

T.127

49811



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES  
ORIENTACION FISILOGÍA VEGETAL

**Trabajo de Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas**


Aspectos bioquímicos, fisiológicos y genéticos de la  
interacción leguminosa - (*Brady*)*Rhizobium* en condiciones  
de estrés. El efecto del fungicida thiram

**JAVIER ALBERTO ANDRÉS**

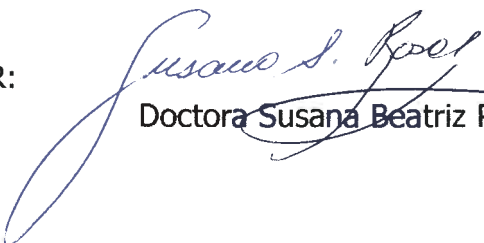
Trabajo de Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas

Aspectos bioquímicos, fisiológicos y genéticos de la interacción leguminosa -  
(*Brady*)*Rhizobium* en condiciones de estrés. El efecto del fungicida thiram

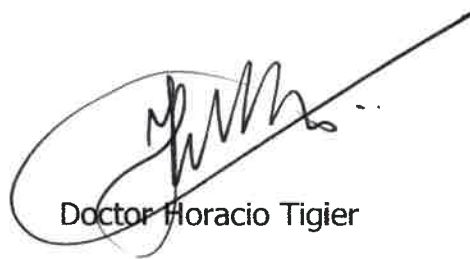
DOCTORANDO:

  
Microbiólogo Javier Alberto Andrés


DIRECTOR:

  
Doctora Susana Beatriz Rosas

JURADOS:

  
Doctor Horacio Tigier

  
Doctor Carlos Tonn

  
Ing. Agr. Ms.Sc. Néstor Correa

11884

T. 127

## *AGRADECIMIENTOS*

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, institución en que cursé mis estudios de grado y de postgrado y en la que me sigo formando día a día

A la Escuela de Postgrado de la UNRC por todo el apoyo brindado para la concreción de esta tesis

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR) y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNRC por las becas concedidas que determinaron mi inicio en la investigación de este tema de tesis

A la Dra. Susana Rosas, directora de este trabajo; al Ing. Agr. Ms. Sc. Néstor Correa, al Dr. Horacio Tigier y al Dr. Carlos Tonn, por su labor como jurados y al Dr. Rubén Bottini, por sus aportes como miembro de la Comisión Especial de Tesis

A la memoria del Dr. Eduardo Guerreiro

A Carmen Olmedo y Alicia Thuar, mis compañeras de la Orientación Microbiología Agrícola

A todo el personal docente, no docente y becarios de los Laboratorios de Fisiología Vegetal, los que están y los que estuvieron

A los amigos de todos los días

*DEDICATORIA*

Porque sobran las palabras, sencillamente dedicado a:

Ana María y Francisco

Mis padres, hermano y abuelos

R.D. Soria, F.A. Barboza y F.B. Bastián

S.G. Alemanno, O. Masciarelli, E.S. Abdul y M.J.L. Sáenz Avalos

## INDICE

	N° de página
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. Introducción General	
El nitrógeno en el suelo	3
Los organismos que fijan N <sub>2</sub> y la enzima nitrogenasa	5
La simbiosis leguminosa-rizobio	9
La fijación biológica de N <sub>2</sub> en condiciones de estrés.	
Factores que la afectan	13
Pesticidas en la agricultura. El fungicida thiram	21
CAPÍTULO 2. El efecto del fungicida thiram sobre aspectos fisiológicos de plantas y microorganismos.	
<i>Introducción</i>	23
<i>Materiales y Métodos</i>	
El efecto de thiram sobre la nodulación en soja	27
El efecto de thiram sobre la nodulación en alfalfa	28
El efecto de thiram sobre la viabilidad de <i>B. japonicum</i>	28
<i>Resultados</i>	
El efecto de thiram sobre la nodulación en soja	29
El efecto de thiram sobre la nodulación en alfalfa	29
Determinación de la viabilidad de <i>B. japonicum</i> en presencia de thiram	30
<i>Discusión</i>	31
¿Es thiram carcinogénico?	
<i>Introducción</i>	33
<i>Materiales y métodos</i>	34
<i>Resultados y Discusión</i>	34
CAPÍTULO 3. Obtención y caracterización de cepas de <i>B. japonicum</i> resistentes a thiram	
<i>Introducción</i>	37
<i>Materiales y Métodos</i>	
Agente químico	38
Aislamiento de cepas de <i>B. japonicum</i> desde nódulos de soja	38
Aislamiento de cepas resistentes a thiram	39
Esterilización de semillas de soja	39
Ensayo de sobrevivencia sobre semillas	39
Ensayos de nodulación	39
Pruebas de caracterización de cepas de <i>B. japonicum</i> resistentes a thiram	
Introducción de marcadores de resistencia	40
Crecimiento a diferentes pH	40
Capacidad desnitrificante	40
Tolerancia salina	41
Producción de sideróforos	41
Solubilización de fosfatos	41



<i>Resultados</i>	
Cepas bacterianas obtenidas o empleadas en este estudio	42
Aislamiento de cepas resistentes a thiram	43
Ensayo de sobrevivencia sobre semillas	43
Ensayos de nodulación	43
Pruebas de caracterización de cepas de <i>B. japonicum</i>	
Resistentes a thiram	45
<i>Discusión</i>	47

#### CAPÍTULO 4. La inducción de genes de nodulación de rhizobia en presencia de thiram

<i>Introducción</i>	50
<i>Materiales y Métodos</i>	
Agente químico	53
Material vegetal	53
Esterilización superficial de semillas	53
Bioensayo de inducción de genes <i>nod</i>	54
<i>Resultados</i>	
Bioensayo de inducción de genes <i>nod</i> ...	
por exudados de alfalfa en presencia de thiram	56
por exudados de soja en presencia de thiram	57
por sustancias flavonoides	58
por exudados de alfalfa suplementados con flavonoides	61
por exudados de soja suplementados con flavonoides	62
<i>Discusión</i>	63

#### CAPÍTULO 5. Conclusión General y Referencias Bibliográficas

Conclusión General	66
Bibliografía	67

## Trabajo de Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas

### Aspectos bioquímicos, fisiológicos y genéticos de la interacción leguminosa - (*Brady*)*Rhizobium* en condiciones de estrés. El efecto del fungicida thiram (disulfuro de bis-dimetil-tiocarbamilo)

#### RESUMEN

En condiciones limitantes de nitrógeno en los suelos, bacterias de la familia Rhizobiaceae, colectivamente denominadas rizobios, establecen una relación simbiótica con plantas leguminosas, determinando la formación de nódulos u órganos especializados en raíces y tallos. En estas estructuras, las bacterias convierten el  $N_2$  atmosférico en  $NH_4^+$ , el que es empleado por la planta como fuente de nitrógeno.

En estados iniciales de esta relación, compuestos flavonoides altamente específicos presentes en los exudados de raíces y semillas desencadenan la expresión de genes bacterianos (genes *nod* y *nol*) dando comienzo al proceso de nodulación.

Distintas condiciones de estrés, como déficit hídrico, salinidad, acidez, alcalinidad, temperaturas extremas y agroquímicos inciden sobre el sistema.

Desde los años '60 existen reportes que dan cuenta que fungicidas empleados como protectores de semillas podían afectar el proceso simbiótico. En algunos estudios realizados con thiram (disulfuro de bis dimetil tiocarbamilo) éste ha sido reportado como un factor de disminución de la nodulación de soja. El objetivo de este trabajo de tesis doctoral es estudiar los efectos de thiram sobre los procesos de reconocimiento planta-bacteria y los estado iniciales de la nodulación en soja y alfalfa, así como tratar de brindar una solución práctica ante el problema del uso de agroquímicos, como es la selección de cepas bacterianas resistentes a fungicidas para ser empleadas en la formulación de inoculantes.

Para los estudios a nivel molecular se cuenta con una serie de cepas isogénicas de rizobia donde los promotores génicos de la región *nod* se encuentran clonados junto al gen estructural *lacZ* de *Escherichia coli*, herramienta que permite probar si exudados vegetales son capaces de activar o inhibir la transcripción de los genes *nod*, midiendo la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

Exudados de semillas y raíces colectados a distintos tiempos del crecimiento vegetal, así como compuestos flavonoides puros fueron ensayados en presencia del fungicida thiram. Los resultados obtenidos muestran que thiram inhibe significativamente la inducción de los genes de nodulación bacterianos. La cantidad o calidad de los exudados vegetales, así como la interacción de los mismos con el producto del gen *nodD* podrían verse afectados en presencia de este fungicida.



En este mismo trabajo se han obtenido cepas de *Bradyrhizobium japonicum* altamente resistentes a thiram, algunas de las cuales (cepas TIIIB, A86 y A2) mantienen intactas las propiedades simbióticas. En otras cepas, la adquisición de la resistencia llevó a la pérdida de la capacidad de nodular (cepas A1, C1 y C6).

Las cepas resistentes fueron sometidas a pruebas de caracterización tales como resistencia y sensibilidad a antibióticos, tolerancia a distintos pH, tolerancia a salinidad, capacidad desnitrificante, producción de sideróforos y solubilización de fosfatos. Estas cepas podrían ser utilizadas en la elaboración de inoculantes apropiados para su uso en semillas tratadas con thiram sin que ello lleve a pérdida de la viabilidad del inoculante y consiguiente merma en los rendimientos.

## Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### El Nitrógeno en el Suelo.

La disponibilidad de nitrógeno, el nutriente del suelo que en mayor cantidad requiere un vegetal, es de considerable importancia económica. Este elemento, clave en la estructura de las proteínas y otras moléculas biológicas, es un componente indispensable en el protoplasma de plantas, animales y microorganismos.

Debido a la posición crítica del suministro de nitrógeno en la producción de cultivos y en la fertilidad del suelo, una marcada deficiencia del mismo puede reducir la producción y la calidad de las cosechas, y también, a causa de que es uno de los pocos nutrientes del suelo que se pierde por condiciones de volatilización, lixiviación y anaerobiosis, requiere de una conservación y mantenimiento constantes

El nitrógeno sufre un número de transformaciones que involucran a compuestos orgánicos, inorgánicos y volátiles. Las reacciones implicadas pueden verse como un ciclo en el cual, en varios pasos, el nitrógeno es manejado a discreción por los microorganismos del suelo (Alexander 1977)

El nitrógeno presente en los tejidos vegetales podrá ser utilizado por los animales en cuyo cuerpo se convertirá en otros compuestos simples y complejos. Cuando los tejidos y excrecencias de animales, plantas e incluso microorganismos son sujetos a la degradación microbiológica, el nitrógeno es liberado de los compuestos orgánicos bajo la forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), el que posteriormente puede ser oxidado a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), proceso conocido en forma global como mineralización. Contrastando con esta conversión de sustancias complejas a simples se encuentra la inmovilización o asimilación, en donde las formas inorgánicas son tomadas por vegetales y microorganismos llevando a la síntesis de moléculas complejas. Los procesos de mineralización e inmovilización ocurren simultáneamente en el ecosistema suelo.

A pesar de su función crítica en la nutrición vegetal, el nitrógeno es asimilado completamente en el estado inorgánico, bajo las formas de nitrato o amonio. Aunque en general los suelos tienen contenidos totales de nitrógeno muy superiores a los requerimientos de los cultivos, casi todo este elemento se encuentra formando parte de la materia orgánica y anualmente sólo se mineraliza una pequeña fracción (1% a 3% del N total). Debido a esta lenta liberación, el nitrógeno frecuentemente se constituye en un limitante para la producción de cultivos.

El nitrógeno, una vez bajo la forma de nitrato, puede perderse del suelo en varias formas. A causa de su solubilidad en la solución del suelo, el nitrato se mueve fácilmente colocándose debajo de la zona de penetración de las raíces (lixiviación). En condiciones de elevado pH en suelo, amonio y nitritos pueden volatilizarse y la

voladura de suelos superficiales por efecto del viento (erosión eólica) así como la quema de pastizales también contribuyen a pérdidas del mineral.

La fuga biológica más importante la constituye la desnitrificación, respiración anaeróbica llevada a cabo por microorganismos, donde el nitrato es reducido a formas gaseosas del nitrógeno ( $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO$ ) las que pasan a la atmósfera, tornándose inutilizables para la mayoría de los seres vivos.

El retiro de importantes cantidades de nitrógeno por las cosechas puede en parte ser compensado con el agregado de fertilizantes químicos, pero el uso de estos es muchas veces inapropiado, pudiendo incluso llegar a generar más problemas que soluciones. Cualquier ruptura en el ciclo disminuye la reserva de nitrógeno en el suelo y puede tener efectos drásticos sobre la economía agrícola.

Como la fuga de nitrógeno hacia la atmósfera es constante, debe existir un proceso inverso para mantener el balance, de lo contrario la reserva mundial de nitrógeno estaría disminuyendo constantemente.

Aunque inactivo en lo que concierne a animales, vegetales y muchos microorganismos, ciertas bacterias pueden actuar sobre el  $N_2$ , pudiéndolo usar como fuente de nitrógeno. Este proceso, conocido como fijación biológica del nitrógeno, da como resultado la acumulación de nuevos compuestos orgánicos en las células de los organismos responsables, por lo que el  $N_2$  se introduce nuevamente en la circulación general cuando los nuevos compuestos son mineralizados.

Las precipitaciones y las descargas eléctricas pueden también regresar una pequeña cantidad de nitrógeno al suelo bajo la forma de sales de amonio o de nitrato, en un proceso a veces llamado fijación no biológica, pero es en realidad la fijación de carácter biológico la que más contribuye al mantenimiento del ciclo.

## Los organismos que fijan nitrógeno y la enzima nitrogenasa.

Los seres vivos agrupados en los reinos Animal, Vegetal, Hongo y Protista, todos los cuales poseen células de estructura eucariota, son incapaces de convertir el gas estable  $N_2$ , componente de aproximadamente el 78% de la atmósfera, en formas de uso biológico. La capacidad de fijar nitrógeno está limitada a algunos organismos del reino Monera, el único con célula de estructura procariota. Este reino ha sido ahora subdividido en otros dos (Eubacteria y Archeobacteria) que difieren entre sí tanto como cada uno de ellos lo hace con los reinos eucariotas (Woese 1987). No obstante, en ambos grupos se encuentran microorganismos fijadores de nitrógeno. La capacidad de fijar  $N_2$  en  $NH_4$  está ampliamente difundida entre los procariotas, de manera que puede ser encontrada tanto en bacterias gram positivas como gram negativas, autótrofas y heterótrofas, aeróbicas, anaeróbicas y anaeróbicas facultativas e incluso en grupos con particulares características como son las cianobacterias y los actinomicetos. Muchas de ellas son bacterias de vida libre, en tanto que otras viven asociadas a plantas, hongos e incluso animales, formando en algunos casos verdaderas asociaciones simbióticas.

### Géneros de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

(Actualizado sobre la base de Sprent y Sprent 1990)

FAMILIA GENERO	COMENTARIO GENERAL
Acetobacteriaceae <i>Acetobacter</i>	Aislado de caña de azúcar. Crece a bajo pH y altas concentraciones de sacaosa. Puede formar acetato desde etanol
Azotobacteriaceae <i>Azotobacter</i> <i>Azomonas</i> <i>Azotococcus</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Dexia</i> <i>Xanthobacter</i>	Suelo, agua, hojas y superficie de raíces Fijan $N_2$ aeróbicamente pero son más eficientes a baja $pO_2$ . Pueden habitar suelos ácidos y alcalinos. <i>Xanthobacter</i> puede fijar autotróficamente ( $H_2$ , $CO_2$ ) y heterotróficamente
Bacillaceae <i>Bacillus</i>	Muy distribuido. Aerobio a anaerobio facultativo La mayoría de las cepas fijan aeróbicamente
<i>Clostridium</i>	Suelo, agua fresca, agua salada, sedimentos, intestinos. Fijan anaeróbicamente o en microaerofilia. Algunas especies reducen $Fe^{+3}$
<i>Desulfotomaculum</i>	Intestino, rumen. Anaerobio estricto. Convierten $SO_4^-$ a $S^-$ . Algunas cepas fijan $N_2$ .

Beggiatoaceae <i>Beggiatoa</i> <i>Vitreoscilla</i> <i>Thiothrix</i>	Marinos y de agua dulce, filamentosas, oxidan el S=
Chlorobiaceae <i>Chlorobium</i> <i>Pelodictyon</i>	Bacterias verdes del azufre. Suelos húmedos y fangosos, aguas dulces y saladas. Anaerobios estrictos, la fijación de N <sub>2</sub> no es común
Chloroflexaceae <i>Chloroflexus</i>	Bacterias verdes filamentosas. Fijan N <sub>2</sub> en condiciones de anaerobiosis
Chromatiaceae <i>Amoebobacter</i> <i>Chromatium</i> <i>Ectothiorhodospira</i> <i>Thiocapsa</i> <i>Thiocystis</i>	Bacterias rojas del azufre. Suelos húmedos y fangosos, anaerobios estrictos. La fijación de N <sub>2</sub> no es común.
Corynebacteriaceae <i>Arthrobacter</i>	Suelos húmedos y fangosos, algunas cepas fijan nitrógeno tanto autotrófica (H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> ) como heterotróficamente en presencia de O <sub>2</sub>
Enterobacteriaceae <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Erwinia</i>	Originalmente aislados desde flora intestinal y actualmente reportados en numerosos habitats, incluyendo hojas, nódulos y cortezas de árboles. Pocas cepas fijan N <sub>2</sub> en aerobiosis y microaerofilia. <i>Erwinia</i> es patógeno de plantas.
Methanomonadaceae <i>Methylobacter</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylocystis</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylosinus</i>	Suelo y agua. Utilizan el metano. Crecen y fijan N <sub>2</sub> en aerobiosis
Pseudomonadaceae <i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i>	Aerobios estrictos, algunos anaerobios facult. Quimioheterótrofos de enorme versatilidad metabólica. Agua, suelo. Algunos patógenos de vegetales y animales. Algunos fijan N <sub>2</sub>
Rhizobiaceae <i>Azorhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Rhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i> <i>Mesorhizobium?</i> <i>Photorhizobium?</i> <i>Agrobacterium</i>	Aerobios del suelo, quimioheterótrofos. Nodulan simbióticamente raíces y tallos de leguminosas formando nódulos. <i>Agrobacterium</i> es patógeno de plantas.
Rhodospirillaceae <i>Rhodomicrobium</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodospirillum</i>	Bacterias púrpuras no sulfurosas. Mayormente acuáticos, anaerobios facultativos, cuando usan nitrógeno combinado crecen en microaerofilia, cuando fijan requieren luz y anaerobiosis

Spirillaceae	
<i>Aquaspirillum</i>	Aerobios obligados asociados por lo general a raíces de gramíneas donde fijan N <sub>2</sub> en condiciones de microaerofilia
<i>Azospirillum</i>	
<i>Herbaspirillum</i>	
<i>Campylobacter</i>	
Streptomycetaceae	
<i>Frankia</i>	Actinomiceto de crecimiento muy lento. Nodulan no leguminosas incluso árboles. Hifas a veces septadas, vesículas fijadoras de N <sub>2</sub> y esporangios. Viven en suelo saprofiticamente o en latencia (esporas)
Thiobacteriaceae	
<i>Thiobacillus</i>	Aguas ácidas con alto contenido de Fe. Quimioautótrofo, oxida Fe <sup>++</sup> y compuestos con S. Aerobios, fijan N <sub>2</sub> en microaerofilia
Vibrionaceae	
<i>Vibrio</i>	Marinos, probablemente halófilos. Pueden usar agar como fuente de carbono
Familias inciertas	
<i>Alcaligenes</i>	Suelos, oxidan el H <sub>2</sub>
<i>Desulfovibrio</i>	Suelos húmedos, aguas dulces y saladas con alto contenido de materia orgánica. No todas las cepas fijan N <sub>2</sub> .

Deben incluirse además numerosos géneros de cianobacterias, agrupados por lo menos en 9 familias. La taxonomía de cianobacterias es sumamente contradictoria, con géneros y familias reconocidos sólo por algunos autores y con el empleo de sinónimos. Sprent y Sprent, 1990, proponen el siguiente ordenamiento:

<u>FAMILIA</u>	<u>GENEROS</u>
Chroococcaceae	<i>Chloroglea, Chroococcidiopsis, Gloetotheca, Synechococcus</i>
Mastigocladaceae	<i>Mastigocladus</i>
Microchaetaceae	<i>Microchaete</i>
Nostocaceae	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Aulosira, Nostoc, Cylindrospermum, Pseudanabaena, Nodularia, Raphidiopsis, Richelia</i>
Oscillatoriaceae	<i>Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Phormidium, Plectonema</i>
Pleurocapsaceae	<i>Pleurocapsa</i>
Rivulariaceae	<i>Calothrix, Dichothrix, Gleotrichia</i>
Scytonemataceae	<i>Scytonema, Tolypothrix</i>
Stigonemataceae	<i>Fischerella, Hapalosiphon, Stigonema, Westelliopsis</i>



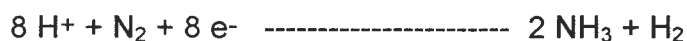
Todos los organismos capaces de fijar nitrógeno poseen el complejo enzimático denominado nitrogenasa. Comparado con varias otras enzimas, la nitrogenasa es de gran tamaño y requiere una importante inversión por parte de la célula, lo que queda demostrado con que alrededor del 30% del total de proteínas celulares puede ser contado como parte integrante de la nitrogenasa (Haaker y Klugkist 1987) y sus requerimientos en términos de energía (ATP), Mo y Fe son elevados. La enzima está estructurada en dos componentes, dos metaloproteínas fácilmente separables que recibieron distintos nombres según los laboratorios que las purificaron. La fracción mayor, componente I, Azofermo o proteína FeMo, posee una masa molecular de aproximadamente 220 kD y está a su vez formada por cuatro subunidades. La fracción menor, componente II, Azofer o proteína Fe posee una masa molecular en el rango de 57 a 72 kD y consiste de dos subunidades.

La secuencia completa de aminoácidos para ambos componentes de la enzima ha sido determinada para varios microorganismos fijadores de nitrógeno, demostrándose la existencia de un considerable grado de homología.

Debido a que la reducción del N<sub>2</sub> tiene lugar sobre la proteína FeMo, el término nitrogenasa fue propuesto para denominar a este componente en tanto que la proteína Fe fue llamada nitrogenasa reductasa (Hageman y Burris 1978).

La reducción del N<sub>2</sub> sucede de la siguiente manera: a bajo potencial redox (al menos -430 mv, posiblemente superior en aerobios) moléculas reductoras tales como ferredoxinas o flavodoxinas donan un electrón a la proteína Fe, lo que permite a esta reaccionar con Mg-ATP. Entretanto, el N<sub>2</sub> a reducir se combina con la proteína FeMo en el sitio donde ésta contiene dos átomos de Mo. Ambos componentes ahora se juntan para formar el complejo nitrogenasa y el electrón fluye desde la proteína Fe a la proteína FeMo, concomitantemente con la hidrólisis de 2 moléculas de ATP y la liberación del Mg. El proceso es altamente sensible a la presencia de oxígeno.

Tienen lugar entonces dos reducciones simultáneas y aparentemente inseparables, la del N<sub>2</sub> y la del H<sub>2</sub>:



En condiciones naturales, la reducción de H<sup>+</sup> a H<sub>2</sub> puede ser sustancial y competir con el N<sub>2</sub> por los electrones, por lo que esta reacción podría limitar la eficiencia de la fijación. No obstante, algunas cepas de microorganismos fijadores contienen una enzima hidrogenasa que puede partir el H<sub>2</sub> y reciclar los electrones subsanando de esta manera el problema.

El NH<sub>3</sub> puede resultar tóxico si la concentración es elevada, por lo que es rápidamente incorporado a compuestos orgánicos.

## La Simbiosis Leguminosa - Rizobio

La interacción simbiótica entre bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* o *Azorhizobium* y plantas leguminosas resulta en la formación de nódulos radicales, estructuras altamente organizadas en las que el  $N_2$  es convertido a  $NH_3$  por la bacteria, permitiendo el crecimiento de la planta sin un suministro externo de nitrógeno reducido. La capacidad de establecer esta relación simbiótica está restringida a las leguminosas con una única excepción conocida, el género *Parasponia* de las Ulmaceae. La familia Leguminosae abarca plantas muy diversas en morfología, habitat y ecología que van desde especies anuales del ártico hasta árboles tropicales. Esta familia se divide en tres subfamilias, Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, cada una de las cuales posee géneros capaces de formar nódulos radicales, no obstante el porcentaje de especies nodulantes es muy distinto entre las subfamilias. Existen pocos géneros que no nodulan en Mimosoideae y Papilionoideae, pero en la menos especializada Caesalpinioideae se incluyen numerosos géneros no nodulantes, y dado que esta subfamilia es la más primitiva hemos de suponer que la simbiosis se desarrolló en una etapa bastante tardía de la evolución de las leguminosas (van Rhijn y Vanderleyden 1995).

Los tres géneros bacterianos citados han sido agrupados tradicionalmente con las agrobacterias y filobacterias en la familia Rhizobiaceae (Jordan 1984). El uso de métodos modernos de sistemática bacteriana, tal como la taxonomía numérica, la hibridación de ácidos nucleicos y el análisis de ARNr 16S están mostrando la existencia de una marcada diversidad genética dentro de esta gran familia. Algunos nuevos géneros, como *Sinorhizobium* y *Photorhizobium*, han sido propuestos por algunos autores y es de esperar que otros se agreguen con el estudio de otras leguminosas y el avance de la metodología.

La relación leguminosa-rizobio tiene un alto grado de especificidad respecto de determinadas especies o cepas de bacterias para nodular particulares grupos de plantas, tal como pretende mostrarlo la siguiente tabla, aunque es de aclarar que la situación es sumamente compleja dado que el grado de especificidad varía enormemente entre los rizobios.

<u>Bacteria</u>	<u>Planta hospedante</u>
<i>R. meliloti</i> ( <i>S. meliloti</i> ?)	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
<i>R. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Rhizobium</i> sp. <i>cepa</i> NGR234	Leguminosas tropicales, <i>Parasponia</i> spp.
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> y <i>Macroptilium</i> spp.
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. fredii</i> ( <i>S. fredii</i> ?)	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> , otras leguminosas
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> , otras leguminosas
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> , otras leguminosas
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Parasponia</i> spp.
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp. (nódulos en tallo)

La formación de un nódulo radical comprende varios estadios determinados por diferentes juegos de genes tanto del micro como del macrosimbionte.

Durante las etapas tempranas de la interacción tiene lugar un intercambio de señales entre los simbiontes involucrando la expresión, regulada espacial y temporalmente, de genes específicos.

Moléculas señales del tipo flavonoides, liberadas por la planta, inducen la expresión de genes de nodulación (*nod* y *nodI*) en los rizobios, los que están relacionados con la producción de estructuras lipoquitooligosacáridos, comunmente denominados factores Nod. Estos son capaces de disparar varias respuestas en la planta, tal como la deformación de los pelos radicales, la formación de hilos de preinfección y la inducción de divisiones celulares corticales que llevan a la formación del primordio nodular (Higashi 1993). Los factores Nod son además responsables de inducir la expresión de genes de la planta específicos de nódulos, llamados genes de nodulinas (van Kammen 1984), los que han sido divididos en genes de nodulinas tempranas y tardías de acuerdo al momento en que tiene lugar su expresión durante el desarrollo del nódulo. Por definición, estos genes debieran ser activos solamente en las estructuras simbióticas y no en células no infectadas o en otra parte de la planta, no obstante para algunos genes primariamente considerados como nodulinas se encontró que su expresión no está limitada al nódulo, lo que permite hipotetizar que juegan algún papel en otros órganos y han sido seleccionados para participar en la organogénesis y funcionamiento del nódulo (Muñoz et al. 1996).

Al principio, en un estado de pre-infección, la bacteria responde por quimiotaxis positiva a exudados vegetales y se mueve hacia sitios localizados de la raíz donde induce la deformación, ramificación y curvado de los pelos radicales. En el próximo estado, la bacteria penetra la pared celular a través de una disolución parcial de la misma cercana a la región curvada del pelo radical. En este sitio, una pared celular secundaria es depositada por la planta y contribuye a la formación de una nueva estructura celular, el hilo de infección. Estos tubos, verdaderas invaginaciones de la membrana plasmática, penetran a través de las capas celulares por medio de un mecanismo de degradación y nueva deposición de pared, al tiempo que se ramifican y transportan a las bacterias que a su vez se están multiplicando activamente. Concomitantemente, e incluso con anterioridad, a la formación del hilo de infección, se inducen divisiones mitóticas en la corteza radical llevando a la formación de un primordio nodular a través del cual crece el hilo de infección. Las bacterias son liberadas desde las puntas del hilo de infección dentro de las células vegetales por un proceso de endocitosis durante el cual las células son rodeadas por una membrana celular vegetal llamada membrana peribacteroide. Simultáneamente se forma un meristema en la zona apical del primordio nodular. Estas células meristemáticas son de tamaño pequeño y poseen vacuolas de menor tamaño que las demás células del primordio. Luego de la liberación dentro de las células vegetales, las bacterias detienen su división celular, aumentan de tamaño y se diferencian hacia formas endosimbióticas denominadas bacteroides fijadores de  $N_2$  mientras que el primordio lo hace hacia un nódulo radical. Una representación esquemática de los distintos eventos del proceso de nodulación se presenta en la figura 1.

Las células vegetales experimentan una sucesión de cambios morfológicos y bioquímicos como la aparición de nuevas nodulinas y de un sistema vascular a fin de facilitar el intercambio de nitrógeno fijado y nutrientes (en especial carbohidratos) entre los miembros de la simbiosis.

Basándose en la presencia o ausencia de un meristema persistente, podemos diferenciar dos tipos de nódulos (figura 2). Ambos presentan una zona central fijadora de  $N_2$ , con células invadidas y no invadidas así como varios tejidos periféricos (epidermis, corteza nodular, endodermis, parénquima nodular).

En general, las leguminosas de clima templado (ej. alfalfa, trébol, arveja) poseen nódulos con un patrón de crecimiento indeterminado, de forma cilíndrica y con la presencia de un meristema apical persistente que permite la elongación del nódulo ya que nuevas células son agregadas constantemente. Mientras el meristema está activo los rizobios son liberados desde los hilos de infección dentro del citoplasma de las células invadidas. Es posible distinguir diferentes zonas del nódulo con distinto estado de desarrollo. La zona más distal es el meristema apical, luego le siguen una zona de invasión donde los hilos de infección están liberando bacterias, una zona



simbiótica temprana donde los rizobios se están diferenciando hacia bacteroides, una zona simbiótica tardía donde se está fijando el  $N_2$  y finalmente una zona senescente, la más proximal, donde las células vegetales y microbianas están degenerando.

Por otro lado, la mayoría de las leguminosas tropicales (ej. soja, maní, poroto) presentan nódulos con un patrón determinado de crecimiento, ya que las divisiones celulares cesan tempranamente y la forma final depende de la expansión celular, resultando usualmente esféricos. Todas las células del tejido central se encuentran en el mismo estado de desarrollo.

El nitrógeno fijado es convertido en compuestos orgánicos en los nódulos antes de ser exportado a través del xilema. Basándose en la composición del jugo xilemático, las leguminosas fijadoras de  $N_2$  pueden dividirse en exportadoras de amidas o exportadoras de ureídos. En la primera situación, característica de leguminosas de clima templado y nódulos indeterminados, el  $NH_3$  producido en el bacteroide es incorporado en aminoácidos, en especial glutamina y asparragina. Por su parte en el segundo caso, característico de leguminosas de clima tropical o subtropical y nódulos determinados, el nitrógeno fijado es conducido a la síntesis de ureídos, de los que los más abundantes son el ácido alantoico, la alantoína y la citrulina.

El problema del oxígeno: la enzima nitrogenasa es extremadamente sensible al  $O_2$  debido a que uno de sus componentes, la proteína FeMo, se desnaturaliza irreversiblemente en presencia de este gas. Por otra parte, la gran cantidad de energía requerida para el funcionamiento de la enzima debe ser generada por procesos oxidativos, de allí que los nódulos demanden abundante  $O_2$ . En los nódulos el problema se afronta con una baja tensión de  $O_2$  en la parte central gracias a la combinación de una alta actividad metabólica de los bacteroides y la presencia de una barrera difusora del oxígeno en el parénquima nodular, que contiene muy pocos y pequeños espacios intercelulares. Además, en las células infectadas de la zona central la difusión del  $O_2$  se facilita por una proteína transportadora, la nodulina Leg-Hemoglobina, presente en altos niveles y que provee a los bacteroides con suficiente  $O_2$  como para asegurar la producción de energía al tiempo que mantiene un concentración muy baja de este gas libre en el citoplasma de la célula infectada.

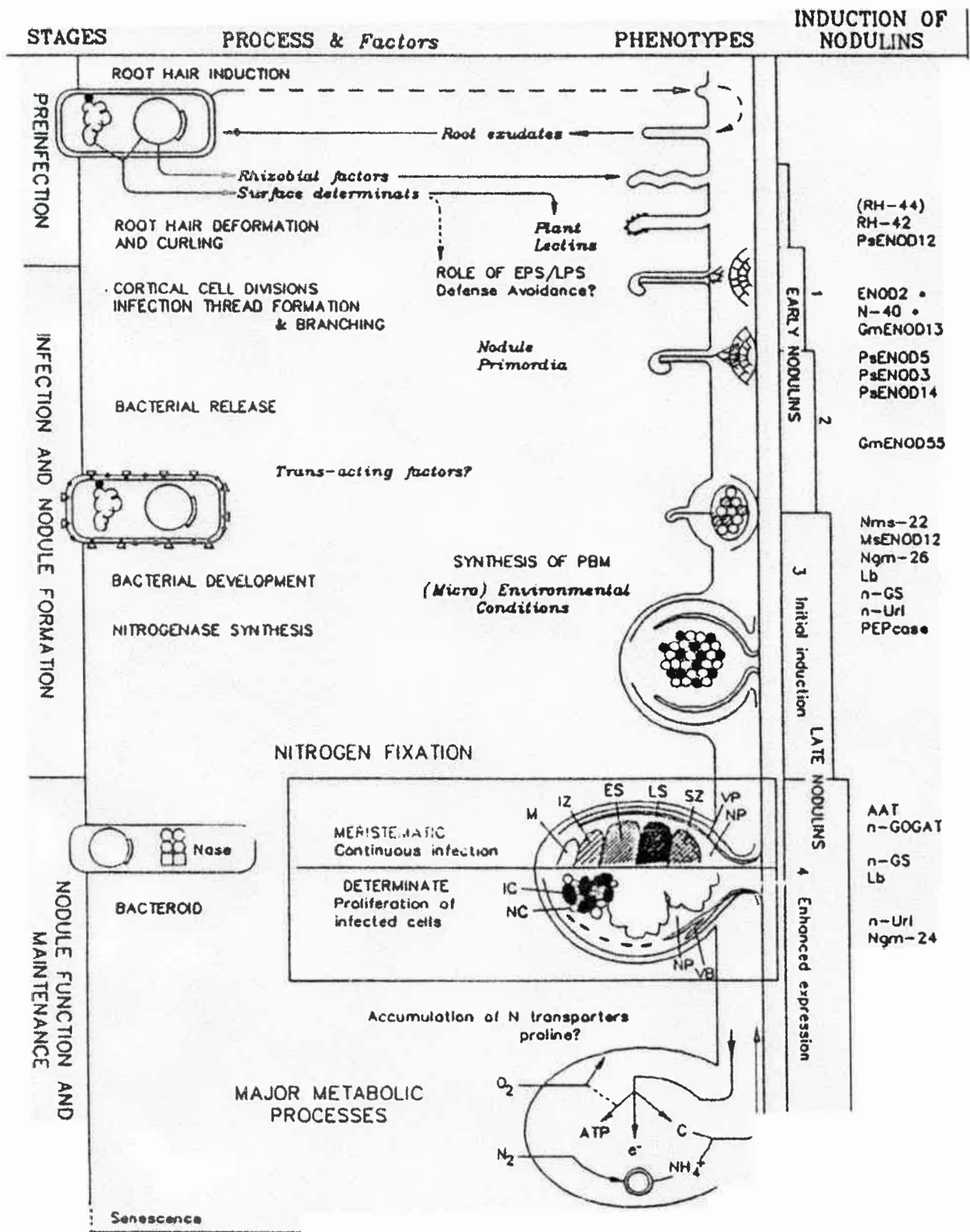
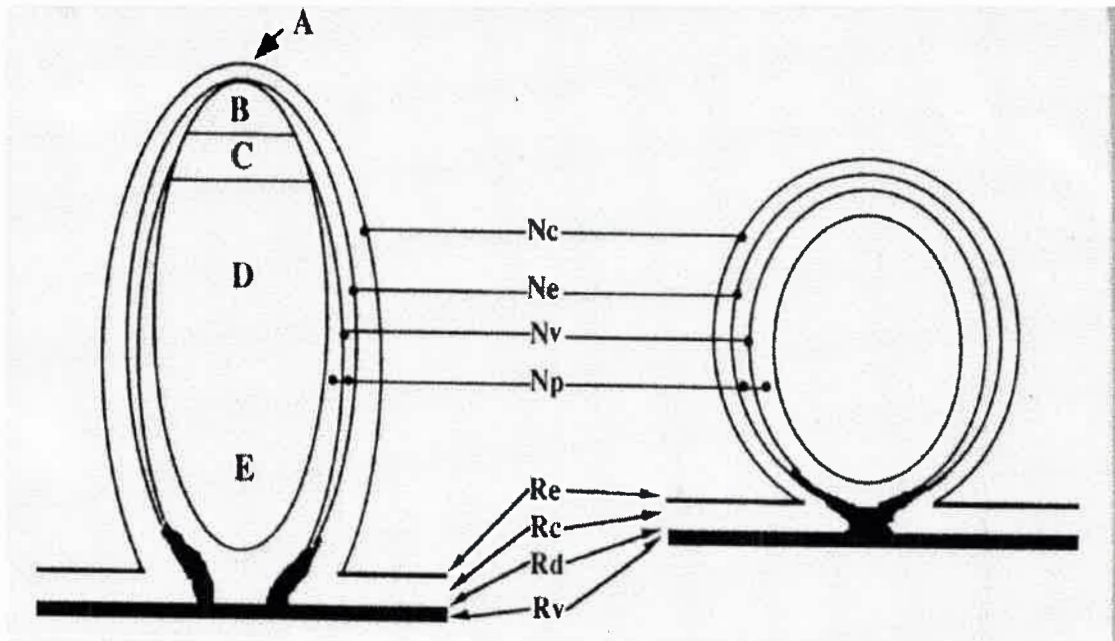


Figura 1. Representación esquemática de los eventos involucrados en la formación de un nódulo fijador de N<sub>2</sub>. (Tomado de Sánchez y col. 1991)





**Figura 2.** Representación de un nódulo indeterminado (izquierda) y uno determinado (derecha). A: meristema nodular, B: zona de infección, C: interzona, D: zona de fijación de  $N_2$ , E: zona senescente, Nc: corteza del nódulo, Ne: epidermis del nódulo, Nv: tejido vascular del nódulo, Np: parénquima del nódulo, Re: epidermis de raíz, Rc: corteza de raíz, Rd: endodermis de raíz, Rv: tejido vascular de raíz. (Tomado de Muñoz y col. 1996)

## La Fijación Biológica del N<sub>2</sub> en condiciones de estrés. Factores que la afectan.

Numerosos factores, tanto de carácter biótico como abióticos, ejercen su influencia sobre la fijación del N<sub>2</sub> por las leguminosas.

Entre los **factores bióticos** hemos de considerar principalmente la acción de organismos fitopatógenos así como los mecanismos de sobrevivencia de los rizobios en el suelo.

Cuando los organismos participantes de la interacción simbiótica son atacados por patógenos, el proceso de fijación se ve usualmente afectado de una manera desfavorable.

Los virus vegetales afectan la estructura y la fisiología de las plantas hospedantes y de los nódulos radicales, e incluso se ha puntualizado que las plantas atacadas por virus pueden actuar selectivamente sobre los rizobios del suelo a través de los exudados de sus raíces, cuya composición se vería alterada. Altos niveles de virus en los nódulos pueden directamente afectar la actividad de los mismos (Khadair y col. 1984, Sprent y Sprent 1990).

También han sido reportadas interacciones entre hongos patógenos de plantas y nódulos radicales. Tu, en 1978, describió que especies de *Rhizobium* podían colonizar las puntas de las hifas de *Phytophthora megasperma*, hongo patógeno de soja y alfalfa, y de este modo afectar el crecimiento del hongo, constituyendo un mecanismo protector que podría ser de significancia para estos cultivos.

Los nódulos radicales pueden ser atacados y utilizados como fuente de alimento por larvas de insectos. Wolfson, en 1987, encontró que algunas larvas podían ser fuertemente atraídas hacia nódulos de alfalfa y trébol, que la tasa de sobrevivencia de las larvas era mayor en presencia de raíces noduladas y que en condiciones en las que la nodulación era prevenida por la aplicación de fertilizantes nitrogenados el número de larvas y de adultos emergentes era significativamente menor.

La infección de las plantas por nemátodos puede resultar en la producción de factores que suprimen la nodulación (Ko y col. 1984).

Por otra parte, las leguminosas pueden producir muchas toxinas contra organismos patógenos. Se piensa que una estrategia importante es la exportación del nitrógeno fijado en los nódulos bajo la forma de ureídos, sustancias que no son utilizadas por los insectos herbívoros, por lo que estas plantas se verían en ventaja respecto de las que exportan el nitrógeno mediante otro mecanismo, caso la vía de las amidas (Wilson y Stinner 1984).

Debido a que el área inmediatamente adyacente al sistema radical es el sitio de origen de los rizobios infectivos, no es sorprendente que la microflora asociada tenga influencia en el desarrollo de la simbiosis. Los fracasos ocasionales en la nodulación de cultivos pueden ser el resultado de una competencia microbiológica que suprime a los microorganismos deseados. Desde los años '20 los investigadores conocen que los suelos contienen cepas indígenas de rizobios que a menudo limitan el crecimiento de las leguminosas. A menudo, experiencias de inoculación fallan debido a que las cepas indígenas, bien adaptadas a sus nichos, ocupan los nódulos con exclusión de las cepas inoculadas, situación conocida como el problema de la competencia entre rizobios.

Cuando se introduce un gran número de rizobios al suelo, como sucede durante las temporadas de siembra a través de semillas inoculadas, la abundancia de estos microorganismos en el suelo puede, sin embargo, disminuir drásticamente. Esta disminución ha sido correlacionada con un aumento en la densidad de protozoarios, predadores capaces de alimentarse ávidamente de bacterias (Ramírez y Alexander 1980, Wrigth y col. 1993).

Las especies de rizobios son también susceptibles al ataque y lisis por bacteriofagos, virus bacterianos usualmente presentes en suelo, raíces y nódulos. En ocasiones, el cultivo continuo de ciertas leguminosas, particularmente alfalfa y trébol, produjo plantas de escaso vigor y bajo rendimiento, condición que fue atribuida a los efectos nocivos de un bacteriofago sobre *Rhizobium* (Alexander 1977).

Alternativamente, los miembros de la microflora pueden ejercer una influencia benéfica proporcionando factores de crecimiento, degradando metabolitos tóxicos, eliminando a organismos patógenos, inmovilizando el nitrógeno inorgánico y otros mecanismos, de manera que la interacción simbiótica resulta favorecida (Derylo y Skorupska 1993, Burdan y col. 1996)



A pesar de la importancia que tienen los factores bióticos, se ha dado una mayor atención al estudio de la influencia que los **factores abióticos** tienen sobre la fijación simbiótica de  $N_2$ . Entre estos podemos citar:

**Temperatura:** la temperatura del suelo ejerce un efecto directo tanto sobre la nodulación como sobre la actividad de nódulos ya formados.

En un trabajo realizado en Australia en 1970, Roughley evaluó el proceso de nodulación de *Trifolium subterraneum* por cepas de *Rhizobium trifolii* (actualmente *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*) a diferentes temperaturas y en un rango comprendido entre los 7°C y los 19°C.

Las bajas temperaturas afectaron la estructura de los nódulos y la eficiencia en la fijación del  $N_2$  en tanto que una mayor cantidad de tejido nodular se formó entre 11°C y 15°C. Las bajas temperaturas también previnieron o hicieron lenta la diferenciación de los bacteroides y la zona de diferenciación de los nódulos resultó menor a 7°C y 19°C respecto de la superficie cubierta en el rango 11°C-15°C. La diferenciación se vio también afectada por la cepa de rizobio empleada y por el cultivar vegetal. En este estudio, la cepa TA1, aislada de un suelo frío, formó bacteroides a 7°C en tanto que la cepa SU297, proveniente de un suelo templado, no logró diferenciar bacteroides a esa temperatura. A 15°C y 19°C ambas formaron la misma cantidad de tejido bacteroide, pero la temperatura óptima para que esto ocurriera no fue necesariamente la misma que para la máxima fijación de  $N_2$ . La temperatura óptima para la fijación es 19°C, no obstante las plantas formaron mayor cantidad de tejido nodular a 11°C, estimulación que compensaría parcialmente la poca eficiencia de los bacteroides para fijar  $N_2$  a esa temperatura.

Otros trabajos permitieron evidenciar que el proceso de nodulación es más sensible al frío que la actividad nitrogenasa en sí y que, a bajas temperaturas, una mayor cantidad de nitrógeno fijado es retenido por los nódulos, sugiriendo que la exportación hacia las partes aéreas se ve retardado (Gibson 1969).

La sensibilidad de la interacción fijadora de  $N_2$  a las bajas temperaturas en leguminosas subtropicales como la soja constituye una enorme limitación para la adaptación de este cultivo en áreas de estación cálida breve (Zhang y col. 1995).

En el otro extremo de la escala, las altas temperaturas pueden afectar la sobrevivencia y la persistencia de los rizobios en el suelo así como la interacción con las leguminosas. Esta situación es crítica para cultivos de regiones tropicales en donde la temperatura del suelo próximo a la superficie puede alcanzar valores entre los 40°C y 60°C durante el verano.

Se ha reportado la existencia de una considerable variación en las cepas de rizobios en cuanto a la sobrevivencia y capacidad de nodulación en altas temperaturas (Michiels y col. 1994). Al respecto caben citar experiencias realizadas en un mismo suelo y en donde la mortandad de cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* por altas temperaturas trajo grandes pérdidas en cultivos de trébol, en tanto que la nodulación prácticamente no se vio afectada en lupino. Esta planta es nodulada por *Rhizobium lupini*, que en estudios de laboratorio mostró una sobrevivencia a altas temperaturas muy superior a la del simbiote del trébol (Marshall 1964). El mecanismo de protección de los rizobios ante el calor es aún desconocido, existiendo hipótesis que van desde la interacción con las partículas de arcillas hasta la presencia de plásmidos involucrados en la resistencia a altas temperaturas (Barbour y Elkan 1989).

Relaciones hídricas: la disponibilidad de agua tiene un importante efecto sobre la nodulación y la fijación de  $N_2$ . En *Trifolium subterraneum* el descenso del potencial agua del suelo ha sido correlacionado con un menor número de hilos de infección, llegando incluso a la inhibición total de la nodulación (Worrall y Roughley 1976).

El crecimiento de la raíz y de los pelos radicales se ve fuertemente influenciado por la condición de estrés lo cual sería un importante causal en la inhibición de la nodulación, basándose especialmente en que experiencias de rehidratación del suelo han permitido reanudar el crecimiento y la subsecuente infección.

Una vez iniciado el proceso de infección, un reducido suministro de agua puede retardar el crecimiento del nódulo y acelerar la senescencia del mismo. La actividad nitrogenasa también se ve disminuída de manera importante, acompañando al descenso de la actividad respiratoria del nódulo (Weisz y col. 1985). Por su parte, el transporte del nitrógeno fijado fuera del nódulo se ve disminuído, posiblemente debido a un insuficiente suministro de fotosintatos desde los tallos y hojas estresados (Huang y col. 1975).

Otro tipo de experiencias han mostrado que trabajando con leguminosas y cepas de rizobios seleccionadas tolerantes a la desecación, la interacción simbiótica puede llevarse a cabo (Soria y col. 1996).

En el otro extremo de la escala, muchas leguminosas son sensibles al exceso de agua (anegamiento). El desarrollo y funcionamiento del nódulo se ve por lo general más afectado que la propia infección, y algunos efectos, como la disminución de la actividad nitrogenasa, puede ser incluso más intensos que en el caso de déficit hídrico. El reducido a nulo aporte de  $O_2$  al nódulo parece ser el principal problema del efecto del anegamiento. La difusión del  $O_2$  dentro de los nódulos es en parte regulada por una barrera física localizada en células del parénquima nodular.



Bajo condiciones de estrés, la resistencia a la difusión aumenta determinando una falta de O<sub>2</sub> en el interior del nódulo, lo que lleva a inhibir su actividad (Day y Copeland 1991).

Tanto el exceso como la falta de agua en el suelo ejercen su efecto sobre la sobrevivencia de los rizobios. Generalmente la desecación es más grave para la sobrevivencia bacteriana que el exceso de agua, especialmente en regiones donde la falta de agua se combina con las altas temperaturas.

Una considerable cantidad de información se ha acumulado respecto de diferencias en la tolerancia a la desecación de diferentes cepas, especies y géneros de rizobios (Al-Rashidi y col. 1982, Aurag y Sasson 1992). Las bacterias de crecimiento lento (género *Bradyrhizobium*) presentan una mayor tolerancia a la desecación que las de crecimiento rápido (género *Rhizobium*) según coinciden la mayoría de los reportes.

Los mecanismos de tolerancia a la desecación no son bien conocidos, citándose algunas propuestas como las distintas cantidades de agua que las células pueden retener, la capacidad de limitar a un mínimo el metabolismo celular, incremento de la actividad catalasa y presencia de plásmidos específicos para la tolerancia a la sequía.

Salinidad: la actividad de los nódulos puede verse afectada por la presencia de solutos en la solución del suelo de varias maneras. Con altas concentraciones de solutos la nodulación puede inhibirse y en casos de formación de nódulos el agua puede salir de los mismos por efecto osmótico afectando severamente la actividad nitrogenasa. Al efecto osmótico debe sumarse la toxicidad que algunos iones poseen para vegetales y microorganismos cuando se encuentran en cantidad elevada.

En un estudio realizado en soja se evaluó la interacción de *Bradyrhizobium japonicum* con los pelos radicales bajo concentraciones crecientes de NaCl en el rango de 0% al 1,8% en la solución de cultivo. A una concentración de 1% se pudo evidenciar inhibición en el curvado de los pelos, fenómeno notablemente acentuado a medida que se elevaban las concentraciones. A partir de 0,2% de NaCl comenzó a declinar el crecimiento del microorganismo y a una concentración de 1,2% la nodulación ya no tuvo lugar (Tu 1981).

En algunas experiencias realizadas con *Vicia faba* (arveja) y *Vigna unguiculata* (cowpea) se observó que la aplicación de distintas concentraciones de NaCl en el momento de formación de los pelos radicales podía reducir la colonización de las raíces, el curvado de los pelos, la estructura de los pelos y de células hipodérmicas, el número y peso de los nódulos y la actividad nitrogenasa (Zaharan y Sprent 1986, Georgiev y Atkins 1993). Al tiempo que la salinidad afectaba la fotosíntesis y se registraba una merma significativa en la actividad nitrogenasa, el exporte del



nitrógeno fijado y la respiración nodular mantenían un nivel similar o incluso superior a las plantas sin exposición al NaCl.

Existen numerosos reportes sobre los efectos de la salinidad en otras leguminosas y las respuestas varían según la necesidad de nitrógeno de la planta y la combinación de la fijación con las formas directamente asimilables desde suelo.

La acumulación de solutos osmocompatibles tales como prolina, sucrosa y D-pinitol, ha sido descrita en nódulos de algunas leguminosas tales como alfalfa y cowpea y ellos ejercerían una función osmorreguladora en situaciones de salinidad (Irigoyen y col. 1992)

La búsqueda de cepas de rizobios tolerantes a salinidad puede ser una alternativa para lograr el establecimiento de la simbiosis en condiciones en las que el crecimiento del cultivo no se ve alterado (Doura y col. 1984, Mohammad y col. 1991, Rosas y col. 1996).

pH: la nodulación de leguminosas se ve generalmente reducida por condiciones de bajo pH en el suelo, situación que puede deberse a un escaso crecimiento de los rizobios, a un incremento en el número de cepas inefectivas o sensibilidad del proceso de infección.

La disponibilidad de algunos nutrientes esenciales como calcio, magnesio, fósforo y molibdeno es baja en suelos ácidos, en tanto que los altos niveles de aluminio y manganeso pueden llegar a ser tóxicos para las plantas y los rizobios (Coventry y Evans 1989).

El pH del suelo puede alterarse según el tipo de nutrición nitrogenada de las plantas. Así, las plantas que fijan N<sub>2</sub> tienen una producción neta de protones que tiende a bajar el pH del suelo, mecanismo demostrado por lo menos en soja y en alfalfa. La capacidad buffer de algunos suelos puede evitar importantes cambios del pH, pero en suelos con baja capacidad de intercambio catiónico el problema puede ser importante. A esto debe sumarse que en general las plantas que fijan N<sub>2</sub> son más sensibles a la acidez que plantas de la misma especie que se nutren de nitrógeno mineral (Andrews 1976).

En alfalfa, el número de nódulos se reduce rápidamente cuando el pH del suelo es inferior a 4,7. La selección de genotipos tolerantes a acidez tanto de plantas como de cepas de *R. meliloti* ha tenido un efecto marcado sobre la productividad de este cultivo en suelos ácidos de Australia (Howieson y col. 1992).

El crecimiento y sobrevivencia de los rizobios se ve afectado a pH inferiores a 4,5 en los medios de cultivo, no obstante se verifica una gran variabilidad en la tolerancia a pH incluso entre distintas cepas de una misma especie (Hagedorn y Caldwell 1981).

Entre los mecanismos sugeridos para explicar una mayor tolerancia a la acidez pueden citarse la producción de polisacáridos extracelulares (Cunningham y Munns 1984) y un interesante mecanismo descrito por O'Hara y col. en 1989 según el cual las cepas tolerantes a bajo pH pueden controlar su medio interno, el que permanece alcalino, en tanto que las cepas sensibles no pueden mantener un citoplasma alcalino en condiciones de acidez elevada.

Un gran problema consiste en distinguir entre los efectos del bajo pH y la toxicidad de algunos minerales, en especial el aluminio. Recientes trabajos están avanzando sobre el tema, siendo destacable un estudio iniciado por Richardson y col. en 1988 en el cual se midió la capacidad inductora de genes *nod* a bajo pH y presencia de aluminio y calcio en *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. En este estudio, la presencia de aluminio no impidió la transcripción del gen *nodD* cuando el pH era superior a 4,8. Valores de pH inferiores a 4,8 fueron determinantes en la inhibición de la inducción de genes *nod* en varias cepas probadas. La presencia de aluminio limitó la expresión del gen *nodA*, fenómeno que parcialmente pudo ser revertido aumentando la concentración de calcio.

En algunos lugares la alcalinidad del suelo también resulta problemática para la fijación biológica del N<sub>2</sub>, como sucede en el norte de la India donde el pH de los suelos puede alcanzar valores entre 8 y 10,5. Singh y col., en 1973, encontraron que el número de nódulos radicales formados en alfalfa se podía ver significativamente reducido en soluciones de cultivo conteniendo 0,1% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub>. La información disponible sobre alcalinidad es notoriamente escasa en comparación con lo que sucede con la situación de acidez.

Efecto de nutrientes: las leguminosas requieren cualitativamente los mismos nutrientes que los demás vegetales tanto en macro como en microescala, no obstante es necesario un mayor aporte en hierro y molibdeno, necesarios para la fabricación y mantenimiento de la nitrogenasa y de la leg-hemoglobina.

La presencia de nitrógeno combinado en el suelo, bajo la forma de compuestos orgánicos e inorgánicos, puede reducir la nodulación, la producción y curvado de los pelos radicales, la actividad de los nódulos y acelerar la senescencia (Becana y Sprent 1987).

Un nutriente que en muchas áreas resulta limitante para la nodulación, y el crecimiento vegetal en general, es el fósforo. El contenido de este mineral en los nódulos es superior al hallado en la zona no nodulada de las raíces, y posiblemente ello sea debido al alto requerimiento energético (ATP) para el funcionamiento de la nitrogenasa. La toma de fósforo desde el suelo, especialmente si la fuente del mineral es insoluble, se ve en ocasiones estimulada por la presencia de micorrizas vesículo-arbusculares, hongos que forman una extensa red de hifas en el suelo y

cuya relación simbiótica con vegetales permite una mejor toma de minerales (en especial fósforo) y agua. Actualmente se están realizando experiencias de co-inoculación de leguminosas con rizobios y micorrizas en aquellos suelos con baja disponibilidad de fósforo.

El níquel es un micronutriente que la planta requiere en bajas cantidades para su normal crecimiento y desarrollo. Algunas enzimas presentes en el proceso de fijación biológica del  $N_2$ , tales como la ureasa y la hidrogenasa, lo requieren, pero en cantidades elevadas puede resultar tóxico (Dalton y col. 1988).

Otros microelementos de importancia para la fijación biológica del  $N_2$  son el potasio, requerido especialmente durante la diferenciación de los bacteroides, y el molibdeno, constituyente de la nitrogenasa. Este último mineral es un importante limitante en suelos ácidos, en los que su disponibilidad es mínima.

Agroquímicos: los agroquímicos constituyen importantes herramientas que la agricultura actual emplea a fin de proteger el rendimiento y calidad de los cultivos, no obstante la información disponible sobre la influencia que muchos de ellos pueden tener sobre la fijación del  $N_2$  y la actividad nitrogenasa es incompleta y muchas veces inconsistente.

La mayoría de las leguminosas cultivadas están expuestas a agroquímicos, empleados como protectores de las plantas y como fertilizantes, que pueden contener compuestos químicos potencialmente nocivos para la fijación biológica del  $N_2$ . La exposición de las plantas a este tipo de sustancias puede ser intencional, por ejemplo aplicando un insecticida al cultivo, o no intencional como ocurre cuando existen residuos remanentes de algún tratamiento anterior.

Un significativo volumen de investigaciones se lleva a cabo con soja, primer leguminosa cultivada en la escala mundial, y en muchos casos los resultados informados al evaluar un mismo agroquímico resultan contradictorios. A manera de ejemplo vale citar el caso del herbicida trifluralin, el que fue reportado como inhibidor de la nodulación en soja (Parker y Dowler 1976). Bollich y col., en 1985, reportaron a su vez que trifluralin no afectaba el número y peso de nódulos ni la actividad nitrogenasa en tanto que Alaa-Eldin y col., en 1981, sugirieron que dosis de trifluralin superiores a las usualmente empleadas estimulaban la nodulación de soja.

Curley y Burton, en 1975, informaron que el fungicida pentaclorobenceno (PCNB) reducía la nodulación de soja, mientras que Mallik y Tesfai, en 1985, reportaron su inocuidad a dosis incluso diez veces superiores a las corrientes.

La mayoría de los estudios sobre los efectos de agroquímicos en leguminosas se han centrado en la acción sobre la planta o sobre la bacteria y principalmente con compuestos de la categoría de los herbicidas, resultando que a muchos de estos se les han adjudicado acciones nocivas sobre la fijación en cuanto a la reducción del

número y peso de los nódulos formados, de la actividad nitrogenasa y de los rendimientos a campo. Ensayos de laboratorio mostraron también efectos adversos sobre la sobrevivencia de microorganismos. No obstante, pocos estudios han tenido en cuenta cuál es el estadio del proceso simbiótico que se ve originalmente afectado por estos químicos, lo que lleva a la necesidad de implementar nuevas técnicas de investigación a fin de dilucidar si se trata de la planta, la bacteria o la interacción entre ambos.

### **Pesticidas en la agricultura. El fungicida thiram.**

La mayor parte de los pesticidas empleados en las prácticas agrícolas están destinados a eliminar organismos seleccionados. Todos ellos actúan bloqueando o interfiriendo con algún proceso metabólico, no obstante cómo lo hacen, es decir su modo de acción, es difícil de determinar y en muchos casos no se conoce aún. Incluso un mismo pesticida puede llegar a exhibir más de un modo de acción, lo que torna aún más complejo su estudio (Johnson y Ware 1992).

Entre el 90% a 95% de los pesticidas usados en la actualidad caen dentro de tres grupos: insecticidas, herbicidas y fungicidas. De estas tres clases principales de pesticidas, los fungicidas son quienes menor regulación legal presentan para su uso, lo que puede ser atribuido a dos principales razones: a) los fungicidas son en general poco tóxico para los vegetales cuando se usan en las dosis recomendadas y b) son generalmente de muy baja toxicidad para animales de sangre caliente, incluyendo el ser humano, si los comparamos con herbicidas e insecticidas.

La acción de los fungicidas se expresa usualmente de dos modos físicamente visibles: a) la inhibición de la germinación de esporas y b) la inhibición del crecimiento fúngico.

Qué sucede a nivel celular para causar estos resultados fácilmente visibles?

Todos los fungicidas son inhibidores metabólicos y sus modos de acción conocidos pueden ser clasificados en cuatro grupos:

- inhibidores de la cadena de transporte de electrones
- inhibidores de enzimas
- inhibidores del metabolismo de ácidos nucleicos y síntesis de proteínas
- inhibidores de la síntesis de esteroides

Los fungicidas, estrictamente hablando, son químicos empleados para prevenir, eliminar o detener el crecimiento de hongos, no obstante en la agricultura el término también se extiende a productos destinados a combatir enfermedades provocadas por bacterias.



Existen cientos de ejemplos de enfermedades de plantas. Ellas incluyen podredumbre de raíces, enfermedades en la germinación, enfermedades de agallas o tumores, podredumbre durante el almacenamiento, marchitamiento, enfermedades por mohos, tizones, virus, etc. Estas pueden, en muchas instancias, ser controladas por la temprana y continua aplicación de fungicidas seleccionados.

Las enfermedades fúngicas son, básicamente, más difíciles de controlar que las provocadas por insectos, dado que los hongos son organismos con mayor semejanza morfológica y fisiológica a los vegetales que viven en cerrada asociación con el hospedante, lo que explica la dificultad para encontrar productos químicos que combatan al hongo sin dañar al vegetal.

En la actualidad existen aproximadamente 200 fungicidas químicos, muchos de los cuales son compuestos orgánicos recientemente descubiertos. La mayoría de ellos actúan como protectores, evitando la germinación de esporas y la subsecuente penetración del hongo a los tejidos vegetales. En algunos casos se requieren sucesivas aplicaciones de un producto a fin de cubrir zonas de nuevo crecimiento vegetal y/o reemplazar fungicida que ha sido deteriorado, degradado o lavado por las lluvias. Algunos de estos inhibidores o tóxicos químicos pueden retardar o detener el crecimiento del hongo cuando son aplicados luego que el estado infeccioso ya se ha establecido, como en el caso de los nuevos fungicidas sistémicos, que erradican la infección, deteniendo el progreso de enfermedades existentes cuando los síntomas ya han aparecido.

Históricamente, los fungicidas han consistido en compuestos con azufre, cobre o mercurio y aún en la actualidad la mayoría de las enfermedades vegetales pueden ser controladas por este grupo. No obstante, los compuestos con azufre y cobre pueden retardar el crecimiento en plantas sensibles, por lo que se han desarrollado nuevos fungicidas, de carácter orgánico, que presentan mayor actividad y menor fitotoxicidad.

Thiram, el primero de los fungicidas orgánicos azufrados fue descubierto en 1931 y a él siguieron muchos otros. Los nuevos fungicidas orgánicos son bastante eficientes, ya que se requiere la aplicación de pequeñas cantidades comparado con las dosis empleadas en el pasado y, en general, tienen baja fitotoxicidad y pueden ser degradados por los microorganismos del suelo previniendo su acumulación y efectos no deseados sobre el medio ambiente.

## Capítulo 2. EL EFECTO DEL FUNGICIDA THIRAM SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS

### INTRODUCCIÓN

El incremento en la producción de alimentos para la creciente población mundial ha llevado a prácticas agrícolas intensivas en que prácticamente la totalidad de las tierras cultivables en climas templados están siendo utilizadas, con un creciente avance hacia las zonas ecuatoriales.

Los fungicidas juegan un papel preponderante en la producción agrícola intensiva de la actualidad, en las actividades industriales y en la prolongación de la utilidad de productos manufacturados. Algunas estimaciones indican que aproximadamente la mitad de la producción mundial de granos emplea fungicidas. De la enorme cantidad de especies de hongos conocidas, poco más de 200 son considerados patógenos vegetales y aproximadamente una docena de ellas causan serias pérdidas a los cultivos. Debido a las variaciones de temperatura, humedad, radiación solar, tipos de suelos y microflora de las distintas regiones el uso de los mismos requiere de una evaluación de los materiales tóxicos a emplear, su formulación y modo de aplicación, etapas que muchas veces no se cumplen.

Los compuestos orgánicos empleados como fungicidas presentan una diversidad química importante, pudiendo ser agrupados en: ditiocarbamatos, tiazoles, triazinas, aromáticos sustituidos, sulfonimidias, dinitrofenoles, quinonas, organotinas, alifáticos nitrogenados y un grupo muy variado que comprende a los nuevos fungicidas sistémicos.

En el grupo de los ditiocarbamatos encontramos las "viejas liberaciones" -thiram, mancozeb, ferban, ziram, metam-sodio y zineb- todos desarrollados en las décadas del '30 y del '40. Tales fungicidas tienen difusión mundial y el uso de este grupo es probablemente superior al de todos los otros fungicidas reunidos.

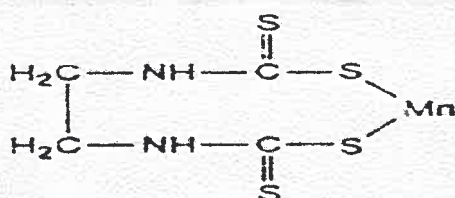
En 1931, Tisdale y Williams (consignatarios de E.I. du Pont de Nemours & Co) patentaron en EE.UU. una serie de desinfectantes derivados del ácido ditiocarbámico destinados a prevenir y controlar el crecimiento de hongos. Otros estudios con este tipo de compuestos aparecieron más tardíamente en Inglaterra e Irlanda del Norte.

A pesar de la fecha de patentamiento, el uso de este tipo de fungicidas recién se intensificó con el advenimiento de la II Guerra Mundial, cuando la alta demanda de Cu y Hg requirió del empleo de sustancias alternativas. El primer ditiocarbamato en alcanzar preminencia fue el bis dimetil tiocarbamilo, corrientemente denominado thiram, un material cristalino blanco consistente de dos ditiocarbamatos unidos por un puente disulfuro (figura 3).

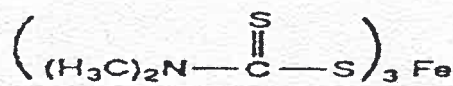




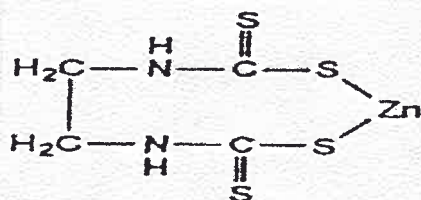
**THIRAM**  
Disulfuro de bis-dimetil-tiocarbamilo



**MANEB**  
Etilen-bis-ditiocarbamato de manganeso



**FERBAM**  
Dimetil-ditiocarbamato férrico



**ZINEB**  
Etilen-bis-ditiocarbamato de zinc

Figura 3. Estructuras de algunos ditiocarbamatos

También empleado en la industria de la goma y como repelente de insectos, thiram se convirtió finalmente en el más conocido y mundialmente empleado protector químico de semillas.

Es bastante limitada la información sobre el impacto de los ditiocarbamatos sobre el medio ambiente en lo que respecta a la persistencia y bioacumulación en diferentes especies y cadenas alimentarias. Van Leeuwen, en 1986, llevó a cabo un extenso estudio con 18 ditiocarbamatos y 3 metabolitos de estos compuestos, midiendo el efecto de los mismos sobre peces (*Poecilia reticulatum*), crustáceos (*Daphnia magna*), algas (*Chlorella pyrenoidosa*, *Phytobacterium phosphoreum*) y bacterias nitrificantes (*Nitrosomas sp.* y *Nitrobacter sp.*) estableciendo una dosis letal 50 promedio de 1 mg/l para invertebrados, 1-4 mg/l para algas, 1-8 mg/l para peces, y entre 30-50 mg/l para bacterias nitrificantes.

Estudios realizados en ratas con algunos ditiocarbamatos a altas dosis indujeron efectos adversos sobre estructuras y funciones endócrinas y reproductivas (Ivanova-Chemishanska y Antov, 1980). Dosis superiores a 50 mg/kg de peso corporal produjeron efectos neurotóxicos en ratas, conejos y pájaros (Edington y Howell 1966, Lee y Peters 1976, Rasul y Howell 1974). Los ditiocarbamatos han sido también reportados como causantes de redistribución de metales pesados (plomo y cadmio) en cerebro de ratas (Oskarsson 1974). Recientes estudios en ratas y perros adjudican a ditiocarbamatos retardo en el crecimiento, anemias, cambios en los niveles de transaminasas hepáticas, atrofia y degeneración nervo muscular, hipertrofia de tiroides y otros efectos (Maita y col. 1997)

En el ser humano, el regular contacto con ditiocarbamatos puede causar cambios funcionales en los sistemas nervioso y hepatobiliario, dermatitis de contacto y sensibilización (Blackwell-Smith et al. 1953, Environmental Health Criteria 1988, Kim y Rizzuto 1975). Un interesante efecto de los alquil ditiocarbamatos es la inducción de intolerancia al alcohol, fenómeno que ha sido estudiado en ratas y reproducido en el ser humano, lo que ha llevado al empleo de disulfiram en el tratamiento del alcoholismo crónico (Hald y Jacobsen 1948).

En general, la mayoría de los ensayos de mutagenicidad llevados a cabo con ditiocarbamatos dieron inicialmente resultado negativo (Seiler 1973, Shirasu y col. 1976), aunque estudios actuales están aportando evidencias en contrario (Agrawal y col. 1997)

Los microorganismos del suelo son capaces de metabolizar los ditiocarbamatos y se piensa que los productos de la degradación pueden afectar actividades enzimáticas, respiración y mineralización.

Sobre la base de la información disponible se presume que la mayoría de estos compuestos, cuando son agregados al suelo, se degradan rápidamente en presencia

de oxígeno y humedad, formando una variedad de productos, algunos de los cuales, caso etilen tiourea (ETU) y propilen tiourea (PTU) son toxicológicamente importantes (Environmental Health Criteria 78, 1988).

La necesidad de incrementar el conocimiento sobre la influencia de la aplicación de pesticidas sobre el ciclo del nitrógeno se vio enfatizada por un estudio de Dubey, 1970, en el que se demostró que las aplicaciones repetidas de maneb y otros fungicidas a un campo de cultivo de tomates en Puerto Rico, causó una marcada reducción en las poblaciones microbianas, resultando en inhibición tanto de la mineralización del carbono orgánico como de la nitrificación del amonio en ese suelo. Martens y Bremner, 1997, midieron el efecto de 17 fungicidas, thiram entre ellos, sobre la transformación de la urea en suelos de distinta textura incubados con 1 y 50 mg de ingrediente activo (IA) del agroquímico por kg de suelo seco. La primera dosis es la usualmente recomendada para una aplicación, en tanto que la segunda refleja la posible acumulación del fungicida en el suelo cuando, en prácticas intensivas, se realizan aplicaciones semanales.

Cuando los fungicidas fueron aplicados en la dosis de 1 mg IA/kg suelo, anilazina, benomyl, captan, cloranil, maneb, mancozeb y thiram retardaron la hidrólisis de la urea particularmente en suelos de textura ordinaria (francos) y prácticamente todos los fungicidas ensayados retardaron la nitrificación. En suelos de textura muy fina solamente maneb y etriazole hicieron sentir su efecto sobre la hidrólisis de la urea y la nitrificación respectivamente.

Cuando los fungicidas fueron aplicados en la tasa de 50 mg IA/kg suelo, anilazina, captan, cloranil, fenaminosult, folpet, maneb, mancozeb y thiram retardaron la hidrólisis de la urea en todos los tipos de suelos ensayados, en tanto que la totalidad de los fungicidas, a excepción de cloroneb, fenarimol e iprodiona, retardaron la nitrificación.

Los efectos inhibidores se vieron estimulados con el decrecimiento de la cantidad de materia orgánica del suelo y el incremento en el contenido de arena.

Desde la década del '60 existen reportes que dan cuenta que fungicidas empleados como protectantes de semillas podían afectar el proceso simbiótico operando a nivel de crecimiento de plantas, sobrevivencia de rizobios, nodulación y fijación del N<sub>2</sub>.

Jakubisiak y Golebiowska, 1963, encontraron que algunos fungicidas empleados como curasemillas, inhibían marcadamente la nodulación. Keckes y Vincent, 1969, trabajando con cultivos puros de *Rhizobium leguminosarum* reportaron la inhibición del crecimiento bacteriano y la acción letal de algunos fungicidas. Fisher y col., 1978, examinaron la acción de fungicidas sobre las propiedades simbióticas del trébol blanco, encontrando inhibición de la actividad nitrogenasa en nódulos ya formados.

Trabajos de la década del '80 informan que fungicidas protectores de semillas, entre ellos thiram, reducen la supervivencia de los rizobios inoculados a semillas, afectando además el crecimiento del vegetal en sus primeros estadios, la nodulación, la actividad nitrogenasa y ocasionan daños en la membrana citoplasmática de las bacterias (Nutti y col. 1984, Ruiz-Sainz y col. 1984 y 1986, Rosas y Carranza 1987). En algunos estudios realizados con el fungicida thiram, éste fue reportado como detrimental con respecto a la supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum* y perjudicial para la nodulación de soja (Tu 1980, Rennie y Dubetz 1984), pero las conclusiones sobre la compatibilidad de los rizobios con fungicidas no son precisas y las variaciones en cuanto a los métodos de ensayo y las variables consideradas han llevado a reportes contradictorios. Así, Curley y Burton, 1975, informaban sobre la inocuidad de thiram tanto para la viabilidad de la bacteria como para la nodulación, en tanto que otros estudios incluso reportaron incremento del peso nodular y de los rendimientos en los tratamientos con thiram (Welty y col. 1988).

Constituye el OBJETIVO GENERAL de este trabajo:

“Investigar cómo se ve afectada la relación simbiótica leguminosa-rizobio ante la posible situación de estrés generada por la aplicación del fungicida curasemillas thiram”,

formulándose una HIPOTESIS GENERAL enunciada como:

*“el fungicida thiram es perjudicial para la simbiosis leguminosa-rizobio”*

Como un primer OBJETIVO ESPECIFICO se describe en este capítulo el:

“Estudio de parámetros fisiológicos en leguminosas y microorganismos bajo tratamientos con thiram.”

## MATERIALES Y MÉTODOS

### El efecto de thiram sobre la nodulación en soja:

Se realizaron experiencias a nivel de laboratorio y de campo con semillas de soja tratadas con el fungicida thiram y con inoculantes comerciales aplicados ambos en las dosis recomendadas por los fabricantes.

En los ensayos a nivel de laboratorio se trabajó con cubas de acrílico opaco de 25 cm de altura x 5 cm de ancho y 30 cm de largo, utilizándose como soporte una mezcla estéril de arena y perlita (1:2). A lo largo del crecimiento vegetal se regó alternativamente con solución salina de Jensen libre de nitrógeno (CIAT 1988) y agua. En los tratamientos de estrés químico las semillas, previamente desinfectadas con Hipoclorito de Sodio (solución comercial 60 gr/l) al 2% durante 3 minutos y luego lavadas 10 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril, fueron peleteadas con thiram 50% antes de ser inoculadas. Se utilizó un control N donde la cuba es regada alternativamente con agua y solución de Jensen suplementada con KNO<sub>3</sub> 0.5%

Las experiencias se llevan a cabo en cámaras de cultivo programadas con 16 h de luz a 28°C y 8 h de oscuridad a 16°C respectivamente, con una intensidad lumínica de 220  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}^{-1}$

Un ensayo de nodulación a campo se realizó en un lote de 12x20 m del campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, donde se sembraron hileras de soja inoculadas con el inoculante comercial y tratadas con thiram junto a sus respectivos controles sin tratamiento con el fungicida.

También se llevaron a cabo ensayos a nivel de laboratorio con alfalfa, planta cuyo pequeño tamaño y temprana nodulación permite seguir el ensayo de laboratorio en tubos con soporte de agar.

#### El Medio de Jensen (CIAT 1988)

CaHPO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl <sub>3</sub>	0,1 g
Sol. micronutrientes	5,0 ml
Agua hasta	1000 ml

#### Solución de micronutrientes

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,31 g
NaMoO <sub>4</sub>	0,01 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01 g
KCl	0,041 g
CaCl <sub>2</sub>	0,001 g
Agua hasta	250 ml



### El efecto de thiram sobre la nodulación en alfalfa:

Se efectuó una prueba de nodulación en medio agarizado, procediéndose de la siguiente manera: las semillas fueron escarificadas y superficialmente esterilizadas agitándolas durante 15 minutos en ácido sulfúrico concentrado y seguidamente se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril y se sumergieron durante 3 minutos en etanol 70% . Finalmente se lavaron con varios cambios de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se sembraron en tubos conteniendo 30 ml de medio Jensen libre de N agarizado al 0.8% en razón de dos semillas por tubo. Para los tratamientos con el fungicida, las semillas se peletearon con thiram 50% (formulación comercial) previo a la siembra. A las 48 h cada tubo fue inoculado con 0.2 ml de un cultivo de *Rhizobium meliloti* c.a. 10<sup>9</sup> ufc/ml en medio EMA (Vincent 1970). Las plantas fueron regadas periódicamente con agua destilada estéril y solución de Jensen libre de N en forma alternada. Como controles se emplearon plántulas no inoculadas y con el agregado de N (como KNO<sub>3</sub>) en la solución nutritiva.

#### El medio EMA (Vincent 1970)

Manitol	10,0	g
Extracto de Levadura	1,0	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	g
NaCl	0,2	g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01	g
Sol. Rojo Congo	10,0	ml
Agua hasta	1000	ml

Solución de Rojo Congo: 1 g de colorante en 400 ml de agua

### El efecto de thiram sobre la viabilidad de *Bradyrhizobium japonicum*:

Tres cepas bacterianas obtenidas de inoculantes comerciales [Nodulgen Plus (San Jorge-Bago), Nitromax (Lab. Oeste Argentino), Crinigan (Crinigan)] fueron cultivadas en medio EMA líquido suplementado con thiram hasta lograr las siguientes concentraciones finales del fungicida en el medio: 100, 200, 500, 1000 y 2000 mg/l. 50 ml de medio EMA fue inoculado con 0.5 ml de cultivo bacteriano en fase de crecimiento logarítmica temprana e incubado en agitación a 28°C durante 84 h. La viabilidad del cultivo fue estimada determinando ufc (unidades formadoras de colonia)/ml.

## RESULTADOS

En los ensayos con **soja** a nivel de laboratorio y en el de campo se realizó un muestreo de plantas a los 30 días de sembradas a fin de observar el sistema radical y el proceso de nodulación. En esta etapa las plantas del tratamiento con el fungicida thiram presentaban clorosis en hojas, síntoma claro de deficiencia en nitrógeno, más acentuada en el ensayo en cubas. El crecimiento en general se veía afectado.

	<u>Control</u>	<u>Thiram</u>
Número de nódulos/planta (promedio)	70	7
Longitud de sistema radical	33 cm	25 cm
Ancho de raíz principal (altura de cuello)	12 mm	7 mm
Longitud del tallo	47 cm	18 cm
Cantidad de nudos	10	7
Número de nódulos (5 cm del cuello)	56	3

En los controles, el sistema radical se observa bien desarrollado, con nódulos que constituyen agrupamientos ("cluster") sobre la raíz principal y en los primeros 5 cm de la zona de cuello de raíz. Pocos nódulos se observan en raíces laterales y en zonas alejadas del cuello. Por su parte, las plantas de los tratamientos con thiram mostraron un sistema radical poco expandido, con menor tamaño de la raíz principal y escasas raíces laterales y nodulación mínima o nula (figura 4)

En una posterior evaluación realizada a los 60 días de siembra, cuando las plantas se encontraban en el estado reproductivo R5 (formando los granos, clasificación de Fehr y col. 1971) los tratamientos con thiram evidencian una recuperación de la parte aérea, con desaparición gradual de los síntomas de clorosis y con una importante cantidad de nódulos, algunos de gran tamaño, distribuidos por las raíces laterales.

En plantas de **alfalfa** crecidas en medio agarizado y provenientes de semillas tratadas con el fungicida se observó un menor crecimiento del sistema radical con una marcada restricción en la emisión de raíces laterales. A los 40 días a partir de la fecha de siembra se dió por terminada la experiencia observándose la nodulación (figura 5). Las plantas controles presentaron un mejor crecimiento que las tratadas con thiram y una buena nodulación, con nódulos indeterminados, característicos de alfalfa, aislados o en ramilletes y efectivos en la fijación del  $N_2$ , lo que puede estimarse indirectamente al realizar un corte de nódulos y observar la coloración rojiza característica de la leg-hemoglobina.

En las plantas tratadas con thiram la nodulación fue escasa e incluso ausente en varios tubos. En algunos casos se observaron "pseudonódulos" o nódulos vacíos, estructuras de forma irregular y carentes de rizobios (figura 6)

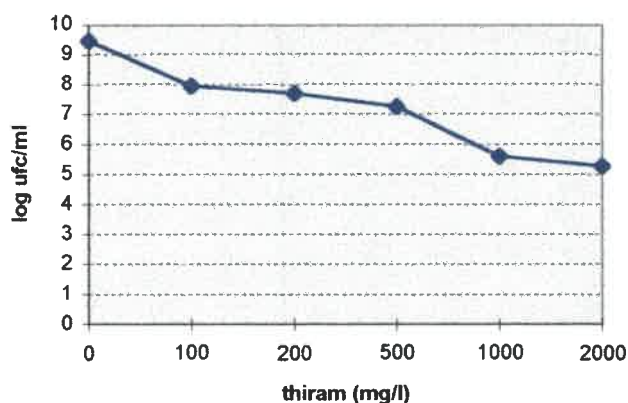
La siguiente tabla resume las diferencias encontradas en el crecimiento de plántulas originadas de semillas peleatas con thiram y sus controles en cultivo hidropónico sobre solución salina de Jensen diluída 10 veces, metodología que se emplea para la obtención de exudados vegetales y que se describe en el capítulo 4, en tanto que en la figura 7 se muestra el tamaño de plántulas de alfalfa a las 120 h de sembradas.

LONGITUD (cm) a las 120 h de siembra			
	PARTE AEREA	PARTE RADICAL	PLANTA ENTERA
<b>ALFALFA</b>			
CONTROL	2.68± 0.27	3.70± 0.35	6.44± 0.53
THIRAM	2.18± 0.23	1.51± 0.25	3.66± 0.35
<b>SOJA</b>			
CONTROL	2.84± 0.61	3.93±0.70	6.73± 0.82
THIRAM	1.91± 0.26	2.68± 0.38	4.62± 0.52
Medición promedio de 12 plántulas			

#### Determinación de la viabilidad de *B. japonicum* en presencia de thiram

La sobrevivencia de *B. japonicum* creciendo en medio EMA líquido suplementado con dosis crecientes de thiram se muestran en las siguientes figuras. Los datos representados son un promedio de las ufc/ml estimadas a las 84 h de cultivo y para 3 cepas bacterianas aisladas desde inoculantes comerciales. El error standard fue aproximadamente del 10%.

Tratamiento	Concentración de Thiram en el medio YMB (mg/l)	ufc/ml
1	0	3.0 10 <sup>9</sup>
2	100	9.0 10 <sup>7</sup>
3	200	5.1 10 <sup>7</sup>
4	500	1.9 10 <sup>7</sup>
5	1000	4.2 10 <sup>5</sup>
6	2000	1.9 10 <sup>5</sup>



## DISCUSIÓN

El fungicida thiram, de uso intensivo en el país, afectó la viabilidad de *B. japonicum* así como el crecimiento y la nodulación de soja y alfalfa.

El ensayo de sobrevivencia de *B. japonicum* en presencia del fungicida marcó un notable descenso en el número de bacterias viables a medida que la concentración de thiram en el medio se incrementa, disminuyendo desde  $3 \cdot 10^9$  ufc/ml en la situación control hasta  $1,9 \cdot 10^5$  ufc/ml en presencia de 2000 mg/ml de thiram, concentración ésta que es la más aproximada a la cantidad de fungicida presente en una semilla de soja cubierta con el agroquímico.

El efecto de thiram sobre las plantas se puso de manifiesto bajo diferentes condiciones de cultivo. Plántulas de soja y alfalfa de los tratamientos con thiram presentaron una longitud de parte aérea, de raíces y total notoriamente inferior a las no tratadas, diferencias que se observan a partir de la germinación y que se acentúan con el transcurso de la experiencia.

Un interesante efecto es la inhibición en la emisión de raíces laterales que pudo observarse en alfalfa creciendo tanto en hidroponia como en medio agarizado y en soja creciendo en el soporte arena:perlita y a campo.

La nodulación se vio inhibida totalmente en soja tratada con thiram, notándose una tardía recuperación cuando la planta está formando los granos. Esta nodulación tardía se presenta en raíces laterales y en zonas alejadas del cuello de raíz, pudiendo constituir una infección por parte de rizobios remanentes en el suelo una vez que el fungicida ha sido degradado y que pueden invadir las raíces más jóvenes.

Los nódulos formados difieren de la situación control no sólo en la ubicación sobre la raíz sino también en tamaño ya que algunos se presentan muy grandes (diámetro superior a los 5 mm) y de formas irregulares.

En plantas de alfalfa creciendo en medio agarizado se pudo observar, en los tratamientos con thiram, la formación de estructuras en las raíces parecidas a nódulos pero que carecen de rizobios. Este tipo de estructuras, conocidas como pseudonódulos, falsos nódulos o nódulos vacíos, ya han sido descritas en tratamientos con otros agroquímicos, por ejemplo cuando alfalfa fue tratada con parathion, pesticida capaz de provocar alteraciones morfológicas, curado de plásmidos en rizobios y alteraciones hormonales en nódulos (Rosas y Correa 1989). Estos pseudonódulos pueden, en ocasiones, adquirir características típicas de nódulos indeterminados, pero otras veces difieren considerablemente en su forma y posición sobre las raíces. Han sido descritos también como una respuesta del vegetal ante la falta de N, y el suministro de  $\text{NO}_3^-$  al medio de crecimiento previene su formación (Caetano-Anollés y col. 1991 y 1994, Blaunfeldt y col. 1994). Este mismo tipo de estructuras se obtuvieron en alfalfa con la aplicación exógena de fitohormonas e inhibidores del transporte de auxinas, con la inoculación con rizobios mutados en la síntesis de exopolisacáridos y con la inoculación con cepas transconjugantes de *Agrobacterium tumefaciens* que portan genes de nodulación de *Rhizobium meliloti* (Hirsch y col. 1989, Caetano-Anollés y col. 1993).



Handwritten notes, possibly a list or table, with several columns and rows of text. The text is very faint and difficult to read.

Handwritten text at the bottom of the page, possibly a signature or a date.





**Figura 4.** Nodulación característica de una planta de soja (izquierda). Los nódulos se presentan en su mayoría formando un agrupamiento (cluster) sobre la raíz principal en la zona del cuello de raíz. A la derecha se observa la comparación entre una planta control y una del tratamiento con thiram, en donde el sistema radical está menos desarrollado y la nodulación inhibida.



THE FOLLOWING INFORMATION IS FOR YOUR INFORMATION ONLY. IT IS NOT TO BE USED AS A BASIS FOR ANY ACTION. THE INFORMATION IS SUBJECT TO CHANGE WITHOUT NOTICE. THE INFORMATION IS NOT TO BE USED FOR ANY OTHER PURPOSES. THE INFORMATION IS NOT TO BE USED FOR ANY OTHER PURPOSES. THE INFORMATION IS NOT TO BE USED FOR ANY OTHER PURPOSES.



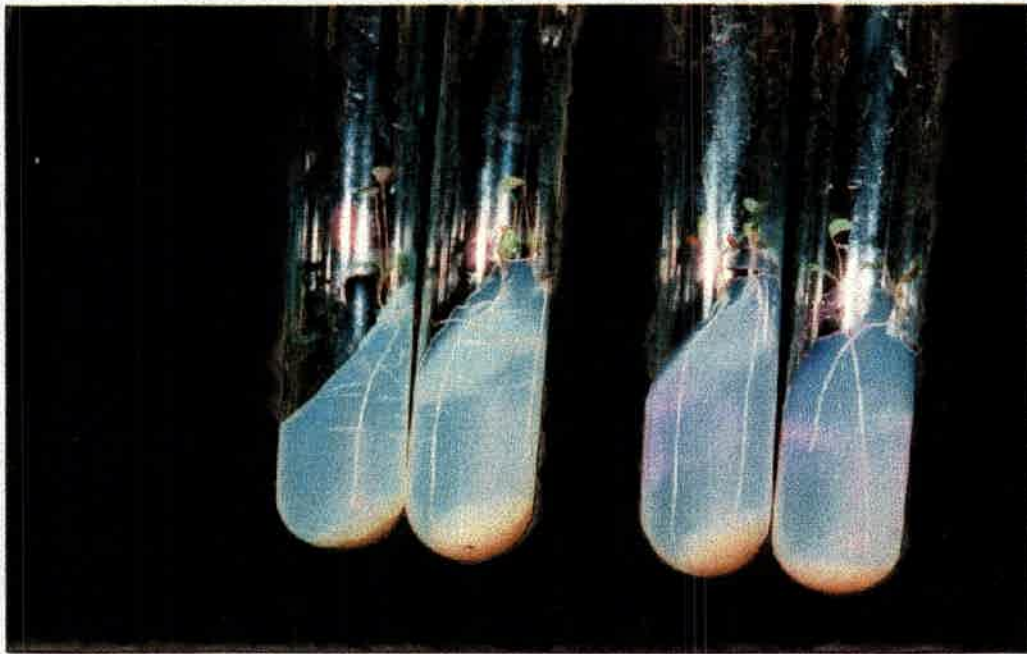


Figura 5. Crecimiento de alfalfa en medio salino agarizado. Los tubos agrupados a la izquierda muestran los controles, en tanto que los de la derecha el tratamiento con thiram. Se observa el menor crecimiento de las plantas y la inhibición de la emisión de raíces laterales en presencia de thiram

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial data and for facilitating the audit process.

2. The second part of the document outlines the various methods used to collect and analyze data. These methods include direct observation, interviews, and the use of statistical models to identify trends and patterns in the data.

3. The third part of the document describes the results of the data analysis. It shows that there is a strong correlation between the variables studied, and that the data supports the hypothesis that was tested.

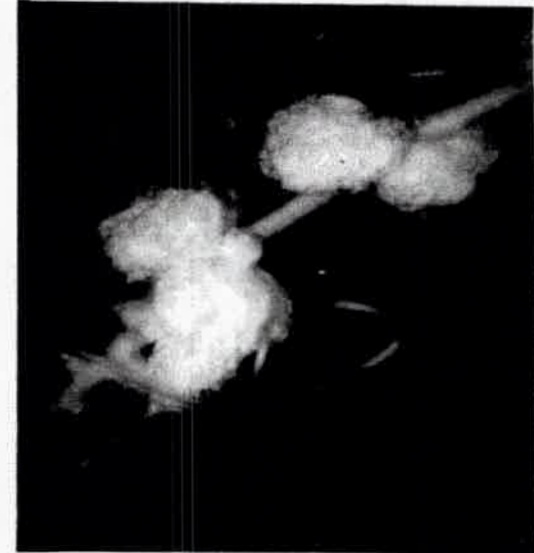
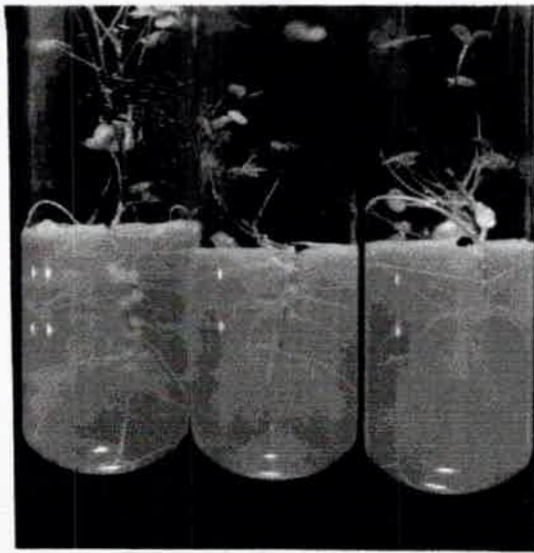
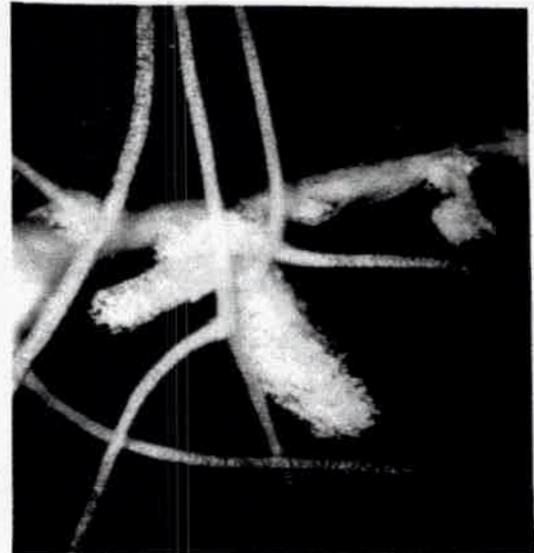
4. The fourth part of the document discusses the implications of the findings. It suggests that the results of this study could be used to inform policy decisions and to guide future research in this area.

5. Finally, the document concludes by summarizing the key findings and highlighting the strengths and limitations of the study.

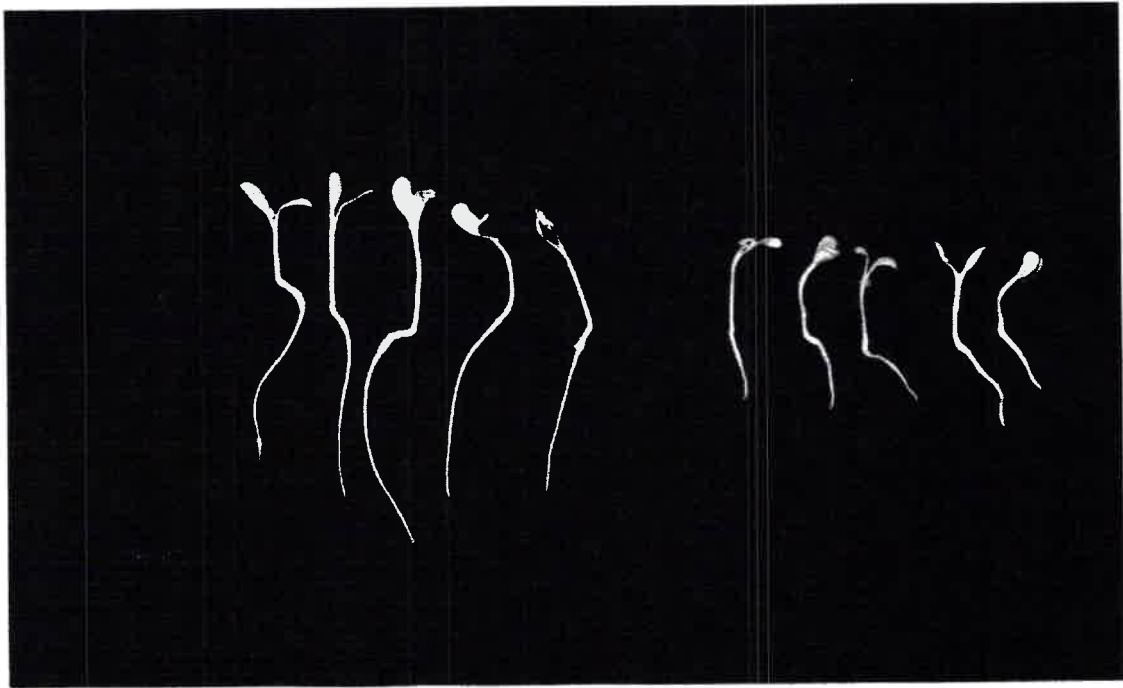
6. The document also includes a list of references to the sources used in the research, and a list of figures and tables that are included in the study.







**Figura 6.** Experiencia de nodulación de alfalfa en medio salino agarizado. Las fotografías superiores muestran los controles, con nódulos indeterminados característicos, mientras que las inferiores muestran el tratamiento con thiram y la formación de falsos nódulos.



**Figura 7.** Diferencias en el crecimiento de plántulas de alfalfa a las 120 horas de sembradas. El grupo de la izquierda es el control y el de la derecha el tratamiento con thiram.

## ¿Es thiram carcinogénico?

### INTRODUCCIÓN

El hecho de que agentes físicos y químicos presentes en el medio ambiente incrementan la incidencia de algunos tumores ha cobrado un gran interés en los últimos años, y resulta inmediato que una adecuada limitación a la exposición del hombre a sustancias cancerígenas salvaría numerosas vidas.

Los ensayos habituales efectuados con animales a fin de probar la potencial capacidad cancerígena de una sustancia requieren mucho tiempo y grandes sumas de dinero, pero afortunadamente existen hoy algunas alternativas a estos clásicos experimentos, recurriéndose a bacterias como organismos de ensayo. De esta manera, un ensayo sobre capacidad cancerígena puede durar horas o días, en comparación con los meses o años que demandan cuando se emplean animales.

Una eficaz prueba es la desarrollada por Bruce N. Ames (Ames y col. 1975) basado en la capacidad que ciertos productos químicos tienen en provocar mutaciones en bacterias. La justificación teórica que permite sustituir las células de mamíferos por bacterias es que tanto el tipo de lesiones que puede experimentar el ADN, así como los mecanismos por los que se las repara, son notablemente similares en todo el mundo viviente, así, lo que es perjudicial para el ADN bacteriano lo puede ser igualmente para el ADN humano.

Con el empleo de este ensayo, al que se le atribuye una fiabilidad del 90%, se han caratulado como carcinógenos potenciales a numerosos productos químicos, que posteriormente han mostrado su naturaleza cancerígena en pruebas con animales.

El organismo empleado en el test de Ames es una cepa de *Salmonella typhimurium*, bacteria habitante del colon, portadora de una mutación (his-) que le impide fabricar una enzima requerida en la síntesis de histidina. A consecuencia de esta mutación la bacteria no crece en medios nutritivos carentes de este aminoácido. En muy raras ocasiones la mutación his- experimenta una reversión, es decir, se restaura la secuencia normal en el ADN y la bacteria puede sintetizar histidina. La reversión se pone de manifiesto en que sólo las bacterias que la han sufrido podrán formar colonias en un medio carente de histidina. Obviamente, la tasa de mutación reversa, normalmente muy baja, se incrementará considerablemente si la bacteria his- es expuesta a un producto que provoque mutaciones. Esta es la base teórica del test de Ames. A la cepa original, Ames y colaboradores le introdujeron posteriormente algunas modificaciones a fin de hacerla más sensible y adaptable a las condiciones experimentales. Estas modificaciones consistieron en la introducción de algunas mutaciones que debilitan la pared celular, verdadera barrera que limita el ingreso de sustancias a la célula, y eliminan la capacidad de reparación del ADN dañado. De

esta manera, con las nuevas cepas, sólo unas pocas moléculas del material carcinogénico son capaces de provocar lesiones en el ADN y estas dan lugar, probablemente, a mutaciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos: se emplean las cepas *TA98* y *TA100* de *Salmonella typhimurium* (rfa, Hys<sup>-</sup>, DuvrB), cedidas por B.N. Ames (Universidad de California en Berkeley)

rfa: cepa sensible a cristal violeta y/o deoxicolato.

Hys<sup>-</sup>: auxótrofo para histidina.

DuvrB: cepa sensible a luz ultravioleta aplicada durante 8 segundos.

Estas cepas poseen además un plásmido que les confiere alta resistencia a Ampicilina.

Agente químico: thiram (disulfuro de bis-dimetil-tiocarbamilo) 98%, obtenido de Síntesis Química SAIC, Argentina.

Medios de cultivo empleados: Medio Luria-Bertani (LB) (triptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 5g, H<sub>2</sub>O hasta 1000 ml, pH 7); Medio E+glucosa (glucosa 8g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2g, ácido cítrico.H<sub>2</sub>O 2g, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H 10g, NaNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 3.5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O hasta 1000 ml); Medio Extracto de Levadura - Manitol (EMA) (manitol 10g, extracto de levadura 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1g, NaCl 0,2g, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,01g, solución acuosa de rojo congo 0,25% 10ml, H<sub>2</sub>O hasta 1000ml, pH 6,8).

Las cepas bacterianas empleadas para la prueba de Ames fueron ensayadas en su capacidad de crecer en los tres medios, suplementados con dosis crecientes de thiram a partir de 0,5 mg/ml.

Prueba de Ames: Las cepas *TA98* y *TA100* fueron cultivadas durante 16h a 37°C en medio LB en condiciones de oscuridad y agitación a 120 rpm. 0,1 ml de cultivo bacteriano (c.a. 1.10<sup>8</sup> ufc/ml) fue agregado a 2 ml de Top Agar (agar Difco 0,6%, NaCl 0,5%, L-histidina.HCl 0,5 mM, biotina 0,5 mM) mantenido líquido a 45°C. El Top Agar inoculado fue suplementado con distintas dosis de thiram 98% hasta alcanzar una concentración final de 0.5, 1, 2, 4 y 6 mg/ml de compuesto activo en el medio. El Top Agar se agregó sobre la superficie de cajas de Petri conteniendo medio E+glucosa y se incubó durante 72 h a 37°C.

El número de colonias que aparecen por reversión espontánea en la caja sin mutágeno está entre 120 a 200 para la cepa *TA100* y entre 30 a 50 para la *TA98*. Se considera que una sustancia tiene carácter mutagénico si el número de revertantes inducidos comparado con el de espontáneos es más del doble.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fungicida thiram afectó la sobrevivencia de las cepas *TA 98* y *TA100*, mostrando la primera una mayor sensibilidad al compuesto, no obstante, la prueba pudo ser aplicada a bajas concentraciones de thiram para la cepa *TA100* y los resultados se visualizan en la tabla 1.

La sensibilidad de los microorganismos a thiram también se puso de manifiesto en cultivos de las cepas en medios LB, E+glucosa y EMA suplementados con dosis crecientes del fungicida.

En esas condiciones, el número de colonias de *TA98* se vió disminuído en un 70% respecto del control en la menor concentración de thiram ensayada (0.5 mg/ml), en tanto que el crecimiento de *TA100* recién se vio severamente afectado con concentraciones superiores a los 3 mg/ml en los tres medios.

Crecimiento (ufc/caja de Petri) de *S. typhimurium TA100* expuesta a distintas dosis de thiram en medio E+glucosa.

Número de colonias por caja de Petri (resultado de 8 repeticiones)				
N° ensayo	Concentración de thiram			
	Control	1 mg/ml	2 mg/ml	3 mg/ml
1	213	336 a	0	0
2	184	265 a	0	0
3	131	210 a	120	0
4	126	340 a	172	0
5	98	315 a	0	0
6	128	282 a	0	0
7	120	291 a	42	0
8	133	263 a	10	0
Promedio	141,63	287,75a		

a: valores significativamente diferentes del control (P=0.05) cuando fueron comparados por el test "t" de Student.

Hasta una concentración de 1 mg/ml el número de revertantes fue de aproximadamente el doble, lo que sugiere un efecto mutagénico por parte del fungicida. Cuando thiram se aplicó a concentraciones mayores, la toxicidad del mismo sobre los microorganismos fue notoria.

La capacidad mutagénica de thiram y de otros ditiocarbamatos es objeto de discusión desde hace varios años. En general, la mayoría de los estudios de mutagenicidad llevados a cabo con ditiocarbamatos dieron inicialmente resultado negativo (Seiler 1973, Shirasu et al. 1976), aunque actualmente se están aportando evidencias en



contrario. Un estudio de Agrawal y col. (1997) realizado con thiram sobre ratones albinos mostró que una simple inyección de 100 mg thiram/kg peso corporal, dosis máxima tolerada por estos animales, fue capaz de inducir mutaciones letales, demostradas a través de la prueba de micronúcleos.

Shukla y col. (1996), también trabajando con ratones albinos, observaron que thiram tiene la capacidad de iniciar la formación de tumores principalmente en el sitio de aplicación (piel dorsal) tanto cuando se administraron una o múltiples dosis. Por otra parte, los mismos investigadores mostraron que thiram tiene la capacidad de promover el desarrollo de tumores cuando estos ya se encuentran iniciados por tratamiento con otros productos carcinogénicos.

### Capítulo 3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *B. japonicum* RESISTENTES A THIRAM

#### INTRODUCCIÓN

El fungicida thiram, de uso intensivo en el país, afecta la viabilidad de *Bradyrhizobium japonicum* y el crecimiento y nodulación de soja, efecto este último que se mantiene hasta el estado reproductivo R5 tanto en condiciones de laboratorio como de campo. Una nodulación tardía tiene lugar en zonas bajas del sistema radical, fundamentalmente en raíces laterales lo que no tendría incidencia en los rendimientos dado que el grano ya está formado.

La obtención de cepas de rizobios, resistentes al fungicida y que conserven intactas las propiedades simbióticas abre nuevas perspectivas para brindar una solución práctica a este problema. Esta alternativa de obtención de cepas resistentes está siendo ya empleada en la búsqueda de soluciones para mejorar la fijación simbiótica del N<sub>2</sub> en distintas condiciones medioambientales y se basa en un efecto notorio presente en todos los casos estudiados: la variabilidad entre cepas de una misma especie de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* respecto de los niveles de tolerancia al estrés.

Se pueden citar trabajos de selección de cepas con capacidad de sobrevivir y nodular en condiciones tales como altas temperaturas del suelo (Marshall 1964, Michiels y col. 1994), desecación (Al-Rashidi y col. 1982, Aurag y Sason 1992, Soria y col. 1996), salinidad (Doura y col. 1984, Mohammad y col. 1991, Rosas y col. 1996), acidez (Hagedorn y Caldwell 1981) y toxicidad por minerales (Richardson y col. 1988, Bayoumi y col. 1995). Diferentes niveles de resistencia a fungicidas se encontraron en cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* lo que orientó a tratar de seleccionar las mismas para la formulación de inoculantes (Gillberg 1971, Faizah y col. 1980) ya que ellas presentarían ventajas competitivas sobre las poblaciones indígenas sensibles a los agroquímicos.

En un trabajo reciente llevado a cabo por Hashem y colaboradores, 1997, se ensayó la sobrevivencia y viabilidad de cepas de *Bradyrhizobium* inoculadas a semillas de maní tratadas con distintos fungicidas así como los efectos resultantes sobre el crecimiento de la planta, la fijación del nitrógeno y el rendimiento. El fungicida Vitavax fue el que presentó el efecto letal más pronunciado sobre cepas de *Bradyrhizobium* creciendo en medio YEM líquido, en tanto que Benomyl presentó el menor efecto. Thiram, junto con Captan, mostraron efectos intermedios. Fue notoria la diferencia entre cepas respecto de la tolerancia a los fungicidas. Por ejemplo, la cepa USDA 3384 se vio severamente afectada por todos los fungicidas

con una sobrevivencia menor a las 9 horas de exposición al agroquímico, en tanto que la cepa USDA 3456 sobrevivió a los fungicidas por encima de 72 horas.

La formación de nódulos, el peso seco y el contenido en N de la planta se vió inhibido por todos los fungicidas, especialmente en inoculaciones con la cepas USDA 3384 tanto en condiciones de invernáculo como a campo.

Como un OBJETIVO ESPECIFICO de este trabajo se describe en este capítulo la:

“Obtención de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* resistentes a thiram, la evaluación de sus propiedades simbióticas y la caracterización de estas cepas”

## MATERIALES Y MÉTODOS

Agente químico: Thiram [bis(dimethylthiocarbamoyl)disulfide] 50% de ingrediente activo fue obtenido de Quazar SA, Argentina.

Aislamiento de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* desde nódulos de soja:

A partir de plantas de soja (*Glycine max* (L) Merr.) cultivar Hood 75 tratada con thiram e inoculadas con inoculante comercial [Nodulgen Plus (San Jorge-Bago) conteniendo aproximadamente  $1.10^9$  células viables/gramo]] en ensayo a campo, se colectaron nódulos de los que se aislaron cepas de *B. japonicum*.

Los nódulos extraídos fueron lavados con agua destilada estéril y posteriormente sumergidos durante 15 segundos en etanol 95% seguido por 4 minutos en bicloruro de mercurio acidificado 0.2% [0.2 g de  $HgCl_2$ , 1.0 ml de HCl, en 100 ml agua destilada] para ser finalmente lavados con varios cambios de agua destilada estéril.

Los nódulos fueron homogeneizados en condiciones de asepsia y partiendo de la suspensión obtenida se sembró en cajas de Petri conteniendo medio EMA suplementado con 10 ml de Rojo Congo (0.025 g/l de medio) y se incubó a 28°C a fin de aislar colonias. Las colonias aisladas fueron usadas para la selección de cepas resistentes a thiram.

Aislamiento de cepas resistentes a thiram: Las colonias aisladas de *B. japonicum* fueron sometidas a dosis crecientes del fungicida (100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 y 6000 mg/l) en medio EMA agarizado al 1.5%.

Algunas colonias que resistieron 4000 mg/l del fungicida fueron seleccionadas al azar y subcultivadas dos veces en esa dosis seguido por tres transferencias a la dosis superior (6000 mg/l). La estabilidad de la resistencia fue comprobada subcultivando cada colonia dos veces en medio sin fungicida y pasándolas finalmente en forma directa a la concentración superior (6000 mg/l).

Esterilización de semillas de soja: Las semillas de soja fueron superficialmente esterilizadas con Hipoclorito de Sodio (solución comercial 60 gr/l) al 2% durante 3 minutos y luego lavadas 10 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril.

Ensayo de sobrevivencia sobre semillas: Con cada cepa resistente se preparó una pequeña cantidad de inoculante usando turba (Tierra del Fuego, pH 6.5) estéril como soporte (CIAT1988). Este material fue acondicionado de acuerdo a Roughley 1970.

Las semillas tratadas con el fungicida en las dosis recomendadas para ensayos a campo se peletearon con el inoculante y se sembraron sobre agar 0.8% en cajas de Petri hasta germinación (48 h). Grupos de semillas rodeadas por una capa de agar de aproximadamente 1 cm de diámetro fueron transferidas a tubos de vidrio conteniendo 0.1% de peptona y 0.1 ml/l de Tween 80 y agitadas vigorosamente durante 10 minutos. A partir de diluciones de esta suspensión se determinaron ufc/semilla en medio EMA.

Ensayos de nodulación: las semillas tratadas con thiram y sus respectivos controles sin fungicida fueron peleteadas con el inoculante de cada cepa a ser probada y enseguida sembradas sobre un cama de arena-perlita (2:1) y llevadas a germinar. Los tratamientos inoculados fueron regados alternativamente con agua destilada estéril y solución de Jensen libre de nitrógeno (Vincent 1970). Los controles no inoculados se regaron de la misma manera pero con la adición de KNO<sub>3</sub> 0.5% en la solución nutritiva. El crecimiento de las plantas tuvo lugar en cámaras de condiciones controladas: 16 h día a 28°C y 8 h noche a 16°C con una intensidad lumínica de 220µE/m<sup>2</sup>/s. 50 días después de la siembra, las plantas fueron cosechadas a fin de evaluar la nodulación estimulada por las diferentes cepas.

## Pruebas de caracterización de cepas de *B. japonicum* resistentes a thiram

### a) Introducción de marcadores de resistencia.

Se introdujeron marcas de resistencia a antibióticos a nivel cromosomal (ácido nalidíxico, sulfato de estreptomycin y rifampicina). Las cepas fueron cultivadas en medio LB (triptona 10.0 g, extracto de levadura 5.0 g, NaCl 5.0 g, H<sub>2</sub>O hasta 1000 ml, pH 7 agarizado al 1.5%) suplementado con un primer antibiótico. 0.1 ml de cultivo bacteriano conteniendo 10<sup>8</sup> células/ml fueron esparcidos en la superficie del medio de cultivo y se incubó a 28°C durante 48 o 72 h. Una colonia elegida resistente al primer antibiótico se subcultivó nuevamente en dicho medio en dos oportunidades. La colonia escogida se sometió a un pasaje sin presión selectiva (medio control) y luego se subcultivó por última vez en el medio con antibiótico. De esta manera se obtuvieron colonias con marca estable para ese antibiótico. Estas colonias se sometieron luego a la acción de un segundo antibiótico marcador, siguiendo todos los pasos ejecutados para el primero. La cepa final ofrece una doble marca cromosomal, lo que permitirá su identificación en posteriores reaislamientos.

### b) Crecimiento a diferentes pH y diferenciación entre crecimiento rápido y lento.

Las cepas fueron sembradas en medio EMA pH 6.8 con el agregado de 5 ml/l de solución ABT [0.5% azul de bromotimol en 0.016N NaOH] y en medio EMA pH 5.5 con el agregado de 5 ml/l de solución PBC [0.5% púrpura de bromocresol en 0.016N NaOH]. El medio EMA pH 6.8 con ABT y el medio EMA pH 5.5 con PBC son inicialmente de color verde y marrón respectivamente. Las cepas de crecimiento lento incrementan el pH de los medios tornándolos de color azul, mientras que las cepas de crecimiento rápido bajan el pH y tornan a ambos medios de color amarillo. 5 cajas de Petri por cada medio fueron incubadas a 28°C y el crecimiento de las colonias se observó cada 24 horas durante una semana.

### c) Capacidad Desnitrificante.

El análisis se realizó en tubos de cultivo conteniendo 10 ml de medio EMA y siguiendo la técnica descripta por Zablotowicz y col. en 1978.

0,1 ml de un cultivo conteniendo 10<sup>9</sup> ufc/ml por cada cepa fue inoculado en tubos conteniendo medio EMA (controles) y en tubos con medio EMA + 0.3 mg/ml de KNO<sub>3</sub>. Los tubos se sellaron, a fin de impedir el intercambio de aire y se incubaron durante 3 semanas a 28°C. El crecimiento bacteriano y la concentración de nitratos



fueron estimados de acuerdo a la técnica colorimétrica de Cataldo y col. 1975, determinando el  $\text{NO}_3^-$  remanente en el medio a través de la absorbancia a 410 nm con un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb).

d) Tolerancia salina.

El medio EMA fue suplementado con 1%, 1.5%, 2% y 2.5% de NaCl. Las cepas fueron sembradas en la superficie del medio sólido e incubadas a 28°C durante 48 h

e) Producción de sideróforos.

Fue utilizado el método del Chromo azurol S (Alexander y Zuberer 1991). Los medios fueron incubados a 28°C durante 5 días. Las colonias que exhibieron un halo color naranja fueron consideradas productoras de sideróforos.

f) Solubilización de fosfatos.

Fue empleado el medio descrito por Frioni en 1990 [extracto de levadura 2.0 g, glucosa 20.0 g, fosfato dicálcico 2.0 g, actidiona 0.06 g, agar 15.0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  hasta 1000 ml, pH 7]. Este medio se inoculó con las cepas y se incubó a 28°C durante 5 días. Las colonias que formaron un halo de clarificación fueron consideradas solubilizadores de fosfatos.

## RESULTADOS

CEPAS BACTERIANAS OBTENIDAS O EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO		
Cepa	Características relevantes	Fuente
<i>B. japonicum</i> T3B	Baja resistencia a thiram buen nodulante, tolerante a NaCl Resistente a ácido nalidíxico y rifampicina, sensible a estreptomicina	Este trabajo
A1	Derivada de T3B, resistente a thiram, no nodulante, desnitrificante, tolerante a NaCl.	Este trabajo
A2	Derivada de T3B, resistente a thiram, no nodulante, desnitrificante, tolerante a NaCl.	Este trabajo
A86	Derivada de T3B, resistente a thiram, buen nodulante, desnitrificante, tolerante a NaCl, resistente a ácido nalidíxico y rifampicina, sensible a estreptomicina.	Este trabajo
C1	Derivada de T3B, resistente a thiram, buen nodulante, desnitrificante, tolerante a NaCl.	Este trabajo
C6	Derivada de T3B, resistente a thiram, no nodulante, desnitrificante, sensible a NaCl.	Este trabajo
E68	Derivada de T3B, resistente a thiram, mal nodulante, no desnitrificante, sensible a NaCl.	Este trabajo
F39	Derivada de T3B, resistente a thiram, mal nodulante	Este trabajo
<i>Azospirillum</i> <i>brasilense</i> Cd.	Comunmente asociado a gramíneas, alta capacidad desnitrificante	ATCC 29729
<i>Bradyrhizobium</i> <u>sp.</u>	Cepa de inoculante comercial, sensible a thiram, alta capacidad desnitrificante	San Jorge-Bago Bs.As. Argentina
<i>Staphylococcus</i> <i>hyicus</i>	Patógeno oportunista, alta capacidad desnitrificante	ATCC 1124

### Aislamiento de cepas resistentes a thiram.

Se obtuvieron varias cepas de *B. japonicum* resistentes a 6000 mg/l de thiram. Esta concentración del fungicida es tres veces superior a la aconsejada para los tratamientos a campo. Las cepas seleccionadas fueron denominadas T3B (obtenida de nódulos de soja tratada con thiram) y A1, A2, A86, C1, C6, F39 y E68, todas derivadas de la T3B.

### Ensayo de sobrevivencia sobre semillas.

Todas las cepas estudiadas mostraron una muy buena tasa de sobrevivencia sobre las semillas con valores similares a los controles sin fungicida. Todos los valores fueron superiores a  $1 \cdot 10^6$  ufc/semilla.

### Ensayos de nodulación.

Las cepas resistentes a thiram y que mostraron una alta tasa de sobrevivencia sobre semillas fueron empleadas en el ensayo de nodulación a fin de verificar su capacidad de nodular y fijar N<sub>2</sub> atmosférico.

El número de nódulos por planta y el peso fresco de los mismos se muestran en la siguiente tabla:

Efecto de diferentes cepas resistentes y tratamiento con thiram sobre la nodulación en soja

cepa <i>B. japonicum</i>	Número de nódulos (por planta)		Peso seco de nódulos (mg por planta)	
	control	thiram	control	thiram
T3B	35.9 ± 10.7	31.5 ± 12.6a	69.9 ± 17.1	64.9 ± 15.5a
A86	41.5 ± 6.2	37.3 ± 10.0a	72.6 ± 11.1	67.9 ± 14.4a
A2	19.1 ± 5.1	20.5 ± 7.1a	49.0 ± 11.7	52.2 ± 11.5a
F39	7.0 ± 4.2	6.7 ± 6.3a	7.2 ± 8.7	7.1 ± 5.4a
E68	5.2 ± 4.0	2.1 ± 3.1b	5.3 ± 4.3	3.3 ± 3.9b
A1	0.3 ± 0.6	0a	0	0a
C1	0	0a	0	0a
C6	0	0a	0	0a
Cepa comercial	56.2 ± 11.6	8.4 ± 7.0b	148.4 ± 17.1	24.6 ± 24.3b

Los resultados representan un promedio de 3 repeticiones por tratamiento. Los valores medios dados bajo la cabecera "thiram" y seguidos por la letra "a" no fueron significativamente diferentes de sus respectivos controles ( $p=0.05$ ) de acuerdo al test "t" de Student. Los valores medios dados bajo la cabecera "thiram" y seguidos por la letra "b" fueron significativamente diferentes de sus respectivos controles ( $p=0.05$ ) de acuerdo al test "t" de Student.

La cepa *T3B* mostró buena capacidad de nodulación pero limitada resistencia a thiram. La nodulación tuvo lugar en la zona del cuello de raíz con una gran cantidad de nódulos de tamaño medio (aproximadamente 5 mm de diámetro) y de tamaño pequeño (aproximadamente 2 a 3 mm de diámetro). Algunos nódulos de gran tamaño (diámetro superior a los 5mm) se observaron principalmente en tratamientos con thiram. Las plantas presentaban buenas condiciones fisiológicas al momento de floración.

Las plantas inoculadas con la cepa *A86* (control y tratadas con thiram) mostraron un buen crecimiento y con un gran número de nódulos preferentemente ubicados en la zona alta de la raíz principal, cerca del cuello. Nódulos de todo tamaño se observaron también en áreas distantes del cuello (figura 8).

En los tratamientos con la cepa *A2*, tanto las plantas tratadas con thiram como los controles mostraron un buen crecimiento de las partes aérea y radical con nodulación en la zona baja, principalmente entre los 4 y 12 cm de distancia del cuello. En general no se observó nodulación en la zona alta de la raíz (figura 9).

Los tratamientos con las cepas *F39* y *E68* presentaron pocos y pequeños nódulos principalmente en las zonas bajas.

Las cepas *C1*, *C6* y *A1* adquirieron una alta resistencia al fungicida thiram pero perdieron la capacidad de nodular (figura 10).

Los resultados fueron obtenidos de 3 experiencias de nodulación en cubas realizadas para cada cepa.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author details the various methods used to collect and analyze the data. This includes both manual data entry and the use of specialized software tools. The goal is to ensure that the data is both accurate and easy to interpret.

The third part of the document focuses on the results of the analysis. It shows that there is a clear trend in the data, which is consistent with the initial hypothesis. This finding is significant as it provides strong evidence for the proposed model.

Finally, the document concludes with a summary of the key findings and a list of recommendations for future research. It suggests that further studies should be conducted to explore the underlying causes of the observed trends and to test the model under different conditions.

The following table provides a detailed breakdown of the data points used in the analysis. Each row represents a different category, and the columns show the corresponding values for each variable.





**Figura 8.** Experiencia de nodulación de soja inoculada con la cepa *B. japonicum* A86 resistente a thiram.

THE  
LIFE OF  
SAMUEL JOHNSON  
BY  
BIOGRAPHICAL  
SKETCHES  
BY  
MRS. HANNAH MORE  
AND  
OTHERS  
IN  
EIGHT VOLUMES  
LONDON  
PRINTED BY  
RICHARD CLAY AND COMPANY  
BUNGAY, SUFFOLK  
1953





Figura 9. Experiencia de nodulación de soja inoculada con la cepa *B. japonicum* A2 resistente a thiram.

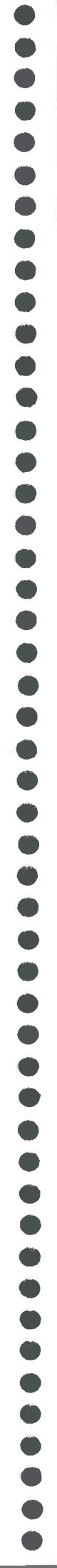
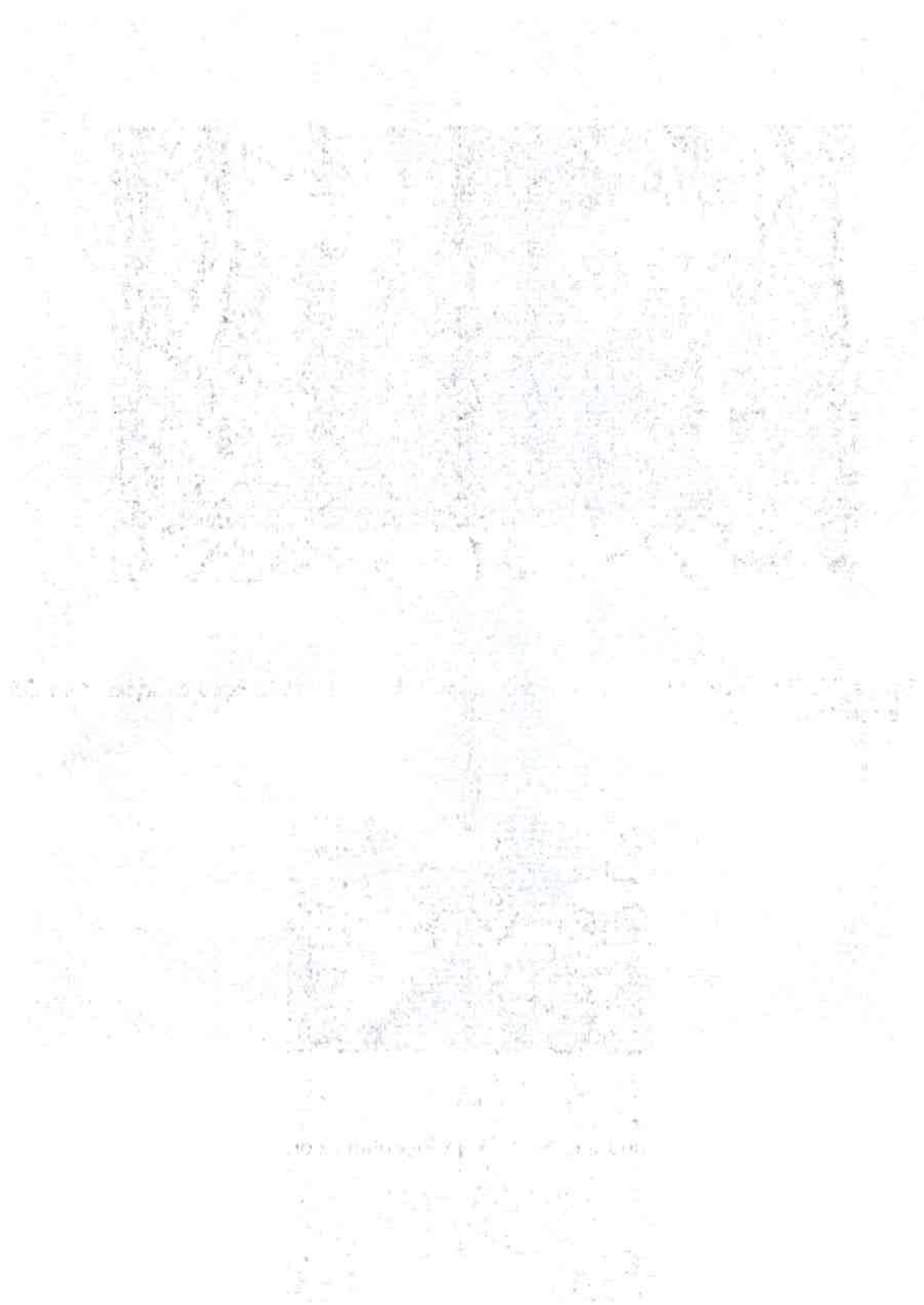




Figura 10. Experiencia de nodulación de soja inoculada con la cepa *B. japonicum* C6 resistente a thiram.





### Pruebas de caracterización de cepas de *B. japonicum* resistentes a thiram:

La introducción de marcadores de resistencia se realizó buscando diferenciar las cepas *T3B* y *A86*, que de acuerdo a lo evidenciado en las pruebas de nodulación son las más promisorias para la formulación de inoculantes. Finalizada la marcación, la cepa *T3B* presentó resistencia a 100 µg/ml de ácido nalidíxico y rifampicina, en tanto que no resiste a estreptomicina. La cepa *86A* resiste 400 µg/ml de ácido nalidíxico y resistencia a estreptomicina superior a los 500 µg/ml, pero el crecimiento es pobre en presencia de rifampicina.

En el ensayo de crecimiento a diferentes pH y diferenciación entre crecimiento rápido y lento, las cepas *T3B*, *A86*, *A2* y *C1* mostraron un buen crecimiento a las 96 h tanto en el medio a pH 5.5 como en el medio a pH 6.8. Estas cepas fueron clasificadas como rizobios de crecimiento rápido. Las cepas *C6*, *F39*, *E68* y *A1* crecieron después de las 96 h y fueron clasificadas como rizobios de crecimiento lento.

Cuando se estudió la capacidad desnitrificante, la cepa parental *T3B* mostró una actividad media con respecto a la de sus cepas derivadas. Las cepas *A86*, *A1*, *A2*, *C6* y *C1* fueron buenos desnitrificantes, superiores a *T3B*, mientras que las cepas *F39* y *E68* presentaron una capacidad desnitrificante inferior a *T3B*.

Capacidad desnitrificante de cepas de *B. japonicum*

Cepas bacterianas	KNO <sub>3</sub> in µg/ml
<i>B. japonicum...</i>	
<i>C1</i>	11.3 ± 3.4
<i>C6</i>	11.5 ± 1.7
<i>A2</i>	31.0 ± 7.4
<i>A86</i>	72.1 ± 9.3
<i>A1</i>	68.5 ± 6.4
<i>F39</i>	272.6 ± 15.2
<i>E68</i>	279.8 ± 18.1
<i>T3B</i>	138.3 ± 24.7
Controles	
<i>S. hyicus</i> ATCC 1124	3.3 ± 3.7
<i>A. brasilense</i> Cd. ATCC 29729	6.0 ± 3.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	7.4 ± 2.0

Los resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia salina, producción de sideróforos y solubilización de fosfatos se presentan en la siguiente tabla:

<u>Cepas</u>	<u>Tolerancia salina</u>					<u>Producción de sideróforos</u>	<u>Solubilización de fosfatos</u>
	<u>%NaCl en YEM medium</u>						
	0	1	1.5	2	2.5		
<i>T3B</i>	+	+	+	+	+	+	++
<i>A86</i>	+	+	+	+	+ -	++	++
<i>A2</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>F39</i>	+	+	+	+	+	+++	+++
<i>E68</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>A1</i>	+	+	+	-	-	++	-
<i>C1</i>	+	+	+	+	-	+++	+
<i>C6</i>	+	+	+	+	+ -	++	-

5 medios fueron sembrados para cada cepa y por cada prueba

En tolerancia salina:

+ buen crecimiento, +- pobre crecimiento, - sin crecimiento

En producción de sideróforos y solubilización de fosfatos:

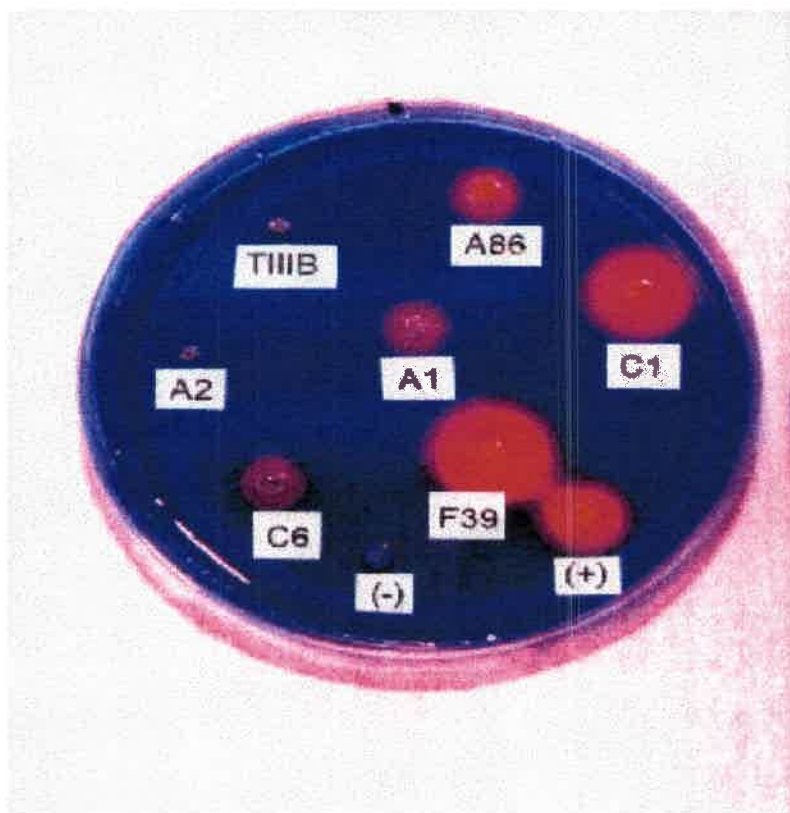
+++ diámetro de halo mayor a 10 mm

++ diámetro de halo entre 5 and 10 mm

+ diámetro de halo menor a 5 mm

- sin producción de halo

El ensayo de producción de sideróforos se muestra en la figura 11.



**Figura 11.** Producción de sideróforos en cepas de *B. japonicum* resistentes a thiram. El halo naranja alrededor de cada colonia indica la producción de sideróforos. (-) control negativo, *Bradyrhizobium* sp. P54 (Soria y col. 1996), (+) control positivo, *Bacillus* sp. (Laboratorio de Fisiología Vegetal UNRC, no publicado)

## DISCUSIÓN

El fungicida thiram afecta la viabilidad de *B. japonicum*, provoca cambios morfológicos y fisiológicos en soja y alfalfa desde la germinación e interfiere con la nodulación y la fijación del N<sub>2</sub>. El uso de cepas de rizobios resistentes al agroquímico constituye una alternativa al problema generado por el uso de thiram en semillas inoculadas, estrategia que también se está empleando en otras condiciones estresantes y con resultados diversos.

Algunas veces, aunque la bacteria sea resistente a un gran número de agroquímicos, la eficiencia simbiótica puede verse alterada. La presencia de agroquímicos en la rizosfera puede interferir con el proceso de infección a nivel de la deformación de pelos radicales inducida por los microorganismos. Posiblemente, la presencia de agroquímicos afecta a las plantas de manera tal que los factores deformantes de pelos radicales, similares a Nod Rm-1 y compuestos relacionados (Truchet y col. 1991) son incapaces de afectar la actividad morfogénica de las plantas (Martensson 1992). Ruiz-Sáinz y col, 1984, seleccionaron cepas mutantes de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* resistentes al fungicida captafol, pero éstas resultaron incapaces de nodular, demostrándose que habían perdido el plásmido *Sym* que porta los genes de nodulación. La resistencia al captafol fue independiente de la pérdida del plásmido y otros plásmidos *Sym* podrían ser transferidos a las cepas restaurando de esta manera la capacidad simbiótica al tiempo que se mantiene la resistencia al fungicida.

En este trabajo se obtuvieron cepas de *B. japonicum* resistentes a altas dosis de thiram (6000 mg/l). Las cepas denominadas A1, C1 y C6 son altamente resistentes a thiram pero han perdido su capacidad de nodular, en tanto que las cepas T3B, A86 y A2 resultaron altamente resistentes al fungicida y presentan una alta capacidad de nodulación y eficiencia en la fijación del N<sub>2</sub>. Estas cepas podrían ser utilizadas en la formulación de inoculantes convencionales para su uso con semillas tratadas con el fungicida e incluso en la elaboración de los nuevos inoculantes líquidos en los que, a fin de facilitar el trabajo del productor, el fungicida se encuentra incorporado junto a los microorganismos. De esta manera, se evitaría la pérdida de viabilidad bacteriana por el contacto con thiram, situación causal de nodulaciones deficientes y rendimientos disminuídos.

La adquisición de resistencia al fungicida le puede brindar a una cepa seleccionada ventajas competitivas para cuando sea introducida al suelo.

Un número suficiente de rizobios deben estar presentes en la rizosfera en el momento en que las raíces son susceptibles a la infección, por lo que cuando una

cepa inoculada se introduce al suelo tendrá que mantener una población alta aún en presencia de competidores, predadores y otros antagonistas.

Los microorganismos dominantes en la rizosfera son bacterias, por lo que ellas serían los principales competidores de los rizobios, aunque otros grupos pueden adquirir importancia temporal. Así, un incremento en el número de protozoos, quienes se alimentan de bacterias, se puede observar luego de una inoculación. Una experiencia de Ramírez y Alexander, 1980, reveló que la aplicación de thiram a semillas de poroto tuvo un efecto letal sobre los protozoos del suelo. Teniendo esto en cuenta, las cepas resistentes a thiram podrán ser aplicadas junto con el fungicida, quien a su vez controlará a algunos predadores de los rizobios.

Respecto de los ensayos de caracterización de las cepas resistentes se pudo observar que, al comparar los resultados de la capacidad de nodulación y la prueba de crecimiento a diferentes pH, los rizobios de crecimiento rápido resistentes a thiram fueron eficientes en el proceso simbiótico y esta habilidad se fue perdiendo a medida que el crecimiento se torna lento.

Un inoculante rizobiano debe competir con microorganismos bien adaptados y persistentes en suelo durante su vida saprofitica y durante el proceso de nodulación. Algunas propiedades tales como resistencia a antibióticos, tolerancia salina, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y capacidad desnitrificante pueden resultar significativas en esta competencia. Las pruebas de caracterización permiten obtener detalles distintivos de estas cepas que nos permitirán prever un posible comportamiento en el suelo así como su identificación en futuros reaislamientos.

Altos niveles de sal alteran el metabolismo de los rizobios y la fijación de  $N_2$  (Dowling y Broughton 1986). No obstante, pudieron obtenerse cepas de rizobios tolerantes a NaCl y eficientes en la fijación de  $N_2$  (Rai 1983, Doura y col. 1984, Rosas y col. 1996), lo que puede resultar de significancia en los intentos de mejorar los resultados de la inoculación en suelos salinos.

La competencia por hierro, la disponibilidad del cual es limitada debido a su insolubilidad a pH neutro en medioambientes aeróbicos, puede ser un factor determinante para la prevalencia de microorganismos en la rizosfera (Guerinot y col. 1990, Carson y col. 1992).

El crecimiento de rhizobia a bajos niveles de fosfato resultó ser una característica muy variable entre cepas (Beck y Munns 1984) y la combinación de pH y niveles de fósforo puede tener una fuerte influencia sobre la competencia por la nodulación.

La capacidad de algunas bacterias aeróbicas para utilizar formas oxidadas de nitrógeno como aceptor final de la cadena transportadora de electrones les permite



sobrevivir y crecer durante períodos de anoxia, situación ambiental desventajosa para la sobrevivencia de rhizobia en suelos (Zablotowicz y col. 1978).

Las cepas *T3B*, *A86* y *A2* mostraron alta tolerancia a NaCl y producción de sideróforos. *T3B* y *A86* son activos solubilizadores de fósforo mientras que *A2* no presenta esta propiedad. *A2*, *A86* y *T3B* mostraron actividad desnitrificante en este orden decreciente.

## Capítulo 4. LA INDUCCION DE GENES DE NODULACION DE RHIZOBIA EN PRESENCIA DE THIRAM

### INTRODUCCIÓN

La simbiosis leguminosa-rizobio se desarrolla a través de una compleja y ordenada secuencia de eventos que incluye la división celular y la diferenciación tanto de bacterias como de células vegetales, lo que requiere la existencia de una íntima comunicación entre ambos miembros de la relación. Hoy conocemos que señales moleculares liberadas tanto por las bacterias como por las plantas juegan un rol esencial desde las fases más tempranas de la simbiosis.

La genética molecular, en combinación con el estudio del comportamiento simbiótico de cepas bacterianas mutadas, han permitido la identificación de dos clases principales de genes bacterianos involucrados en la infección y nodulación.

Una clase incluye genes en los cuales las mutaciones han resultado en alteraciones en la síntesis, transporte y ensamble de componentes superficiales como exopolisacáridos (genes *exo*), lipopolisacáridos (genes *lps*), y  $\beta$ -1,2-glucanos (genes *ndv*) y en alteraciones en el proceso de infección, tal como la incapacidad de disparar la formación del hilo de infección y resultando en la formación de nódulos vacíos no fijadores de N<sub>2</sub> (fenotipo Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup>).

Estos resultados muestran que los polisacáridos están involucrados en el proceso de infección, sugiriéndose posibles roles de los *exo* y los lipopolisacáridos en la determinación de la especificidad de hospedante (Leigh y Coplin 1992). No obstante, no existen claras evidencias genética que muestren que los componentes superficiales de los rizobios sean los principales determinantes del rango de hospedantes.

La segunda clase consiste en los genes de nodulación (*nod* y *nol*). Numerosos genes *nod* han sido sucesivamente identificados a tal punto que todas las letras del alfabeto fueron utilizadas para denominarlos (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD*, etc), por lo que los más recientemente identificados han sido denominados genes *nol*.

Estos genes están involucrados en la infección y nodulación y su inactivación puede resultar en varios fenotipos en la planta, tal como la ausencia de nódulos (Nod<sup>-</sup>), menor nodulación pero efectiva (Nod<sup>d</sup> Fix<sup>+</sup>) e incluso cambios en la especificidad de hospedante.

Algunos genes *nod* son intercambiables entre diferentes especies y biovariedades de rizobios, y por ello se han denominado genes *nod* comunes, en tanto que otros están involucrados en la nodulación de una planta en particular y por ello se han denominado *nod* específicos de hospedante (anteriormente genes *hsn*).

El común *nodABC* fue encontrado en todos los aislamientos de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* estudiados a la fecha y la denominación de comunes responde al hecho de que ellos son estructuralmente conservados y funcionalmente intercambiables entre distintas especies de estos géneros sin alterar el rango de hospedante. La inactivación de los *nodABC* anula la capacidad de disparar cualquier reacción simbiótica por parte de la planta, incluyendo curvado de pelos radicales (Hac<sup>+</sup>), formación de hilo de infección (Inf), divisiones celulares en la corteza radical y formación de nódulos (Nod<sup>+</sup>). Los genes *nodIJ* suelen ser considerados comunes en *R. leguminosarum* *bv. viciae* y *bv. trifolii*, *B. japonicum*, *R. etli*, *A. caulinodans* y *S. meliloti*.

Los genes específicos de hospedante no son funcional ni estructuralmente conservados entre los rizobios y son necesarios para la nodulación de una planta hospedera en particular. En la mayoría de los casos, el efecto de mutaciones sobre estos genes no puede ser reparado por la introducción de los genes correspondientes provenientes de otras especies de rizobio. Uno de los efectos más marcados por las mutaciones es la alteración o extensión del rango de hospedantes, así cepas de *S. meliloti* mutadas en *nodH* dejan de nodular alfalfa pero pueden hacerlo con arveja en tanto que si la mutación se introducen en *nodQ* puede nodular ambas plantas por igual (Faucher y col. 1989).

En la mayoría de las especies de *Rhizobium* estudiadas, los genes *nod* están ubicados en un plásmido simbiótico de gran tamaño (pSym), el que también porta otros genes como los relacionados con la síntesis de la enzima nitrogenasa y reguladores del proceso de fijación de N<sub>2</sub> (genes *nif* y *fix*). En *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y en *Rhizobium loti* todos los genes simbióticos están localizados en el cromosoma bacteriano (Dénarié y col. 1992) (Figura 12).

La mayoría de los genes *nod* no se expresan en cultivo de células bacterianas sino que son inducidos en presencia del vegetal, como una respuesta a compuestos químicos liberados por semillas y raíces, principalmente pertenecientes al grupo de los flavonoides (figura 13). Esta expresión requiere de la presencia de una proteína con función de activador transcripcional, denominada NodD, por ser producto del gen *nodD*, el único que no necesitaría de un activador para transcribirse. La proteína NodD se liga a una secuencia conservada del ADN (la región *nod* box) ubicada corriente abajo del operon inducible *nod* (figura 14). Este sistema regulatorio está presente en todas las cepas de rizobios conocidas pero existen variantes entre las especies en cuanto al número de copias de *nodD* presentes, cifra que varía entre 1 y 5. La especificidad de NodD para un determinado flavonoide radica a nivel de la secuencia de aminoácidos de la región carboxilo terminal. Los flavonoides, presumiblemente, inducen cambios conformacionales en

NodD activándola para unirse al *nod* box. Los flavonoides son liberados como agliconas o como conjugados glicosídicos y si bien estos últimos son menos activos como inductores se estima que son la forma predominante en la rizosfera ya que se solubilizan en agua y pueden ser rápidamente convertidos a la forma activa por la acción de glicosidasas bacterianas. Algunas antocianinas (Hungria y col. 1991) y betaínas (Phillips y col. 1995) también fueron reportados como inductores de genes *nod*. Sustancias flavonoides intervienen además en el movimiento o quimiotaxia de los rizobios hacia la planta (Aguilar y col. 1988, Caetano-Anollés y col. 1988) y en la modulación de la tasa de crecimiento de microorganismos rizosféricos (Hartwig y col. 1991, Phillips y Tsai 1992).

La naturaleza y cantidad de compuestos exudados depende de la planta y de su estado de desarrollo, y el espectro de flavonoides presentes en las cubiertas de semillas y que se liberan a la rizosfera durante la germinación, es distinto del presente en los exudados de raíces (Hartwig y col. 1989). Además, la inoculación con un rizobio infectivo provoca cambios en el pool interno de flavonoides de la raíz, generándose un nuevo juego de compuestos que llevará a un incremento en la inducción de genes *nod* (van Brussel y col. 1990, Schmidt y col. 1994).

En varios casos, flavonoides sin actividad inductora han sido descritos como inhibidores de la inducción por otros flavonoides, lo que tendría lugar a través de un mecanismo competitivo, dado que los anti-inductores presentan estructuras semejantes a los inductores y la inhibición puede ser superada incrementando la concentración del inductor (Peters y Long 1988). De la misma manera se han reportado también acciones sinérgicas entre inductores (Hartwig y col. 1989)

Los estudios realizados en este trabajo de tesis han mostrado que el fungicida thiram afecta la sobrevivencia de *B. japonicum*, persistiendo no obstante una población remanente que podría ser suficiente para iniciar el proceso de nodulación, no obstante éste no se lleva a cabo, por lo menos hasta en etapas avanzadas del crecimiento de la planta y cuando el fungicida ya no se encuentra en el medio. Similares resultados encontraron Rosas y Correa (datos no publicados) estudiando la sobrevivencia de *S. meliloti* en presencia de thiram y determinando cambios en el perfil de exudados radicales en presencia de thiram.

Estas evidencias llevan a pensar que la falla en la nodulación podría deberse no sólo a la disminución de la población bacteriana sino también a que los rizobios pueden no reconocer los compuestos inductores presentes en los exudados.

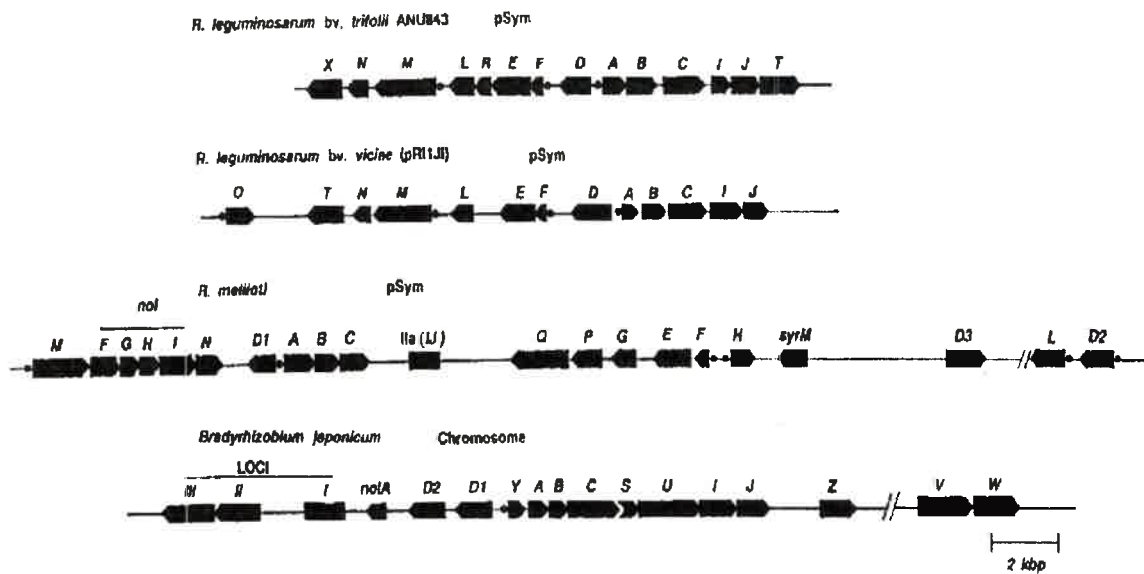
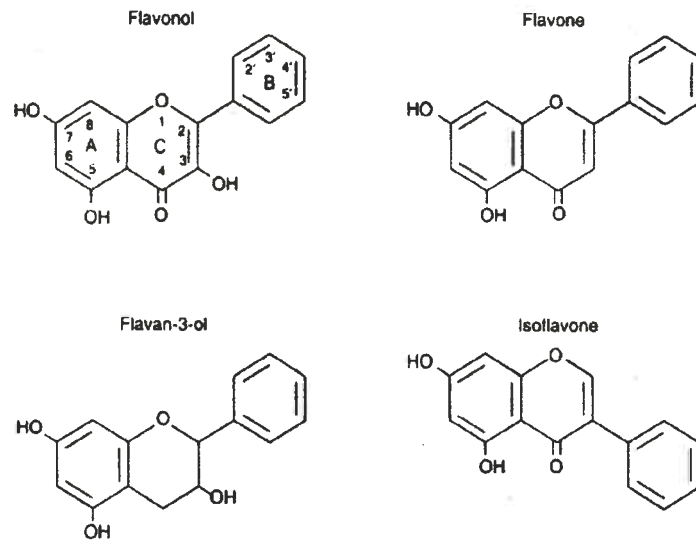
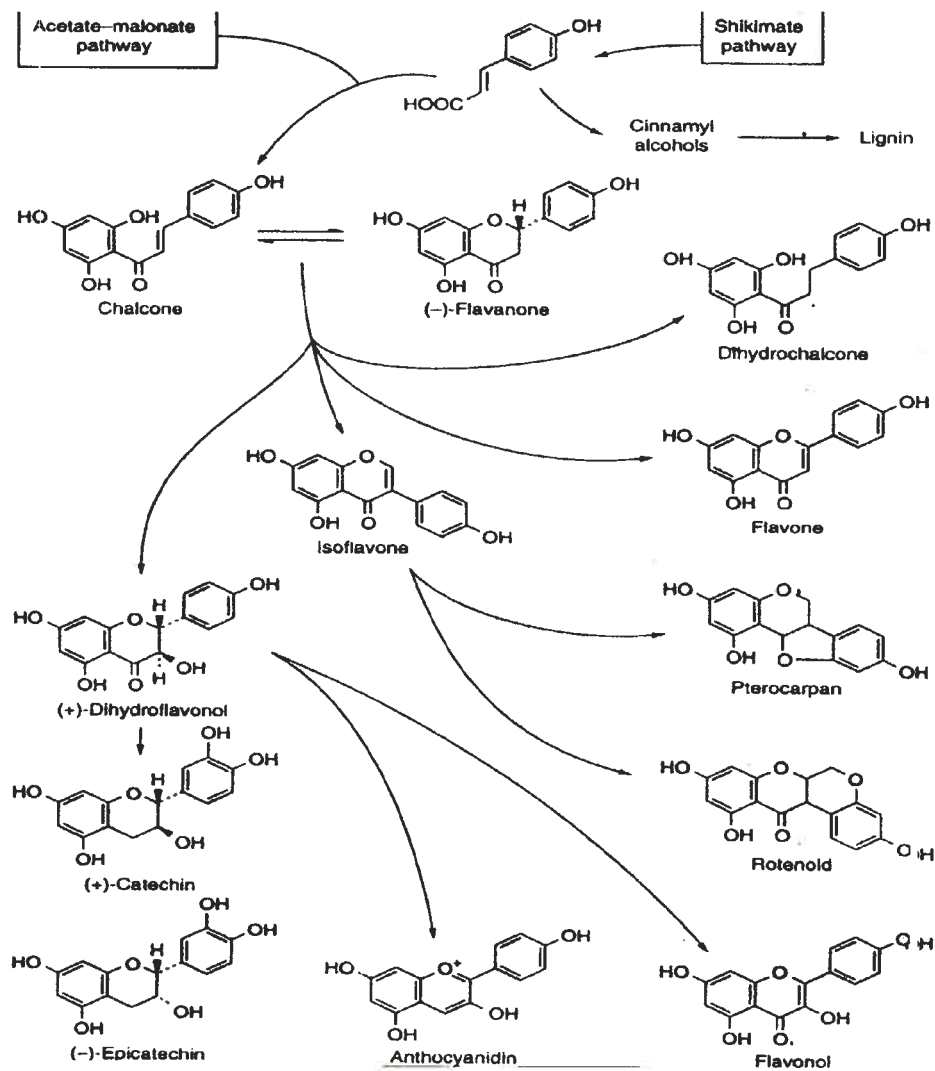


Figura 12. Organización de los genes *nod* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. meliloti* y *B. japonicum*. Las flechas indican la dirección de transcripción y los círculos negros las secuencias conservadas (*nod* box). (Tomado de Higashi 1993)





**Figura 13.** (Arriba) Estructuras flavonoides. La estructura básica consiste de dos anillos fusionados (A y C) a los que se une un tercer anillo (B). el grupo incluye flavonoles (ej. quercetina, kaempferol), flavonas (ej. luteolina, apigenina, crisina), flavanoles (ej. catequina) e isoflavonas (ej. genisteína, daidzeína). (Abajo) Interrelación entre clases de flavonoides. Las flechas indican la principal ruta biosintética. (Tomado de Rice-Evans y col. 1997)



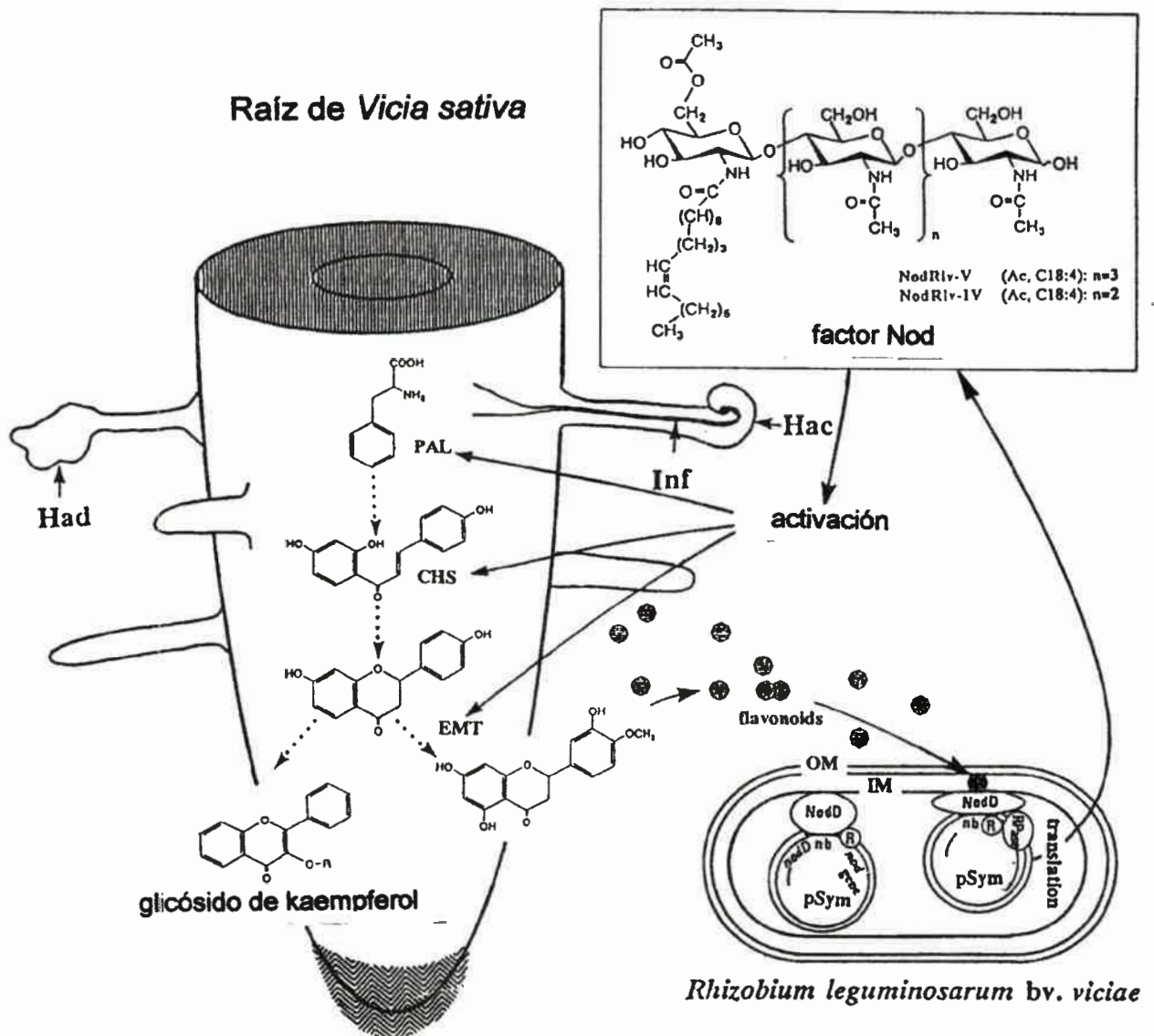


Figura 14. El papel de los flavonoides en los pasos tempranos de la infección de *Vicia sativa* por *R. leguminosarum* bv. *viciae*. PAL: fenilalanina amonio liasa, CHS: chalcona sintetasa, EMT: eriodictiol metil transferasa, Had: deformación del pelo radical, Hac: curvado del pelo radical, Inf: formación del hilo de infección, OM: membrana externa de *Rhizobium*, IM: membrana interna de *Rhizobium*, pSym: plásmido simbiótico, nb: nod box, Rpase: RNA polimerasa, R: represor. (Tomada de Higashi 1993)

Como un OBJETIVO ESPECIFICO de este trabajo se describe en este capítulo:

“El efecto de thiram sobre los procesos de reconocimiento planta-bacteria e inicio de la nodulación, a través de la evaluación de la inducción de genes *nod* por exudados de semillas y raíces de soja y alfalfa, por compuestos flavonoides puros y por la combinación de flavonoides y exudados”

Para los estudios a nivel de exudados se cuenta con una serie de cepas isogénicas de rizobia donde promotores de genes de la región *nod* fueron clonados junto al gen estructural *lacZ* de *Escherichia coli* llevando además, genes *nodD* de diferente origen, herramienta que permite demostrar si los exudados son capaces de activar o inhibir la transcripción de los genes *nod* comunes midiendo actividad  $\beta$ -Galactosidasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Agente químico: Thiram [bis(dimethylthiocarbamoyl)disulfide] 98%, grado técnico, fue obtenido de Síntesis Química SAIC y de ICONA SA, Argentina.

Material vegetal: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) y Soja (*Glycine max* (L) Merr.)

Esterilización superficial de semillas: Las semillas de alfalfa se escarificaron agitándolas durante 15 minutos en ácido sulfúrico concentrado y seguidamente se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril y se sumergieron durante 3 minutos en etanol 70% . Finalmente se lavaron con varios cambios de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Las semillas de soja fueron superficialmente esterilizadas con hipoclorito de sodio (solución comercial 60 gr/l) al 2% durante 3 minutos y luego lavadas 10 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril.

Luego de desinfectadas, un lote de semillas fue peleteado con el fungicida thiram. Las plántulas crecieron en condiciones de hidroponia sobre un soporte estéril de gasa y acero dentro de un contenedor de vidrio con 500 ml de medio Jensen diluído 10 veces (Zaat y col. 1988, Hartwig y col. 1990). Los contenedores fueron mantenidos en cámaras de cultivo con 16 h luz a 28°C y 8 h oscuridad a 16°C y a una intensidad lumínica de 220  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}^{-1}$ .

A las 4 h y luego cada 24 h se retiraron muestras del medio bajo condiciones de esterilidad a fin de coleccionar exudados de semillas y raíces.

### Bioensayo de Inducción de genes *nod*:

Se realizaron las siguientes experiencias:

a) Estudio de la actividad inductora de genes *nod* en presencia y ausencia de thiram por exudados de alfalfa y soja colectados a las 4 y 120 horas de su siembra en condiciones de hidroponia.

b) Estudio de la capacidad inductora de genes *nod* por parte de compuestos flavonoides puros en presencia y ausencia de thiram. Los flavonoides Luteolina, Luteolina-7-glucósido, Quercetina, Apigenina y Chrysin fueron obtenidos de Carl Roth GmbH+Co, Alemania. Naringenina y Naringina fueron obtenidos de SIGMA, USA.

Todos los flavonoides fueron resuspendidos en metanol 50% y empleados para el bioensayo de inducción a una concentración final de 10  $\mu$ M.

El fungicida Thiram 98% fue agregado a los tubos de inducción a una concentración final de 2000  $\mu$ g/ml.

c) Estudio de la actividad inductora de genes *nod* en presencia y ausencia de thiram por parte de exudados de alfalfa y soja colectados a las 4 y 120 horas de su siembra en condiciones de hidroponia y suplementados con una concentración 10 $\mu$ M de flavonoides cuya actividad inductora ha sido probada en el paso anterior.

La capacidad de los exudados y de compuestos flavonoides para inducir los genes de nodulación se evaluó utilizando cepas isogénicas de rizobia (obtenidas del Dr. S.A.J. Zaat, Leiden University, Netherlands) donde promotores de la región *nod* fueron clonados junto al gen estructural *lacZ* de *Escherichia coli*. Estas cepas derivan de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* donde el plásmido *Sym* ha sido removido y portan un plásmido *Inc P* con genes *nodD* de diferente procedencia y un plásmido *Inc Q* con el promotor *nodA,B,C,I,J* clonado antes del gen estructural *lacZ*.

<u>Designación</u>	<u>Fondo</u>	<u>Fuente de <i>nod D</i></u>
RBL 5280	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>
RBL 5283	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>
RBL 5284	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	<i>R. meliloti</i>

Las cepas bacterianas portando la fusión *nod-lacZ* fueron cultivadas hasta una DO<sub>600</sub> 0.1-0.3 en medio EMA suplementado con los antibióticos estreptomycin (100  $\mu$ g/ml), tetraciclina (2  $\mu$ g/ml) y cloramfenicol (10  $\mu$ g/ml) para el mantenimiento de plásmidos. Los exudados se utilizaron sin purificar y el pH fue ajustado a 7.0 con Na(OH) inmediatamente antes de la experiencia.

500µl de exudados fueron combinados con 500 µl de cultivo de las cepas e incubados a 28°C durante 3 h (etapa de inducción).

Seguido a la incubación, 1 ml de buffer Z (Miller 1972), 50 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1% y 20µl de cloroformo fueron agregados a los tubos. La mezcla fue vigorosamente agitada a fin de lisar las células (Howieson et al. 1992)

Actividad de enzima β-galactosidasa liberada fue determinada por la adición de 400 µl de reactivo ONPG (o-nitrofenil β-D-galacto piranósido SIGMA 4 mg/ml) seguido por incubación a 28°C hasta desarrollo de un color amarillo (tubos positivos). La reacción se termina con la adición de 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. La actividad enzimática fue calculada por el método de Miller 1972. El nivel basal de producción de β-galactosidasa por las cepas RBL (las bacterias no toman contacto con exudados ni flavonoides) se determinó del mismo modo, agregando 500 µl de solución Jensen 1/10 estéril en la etapa de inducción.

Unidades enzimáticas:  $1000 \times DO_{420} - 1.75 \times DO_{550} / T \times V \times DO_{600}$

DO<sub>420</sub>: absorción del o-nitrofenol

1.75 x DO<sub>550</sub>: medida para corregir lectura debida al esparcimiento de la luz por restos celulares.

T: tiempo de reacción en minutos (cuando aparece amarillo)

V: volumen de cultivo microbiano empleado

DO<sub>600</sub>: densidad celular justo antes del ensayo



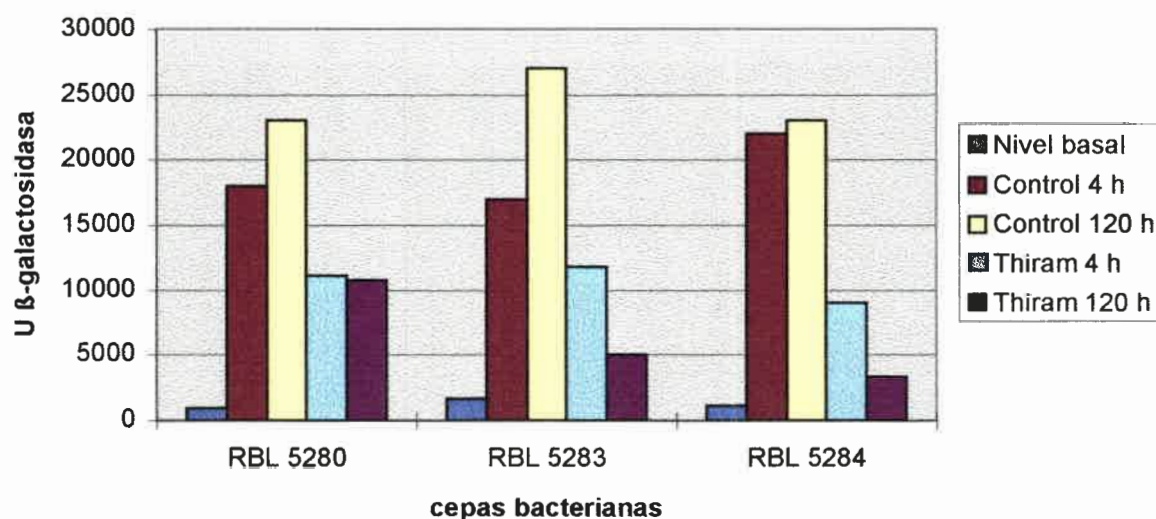
## RESULTADOS

### Bioensayo de inducción de genes *nod*:

Diferencias significativas se observaron en la capacidad inductora de genes *nod* por parte de exudados obtenidos de semillas de alfalfa controles respecto de semillas peleteadas con thiram. Cuando se probaron exudados colectados a las 4 h de imbibición una fuerte inducción superior a 22000 U de  $\beta$ -galactosidasa se obtuvo con la cepa RBL 5284 (la que porta el promotor *nodD* de *R. meliloti*, simbionte de alfalfa) en la situación control. Valores de 17000 y 18000 U se obtuvieron para las cepas RBL 5283 y RBL 5280. Con exudados provenientes de semillas tratadas con thiram la actividad inductora se redujo a 11000 U en la cepa 5280, 11700 U en 5283 y 9000 U en 5284.

Con exudados colectados a las 120 h, donde ya están presentes otros compuestos liberados por las jóvenes raíces, en las cepas RBL 5280 y RBL 5284 la producción de aproximadamente 23000 U se redujo a 10750 y 3300 U respectivamente en presencia de thiram, en tanto que para RBL 5283 el nivel de aproximadamente 27000 U se redujo a 5000 U.

### **Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de alfalfa en presencia de thiram**

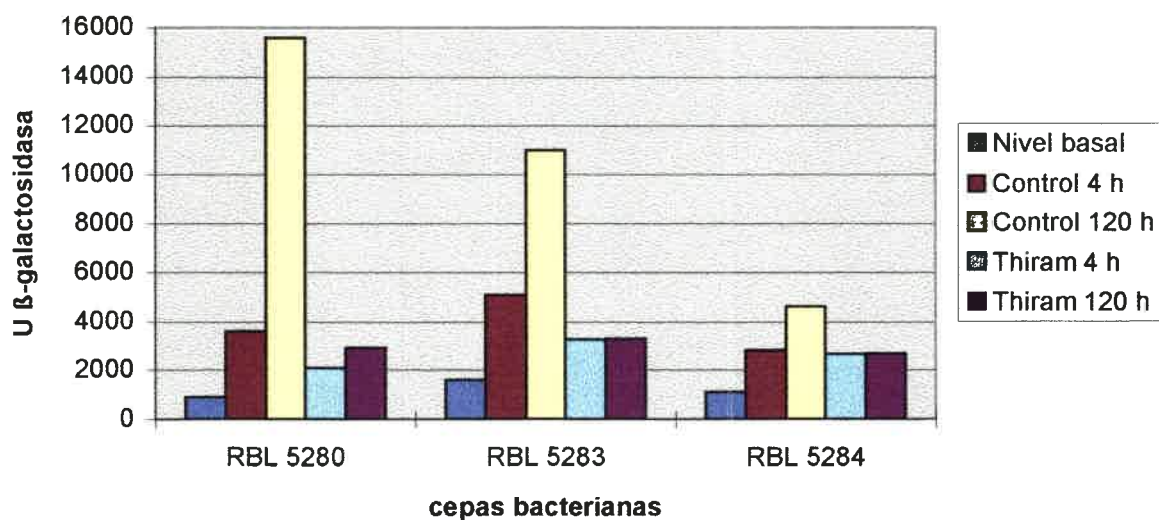


Cuando el tiempo de incubación (cepas RBL en contacto con los exudados) se extendió de 3 a 24 h se obtuvieron similares resultados.

Los niveles basales de producción de  $\beta$ -galactosidasa en las cepas RBL fueron de 900 U en 5280, 1600 U en 5283 y 1100 U en 5284.

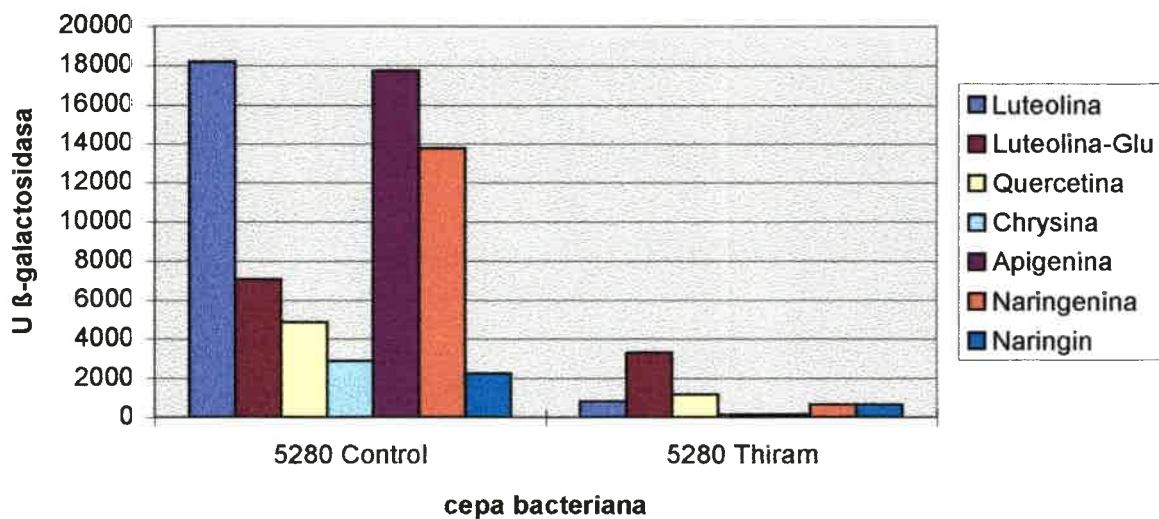
En soja, con los exudados colectados a las 4 h se observaron niveles de inducción muy bajos. Para las cepas 5280, 5283 y 5284 se obtuvieron 3600, 5000 y 2800 U de  $\beta$ -galactosidasa respectivamente. En todos los casos, en presencia de thiram los niveles de inducción fueron muy bajos, cercanos a los niveles basales de producción de  $\beta$ -galactosidasa para las cepas.

### Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de soja en presencia de thiram

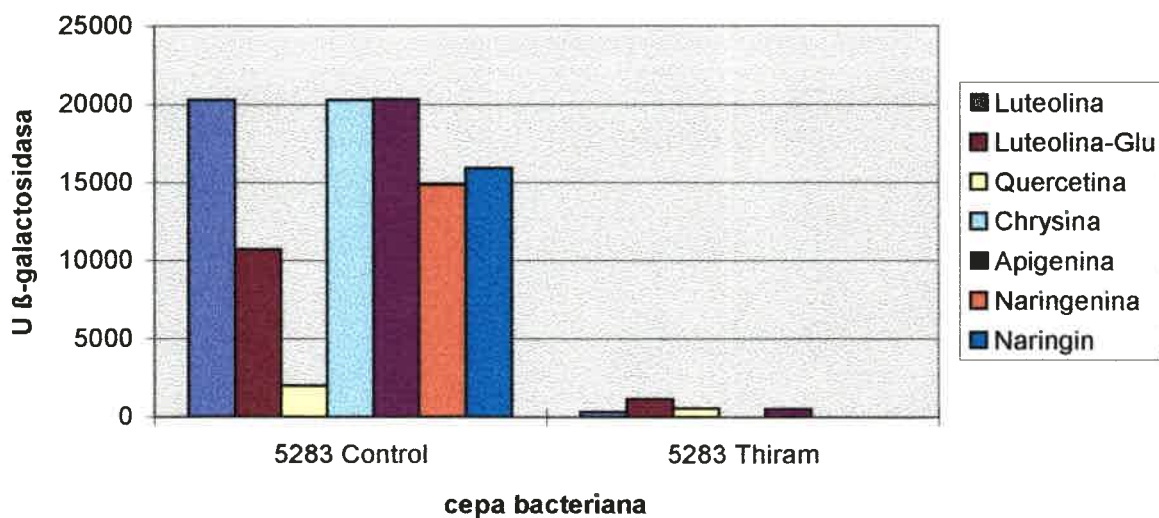


La actividad inductora de distintos compuestos flavonoides, a una concentración 10  $\mu\text{M}$  en el medio de inducción, y el efecto de 2000  $\mu\text{g/ml}$  de thiram sobre la misma se muestra en los siguientes gráficos

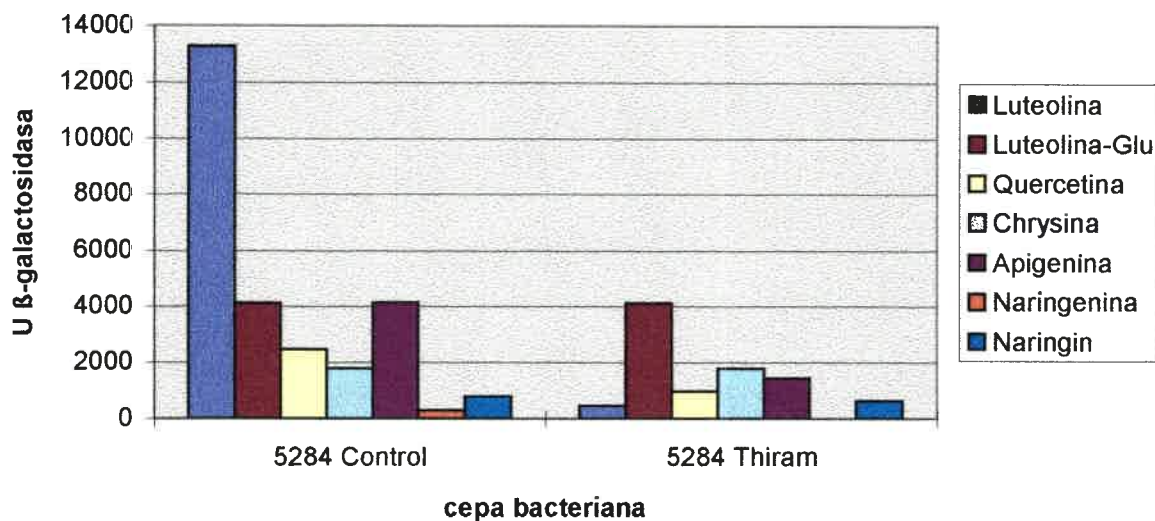
**Bioensayo de inducción de genes *nod* en RBL 5280 por sustancias flavonoides**



**Bioensayo de inducción de genes *nod* en RBL 5283 por sustancias flavonoides**



### Bioensayo de inducción de genes *nod* en RBL 5284 por sustancias flavonoides



En RBL 5280, los flavonoides luteolina, apigenina y naringenina mostraron una alta actividad inductora, con niveles de inducción entre 18000 y 13800 U de  $\beta$ -galactosidasa. En RBL 5283 a los nombrados se agregan chrysin y naringina, con niveles de inducción entre 20300 y 14800 U mientras que en RBL 5284 solamente luteolina presentó buena inducción, registrándose 13300 U.

En todos los casos, la presencia de thiram en el medio disminuyó de manera muy marcada los niveles de inducción, con porcentajes de inhibición que varían entre 53% y 100% según la cepa y el flavonoide probado. Este efecto se muestra en la siguiente tabla:

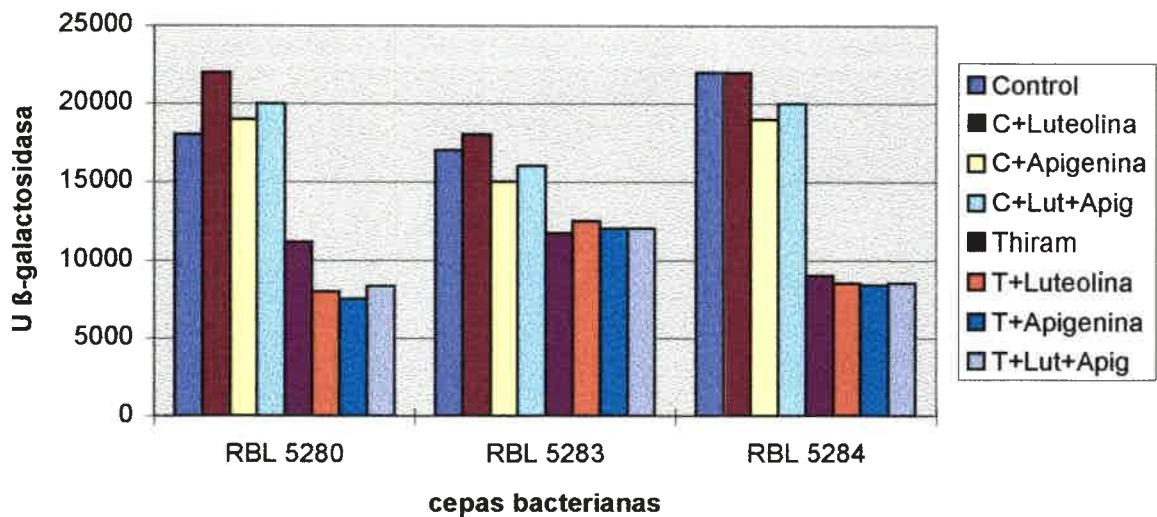
	<u>Unidades <math>\beta</math>-galactosidasa</u>		<u>% Inhibición de inducción</u>
	<u>Control</u>	<u>Thiram</u>	
<b>Cepa RBL 5280</b>			
Luteolina	18200	820	95.5
Luteolina-7-glucósido	7050	3280	53.5
Quercetina	4860	1170	75.8
Chrysin	2860	120	95.7
Apigenina	17750	120	99.3
Naringenina	13800	650	95.3
Naringina	2230	640	70.9
<b>Cepa RBL5283</b>			
Luteolina	20290	290	98.6
Luteolina-7-glucósido	10720	1160	89.2
Quercetina	2030	580	71.4
Chrysin	20290	0	100
Apigenina	20300	500	97.5
Naringenina	14870	0	100
Naringina	15900	0	100
<b>Cepa RBL 5284</b>			
Luteolina	13290	460	96.5
Luteolina-7-glucósido	4120	4120	0
Quercetina	2460	960	61.0
Chrysin	1790	1790	0
Apigenina	4130	1460	64.7
Naringenina	290	0	100
Naringina	790	620	21.1

Modificación de la actividad inductora de genes nod en cepas portadoras de la fusión nod-lacZ por el agregado de 2 mg/ml de thiram 98% al medio de inducción.

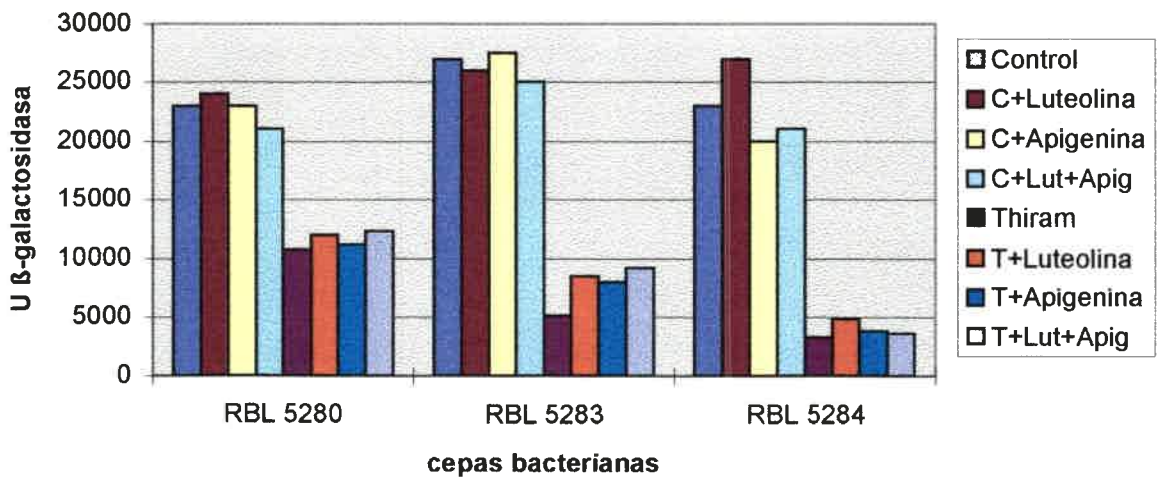


La inhibición de la inducción por la presencia de thiram no pudo ser revertida con el agregado de inductores, con actividad probada, a los exudados de alfalfa y soja, tal como lo muestran las siguientes figuras.

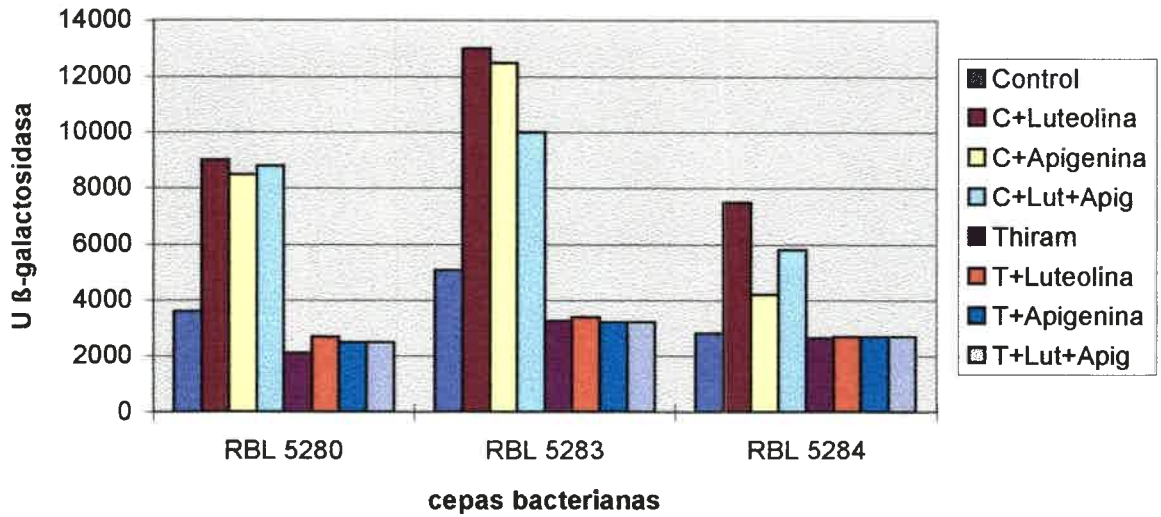
**Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de alfalfa de 4 horas suplementados con sustancias flavonoides**



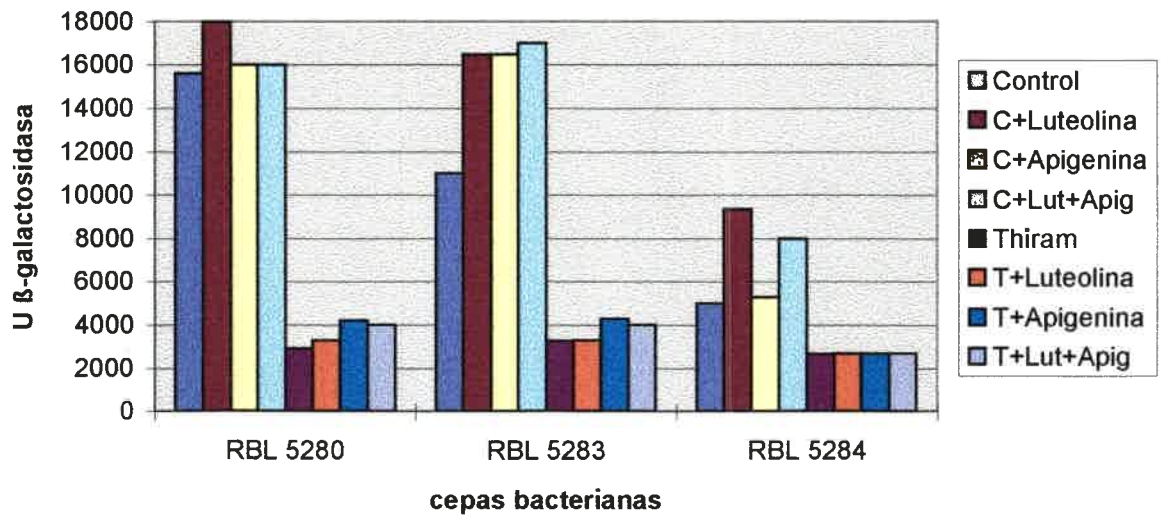
**Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de alfalfa de 120 horas suplementados con sustancias flavonoides**



**Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de soja de 4 horas suplementados con sustancias flavonoides**



**Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de soja de 120 horas suplementados con sustancias flavonoides**



Los mismos resultados, y presentados como porcentaje de inhibición de la inducción, se muestran en la siguiente tabla:

Tratamiento	Exudados de 4 h			Exudados de 120 h		
	5280	5283	5284	5280	5283	5284
<b>ALFALFA</b>						
Exudado	38.2	30.7	59.1	53.3	81.2	85.6
+ luteolina	63.7	60.6	61.4	50.0	67.3	82.2
+ apigenina	60.5	20.0	55.8	51.3	70.9	81.0
+lut+apig	58.5	25.0	57.5	41.4	63.2	82.8
<b>SOJA</b>						
Exudado	41.7	35.7	6.1	81.4	70.3	42.2
+ luteolina	70.0	73.8	64.0	81.7	80.0	75.5
+apigenina	70.6	74.4	35.8	73.8	73.9	56.6
+lute+apig	10.7	68.0	53.4	75.0	76.5	60.0

Porcentaje de inhibición de la inducción de genes *nod* en presencia de thiram en cepas RBL 5280, 5283 y 5284 por exudados de semillas y raíces de alfalfa y soja colectados a las 4 y 120 h de cultivo en condiciones de hidroponia y con el agregado de flavonoides inductores a una concentración final 10µM.

## DISCUSIÓN

El fungicida thiram inhibió marcadamente la inducción de genes de nodulación en cepas RBL por parte de exudados de semillas y raíces de alfalfa y soja, por parte de compuestos flavonoides purificados y en la combinación de exudados e inductores.

El flavonoide luteolina es mencionado comunmente como el inductor de *Sinorhizobium meliloti* (Peters et al., 1986), no obstante se han detectado otros inductores para la misma cepa, como chrysoeriol (Hartwig et al., 1990), que junto con luteolina está presente en las cubiertas seminales de alfalfa, y 4',7-dihydroxiflavona, 4',7-dihydroxiflavanona y 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona (Maxwell et al., 1989) liberados por las raíces.

A bajas concentraciones se detecta un efecto aditivo (sinergismo) en la inducción de genes *nod* por parte de los inductores fuertes (luteolina y 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona); en tanto que la liberación de inductores más débiles (4',7-dihydroxiflavona, 4',7-dihydroxiflavanona, apigenina, eriodictiol) puede limitar el efecto inductor como un mecanismo regulatorio por parte de la planta (Hartwig et al., 1989)

Otros compuestos flavonoides, caso naringenina, morina, kaempferol, chrysin, demuestran fuerte actividad antagónica para la inducción de *S. meliloti* (Peters and Long, 1988).

Chrysin y naringenina fueron reportados como inductores para *R. leguminosarum* *bv. trifolii* y *R. leguminosarum* *bv. viciae* (van Rijn y Vanderleyden 1995). Quercetina, el flavonoide predominante en cubiertas seminales de alfalfa, no presenta actividad inductora de genes *nod* y su notoria acción en la rizosfera es modular la tasa de crecimiento y la germinación de esporas de distintos microorganismos. (Hartwig et al. 1991).

El sistema de reconocimiento leguminosa-rizobio en alfalfa (el caso más estudiado) es bastante complejo. *S. meliloti* tiene 3 genes *nodD* funcionales (*nod D1*, *D2* y *D3*) los cuales responden de distinta manera a los flavonoides inductores citados e incluso a otros compuestos no flavonoides tales como las betaínas trigonelina y estaquidrina, las que liberadas por semillas actúan como activadores exclusivamente del *nodD2* (Phillips y col. 1992). El gen *nodD3* está involucrado en mecanismos regulatorios en el que participan otros genes (como *syrM* y *nolR*) cuyos productos regulan a los *nod* y también están involucrados en la síntesis de exopolisacáridos (Higashi, 1993)

Con los exudados obtenidos de semillas y raíces de soja no se observó en las cepas RBL un nivel de inducción tal elevado como con los exudados de alfalfa, no obstante, pudieron observarse importantes diferencias en la actividad inductora entre los tratamientos con thiram y sus controles. La causa de estos menores niveles de inducción radicaría en que ninguna de las cepas empleadas posee el gen *nodD* de *Bradyrhizobium japonicum* (simbionte de soja) y que la bacteria de fondo sobre la cual se hacen las construcciones genéticas es *Rhizobium*.

Los exudados radicales de soja son ricos en las isoflavonas daidzeína y genisteína, fuertes activadores del *nodD* de *B. japonicum* pero que no inducen en *R. leguminosarum* *bv. viciae*, *R. leguminosarum* *bv. trifolii* y *S. meliloti* (Kosslak y col. 1987, van Rijn y Vanderleyden 1995) cuyos genes *nodD* fueron empleados en la construcción de las cepas RBL 5280, 5283 y 5284 respectivamente.

Evidentemente, el fungicida thiram interfiere en el proceso de reconocimiento planta-bacteria. La cantidad y/o calidad de componentes de exudados vegetales así como la interacción flavonoide - proteína NodD pueden verse afectados en presencia del fungicida.

En *R. leguminosarum* *bv. viciae* la proteína NodD fue localizada en membrana citoplasmática (Schlaman et al. 1989). En *S. meliloti* fue localizada en citosol y migra hacia la membrana cuando se agregan los flavonoides adecuados (Kondorosi et al. 1989). También fue reportada la acumulación de flavonoides en la membrana



citoplasmática (Recourt et al. 1989). Recientemente, Hubac et al. en 1993 mostraron que la absorción de luteolina por las membranas de *S. meliloti* involucra directamente a la proteína NodD.

Por otra parte, se sabe que los fungicidas del tipo de los ditiocarbamatos (thiram, mancozeb, maneb, ferban, polyram, ziram, zineb y otros) pueden actuar siendo metabolizados al radical isothiocianato ( $-N=C=S$ ) el cual inactiva los grupos -SH de aminoácidos, proteínas y enzimas de los organismos patógenos sensibles. Estos fungicidas poseen además actividad quelante de Fe, Mg y Zn de manera que afectan a las enzimas ya sea privándolas de las mismos o proveyéndoselos en concentraciones tóxicas (Johnson y Ware 1992).

La no reversión de la falta de inducción, por exudados en tratamientos con thiram por la adición de flavonoides con actividad inductora probada, sugiere que alguna alteración a nivel de pared o membrana bacteriana podría tener lugar cuando thiram está presente.



## Capítulo 5. CONCLUSIÓN GENERAL Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### CONCLUSIÓN GENERAL

En este trabajo se ha obtenido información sobre diferentes aspectos de la incidencia biológica de un agroquímico, el fungicida protector de semillas thiram, ampliamente utilizado en nuestro país.

Los datos disponibles sobre los alcances de la acción de este compuesto son bastante contradictorios, debido en parte a los diferentes métodos de estudio que los investigadores han empleado y, posiblemente, a la existencia de intereses económico - comerciales que, como sucede con tantas otras sustancias aplicadas a las actividades productivas, poco tienen en cuenta su impacto sobre el medio ambiente.

En un estudio adicional, tendiente a evaluar el potencial cancerígeno de thiram y motivado también por las informaciones poco precisas sobre este aspecto, se demuestra la capacidad mutagénica sobre bacterias, lo que podría extenderse hasta el ser humano tal como lo están hoy mostrando recientes estudios sobre mamíferos.

En los ensayos realizados con soja, alfalfa y microorganismos fijadores de N<sub>2</sub> se concluye que el fungicida thiram afecta la sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* así como el crecimiento de las leguminosas ensayadas desde la germinación. Los efectos sobre la nodulación son notorios tanto en condiciones de laboratorio como a campo abarcando desde una inhibición prácticamente total de la misma en las etapas tempranas del crecimiento vegetal a una nodulación tardía en raíces laterales de las zonas bajas del sistema radical. En alfalfa es destacable la aparición del fenómeno de falsa nodulación.

Como una alternativa ante el prácticamente inevitable empleo del fungicida en los cultivos de las leguminosas se propuso la obtención de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* resistentes a thiram. Los trabajos de laboratorio permitieron la obtención de varias cepas resistentes aunque se encontró que algunas de las cepas han perdido la capacidad de nodular. Otras, no obstante, mantienen tal capacidad y son efectivos fijadores de N<sub>2</sub> en presencia de thiram. Estas últimas, y en particular las cepas denominadas TIIIB, A2 y A86 podrán ser ofrecidas a la tecnología agropecuaria para la elaboración de nuevos inoculantes, tanto aquellos que serán aplicados a semillas tratadas con thiram como los nuevos inoculantes líquidos formulados conjuntamente con la bacteria y el fungicida.

Las cepas resistentes fueron sometidas a diversas pruebas de caracterización (resistencia y sensibilidad a antibióticos, tolerancia salina, crecimiento a diferentes pH, capacidad desnitrificante, solubilización de fosfatos) que nos permiten conocer algunos detalles distintivos de las mismas con los que podemos preveer un posible comportamiento en el campo así como su identificación en posibles reaislamientos desde nódulos o desde el suelo.

Los estudios de inducción de genes de nodulación de rhizobia empleando la fusión *nod-lacZ* permiten concluir que la presencia del fungicida thiram afecta el reconocimiento planta - bacteria, posiblemente operando a nivel de la membrana citoplasmática, sitio donde interactúan el producto del gen *nodD* con sustancias flavonoides liberadas por el vegetal, etapa desencadenante de la interacción simbiótica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal R.C., Y. Shukla and N.K. Mehrotra. 1997. Assessment of mutagenic potential of thiram. *Food Chem. Toxicol.* 35(4):523-525
- Aguilar J.M.M., A.M. Ashby, A.J.M. Richards, G.J. Loake, M.D. Watson and C.H. and Shaw. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* toward flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2741-2746
- Alaa-Eldin M.N., S. Mahmoud, A. Makawi, M. Abdel-Nasser and N. Herzallah. 1981. Effect of preemergence application of some herbicides on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean. *Pesquisa Agrop. Bras.* 16:883-889
- Alexander D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soil* 12:39-45
- Alexander M. 1977. Introduction to soil microbiology. Wiley & Sons, New York.
- Al-Rashidi R.K., T.E. Loynachan and L.R. Frederick. 1982. Desiccation tolerance of four strains of *Rhizobium japonicum*. *Soil. Biol. Biochem.* 14: 489-493
- Ames B.N., J. Mc Cann and E.Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity tests. *Mutat. Res.* 31:347-364
- Andrés J.A., N.S. Correa y S.B. Rosas. 1995,a. Exudados radicales de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones de estrés salino. Expresión de genes *nod* en *Rhizobium*. *Agriscientia* XII:87-91
- Andrews C.S. 1976. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. *Aust. J. Agric. Res.* 27:611-623
- Aurag J. and A. Sasson. 1992. Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity and drought. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 532-533
- Barbour W.M. and G.H. Elkan. 1989. Relationship of the presence and copy number of plasmids to exopolysaccharide production and symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii* USDA 206. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:813-818
- Bayoumi H.E., B. Biró and M. Kekskés. 1995. Some environmental factors influencing the survival of *R. leguminosarum* bv. *viciae*. *Acta Biol. Hung.* 46:17-30
- Becana M. and J.I. Sprent. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiol. Plant.* 70:757-765
- Beck D.P. and D.N. Munns. 1984. Phosphate nutrition of *Rhizobium* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:278-282
- Blackwell-Smith R. Jr. , J.K. Finnegan, P.S. Larson, P.F. Sahyoun, M.L. Dreyfuss and H.B. Haag. 1953. Toxicologic studies on zinc and disodium ethylene bisdithiocarbamates. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 109:159-166

- Blauenfeldt J., P.A. Joshi, P.M. Gresshoff and G. Caetano-Annollés. 1994. Nodulation of white clover (*Trifolium repens*) in the absence of *Rhizobium*. *Protoplasma* 179:106-110
- Bollich P.K., E.P. Dunigan and W.M. Jadi. 1985. Effects of seven herbicides on N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation by soybeans. *Weed Sci.* 33:427-430.
- Burdman S., H. Volpin, J. Kigel, Y. Kapulnik and Y. Okon. 1996. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3030-3033
- Caetano-Annollés G. 1993. Nodule morphogenesis in the absence of *Rhizobium*. In: R. Palacios, J. Mora and W. Newton Eds. *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Dordrecht, pp 297-302.
- Caetano-Annollés G., D.K. Christ-Estes and W.D. Bauer. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170:3164-3169
- Caetano-Annollés G., P.A. Joshi and P.M. Gresshoff. 1991. Spontaneous nodules induce feedback suppression of nodulation in alfalfa. *Planta* 183:77-82
- Carson K.C., S. Holliday, A.R. Glenn and M.J. Dilworth M.J. 1992. Siderophore and organic acid production in root nodule bacteria. *Arch. Microbiol.* 157:264-271
- Cataldo D.A., M. Haroon, L.E. Schrader and V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 6:71-80
- Chen H., A.E. Richardson and B.G. Rolfe. 1993. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1798-1804
- CIAT 1988. *Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo* FBN. Proyecto Especial CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia
- Coventry D.R. and J. Evans. 1989. Symbiotic nitrogen fixation and soil acidity. In: *Soil acidity and plant growth*. A.D. Robson, Ed. Academic Press, Sidney. pp 193-107
- Cunningham S.D. and D.N. Munns. 1984. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48:1273-1276.
- Curley R.L. and J.C. Burton. 1975. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agron. J.* 67:807-808
- Dalton D.A., S.A. Russell and H.J. Evans. 1988. Nickel as a micronutrient for plants. *Biofactors* 1:11-16
- Day D.A. and L. Copeland. 1991. Carbon metabolisms and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 29:185-201
- Day J.M., R.J. Roughley, A.R.J. Eaglesham, N. Dye and S.P. White. 1978. The effect of high soil temperatures on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Ann. Appl. Biol.* 89:476-481.

- Dénarié J., F. Debellé and C. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:497-531
- Derylo M. and A. Skorupska. 1993. Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin secreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Sci.* 154:211-217.
- Doura C.E., A.C. Xenoulis and T. Paradellis. 1984. Salinity tolerance of a *Rhizobium meliloti* strain isolated from salt affected soils. *Folia Microbiol. Prague* 29:316-324
- Dowling D.N. and W.J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:131-157
- Dubey H.D. 1970. A nitrogen deficiency disease of sugarcane probably caused by repeat pesticide applications. *Phytopathol.* 60:485-487
- Edington N. and J.McC. Howell. 1966. Changes in the nervous system of rabbits following the administration of sodium diethyldithiocarbamate. *Nature* 210(5040):1060-1062
- Environmental Health Criteria 78. 1988. Dithiocarbamate pesticides. Ethylene thiourea and propylene thiourea: a general introduction. World Health Organization, Geneva.
- Faizah A.W., W.J. Broughton and C.K. John. 1980. Rhizobia in tropical legumes. XI. Survival in the seed environment. *Soil Biol. Biochem.* 12:219-227
- Faucher C., H. Camult, J. Dénarié and G. Truchet. 1989. The *nodH* and *nodQ* host range genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2:291-300
- Fehr W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood and J.S. Pennington. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop. Sci.* 11:929-931
- Fisher D.J., A.L. Hayes and C.A. Jones. 1978. Effects of some surfactant fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. *Ann. Appl. Biol.* 90:73-84
- Froni L. 1990. *Ecología Microbiana del Suelo*. Departamento de Publicaciones y Ediciones, Universidad de la República, Uruguay, p 497
- Georgiev G.I. and C.A. Atkins. 1993. Effects of salinity on N<sub>2</sub> fixation, nitrogen metabolisms and export and diffusive conductance of cowpea nodules. *Symbiosis* 15:239-255
- Gibson A.H. 1969. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. VI. Nitrogen retention within the nodules of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Biol. Sci.* 22:829-838
- Gillberg B. 1971. On the effects of some pesticides on *Rhizobium* and isolation of pesticide-resistant mutants. *Arch. Microbiol.* 75:203-208
- Graham P.H., G. Ocampo, L.D. Ruiz and A. Duque. 1980. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. *Agronomy Journal* 72:625-627
- Guerinot M.L., E.J. Meidl and O. Plessner. 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 172:3298-3303

- Haaker H. and J. Klugkist. 1987. The bioenergetics of electron transfer to nitrogenase. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:57-71
- Hageman R.V. and R.H. Burris. 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:2699-2702
- Hagedorn C. and B.A. Caldwell. 1981. Characterization of diverse *Rhizobium trifolii* isolates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:1513-1516
- Hald J. and E. Jacobsen. 1948. The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of Antabuse (tetraethylthiuram disulfide) and alcohol. *Acta pharmacol. toxicol.* 4:305-310
- Hartwig U.A., C.A. Maxwell, C.M. Joseph and D.A. Phillips. 1989. Interaction among flavonoid *nod* gene inducers released from alfalfa seeds and roots. *Plant Physiol.* 91:1138-1142
- Hartwig U.A., C.A. Maxwell, C.M. Joseph and D.A. Phillips. 1990. Chrysoeriol and Luteolin released from Alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 92:116-122
- Hartwig U.A., C.M. Joseph and D.A. Phillips. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 95:797-803
- Hashem F.M., S.A. Saleh, P. van Berkum and M.Voll. 1997. Survival of *Bradyrhizobium* sp (*Arachis*) on fungicide-treated peanut seed in relationship to plant growth and yield. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13:335-340
- Higashi S. 1993. (*Brady*)*Rhizobium*-Plant communications involved in infection and nodulation. *J. Plant Res.* 106:201-211
- Hirsch A.M., T.V. Bhuvanewari, J.G. Torrey and T. Bisseling. 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1244-1248
- Howieson J.G., A.D. Robson and L.K. Abbott. 1992. Acid-tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:287-296
- Huang C.Y., J.S. Boyer and L.N. Vanderhoef. 1975. Limitation of acetylene reduction (nitrogen fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials. *Plant Physiol.* 56:228-232
- Hubac C., J. Ferran, D. Guerrier, A. Tremolieres and A. Kondorosi. 1993. Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti* wild-type and mutant strains. *J. Gen. Microbiol.* 139:1571-1578
- Hungria M.A., C.M. Joseph and D.A. Phillips. 1991. Anthocyanidins and Flavonols, Major *nod* Gene Inducers from of a Black-Seeded Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 97:751-758



- Irigoyen J.J., D.W. Emerich and M. Sánchez-Díaz. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84:55-60
- Ivanova-Chemishanska L. and G. Antov. 1980. Changes in the gonads reproduction of white rats under the effect of some pesticides. *Arch. Toxicol. Suppl.* 4:459-462
- Jakubisiak B. and J. Golebiowska. 1963. Influence of fungicides on *Rhizobium*. *Acta Microbiol. Pol.* 12:196-202
- Johnson J.M. and G.W. Ware (Eds). 1992. *Pesticide Litigation Manual*. Clark, Boardman, Callagan. USA
- Jordan D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae. *Conn 1938*, 321<sup>AL</sup> pp 234-254. In: N.R. Krieg and J.G. Holt, Eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Khadair A.H., R.C. Sinhg and J.F. Peterson. 1984. Effect of white clover mosaic virus infection on various processes relevant to N<sub>2</sub> fixation in red clover. *Can. J. Bot.* 62:38-42
- Kekskes M. and J. Vincent. 1969. The effect of some fungicides on *Rhizobium leguminosarum*. I. Laboratory Investigations. *Agrokem Talajt*; 18 N°1:57-70
- Kim S.U. and N. Rizzuto. 1975. Neuroaxonal degeneration induced by sodium diethylthiocarbamate in cultures of central nervous tissue. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 34:531-541
- Ko M.P., K.R. Barker and J.S. Huang. 1984. Nodulation of soybeans as affected by half root infection with *Heterodera glycine*. *J. Nematol.* 16:97-105
- Kondorosi E., J. Gyuris, J. Schmidt, M. John, E. Duda, B. Hoffman, J. Schell and A. Kondorosi. 1991. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 5:1331-1341
- Kosslak R.M, R. Bookland, J. Barkei, H.E. Paaren and E.R. Appelbaum. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7428-7432
- Lee C.C. and P.J. Peters. 1976. Neurotoxicity and behavioural effects of thiram in rats. *Environ. Health Perspect.* 17:35-42
- Leigh J.A. and D.L. Coplin. 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:307-346
- Lukens R.J. 1971. Chemistry of fungicidal action. *Molecular biology, biochemistry and biophysics* 10. A. Kleinzeller, G.F. Springer and H.G. Wittmann Eds. Springer-Verlag NY, 136 p.
- Maita K., A. Enomoto, N. Nakashima, T. Yoshida, K. Sugimoto, M. Kuwahara and T. Harada. 1997. Chronic toxicity studies with ziram in F344 rats and beagle dogs. *J. Pest. Sci.* 22(3):193-207

- Mallik M.A.B. and K. Tesfai. 1985. Pesticidad effect on soybean rhizobia symbiosis. *Plant Soil* 85:33-41
- Marenco R.A., N. Fernandes Lopes and P.K. Mosquim. 1993. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 5:121-126
- Marshall K.C. 1964. Survival of root nodule bacteria in dry soils exposed to high temperature. *Aust. J. Agric. Res.* 15:273-281
- Martens D.A. and J.M. Bremner. 1997. Inhibitory effects of fungicides on hydrolysis of urea and nitrification of urea nitrogen in soil. *Pest. Sci.* 49:344-352
- Martensson A.M. 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing Rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.* 24:435-445
- Maxwell C.A., U.A. Hartwig, C.M. Joseph and D.A. Phillips. 1989. A chalcone and two related flavonoids released from Alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 91:842-847
- Maxwell C.A. and D.A. Phillips. 1990. Concurrent synthesis and release of nod-gene-inducing flavonoids from Alfalfa roots. *Plant Physiol.* 93:1552-1558
- Michiels J., C. Verreth and J. Vanderleyden. 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1206-1212
- Miller J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. pp 352- 355. Cold Spring Harbor Laboratory. Press: Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mohammad R.M., M. Akhavan-Kharazian, W.F. Campbell and M.D. Rumbaugh. 1991. Identification of salt and drought tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil* 134:271-276
- Muñoz J.A., A.J. Palomares and P. Ratet. 1996. Plant genes induced in the Rhizobium-legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:189-202
- Nuti M., S. Casella and M. Pasti. 1984. Evaluation of Rhizobia genetically engineered for pesticide resistance. In *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Edited by H. Veeger and W.E. Newton. Noordwijkerhout, Holland. p. 720
- O'Hara G.W., T.J. Goss, M.J. Dilworth and A.R. Glenn. 1989. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1870-1876.
- Osa-Afiana L.O. and M. Alexander. 1979. Effect of moisture on the survival of Rhizobium in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43:925-930
- Oskarsson A. 1984. Dithiocarbamate induced redistribution and increased brain uptake of lead in rats. *Neurotoxicol.* 5:283-294
- Parker M.B. and C.C. Dowler. 1976. Effects of nitrogen with trifluralin and vernolate on soybeans. *Weed Sci.* 24:131-133
- Peters N.K, J.W. Frost and S.R. Long. 1986. A Plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233:977-980

- Peters N.K. and S.R. Long. 1988. Alfalfa roots exudates and compounds with promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* 88:396-400
- Phillips D.A.; C.M. Joseph and C.A. Maxwell. 1992. Trigonelline and Stachydrine released from alfalfa seeds activate the NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 99:1526-1531
- Phillips D.A. and S.M. Tsai. 1992. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. *Mycorrhiza* 1:55-58
- Phillips D.A., J. Wery, C.M. Joseph, A.D. Jones and L.R. Teuber. 1995. Release of flavonoids and betaines from seeds of seven *Medicago* species. *Crop Sci.* 35:805-808
- Rai R. 1983. The salt tolerance of *Rhizobium leguminosarum* strains and lentil *Lens esculenta* genotypes and the effect of salinity on aspects of symbiotic nitrogen fixation. *J. Agric. Sci.* 100:81-86
- Ramírez C. and M. Alexander. 1980. Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Appl. Environ. Microbiol.* 40:492-499
- Rasul A.R. and J.M. Howell. 1974. The toxicity of some dithiocarbamate compounds in young and adult domestic fowl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 30:63-78
- Recourt K., A.A.N. van Brussel, A.J.M. Driessen and B.J.J. Lugtenberg. 1989. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. *J. Bacteriol.* 171:4370-4377
- Redmond J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel and B.G. Rolfe. 1986. Flavones induces expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323:632-634
- Rennie R.J. and S. Dubetz. 1984. Effect of fungicides and herbicides on nodulation and N<sub>2</sub> fixation in soybean fields lacking indigenous *Rhizobium japonicum*. *Agronomy Journal* 76:451-454
- Revellin C., P. Leterme and G. Catroux. 1993. Effect of some fungicide seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Biol. Fertil. Soil* 16:211-214
- Rice-Evans C., N. Miller and G. Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-158
- Richardson A.E., R.J. Simpson, M.A. Djordjevic and B.G. Rolfe. 1988. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is affected by low pH, Ca and Al. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2541-2548.
- Rosas S.B. and M. Carranza. 1987. The action of pesticides on microorganisms. I *Tox. Assesm. Intern. Quarterly* 2:293-303
- Rosas S.B. and N.S. Correa. 1989. Effects of parathion on nodulation and levels of phytohormones in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Phyton - Int. J. Exp. Bot.* 50:141-146

- Rosas S.B., S. Palacios and N.S. Correa. 1996. Growth and nodulation of *Cyamopsis tetragonoloba* L (guar) under conditions of salinity. *Phyton - Int. J. Exp. Bot.* 58:107-114
- Roughley R.J. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant Soil* 32:675-701
- Roughley R.J. 1970. The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Ann. Bot.* 34:631-646
- Ruiz Sáinz J., R. Bellogin, R. Jiménez Díaz, A. Gutiérrez Navarro, and J. Pérez Silva. 1986. Cysteine and toxicity of the fungicide Captan and Captafol on *Rhizobium*. *Microbios* 46:71-86
- Ruiz Sáinz J., J. Beringer and A. Gutiérrez Navarro, A. 1984. Effect of the fungicide Captafol on the survival and symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bacteriol.* 57:361-367
- Sánchez F., J. Padilla, H. Pérez and M. Lara. 1991. Control of nodulin genes in root -nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:507-528
- Schlaman H.R.M., H.P. Spaink, R.J.H. Okker and B.J.J. Lugtenberg. 1989. Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 171:4648-4693
- Schmidt P.E., W.J. Broughton and P. Werner. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. *NGR234* induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7:384-390
- Seiler J.P. 1973. A survey on the mutagenicity of various pesticides. *Experimentia (Basel)* 29:622-623
- Shirasu Y., M. Moriya, K. Kato, A. Furuhashi and T. Kada. 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* 40:19-30
- Shukla Y., S.M. Bagar and N.K. Mehrotra. 1996. Carcinogenic and co-carcinogenic studies of thiram on mouse skin. *Food Chem. Toxicol.* 34:283-289
- Singh C.S., M. Lakshmi-Kumari, A. Biswas and N.S. Subba Rao. 1973. Effect of carbonate and bicarbonate of sodium on growth of rhizobia and nodulation in lucerne (*Medicago sativa* L). *Ind. J. Microbiol.* 13:125-128
- Soria R.S., N.S. Correa and S.B. Rosas. 1996. Effect of water stress on the Guar-*Bradyrhizobium* system using PEG 6000. *Phyton - Int. J. Exp. Bot.* 58:97-106
- Sprent J.I. and P. Sprent. 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, Cambridge.
- Truchet G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Caumont, F. de Billy, J. Promé and J. Denarié. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351:670-673
- Tu C.M. 1980. Effect of fungicides on growth of *Rhizobium japonicum* in vitro. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 25:364-368

- Tu J.C. 1978. Protection of soybean from severe *Phytophthora* root rot by *Rhizobium*. *Physiol. Plant Path.* 12:233-240
- Tu J.C. 1981. Effect of salinity on *Rhizobium* root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant. Sci.* 61:231-239
- van Brussel A.A.N., K. Recourt, E. Pees, H.P. Spaink, T. Tak, C.A. Wijffelman, J.W. Kijne and B.J.J. Lugtenberg. 1990. A biovar-specific signal of *R. leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J. Bacteriol.* 172:5394-5401.
- van Leeuwen C.J. 1986. Ecotoxicological aspects of dithiocarbamates. University of Utrecht, Thesis
- van Rhijn, P. and J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-Plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* p 124-142
- Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. In: IBP Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 3-4 and p 75-76
- Weisz P.R., R.F. Denison and T.R. Sinclair. 1985. Response to drought stress of nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybean. *Plant Physiol.* 78:525-530
- Welty L.E., L.S. Prestbye, J.A. Hall, D.E. Mathre and R.L. Ditterline. 1988. Effect of fungicide seed treatment and *Rhizobium* inoculation on chickpea production. *Appl. Agric. Res.* 3:17-20
- Wilson K.G. and R.E. Stinner 1984. A potential influence of *Rhizobium* activity on the availability of nitrogen to legume herbivores. *Oecologia* 61:337-345
- Woese C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Wolfson J.L. 1987. Impact on *Rhizobium* nodules of *Sitona hispidulus*, the clover root curculio. *Entomol. Exp. Appl.* 43:237-243
- Worrall V.S. and R.J. Roughley . 1976. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang. *J. Exp. Bot.* 27:1233-1241.
- Wright D.A., K. Killham, L.A. Glover and J.I. Prosser. 1993. The effect of location in soil on protozoal grazing of a genetically modified bacterial inoculum. *Geoderma* 56:633-640
- Yueh L.Y. and D.L. Hensley. 1983. Pesticide effect on acetylene reduction and nodulation by soybean and lima bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118:73-76
- Zaat S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Van Brussel, A.A.N., Okker, R.J. and Lugtenberg, B.J.J. 1987. Induction of the nodA promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones. *Journal of Bacteriology* 169:198-204
- Zaat S.A.J., Wijffelman, C.A., Mulders, I.H.M., Van Brussel, A.A.N. and Lugtemberg, B.J.J. 1988. Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. *Plant Physiol* 86:1298-1303



Zablotowicz R.M., D.L. Eskew and D.D. Focht. 1978. Denitrification in *Rhizobium*. Can. J. Microbiol. 24:757-76

Zhang F., D.H. Lynch and D.L. Smith. 1995. Impact of low root temperatures in soybean (*Glycine max.* L. Merr.) on nodulation and nitrogen fixation. Environ. Exp. Bot. 35:279-285

Zharan H.H. and J.I. Sprent. 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta 167:303-309