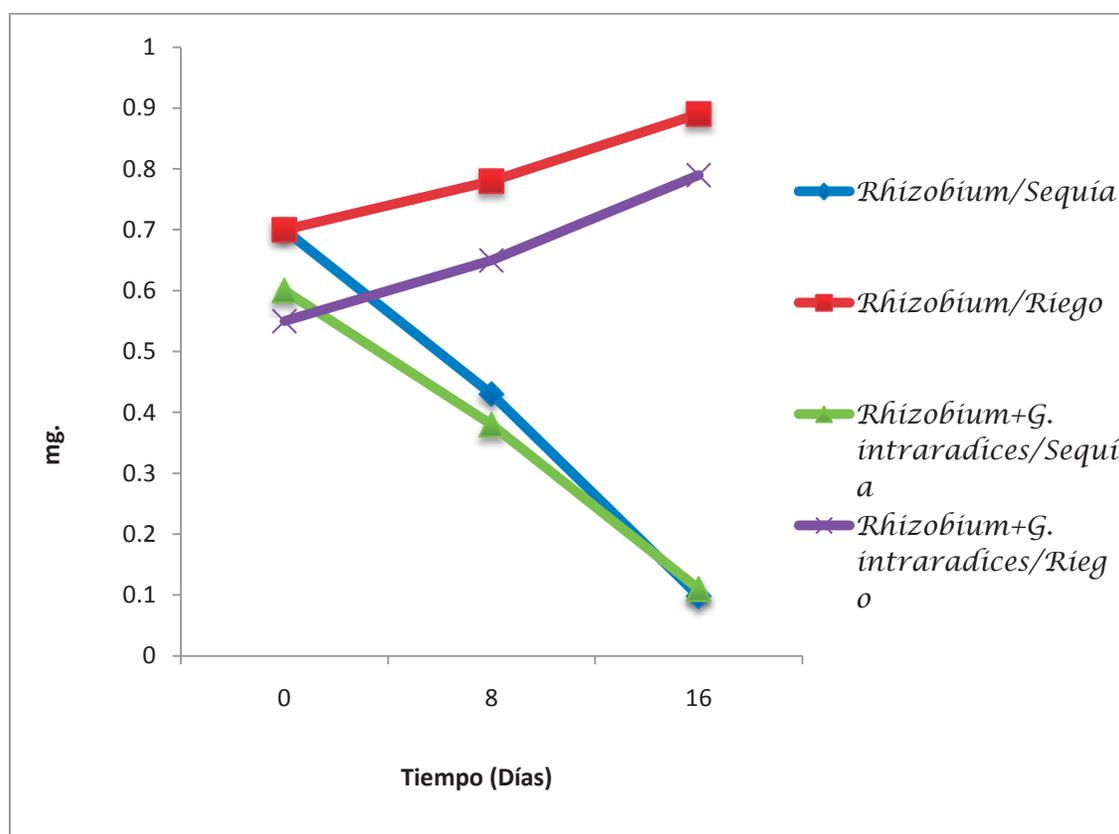


Figura 17. Peso fresco de nódulos de *Phaseolus vulgaris* c.v. Pinto Saltillo bajo dos regímenes de riego.

VII.5.5. *Phaseolus filiformis* P1535309

Para *P. filiformis* en condiciones normales de humedad, la masa nodular fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 18). Bajo condiciones de estrés, la masa nodular disminuyó en las plantas inoculadas con *Rhizobium* de 0.7 g^{-1} al inicio del análisis experimental a 0.45 g^{-1} a los 8 días y 0.1 g^{-1} a los 16 días sin mostrar diferencias significativas con el tratamiento coinoculado, con valores de 0.6 g^{-1} al inicio del experimento, 0.4 g^{-1} a los 8 días y 0.1 g^{-1} a los 16 días.

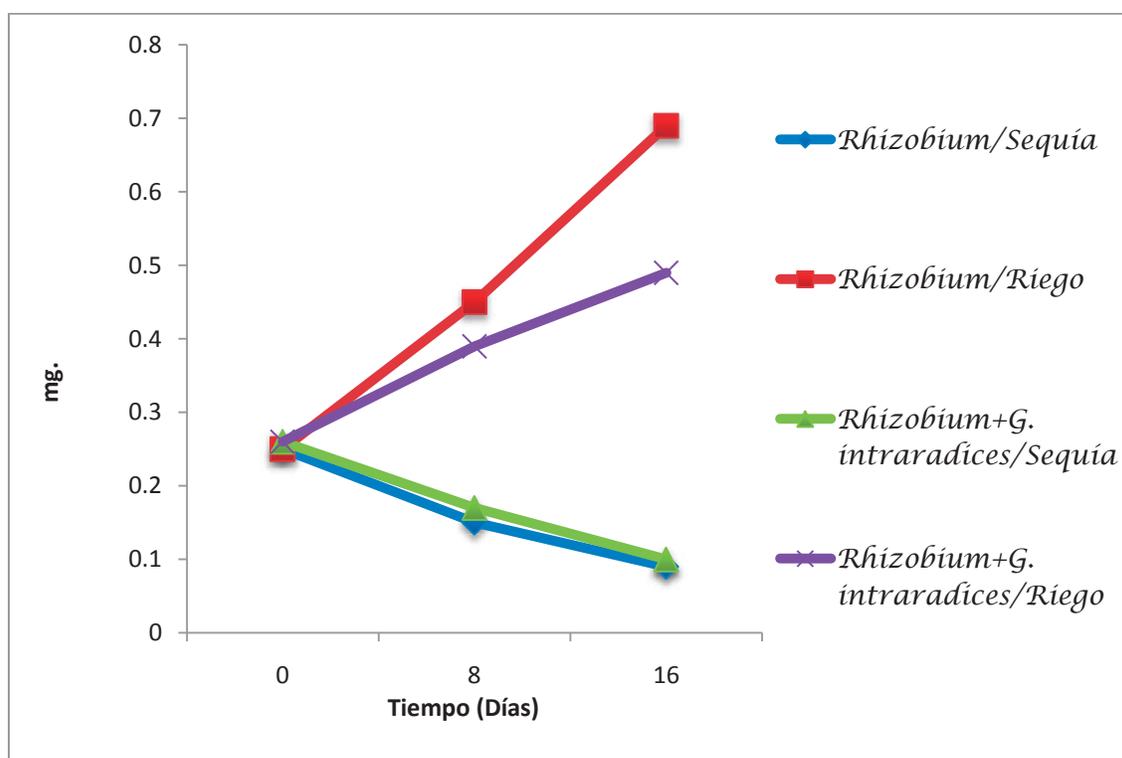


Figura 18. Peso fresco de nódulos de *Phaseolus filiformis* bajo dos regímenes de riego

VII.6. PESO SECO DE NÓDULO DE FRIJOL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN BAJO ESTRÉS HÍDRICO

VII.6.1. *Phaseolus vulgaris* P132568

En condiciones normales de humedad, el peso seco del nódulo fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 19) donde no se observaron diferencias significativas en los diferentes muestreos.

El peso seco de nódulo para *Phaseolus vulgaris* inoculado solo con *Rhizobium* en condiciones de sequía presentó una disminución en peso de 0.16 g^{-1} al inicio del muestreo, 0.14 g^{-1} a los 8 días y 0.1 g^{-1} a los 16 días. Para el tratamiento coinoculado se observó un valor de 0.15 g^{-1} al inicio del muestreo, 0.09 g^{-1} a los 8 días y 0.06 g^{-1} a los 16 días.

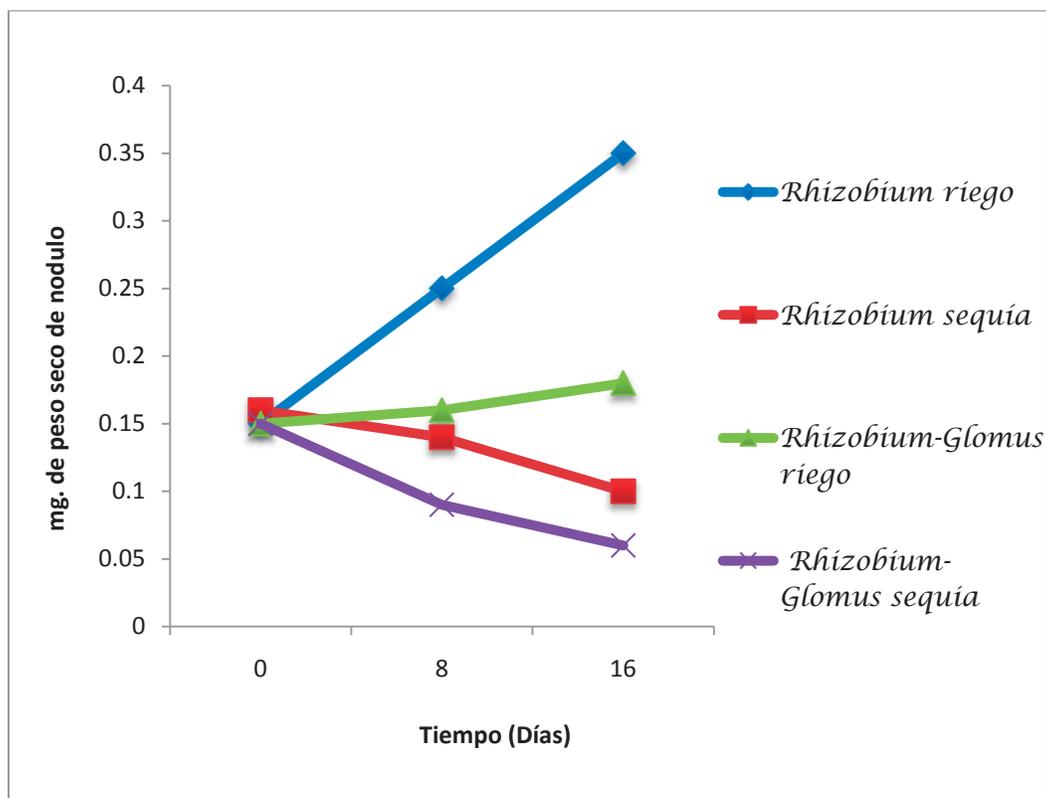


Figura 19. Peso seco de nódulos en *Phaseolus vulgaris* bajo dos regímenes de riego.

VII.6.2. *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo

Para el cultivar Flor de Mayo inoculado sólo con *Rhizobium* en condiciones normales de humedad, el peso seco de nódulo fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 20). Bajo condiciones de estrés el peso seco de nódulos disminuyó de 0.15 g^{-1} al inicio del muestreo a 0.1 g^{-1} a los 8 días y 0.015 g^{-1} a los 16 días. En el tratamiento coinoculado en sequía se observó al tiempo inicial un valor de 0.06 g^{-1} , 0.11 g^{-1} a los 8 días y 0.025 g^{-1} a los 16 días.

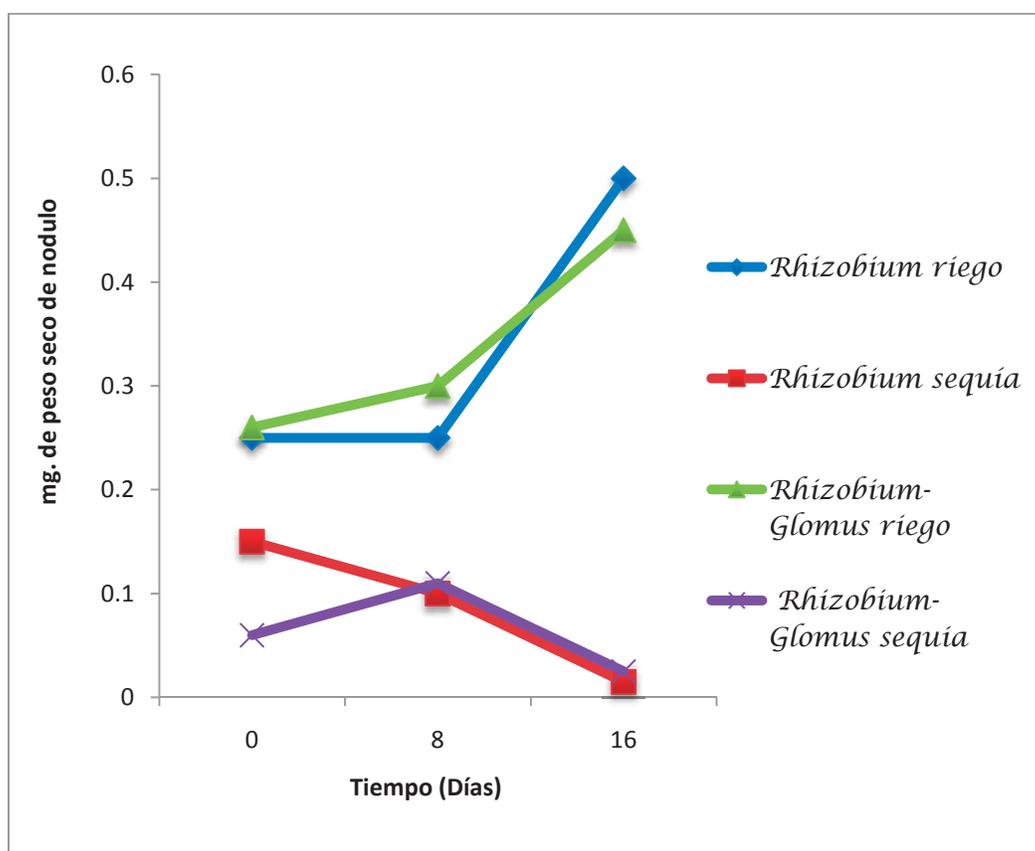


Figura 20. Peso seco de nódulo en *Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo bajo dos regímenes de riego.

Letras iguales indican que no existe diferencia estadística Tukey $p < 0.05$

VII.6.3. *Phaseolus acutifolius* P132568

En *P. acutifolius* bajo condiciones normales de humedad, el peso seco de nódulo fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus* (Figura 21).

Bajo condiciones de estrés el tratamiento inoculado con *Rhizobium* se mantuvo en niveles estadísticamente iguales durante los 16 días (0.18-0.26 g⁻¹). En la coinoculación bajo sequía se obtuvieron valores menores a 0.1 g⁻¹ en el transcurso de los 16 días.

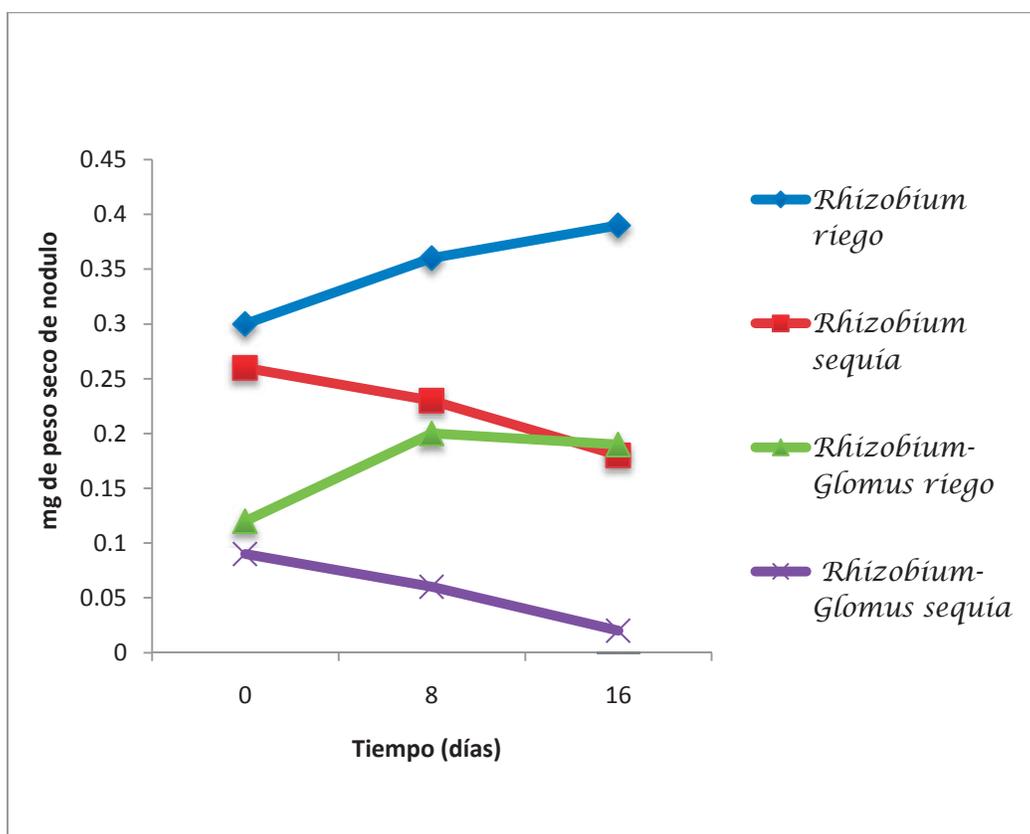


Figura 21. Peso seco de nodulos de *Phaseolus acutifolius* bajo dos regímenes de riego

VII.6.4. *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto Saltillo

En *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto Saltillo bajo condiciones normales de humedad, el peso seco de nódulos fue mayor en las plantas inoculadas previamente con *Rhizobium* (Figura 22), en comparación a lo observado en las plantas coinoculadas con *Rhizobium* y *Glomus*.

Bajo estrés en el tratamiento inoculado solo con *Rhizobium*, no se presentaron diferencias significativas en el peso seco de nódulos con respecto al tiempo, con valores de 0.15 g^{-1} al inicio del experimento, 0.1 g^{-1} a los 8 días y 0.01 g^{-1} al término de los 16 días. El peso seco de nódulos en el tratamiento coinoculado bajo sequía fue de 0.11 g^{-1} al inicio del muestreo, 0.05 g^{-1} a los 8 días y 0.01 g^{-1} a los 16 días.

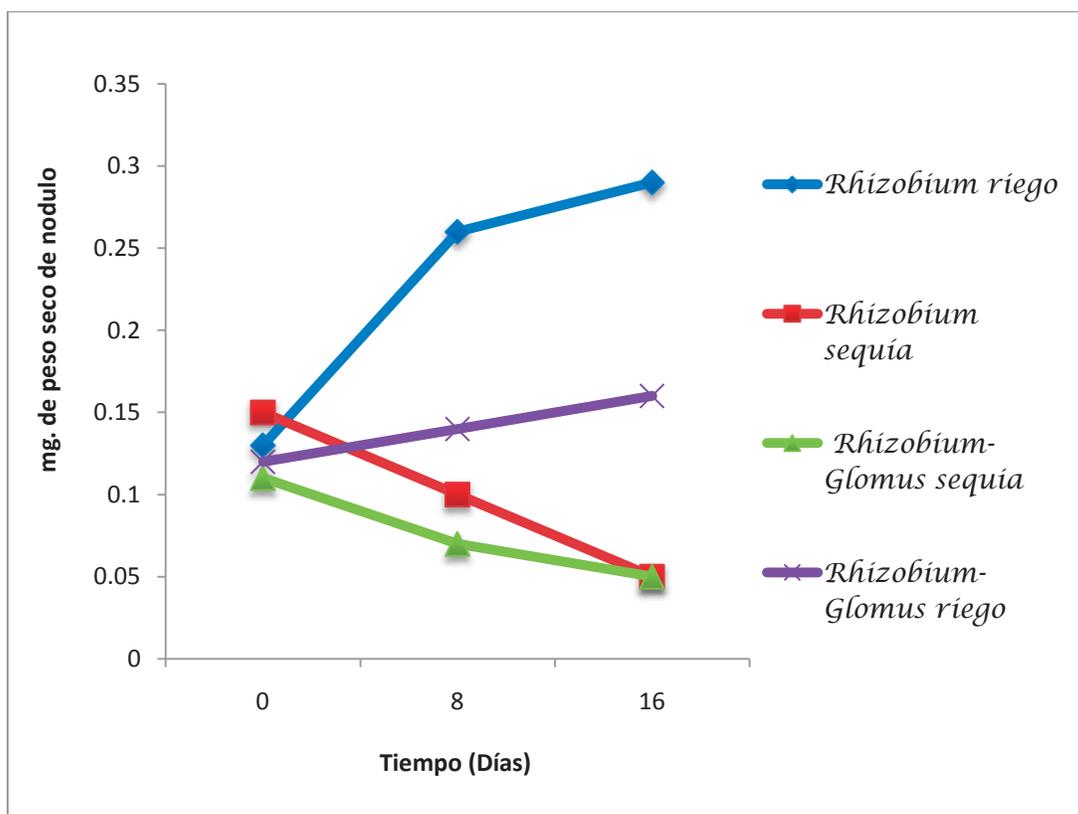


Figura 22. Peso seco de nodulos de *Phaseolus vulgaris* c.v. Pinto Saltillo

VII.6.5. *Phaseolus filiformis* P1535309

En condiciones normales de humedad, el peso seco de nódulos en *P. filiformis* en los tratamientos previamente inoculados con *Rhizobium* y coinoculado *Rhizobium-Glomus*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con valores de 0.25-0.3 g⁻¹. (Figura 23).

Bajo condiciones de estrés, el peso seco de nódulos en el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium* al inicio del experimento fue de 0.2 mg disminuyendo a 0.18 mg a los 8 días y a 0.15 mg a los 16 días. En el tratamiento coinoculado, los valores al inicio del muestreo fueron de 0.2 mg y 0.17 mg a los 8 días y de 0.12 mg a los 16 días. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los dos tratamientos.

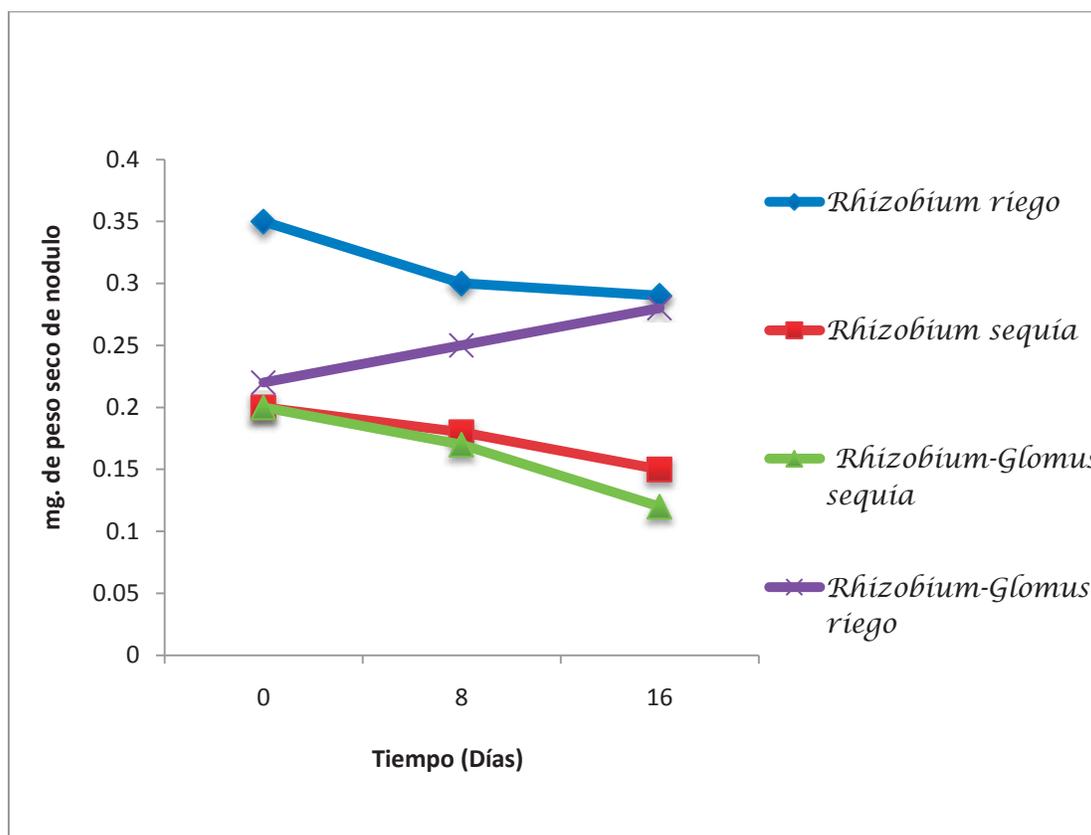


Figura 23. Peso seco de nódulo de *Phaseolus filiformis* bajo dos regímenes de riego.

VII.7. NÚMERO DE NÓDULOS EN FRIJOL SOMETIDO A SEQUÍA EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN

Para la condición de riego normal, *P. vulgaris* presentó 500 nódulos en el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium* siendo diferente estadísticamente con el número de nódulos presentes en la coinoculación, con un valor de 300 (Figura 24). En las otras especies y cultivares estudiados no se encontraron diferencias significativas entre sí bajo esta condición.

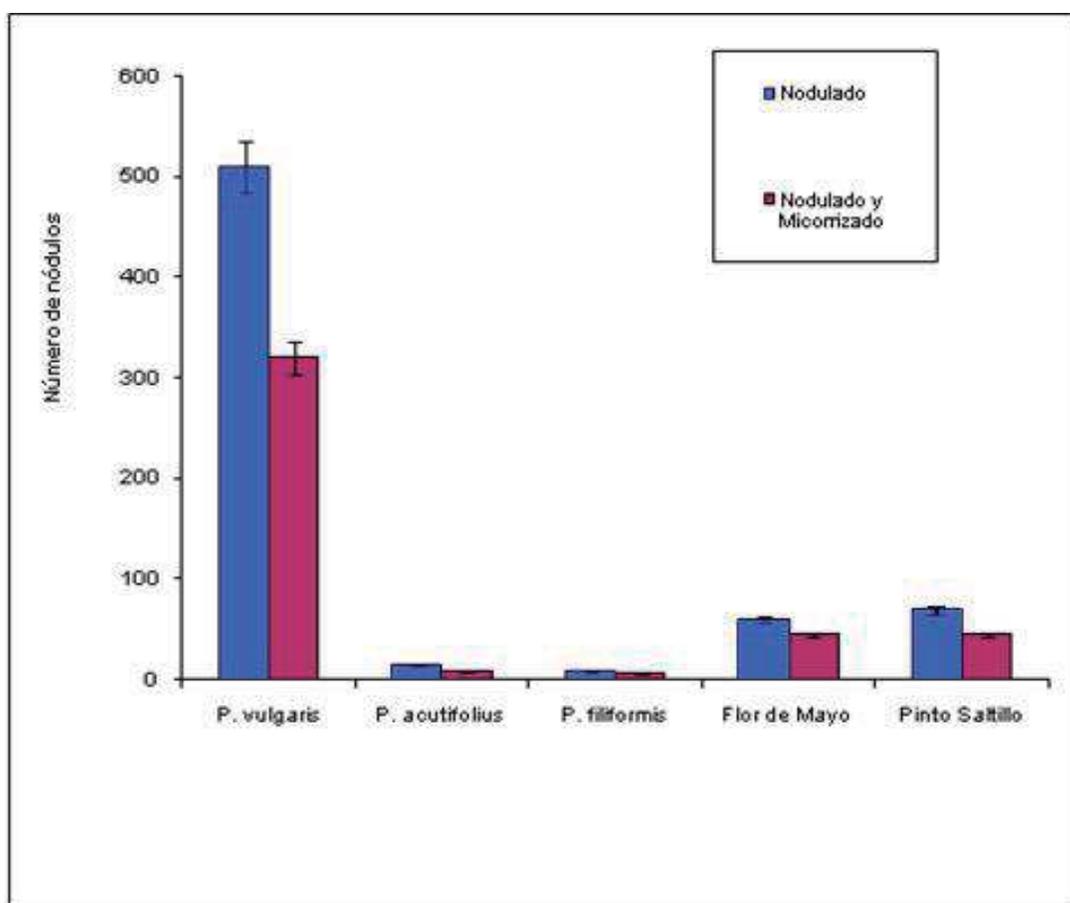


Figura 24. Efecto de la inoculación sobre el número de nódulos en diferentes cultivares y genotipos de frijol bajo condiciones de riego normal.

Bajo la condición de sequía se encontró que aún cuando *P. vulgaris* presenta la mayor cantidad de nódulos existen diferencias significativas en el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium* donde se obtuvo un valor de 350 contrastando con los 100 encontrados en el coinoculado con *Glomus*.

En *P. acutifolius*, *P. filiformis* y Flor de Mayo se detectó un incremento en el número de nódulos en el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium* en comparación con su contraparte coinoculada con *Glomus*, aun cuando no es estadísticamente significativo es visible.

En *P. vulgaris* cv. Pinto Saltillo se observó un comportamiento diferente en condiciones de riego, se cuantificaron 50 nódulos en el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium* y 24 en el coinoculado con *Glomus*. En la condición de sequía se observó lo contrario, 45 nódulos en el tratamiento coinoculado y 20 en el inoculado sólo con *Rhizobium* (Figura 25).

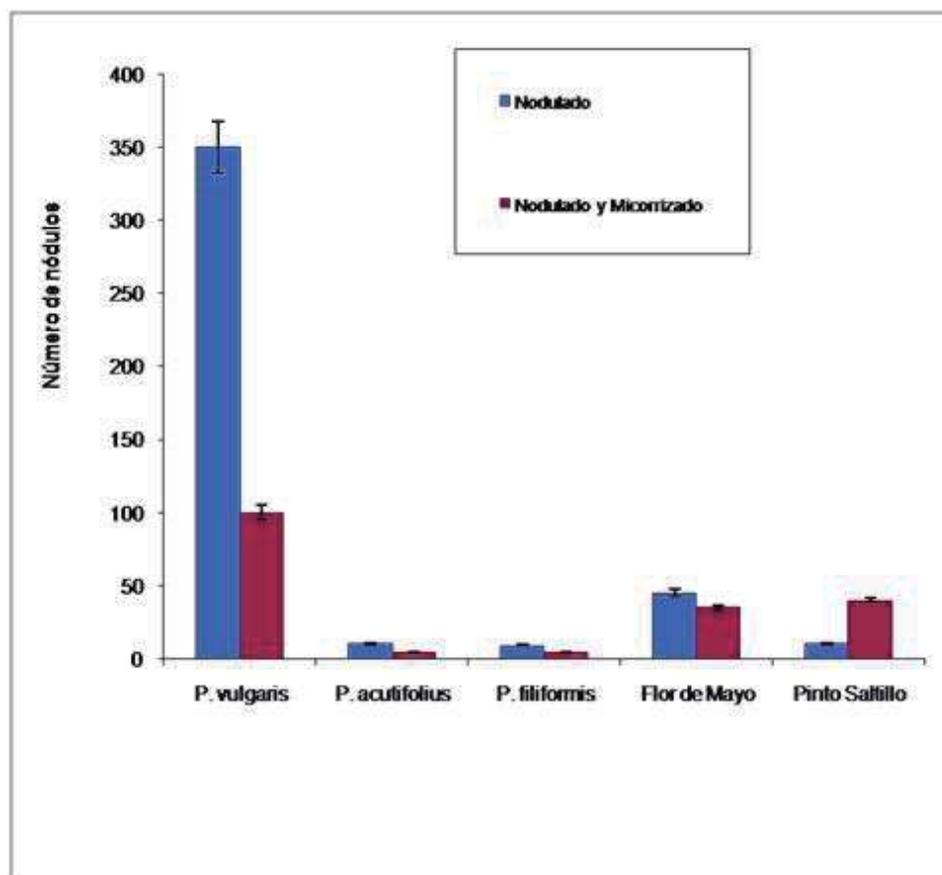


Figura 25. Efecto de la inoculación en el número de nódulos en diferentes cultivares y genotipos de frijol sometidos a sequía.

VII.8. COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN FRIJOL MANTENIDO BAJO DOS CONDICIONES DE RIEGO

En la Figura 26 se presentan los resultados de porcentaje de colonización micorrícica, en *P. vulgaris* bajo riego se obtuvo un porcentaje de colonización promedio de 20 % en los dos tratamientos de inoculación, micorrizado y micorrizado-nódulado y en condiciones de sequía el tratamiento micorrizado presentó un porcentaje de colonización de 45 % en contraste con el 20 % de colonización en el tratamiento coinoculado.

El genotipo Flor de Mayo no mostró diferencias significativas en el porcentaje de colonización micorrícica en los dos sistemas de inoculación y bajo las condiciones de riego y sequía.

Para *P. acutifolius* en condiciones de riego no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de colonización micorrícica en los dos sistemas de inoculación pero en sequía si se encontraron diferencias estadísticas en los dos tipos de inoculación obteniéndose 37 % en el tratamiento inoculado solo con *Glomus* y 18 % en el coinoculado.

En el genotipo Pinto Saltillo en riego, el tratamiento inoculado sólo con *Glomus* se observó un porcentaje de colonización de 27 % en comparación con el 13 % en el tratamiento coinoculado, en sequía el porcentaje de colonización en el tratamiento con *Glomus* solo fue de 45%, 19 % más que en riego y el tratamiento coinoculado fue de 25 %, 12 % más que en riego.

En el genotipo *P. filiformis* se alcanzó un porcentaje de colonización micorrícica de 22 % bajo la condición de riego e inoculado con *Glomus*, el tratamiento coinoculado bajo la misma condición fue de 18 %. En la condición de sequía e inoculado sólo con *Glomus* el porcentaje de colonización micorrícica fue de 50% en el tratamiento inoculado sólo con *Glomus*, siendo el único tratamiento y genotipo donde se alcanzó lo que se considera una colonización óptima, (Figura 27 y 28) en el tratamiento coinoculado con *Rhizobium* el porcentaje de colonización fue de 3 %.

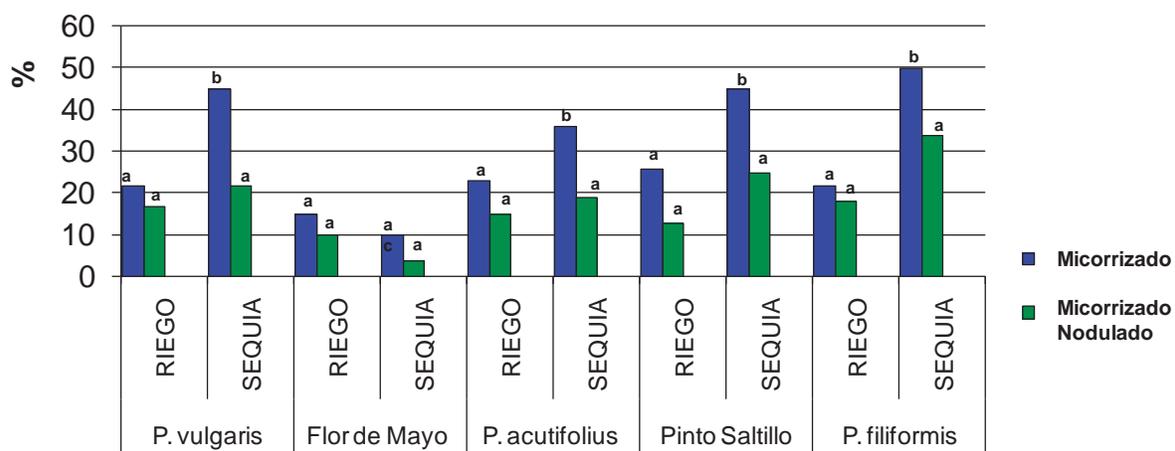


Figura 266. Porcentaje de Colonización por *Glomus intraradices* en diferentes cultivares y genotipos de frijol mantenidos en dos regimenes de riego.



Figura 277. Fotomicrografía de la colonización por *Glomus intraradices* en *P. filiformis* bajo estrés hídrico 100X.



Figura 28. Fotomicrografía por MEB de la colonización por *Glomus intraradicces* en *P. filiformis* bajo estrés hídrico 1000 X.

VIII. DISCUSIÓN

La trealosa es un disacárido ampliamente distribuido en la naturaleza, se presenta principalmente en microorganismos (Elbein, 1974, Müller *et al.*, 1996). En plantas superiores su presencia se atribuye a los microorganismos con los que se relaciona (Farías-Rodríguez, 1998).

En la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosa, se sabe que la síntesis de trealosa la realizan exclusivamente los bacteroides. Sin embargo, la mayor parte de la trealosa sintetizada es liberada al citoplasma de las células huésped en donde se almacena, (Streeter, 1985). Se cree que, como ocurre en los microorganismos, el papel de la trealosa está relacionado con la resistencia a diversos tipos de estrés, entre los que destaca la sequía (Crowe *et al.*, 1984a, Farías-Rodríguez *et al.*, 1998). En este sentido, se ha observado una acumulación de carbohidratos en las llamadas “Plantas de la resurrección” (Müller *et al.*, 1995) así como en nódulos de soya (Müller *et al.*, 1992) y alfalfa (Irigoyen *et al.*, 1992).

Hasta la fecha la mejor evidencia de que la trealosa presente en los nódulos de las leguminosas puede actuar en la tolerancia a la sequía proviene de un estudio de diversos cultivares de frijol (Farías-Rodríguez, 1998), en donde se demostró que las plantas no noduladas y que por lo tanto no contenían trealosa, independientemente del cultivar, tenían una pobre tolerancia al estrés hídrico. Por otra parte en cultivares nodulados sometidos a condiciones de sequía se observó un incremento en la concentración de trealosa y esto se relacionó con una mayor tolerancia a la sequía, ya que los cultivares que acumularon poca trealosa mostraron ser sensibles a este estrés.

Este y varios mecanismos han sido descritos para explicar la variabilidad de repuestas fisiológicas al agobio hídrico de las leguminosas, destacando el estudio del frijol común el cual dadas sus características de cultivo y distribución presenta diferentes niveles de agobio hídrico en algún momento de su desarrollo (Broughton *et al.*, 2003). Generalmente, se cataloga como una especie cuya respuesta a la sequía es ampliamente variable dependiente del cultivar. Además, la producción de frijol normalmente se ve influida por la capacidad de diferentes genotipos para establecer relaciones simbióticas exitosas.

Los experimentos mostraron que en todos los genotipos de este trabajo se incrementó la acumulación de trealosa en los nódulos de plantas bajo condiciones de estrés. Destacando dentro de los cultivares *P. vulgaris* cv. Pinto saltillo inoculado solo con *Rhizobium* que llegó a acumular 4.2 g⁻¹ al inicio de la etapa de estrés, 6.0 g⁻¹ a los 8 días y 7.0 g⁻¹ a los 16 días. Del mismo modo *Phaseolus vulgaris* P1325687 inoculado sólo con *Rhizobium* acumuló 4.5 g⁻¹ al inicio del estrés, 7.0 g⁻¹ a los 8 días y 9.0 g⁻¹ a los 16 días. Es importante mencionar que este último es un genotipo silvestre y que en el presente trabajo el análisis se realizó en etapa reproductiva. Coincide con trabajos previos en otras leguminosas que mencionan que la tolerancia al estrés hídrico de las plantas noduladas, depende en parte de la etapa fenológica. El efecto de agobio hídrico parece tener mayor efecto en etapas más avanzadas de desarrollo (Nielsen y Nam, 1999, Singh, 1995, Foster *et al.*, 1995) y coincide con una mayor concentración de trealosa en los nódulos de los genotipos analizados conforme transcurrió el tiempo de estrés.

Por otro lado en la simbiosis micorrizica, el hongo y la membrana plasmática constituyen una interfase que posee rasgos citológicos que indican un activo intercambio de nutrimentos y se ha establecido que el hongo recibe carbohidratos, y el huésped recibe principalmente fosfato. Ambas sustancias pasan por la vía del apoplasto previa captación por cada uno de los socios, el flujo en masa desde los arbusculos al citoplasma es bidireccional. La planta aumenta su capacidad fotosintética para compensar el carbono "perdido" en el hongo. (Mosse, 1973).

Un autótrofo en muchas asociaciones simbióticas libera hidratos de carbono al heterótrofo que los almacena en forma de polisacáridos o azúcares complejos. Los hidratos de carbono complejos son trealosa y manitol, fue interesante observar en estos resultados que la inoculación con *Glomus intraradices* bajo las condiciones manejadas en este trabajo no se encontró trealosa en raíz, tallo, hoja y semilla para ningún genotipo. El papel de la mencionada simbiosis es fundamental en la captación de nutrimentos minerales de lenta difusión en los suelos, como por ejemplo los fosfatos solubles, el Zn y el Cu y se traduce en crecimiento y desarrollo de la planta hospedera (Mosse, 1973).

Así, se acepta que uno de los principales beneficios de los hongos micorrizicos es el de aumentar la absorción de P. Las hifas absorben este elemento y lo remobilizan por la

planta incrementando directamente, el contenido nutricional de los tejidos (Souza *et al.*, 1996).

La planta micorrizada es vitalizada por una raíz más desarrollada y un mejor aprovechamiento del agua y los nutrimentos, por la amplia exploración que el hongo hace en el suelo, la presencia de micorrizas disminuye la resistencia hidráulica, permite una mayor tasa de transpiración aún con potenciales hídricos muy bajos en el suelo y proporciona mayor capacidad de recuperación de estrés hídrico puntual. La captación de agua también puede ser aumentada por los hongos micorrícicos. De esta forma, los hongos micorrícicos incrementan la eficiencia de fertilización (Menge *et al.*, 1997).

Se ha puntualizado que la coinoculación *Rhizobium*-micorriza coadyuva a una mayor capacidad de retención de agua en diferentes plantas (Bolandnazar *et al.*, 2007, Khan *et al.*, 2003). Es probable que exudados de raíces micorrizadas sean distintas de las raíces no micorrizadas, quizás debido al mejor estatus nutricional de la planta. La acción directa del hongo en los exudados puede afectar los microorganismos de la rizósfera y así las micorrizas parecen ser una condición necesaria para la nodulación efectiva de algunas leguminosas (Bécard *et al.*, 1991, López *et al.*, 2007).

Es conocido que una nodulación efectiva depende de un adecuado nivel de P, ya que la fijación extra de N requiere más de este elemento (Mosse, 1973).

Con estos antecedentes, al analizar el contenido de trealosa en los genotipos estudiados bajo las condiciones de estrés hídrico y riego normal se observó que después de 16 días de agobio hídrico el contenido de trealosa en los nódulos tuvo un efecto selectivo y fue dependiente del tipo de inoculación y el genotipo, ya que para *P. vulgaris* y *P. filiformis* se obtuvieron mayores niveles de trealosa en el tratamiento inoculado con *Rhizobium*, mientras que en Flor de Mayo y Pinto Saltillo la acumulación de trealosa fue indistinta del tipo de inóculo, sin embargo, para *P. acutifolius* el mejor tratamiento para síntesis de trealosa en nódulo fue la coinoculación *Rhizobium-Glomus* por lo anterior el frijol nodulado presenta una variabilidad de respuesta al agobio hídrico y esta respuesta depende del genotipo y su microsimbionte.

Respecto al contenido de trealosa en los diferentes órganos de la planta, se observó que solamente se detectó trealosa en algunos de ellos, lo anterior dependiendo del tratamiento, de tal forma que para raíz sólo se encontró trealosa en el tratamiento inoculado

sólo con *Rhizobium* y aunque en concentración más baja [μg]. En los otros tratamientos no se detectó trealosa. Cabe resaltar que todos los genotipos presentaron un incremento en trealosa conforme transcurrió la etapa de sequía, encontrándose una mayor producción de trealosa en las especies silvestres, mientras que de los cultivares Pinto saltillo sobresale en producción, y Flor de mayo permaneció sin diferencia significativa en las etapas de muestreo. Esta concentración de trealosa en raíces inoculadas con *Rhizobium* coincide con lo reportado por Altamirano-Hernández *et.al*, (2007), el cual es un estudio con leguminosas de una selva baja caducifolia donde menciona que al inicio de la sequía la concentración de trealosa en las raíces de los árboles disminuyó, debido a que aparentemente el transporte de trealosa hacia la parte aérea de la planta continúa y se pierde al caer las hojas, después de haber realizado su papel protector en estos tejidos la trealosa es utilizada como fuente de energía para la formación de la semilla. En los genotipos de frijol analizados la etapa de llenado de vaina se acortó con respecto a los tiempos reportados en la literatura para cada genotipo en cuanto a la duración de las etapas fenológicas disminuyendo un promedio de 10 días.

Del mismo modo el análisis del contenido de trealosa en tallo, no se logró detectar en ningún tratamiento ni genotipo lo cual resulta interesante dado que sí se detectó en hoja, Lo anterior nos induce a pensar que debe existir una ruta de transporte del nódulo a la raíz y a la hoja para culminar en la semilla que mediante la técnica utilizada no fue posible determinar por lo cual sugerimos que debe ser estudiada con mayor profundidad para tratar de dilucidar este paso.

Al analizar el contenido de trealosa en hoja se encontró que nuevamente el contenido de trealosa sólo se detectó en los tratamientos inoculados con *Rhizobium*. Pero de manera sobresaliente también se encontró en plantas coinoculadas con *Rhizobium-Glomus*, los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas entre sí, tanto por tratamiento como por condición. En todos los genotipos se observó el mismo patrón lo que nos induce a pensar que la trealosa presente en hoja llega a ella de alguna manera a partir del nódulo.

Del mismo modo los resultados de trealosa en semillas mostraron que sólo se detectó en los tratamientos inoculados con *Rhizobium* y *Rhizobium-Glomus* presentándose el mismo patrón de comportamiento que en la hoja, lo que ratifica lo mencionado por

Altamirano-Hernández *et al.*, (2007) donde menciona que podría asumirse en primer término que la trealosa detectada en semillas fue originalmente sintetizada en el nódulo.

En apoyo a la teoría del transporte de trealosa, están las observaciones realizadas en leguminosas silvestres, donde se observó la presencia de trealosa en las raíces a partir del establecimiento de la nodulación. Así mismo, en las etapas de mayor producción de este carbohidrato en el nódulo se observó la mayor concentración de trealosa en las raíces (Altamirano-Hernández *et al.*, 2004).

Se puede suponer que la partición de trealosa entre el nódulo y las semillas ocurre durante la etapa de llenado de vaina, durante la cual, en muchas leguminosas, inicia la senescencia del nódulo, y la trealosa se vuelve el carbohidrato más abundante (Muller *et al.*, 2001). Jiménez-Zacarías *et al.*, (2004) describen esta tendencia de los nódulos en la acumulación de altas concentraciones de trealosa durante la etapa de floración, tanto en condiciones de riego normal como bajo estrés hídrico. En el presente trabajo se observó que la concentración de trealosa en las semillas fue altamente variable dependiendo de la especie o cultivar, pero este tipo de variación ha sido también reportada en nódulos (Jiménez-Zacarías *et al.*, 2004, Farías-Rodríguez *et al.*, 1998, Streeter, 1985, Müller *et al.*, 1994). Por lo tanto, asumiendo que la trealosa es producida durante la simbiosis, esta variación podría corresponder a diversos factores inherentes de la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

Al analizar el CRA se observó que en el genotipo *P. vulgaris* de alguna manera las inoculaciones tuvieron un efecto negativo para esta variable, mientras que para Flor de Mayo, *P. Acutifolius*, *P. filiformis*, y Pinto Saltillo el mejor tratamiento fue el inoculado solo con *Rhizobium*. Mientras que para la evaluación de biomasa total todas las especies y cultivares presentaron la misma tendencia, donde el mejor tratamiento fue el inoculado sólo con *Rhizobium* presentando resultados iguales estadísticamente a los obtenidos en el tratamiento fertilizado con N lo cual muestra parte de los diferentes beneficios que proporciona la inoculación con *Rhizobium* como es que mejora la asimilación de otros nutrimentos por las leguminosas, mediante procesos como la solubilización de P y Fe; *Rhizobium* puede también participar en la promoción del crecimiento vegetal a través de la síntesis de compuestos como auxinas, citocininas y riboflabinas entre otros; control de patógenos, de manera indirecta mediante la competencia por nutrimentos en la zona de la

rizósfera y directa por la producción compuestos bactericidas que inhiban el desarrollo de patógenos y el incremento en la tolerancia al estrés (Arguelles, 2000).

Los resultados obtenidos para el área foliar, bajo riego la respuesta de los 5 genotipos bajo los diferentes tipos de inoculación, mostraron resultados variables, observándose que para *P. filiformis* y *P. acutifolius* las plantas coinoculadas presentaron un efecto negativo reduciendo el área foliar comparado con el área obtenida cuando estaban inoculados sólo con *Rhizobium*, por el contrario el genotipo *P. vulgaris* y Flor de mayo presentaron en promedio una mayor área foliar en presencia de la coinoculación que cuando estaban con los inóculos individuales, por otro lado bajo la condición de estrés hídrico se encontró que para *P. acutifolius* y *P. vulgaris* la mayor área foliar se observó en la inoculación con *Glomus* solo y la coinoculación lo afectó negativamente, por otro lado, Pinto Saltillo presentó una mayor área foliar en presencia de la coinoculación.

Respecto a los parámetros determinados para el nódulo, en cuanto al número de nódulos en el genotipo Pinto Saltillo se obtuvo en la inoculación con *Rhizobium* 20 nódulos en promedio y en la coinoculación con *Glomus* 50 de tal manera que en este último la nodulación aparentemente fue favorecida por la presencia de micorrizas mientras que para *P. acutifolius*, *P. filiformis* y el cv. Flor de mayo no presentó diferencias significativas. Para el genotipo *P. vulgaris* se presentó la mayor cantidad de nódulos en el tratamiento inoculado sólo con *Rhizobium* con un valor de 350 comparado con el coinoculado con *Glomus* con un valor de 100 nódulos, donde podemos ver que la presencia de micorrizas afecto negativamente esta variable. Del mismo modo para las variables de peso seco y fresco de nódulo no se observaron diferencias significativas por tratamiento pero si por condición, por lo que se estima que al parecer el estrés hídrico estimula de alguna manera una mayor producción de nódulos y estos generan una respuesta de resistencia conforme se incrementa el nivel de estrés.

El estudio para observar y determinar el porcentaje de colonización micorrícica no mostró resultados positivos, en las especies y cultivares manejados en este trabajo, encontrando para *P. filiformis* bajo condiciones de sequía e inoculado sólo con *Glomus* se obtuvo un porcentaje de 50 que se considera el mínimo necesario para una colonización micorrícica óptima (Hernández-Dorrego, 2000) y para el resto de las especies y cultivares se logró sólo de 10 a 45% bajo condiciones de sequía e inoculado solo con *Glomus*, en

todos los casos la coinoculación con *Rhizobium* afecto negativamente el porcentaje de colonización micorrícica lo que coincide con lo reportado por Mosse (1973) que menciona que los hongos micorrícicos pueden interactuar con una amplia gama de organismos en la rizosfera. El resultado puede ser positivo, neutral o negativo en la asociación micorrícica o en un componente en particular de la rizósfera.

Es probable que exudados de raíces micorrizadas sean distintas de las raíces no micorrizadas, debido al mejor estatus nutricional de la planta o por la acción directa del hongo a los exudados, y esto afecta los microorganismos de la rizosfera donde al parecer se cree que las micorrizas sean una condición necesaria para la nodulación efectiva de algunas leguminosas, ya que es conocido que una nodulación efectiva depende de un adecuado nivel de P y que la fijación extra de N requiere más P (Olah *et al.*, 2005)

Sin embargo, son necesarios más estudios para tratar de aclarar que es lo que sucede en otro sentido, es decir cómo es que *Rhizobium* afecta a que se lleve a cabo una eficiente colonización micorrícica como ocurrió en el presente trabajo y el efecto negativo que tuvo a su vez la inoculación micorrícica para la nodulación en los genotipos estudiados y por ende en la producción de trealosa y su correspondiente efecto protector contra el estrés hídrico.

IX. CONCLUSIONES

- **La micorrización afectó de manera negativa diferentes parámetros de nodulación (peso seco, número de nódulos y contenido de trealosa).**
- **Independientemente del tipo de inoculación, el contenido de trealosa en todos los tejidos muestreados se incrementó bajo condiciones de estrés hídrico.**
- **Los parámetros agronómicos evaluados bajo estrés hídrico se correlacionan positivamente con el contenido de trealosa en nódulos.**

X. LITERATURA CITADA

- ACOSTA-GALLEGOS, J. A. (2006) Producción competitiva de frijol en Guanajuato: variedades recomendadas para la región norte. *Programa de Frijol. CE-Bajío-INIFAP*.
- ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J., FARÍAS-RODRÍGUEZ, R., JARAMILLO, V. J. & PEÑA-CABRIALES, J. J. (2004) Seasonal variation in trehalose contents of roots and nodules of leguminous trees in a tropical deciduous forest in Mexico. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 869-871.
- ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J., LOPEZ, M. G., ACOSTA-GALLEGOS, J. A., FARÍAS-RODRÍGUEZ, R. & PEÑA-CABRIALES, J. J. (2007) Influence of Soluble Sugars on Seed Quality in Nodulated Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): The Case of Trehalose. *Crop Sci*, 47, 1193-1205.
- ALLAWAY, D., LODWIG, E. M., CROMPTON, L. A., WOOD, M., PARSONS, R., WHEELER, T. R. & POOLE, P. S. (2000) Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol Microbiol*, 36, 508-15.
- ALLEN, O. N. & ALLEN, E. K. (1981) *The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation*, Madison, University of Wisconsin Press.
- ARGUELLES, J. C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol*, 174, 217-24.
- AZCÓN-AGUILAR, C., PALENZUELA, J., GARCÍA, L. & BAREA, J. M. (1999) Aplicación de las micorrizas en la hortofruticultura. *Phytoma*, 110, 46-56.
- BANNEROT, H. (1979) Cold tolerance in beans. *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.*, 22, 81-84.
- BÉCARD, G., DONER, L. W., ROLIN, D. B., DOUDS, D. D. & PFEFFER, P. E. (1991) Identification and Quantification of Trehalose in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi by In vivo ¹³C NMR and HPLC Analyses. *New Phytologist*, 118, 547-552.
- BHANDAL, I. S., HAUPTMANN, R. M. & WIDHOLM, J. M. (1985) Trehalose as Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Carrot and Tobacco Cells. *Plant Physiol.*, 78, 430-432.
- BIANCHI, G., GAMBA, A., LIMIROLI, R., POZZI, N., ELSTER, R., SALAMINI, F. & BARTELS, D. (1993) The unusual sugar composition in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiol Plant*, 87, 223-226.
- BLISS, F. A. (1993) Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 152, 71-79.
- BOE, A. (2003) Genetic and Environmental Effects on Seed Weight and Seed Yield in Switchgrass. *Crop Sci*, 43, 63-67.
- BOLANDNAZAR, S. A., ALIASGARZAD, N., NEISHABURY, M. R. & CHAPARZADEH, N. (2007) Mycorrhizal colonization improves onion (*Allium cepa* L.) yield and water use efficiency under water deficit condition *Scientia Horticulturae*, 114, 11-15.
- BREEDVELD, M. W., ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. & ZEHNDER, A. J. B. (1991) Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic β -(1,2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1. *Archives of Microbiology*, 156, 501-506.
- BROUGHTON, W. J., HERNÁNDEZ, G., BLAIR, M., BEEBE, S., GEPTS, P. & VANDERLEYDEN, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55-128.
- BRÜCHER, H. (1988) The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. IN GEPTS, P. (Ed.) *Genetic Resources of Phaseolus Beans*. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher.
- BURLEIGH, S. H. & DAWSON, J. O. (1994) Desiccation tolerance and trehalose production in *Frankia* hyphae. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 593-598.
- CALVET, C., PINOCHET, J., HERNÁNDEZ-DORREGO, A., ESTAÚN, V. & CAMPRUBÍ, A. (2001) Field microplot performance of the peach-almond hybrid GF-677 after inoculation with

-
- arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root-knot nematodes. *Mycorrhiza*, 10, 295-300.
- CALVET, J. C., BESSEMOULIN, P., NOILHAN, J., BERNE, C., BRAUD, I., COURAULT, D., FRITZ, N., GONZALEZ-SOSA, E., GOUTORBE, J. P., HAVERKAMP, R., JAUBERT, G., KERGOAT, L., LACHAUD, G., LAURENT, J. P., MORDELET, P., OLIOSO, A., PÉRIS, P., ROUJEAN, J. L., THONY, J. L., TOSCA, C., VAUCLIN, M. & VIGNES, D. (1999) MUREX: a land-surface field experiment to study the annual cycle of the energy and water budgets. *Annales Geophysicae*, 17, 838-854.
- CÁRDENAS-NAVARRO, R., ADAMOWICZ, S. & ROBIN, P. (1998) Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. *Journal of Experimental Botany*, 49, 721-730.
- CASTELLANOS, J. Z., PEÑA-CABRIALES, J. J. & ROJAS-MARTÍNEZ, I. (1995) Análisis retrospectivo de inoculantes con cepas elite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Turrialba*, 45, 89-99.
- CROWE, J. H., CARPENTER, J. F. & CROWE, L. M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 73-103.
- CROWE, J. H. & CROWE, L. M. (2000) Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks. *Nat Biotechnol*, 18, 145-6.
- CROWE, J. H., CROWE, L. M. & CHAPMAN, D. (1984a) Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch Biochem Biophys*, 232, 400-7.
- CROWE, J. H., CROWE, L. M. & CHAPMAN, D. (1984b) Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science*, 223, 701-703.
- CROWE, J. H., CROWE, L. M., OLIVER, A. E., TSVETKOVA, N., WOLKERS, W. & TABLIN, F. (2001) The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43, 89-105.
- CROWE, J. H., HOEKSTRA, F. A. & CROWE, L. M. (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 54, 579-99.
- CROWE, J. H., WHITTAM, M. A., CHAPMAN, D. & CROWE, L. M. (1984c) Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochim Biophys Acta*, 769, 151-9.
- CROWE, L. M. & CROWE, J. H. (1992) Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space Res*, 12, 239-47.
- DE ARAUJO, P. S. (1996) The role of trehalose in cell stress. *Braz J Med Biol Res*, 29, 873-5.
- DE SMET, K. A. L., WESTON, A., BROWN, I. N., YOUNG, D. B. & ROBERTSON, B. D. (2000) Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology*, 146, 199-208.
- DEBOUCK, D. G. (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. IN SINGH, S. P. (Ed.) *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publisher.
- DESMARAIS, D., JABLONSKI, P. E., FEDARKO, N. S. & ROBERTS, M. F. (1997) 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. *J Bacteriol*, 179, 3146-53.
- DJEKOUN, A. & PLANCHON, C. (1991) Water Status Effect on Dinitrogen Fixation and Photosynthesis in Soybean. *Agron J*, 83, 316-322.
- ELBEIN, A. D. (1974) The metabolism of alpha,alpha-trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 30, 227-56.
- ELBEIN, A. D. & MITCHELL, M. (1974) Effects of polyanions and polycations on the trehalose phosphate synthetase of *Mycobacterium smegmatis*. *Carbohydr Res*, 37, 223-8.
- ELEUTHERIO, E. C., ARAUJO, P. S. & PANEK, A. D. (1993) Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1156, 263-6.
-

-
- ELEUTHERIO, E. C., MAIA, F. M., PEREIRA, M. D., DEGRE, R., CAMERON, D. & PANEK, A. D. (1997) Induction of desiccation tolerance by osmotic treatment in *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis*. *Can J Microbiol*, 43, 495-8.
- EVANS, A. M. (1973) Genetic improvement of *Phaseolus vulgaris*. IN MILNER, M. (Ed.) *Nutritional improvement of food legumes by breeding: Proceedings of a symposium, held at the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 3-5 July 1972 and PAG Statement 22*. New York, NY, USA, Protein Advisory Group of the United Nations Systems.
- FARÍAS-RODRÍGUEZ, R. (1998) Acumulación de trealosa por la simbiosis *Rhizobium*-frijol: su posible significado ecológico. *CINVESTAV*. México, D. F.
- 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, 352-359.
- FILLINGER, S., CHAVEROCHE, M. K., VAN DIJCK, P., DE VRIES, R., RUIJTER, G., THEVELEIN, J. & D'ENFERT, C. (2001) Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147, 1851-62.
- FINCH-SAVAGE, W. E. (1995) Influence of seed quality on crop establishment, growth and yield. IN BASRA, A. S. (Ed.) *Seed quality: Basic mechanisms and agricultural implications*. New York, Food Products Press.
- FOSTER, E. F., PAJARITO, A. & ACOSTA-GALLEGOS, J. (1995) Moisture stress impact on N partitioning, N remobilization and N-use efficiency in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural Science*, 124, 27-37.
- FREYRE, R., RÍOS, R., GUZMÁN, L., DEBOUCK, D. & GEPTS, P. (1996) Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp. (Fabaceae) in Bolivia. *Economic Botany*, 50, 195-215.
- FUHRMANN, J. & WOLLUM, A. G. (1989) Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biology and Fertility of Soils*, 7, 108-112.
- GEPTS, P. (1988) A Middle American and an Andean common bean gene pool. IN GEPTS, P. (Ed.) *Genetic Resources of Phaseolus Beans: their maintenance, domestication, evolution and utilization*. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publisher.
- GEPTS, P. & BLISS, F. (1986) Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economic Botany*, 40, 469-478.
- GEPTS, P. & DEBOUCK, D. (1991) Origin, domestication and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). IN SCHOONHOVEN, A. V. & VOYSEST, O. (Eds.) *Common Beans: Research for Crop Improvement*. Wallingford, UK, CAB International & CIAT.
- GIOVANNETTI, M., SBRANA, C., AVIO, L., CITERNESI, A. S. & LOGI, C. (1993) Differential Hyphal Morphogenesis in Arbuscular Mycorrhizal Fungi during Pre-Infection Stages. *New Phytologist*, 125, 587-593.
- GODDIJN, O. & SMEEKENS, S. (1998) Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J*, 14, 143-6.
- GODDIJN, O. J. & VAN DUN, K. (1999) Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci*, 4, 315-319.
- GOUFFI, K., PICA, N., PICHEREAU, V. & BLANCO, C. (1999) Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 1491-500.
- GUERIN, V., TRINCHANT, J. C. & RIGAUD, J. (1990) Nitrogen Fixation (C₂H₂ Reduction) by Broad Bean (*Vicia faba* L.) Nodules and Bacteroids under Water-Restricted Conditions. *Plant Physiol*, 92, 595-601.
- GUERINOT, M. L., MEIDL, E. J. & PLESSNER, O. (1990) Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*, 172, 3298-303.
-

-
-
- GUO, N., PUHLEV, I., BROWN, D. R., MANSBRIDGE, J. & LEVINE, F. (2000) Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology* 18, 168-171.
- HARDARSON, G. & LIE, T. A. (1984) *Breeding legumes for enhanced symbiotic nitrogen fixation*, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers.
- HARRIS, S. D. (2008) Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100, 823-832.
- HENCKEL, P. A. (1964) Physiology of Plants Under Drought. *Annual Review of Plant Physiology*, 15, 363-386.
- HERNÁNDEZ-DORREGO, A. (2000) Micorrización temprana de portainjertos de frutales como alternativa biotecnológica para el control de nematodos. *Facultad/Escuela Biología*. Barcelona, Universidad de Barcelona.
- HUBBELING, N. (1957) New aspects of breeding for disease resistance in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 6, 111-141.
- HUSSEIN, H. S., STERN, M. D. & JORDAN, R. M. (1991) Influence of dietary protein and carbohydrate sources on nitrogen metabolism and carbohydrate fermentation by ruminal microbes in continuous culture. *J Anim Sci*, 69, 2123-33.
- HYNES, R. & ZHAO, Q. (2000) The Evolution of Cell Adhesion. *J. Cell Biol.*, 150, F89-96.
- INGRAM, J. & BARTELS, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377-403.
- INOUE, H. & SHIMODA, C. (1981) Changes in trehalose content and trehalase activity during spore germination in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Archives of Microbiology*, 129, 19-22.
- IRIGOYEN, J. J., EMERICH, D. W. & SANCHEZ-DIAZ, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.*, 84, 55-60.
- JIMÉNEZ-ZACARÍAS, J. J., ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J. & PEÑA-CABRIALES, J. J. (2004) Nitrogenase activity and trehalose content of nodules of drought-stressed common beans infected with effective (Fix) and ineffective (Fix) rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1975-1981.
- KAPLAN, L. (1981) What is the origin of common bean? *Econ. Bot.*, 35, 240-254.
- KAUSHIK, J. K. & BHAT, R. (2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem*, 278, 26458-65.
- KHAIRALLAH, M. M., SEARS, B. B. & ADAMS, M. W. (1992) Mitochondrial restriction fragment length polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris* L.: insights on the domestication of the common bean. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 84, 915-922.
- KHAN, I. A., AHMAD, S. & MIRZA, S. (2003) Yield and Water Use Efficiency (WUE) of Avena sativa as Influenced by Vesicular Arbuscular Mycorrhizae (VAM). *Asian Journal of Plant Sciences*, 2, 371-373.
- KOENIG, R. & GEPTS, P. (1989) Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 78, 809-817.
- KOSTER, K. L. & LEOPOLD, A. C. (1988) Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiol*, 88, 829-832.
- KOUCHI, H. & YONEYAMA, T. (1986) Metabolism of [¹³C]-labelled photosynthate in plant cytosol and bacteroids of root nodules of *Glycine max*. *Physiol Plant*, 68, 238-244.
- LESLIE, S. B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J. H. & CROWE, L. M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3592-7.
-
-

-
- LINNÉ, C. (1753) *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*, Stockholm.
- LONG, S. (1989) Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*, 56, 203-214.
- LÓPEZ, M. F., MÄNNER, P., WILLMANN, A., HAMPP, R. & NEHLS, U. (2007) Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 174, 389-398.
- MARUTA, K., MITSUZUMI, H., NAKADA, T., KUBOTA, M., CHAEN, H., FUKUDA, S., SUGIMOTO, T. & KURIMOTO, M. (1996) Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta*, 1291, 177-81.
- MAZZOBRE, M. F., DEL PILAR BUERA, M. & CHIRIFE, J. (1997) Protective role of trehalose on thermal stability of lactase in relation to its glass and crystal forming properties and effect of delaying crystallization. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 324-329.
- MCGONIGLE, T. P., MILLER, M. H., EVANS, D. G., FAIRCHILD, G. L. & SWAN, J. A. (1990) A New Method which Gives an Objective Measure of Colonization of Roots by Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501.
- MELLOR, R. B. (1992) Is trehalose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganisms? *Symbiosis*, 12, 113-129.
- MELLOR, R. B., RONNENBERG, J., CAMPBELL, W. H. & DIEKMANN, S. (1992) Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature*, 355, 717-719.
- MELLOR, R. B. & ROSENDAHL, L. (1994) A soybean peribacteroid space component, riboflavin, represses daidzein-induced common nod-gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Plant Physiology*, 144, 34-37.
- MENGE, J. A., GRAND, L. F. & HAINES, L. W. (1997) The effect of fertilization on growth and mycorrhizae numbers in 11-year-old loblolly pine [*Pinus taeda*] plantations. *Plant physiology and biochemistry*, 23, 37-44.
- MORGAN, J. P. & MORGAN, K. G. (1984) Alteration of cytoplasmic ionized calcium levels in smooth muscle by vasodilators in the ferret. *The Journal of Physiology*, 357, 539-551.
- MOSSE, B. (1973) Advances in study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology*, 11, 171-196.
- MÜLLER, J., BOLLER, T. & WIEMKEN, A. (1995) Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant. Sci.*, 112, 1-9.
- MÜLLER, J., BOLLER, T. & WIEMKEN, A. (1996) Pools of non-structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress. *Physiologia plantarum*, 98, 723-730.
- MÜLLER, J., STAEHELIN, C., MELLOR, R. B., BOLLER, T. & WIEMKEN, A. (1992) Partial purification and characterization of trehalase from soybean nodules. *Journal of plant physiology*, 140, 8-13.
- MÜLLER, J., XIE, Z.-P., STAEHELIN, C., MELLOR, R. B., BOLLER, T. & WIEMKEN, A. (1994) Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiologia plantarum*, 90, 86-92.
- MULLER, J., BOLLER, T. & WIEMKEN, A. (2001) Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *J Exp Bot*, 52, 943-7.
- NIEDERER, M., PANKOW, W. & WIEMKEN, A. (1989) Trehalose synthesis in mycorrhiza of Norway spruce: an indicator of vitality. *European Journal of Forest Pathology*, 19, 14-20.
- NIELSEN, N. C. & NAM, Y. W. (1999) Soybean globulins. IN SHEWRY, P. R. & CASEY, R. (Eds.). Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
-

-
- OLAH, B., BRIERE, C., BECARD, G., DENARIE, J. & GOUGH, C. (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant Journal*, 44, 195-207.
- PARSONS, L. R. & HOWE, T. K. (1984) Effects of water stress on the water relations of (*Phaseolus vulgaris*) and the drought resistant (*Phaseolus acutifolius*). *Physiologia plantarum*, 60, 197-202.
- PEÑA-CABRIALES, J. J. & CASTELLANOS, J. Z. (1993) Effects of water stress on N₂ -fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 152, 151-155.
- PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55, 158-161.
- PILL, W. G. (1995) Low water potential and presowing germination treatments to improve seed quality. IN BASRA, A. S. (Ed.) *Seed quality: Basic mechanisms and agricultural implications*. New York, Food Products Press.
- POTTS, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 58, 755-805.
- QUISPEL, A. (1988) Bacteria-plant interactions in symbiotic nitrogen fixation. *Physiologia plantarum*, 74, 783-790.
- RAMOS, M. L. G., GORDON, A. J., MINCHIN, F. R., SPRENT, J. I. & PARSONS, R. (1999) Effect of Water Stress on Nodule Physiology and Biochemistry of a Drought Tolerant Cultivar of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *Ann Bot*, 83, 57-63.
- RICHARDS, A. B., KRAKOWKA, S., DEXTER, L. B., SCHMID, H., WOLTERBEEK, A. P., WAALKENS-BERENDSEN, D. H., SHIGOYUKI, A. & KURIMOTO, M. (2002) Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol*, 40, 871-98.
- ROMERO, C., BELLÉS, J., VAYÁ, J., SERRANO, R. & CULIÁÑEZ-MACIÀ, F. (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 201, 293-297.
- SCHMIT, V. & DEBOUCK, D. G. (1991) Observations on the origin of *Phaseolus polyanthus* Greenman. *Econ. Bot.*, 45, 345-364.
- SCHUBERT, A., WYSS, P. & WIEMKEN, A. (1992) Occurrence of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal roots. *Journal of plant physiology (Germany)*, 140, 41-45.
- SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (2006a) Situación actual y perspectiva del frijol en México 2000-2005. IN SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP) (Ed.). México, D. F., Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (2006b) Situación actual y perspectivas de la producción de frijol en México 2000-2005. IN SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP) (Ed.). México, D. F., Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- SINGH, S. P. (1995) Selection for Water-Stress Tolerance in Interracial Populations of Common Bean. *Crop Sci*, 35, 118-124.
- SINGH, S. P. (1999) Improvement of Small-Seeded Race Mesoamerica Cultivars. IN SINGH, S. P. (Ed.) *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publisher.
- SINGH, S. P. (2001) Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. *Crop Sci.*, 41, 1659-1675.
-

-
-
- SINGH, S. P., GEPTS, P. & DEBOUCK, D. (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45, 379-396.
- SINGH, S. P. & MUÑOZ, C. G. (1999) Resistance to Common Bacterial Blight among *Phaseolus* Species and Common Bean Improvement. *Crop Sci*, 39, 80-89.
- SMARTT, J. (1979) Interspecific hybridization in the grain legumes—a review. *Economic Botany*, 33, 329-337.
- SMARTT, J. (1984) Gene pools in grain legumes. *Economic Botany*, 38, 24-35.
- SOTO, T., FERNANDEZ, J., VICENTE-SOLER, J., CANSADO, J. & GACTO, M. (1999) Accumulation of Trehalose by Overexpression of tps1, Coding for Trehalose-6-Phosphate Synthase, Causes Increased Resistance to Multiple Stresses in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2020-2024.
- SOUZA, E. S., BURITY, H. A., ESPIRITO SANTO, A. C. & SILVA, M. L. R. B. (1996) Alternative for arbuscular mycorrhizal fungi inoculum production in aeroponic culture. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 153-158.
- SPIILDE, L. A. (1987) Navy Bean Seed Vigor and Field Performance in Relation to Microwave Radiation. *Agron J*, 79, 827-830.
- STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENK, H. & SCHIMPER., A. F. W. (1994) *Tratado de Botánica*, Barcelona, Ed. Omega
- STREETER, J. G. (1980) Carbohydrates in Soybean Nodules: II. DISTRIBUTION OF COMPOUNDS IN SEEDLINGS DURING THE ONSET OF NITROGEN FIXATION. *Plant Physiol*, 66, 471-476.
- STREETER, J. G. (1985) Accumulation of alpha,alpha-trehalose by Rhizobium bacteria and bacteroids. *J Bacteriol*, 164, 78-84.
- STREETER, J. G. & BHAGWAT, A. (1999) Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in *Rhizobia*. *Can. J. Microbiol.*, 45, 716-721.
- STREETER, J. G., SALMINEN, S. O., BEUERLEIN, J. E. & SCHMIDT, W. H. (1994) Factors Influencing the Synthesis of Polysaccharide by Bradyrhizobium japonicum Bacteroids in Field-Grown Soybean Nodules. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2939-2943.
- TEKRONY, D. M. & EGLI, D. B. (1991) Relationship of Seed Vigor to Crop Yield: A Review. *Crop Sci*, 31, 816-822.
- TURNER, N. C. (1986) Adaptation to Water Deficits: a Changing Perspective. *Functional Plant Biology*, 13, 175-190.
- VLISSAK, K. M. & VANDERLEYDEN, J. (1997) Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. *Critical reviews in plant sciences (USA)*, 16, 163-229.
- WELSH, D. T., REED, R. H. & HERBERT, R. A. (1991) The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCIB 9484: interaction of trehalose, K⁺ and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. *Journal of general microbiology*, 137, 745-750.
- WIEMKEN, A. (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 58, 209-217.
- WILCOX, H. E. (1996) Mycorrhizae. IN WAISEL, Y., ESHEL, A. & KAFKAFI, U. (Eds.) *Plant Roots: The Hidden Half*. New York, Marcel Dekker.
- WILLIAMS, R. J. & LEOPOLD, A. C. (1989) The Glassy State in Corn Embryos. *Plant Physiol.*, 89, 977-981.
- YOUNG, A. W., BOLING, J. A. & BRADLEY, N. W. (1977) Abomasal infusion of soybean meal necessary to provide nitrogen retention equivalent to steer fed soybean meal. *Int J Vitam Nutr Res*, 47, 296-303.
- ZAHARAN, H. H. (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 968-89, table of contents.
-
-

