



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

# ***Impacto del glifosato sobre la simbiosis *Rhizobium- Lotus tenuis* en la región de la Pampa Deprimida del Salado***

Trabajo Final

Lic. en Química y Tecnología Ambiental

***Soledad N. Represa***

Directores:

María Julia Estrella

Mariano Pistorio

La Plata, 2014



*“Cuestionar es ir hasta el núcleo vacío  
donde el ser alcanza su límite y  
donde el límite define el ser”*

*Michel Foucault*



Con la intención de favorecer la difusión de los conocimientos recogidos en esta obra en la medida de lo posible y hacerlos accesibles con carácter general y sin restricciones ni impedimentos, esta se distribuye de forma libre bajo una licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

Para consultar los términos detallados de la licencia de distribución ve a la página Web

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## Agradecimientos:

A **Hugo C. Represa** y **Silvia B. Polenta**, mis padres. ¡Lo logramos! A las **Dras. María Julia Estrella** y **Analía Sanazzaro** y al grupo de investigación de **UB3 – INTECH** que pusieron a mi disposición tiempo y recursos para que pudiera culminar mi formación de grado. Al **Dr. Mariano Pistorio**, por apoyar y acompañar esta propuesta. Al **Dr. Ricardo Dewey** por su generosidad desinteresada. A los **Dres. Andrés Porta, Yanina Sánchez** y **Esteban Collman**, por contenerme en este último tramo. A mis compañerxs, amigxs y futuros colegas de la Lic. en Química y Tecnología Ambiental con quienes compartí cada parte de este trayecto. Al colectivo **Dibujando Realidades** por confiar en mí y darme aliento cuando más lo necesitaba. A **Lucía Schwartzman, Francisca Aparicio, Juan Aspromonte, Mariana Fernández, Daniela Pastor** y a todas esas almas bellas que me acompañaron en estos años dentro y fuera de la facultad. Esta etapa se cierra aquí, hoy y ahora, pero sé que en el futuro los volveré a encontrar. Gracias por estos años, por tantos recuerdos. Gracias por aprender al lado mío. Gracias por hacer más ligero mi camino.

# Índice

---

Impacto del glifosato sobre la simbiosis Rhizobium- Lotus tenuis en la región de la Pampa Deprimida del Salado.....	1
Índice .....	6
1. Introducción .....	9
1.1 La Región Pampeana .....	10
1.2 La Pampa Deprimida: una subregión dedicada a la ganadería.....	10
1.3 <i>Lotus tenuis</i> , una leguminosa forrajera utilizada para mejorar la calidad y productividad de las pasturas de la región de la Pampa Deprimida .....	13
1.4 Simbiosis mutualista entre rizobios y leguminosas.....	15
1.4.1 Fijación biológica de nitrógeno.....	16
1.5 Los rizobios de <i>Lotus tenuis</i> .....	17
1.6 Importancia de los rizobios para mejorar la producción de especies forrajeras como <i>L. tenuis</i> en la Pampa Deprimida.....	17
1.7 Evolución de los sistemas agrícolas para incrementar la productividad en la región .....	18
1.8 Glifosato, utilización e impacto en los sistemas productivos de la región.....	19
2. Hipótesis y objetivos .....	21
2.1 Hipótesis .....	22
2.2 Objetivo general.....	22
2.3 Objetivos Particulares .....	22
3. Materiales y métodos .....	23
3.1 Área de estudio.....	24
3.2 Muestreo .....	24
3.3 Obtención de una colección de rizobios simbiotes de <i>L. tenuis</i> en suelos con historia de glifosato .....	25
3.3.1 Desinfección de nódulos .....	25
3.3.2 Aislamiento de rizobios de nódulos de <i>L. tenuis</i> .....	25
3.3.3 Capacidad infectiva de los aislamientos .....	26
3.3.4 Conservación a largo plazo de los aislamientos .....	29

3.4 Análisis de la variabilidad genética de los aislamientos mediante la técnica de huella digital.....	29
3.4.1 Obtención de ADN por lisis celular .....	30
3.4.2 Técnicas de huella digital Rep y Box- PCR .....	30
3.4.3 Separación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa .....	33
3.5 Evaluación de la tolerancia de los aislamientos al herbicida glifosato, en medio de cultivo agarizado. ....	33
3.6 Evaluación de la viabilidad de rizobios al herbicida glifosato aplicado en suelo.....	34
3.7 Evaluación del efecto del glifosato en la simbiosis <i>Rhizobium – Lotus tenuis</i> .....	35
4. Resultados .....	37
4.1 Obtención de una colección de rizobios simbiotes de <i>L. tenuis</i> en suelos con historia de glifosato .....	38
4.2 Capacidad Infecciosa de los rizobios aislados de <i>L. tenuis</i> .....	38
4.3 Análisis de variabilidad genética de los aislamientos mediante la técnica de huella digital.....	40
4.4 Evaluación de la tolerancia de los aislamientos de rizobios al herbicida glifosato, en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> .....	41
4.5 Evaluación de la tolerancia de los aislamientos de rizobios, al herbicida glifosato aplicado en suelo. ....	43
4.6 Evaluación del efecto del glifosato en la simbiosis <i>Rhizobium – Lotus tenuis</i> .....	44
5. Discusión y conclusiones.....	51
6. Bibliografía .....	59
Anexo I.....	64
Anexo II.....	65



## **1. Introducción**

---

## 1.1 La Región Pampeana

La región Pampeana, con una extensión de unos 540.000 km<sup>2</sup>, reúne características climáticas y suelos que la convierten en una de las áreas de mayor productividad para la República Argentina. Posee un relieve relativamente plano, con una suave pendiente hacia el Océano Atlántico, con suelos aptos para la agricultura y la ganadería.

Esta región, a su vez, está subdividida en seis regiones tal como se puede observar en la Figura 1: Pampa Ondulada, Pampa Central, Pampa Semiárida, Pampa Austral, Pampa Mesopotámica y Pampa Deprimida.

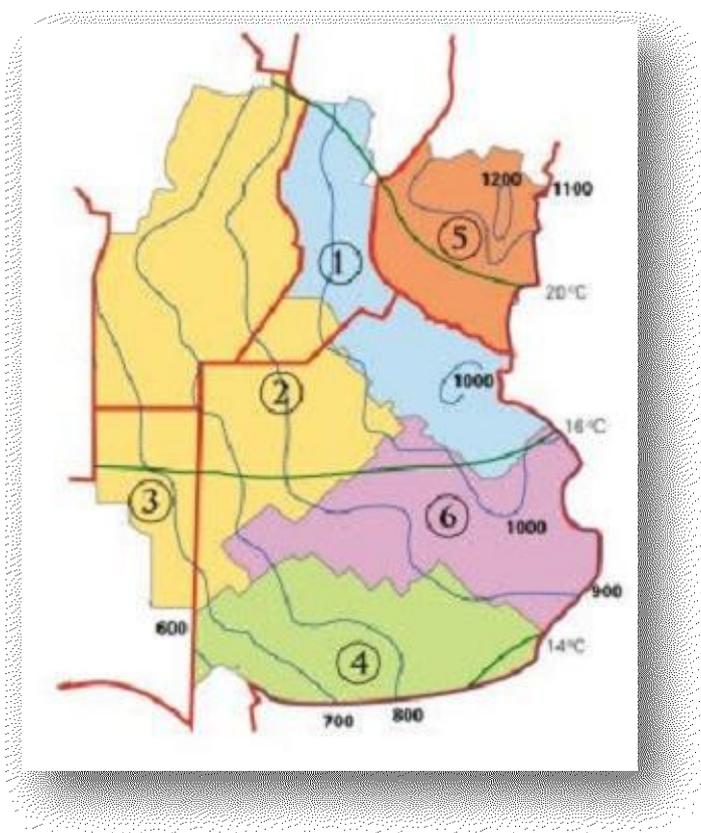


Figura 1. Áreas ecológicas de la pradera pampeana (1) Pampa Ondulada, (2) Pampa Subhúmeda Central, (3) Pampa Semiárida Central, (4) Pampa Austral, (5) Pampa Mesopotámica y (6) Pampa Deprimida. En azul: isohietas (en mm año<sup>-1</sup>). En verde: isoterma (en grados centígrados). Adaptado de Viglizzo & Pordomingo, 2002.

## 1.2 La Pampa Deprimida: una subregión dedicada a la ganadería

En el centro-este de la región Pampeana, se extiende una subregión denominada Pampa Deprimida, donde la actividad predominante es la cría y engorde de ganado bovino, destacándose por su carácter extensivo y de baja adopción de tecnologías (Vázquez *et al.*, 2008). Esta región, tiene una superficie aproximada de 9.000.000 hectáreas, e incluye las

áreas denominadas como la Depresión del Salado (Vervoorst, 1967) y la Región de Laprida (Etchevehere, 1961) (Figura 1).

La Pampa Deprimida se encuentra limitada por la Pampa Ondulada al norte, por el Sistema de Tandilia al sur, la Pampa Alta o Arenosa al oeste y la Planicie Costera del Océano Atlántico al este. Tiene como colector principal al Río Salado, el cual nace al sur de la Provincia de Santa Fe, extendiéndose de noroeste-sudeste a lo largo de unos 650 km (Figura 2). A lo largo de su cauce, se ubican innumerables depresiones las cuales pueden verse sujetas a inundaciones periódicas o esporádicas y a la precipitación de sales por evaporación (Gutiérrez Elorza *et al.*, 2005). Su origen se debe a cambios producidos por los vientos bajo condiciones áridas en los antiguos depósitos arenosos de origen fluvial durante el pasado geológico reciente (Iriondo, 1999). Estas cuencas de deflación pueden presentar entre cientos de metros de diámetros o ser muy pequeñas, sin superar los 0,5m de profundidad. Muchas de estas son ocupadas por lagunas permanentes (Fucks *et al.*, 2012).

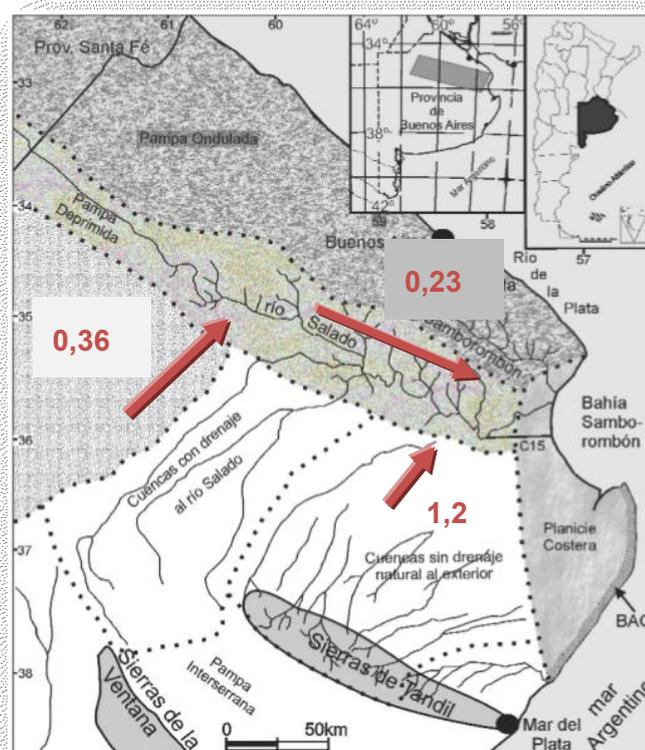


Figura 2. Pampa Deprimida. Se puede observar las bajas pendientes del paisaje, expresadas en metros por kilómetro. (Fucks *et al.* 2012; Quirós *et al.* 2006)

Esta región se caracteriza por su relieve casi plano y gran parte de la misma presenta graves problemas de drenaje de las aguas superficiales (Quirós *et al.*, 2006). Los cordones medanosos y cangrejales del sistema en Samborombón entorpecen el

escurrimiento del agua, lo que lleva a presentar áreas inundables (episaturación) o anegables (endosaturación) por períodos variables de tiempo, en caso de excesos hídricos (Etchevehere, 1961; Tricart, 1973).

Si bien el paisaje de la Pampa Deprimida es una planicie extensa, aún con su escasa pendiente se pueden distinguir ambientes diversos determinados por la posición topográfica y los tipos de suelo, que a su vez dan origen a distintas “comunidades vegetales” (León, 1975, 1979; Perelman *et al.* 2001). Los sitios más altos como “la loma”, que se desarrollan sobre suelos profundos, bien drenados (Hapludoles o Argiudoles), no se inundan y no tienen limitaciones por alcalinidad o salinidad en todo su perfil. Estos ambientes son aptos para la agricultura y pasturas de alto valor forrajero.

En las posiciones intermedias del paisaje como la “media loma”, donde los suelos son menos desarrollados (Natracuoles), el horizonte superficial tiene buen contenido de materia orgánica, no es alcalino ni salino y suele tener de 15 a 20cm de profundidad. Le sigue un horizonte sub-superficial con alto contenido de arcillas, prácticamente impermeable, alcalino y/o con un mayor contenido de sales. En estos ambientes suelen ocurrir anegamientos o saturación hídrica del suelo durante el invierno y principios de primavera. Si bien en estos sitios no hay salinidad ni alcalinidad en superficie, las sales del horizonte sub-superficial pueden ascender cuando el suelo queda con poca cobertura vegetal debido al sobrepastoreo o a labores mecánicas o aplicaciones de herbicidas. En este tipo de suelo la comunidad vegetal se compone de un pastizal diverso, con buena productividad y también coexisten pastos de buen valor forrajero.

En las posiciones más bajas del paisaje, podemos distinguir dos tipos de ambientes:

- Los que se desarrollan sobre suelos anegables pero no salinos ni alcalinos, denominados Argiacuoles o Argialboles, también conocidos como bajo dulce. Presentan una comunidad vegetal dominada por pastos de crecimiento estival adaptados para crecer en ambientes inundables.
- Los que se desarrollan sobre suelos anegables, salinos y/o alcalinos, denominados Natracuolf, o vulgarmente llamados bajo alcalino o barro blanco. Estos suelos presentan alta concentración de sales y/o reacción alcalina en todo su perfil, su horizonte superficial es muy delgado y con poca materia orgánica y son muy frágiles ante el pisoteo. La comunidad vegetal de estos ambientes es de baja productividad y escaso valor forrajero.

Los ambientes más aptos, como la loma o media loma, que tradicionalmente se utilizaban para la implantación de verdeos/pasturas (Carrillo y Schiersmann, 1994) fueron reemplazados por cultivos de verano, principalmente soja (Maresca, 2010). Por este motivo, la producción de forraje para el ganado bovino ha quedado limitada a los ambientes más restrictivos para el crecimiento vegetal como los bajos dulces y bajos bajos salino-alcalinos (Lavado & Alconada, 1994, Berasategui & Barberis, 1982, Salazar Lea Plaza & Moscatelli, 1989).



Figura 3. Aspecto característico de suelos de la Pampa Deprimida con exceso de sodio. Se convierten en duros, secos e impermeables, que afectan el crecimiento y desarrollo de muchas especies vegetales. Tomado de <http://intainforma.inta.gov.ar/>

### **1.3 *Lotus tenuis*, una leguminosa forrajera utilizada para mejorar la calidad y productividad de las pasturas de la región de la Pampa Deprimida**

En los suelos más restrictivos de la Pampa Deprimida, la escasa o nula presencia de leguminosas nativas con valor forrajero afecta severamente la calidad de las pasturas naturales y en consecuencia limita la productividad de la ganadería.

En este contexto, la introducción de leguminosas forrajeras exóticas, que puedan adaptarse a estos suelos, es una alternativa posible para incrementar el contenido proteico y la calidad de las pasturas destinadas a la cría y engorde del ganado bovino.



Figura 4. Imagen representativa de *L. tenuis*

*Lotus tenuis* (ex *Lotus glaber*; Kirkbride, 2006) (Figura 4), es una leguminosa perenne, proveniente del Mediterráneo, introducida en el país en la década del '30, y naturalizada en la región de la Pampa Deprimida (Burkart, 1952). Esta especie es conocida vulgarmente bajo el nombre de lotus, trébol pata de pájaro o lotus de hoja angosta. Su patrón de crecimiento es primavero-estivo-otoñal, creciendo con intensidad en primavera y hacia principios de verano, decayendo luego con la floración y recuperándose rápidamente en otoño después que produjo la semilla. Más del 90% de las semillas no germinan inmediatamente, constituyendo un reservorio o banco de semillas del suelo, a partir del cual se puede mantener o incrementar la densidad de plantas en la pastura (Miñón *et al.*, 1990).

Entre las cualidades de adaptación que presenta esta leguminosa se pueden citar su tolerancia al anegamiento y a la salinidad y su capacidad para crecer en un amplio rango de pH o en suelos deficientes en fósforo (Vignolio *et al.*, 1994; Vignolio *et al.*, 1999; Montes, 1988). En la Figura 5 se observa la distribución del *L. tenuis* según la topografía del suelo. Una desventaja que puede afectar su rendimiento y persistencia en el suelo es su lenta implantación y la competencia con las malezas (Miñón *et al.*, 1990).

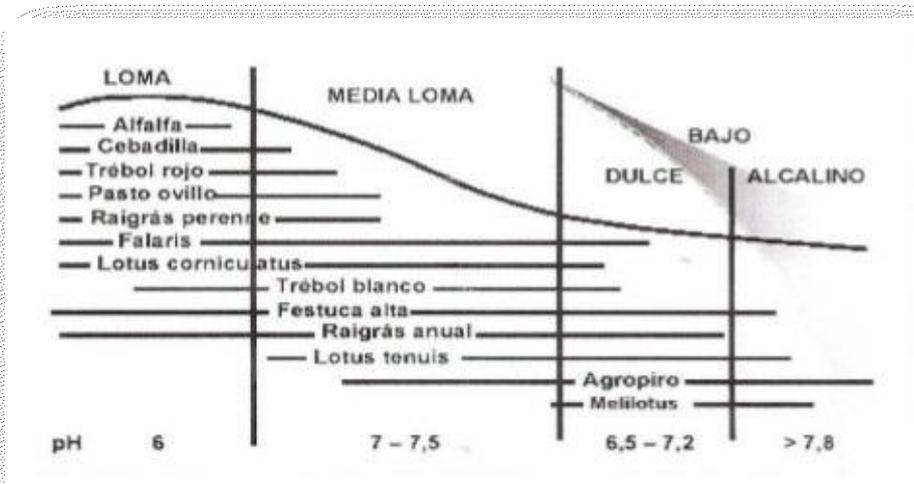


Figura 5. Ubicación del *L. tenuis* en la Cuenca del Río Salado según la topografía y tipo del suelo. Fuente INTA

Por otra parte, esta leguminosa posee un alto valor nutritivo para el ganado vacuno y puede utilizarse como cultivo puro, ya que no existen riesgos de meteorismo<sup>1</sup> (Miñon *et al.*, 1990), lo que se contrapone a lo observado con cultivos puros de otras especies leguminosas tales como alfalfa (D' Mello, 2000).

*L. tenuis*, como muchas otras leguminosas, tiene la ventaja de establecer una interacción simbiótica mutualista con bacterias denominadas rizobios.

#### 1.4 Simbiosis mutualista entre rizobios y leguminosas

El término simbiosis mutualista hace referencia a una interacción benéfica entre dos organismos. La interacción entre rizobios y leguminosas ocurre como consecuencia de un intercambio de señales específicas entre la planta y la bacteria, que da origen a un órgano nuevo, generalmente ubicado en la corona de la raíz, denominado nódulo. En los nódulos, los rizobios sufren cambios morfológicos y fisiológicos, para transformarse en bacteroides y bajo esta forma reducen el nitrógeno atmosférico a amonio, el cual es exportado a otros órganos de la planta como tal, o bien luego de ser transformado en alanina (Waters *et al.*, 1998).

Como ambos organismos se benefician, la planta provee a la bacteria de ácidos carboxílicos que son utilizados como fuente de carbono y energía (Kahan *et al.*, 1998). Estos compuestos son el producto del metabolismo de carbohidratos que provienen de la reducción del dióxido de carbono durante la fotosíntesis. A cambio, la bacteria provee a la planta de amonio u otros compuestos nitrogenados, producto de la fijación del nitrógeno atmosférico. Generalmente, existe una gran especificidad entre rizobios y leguminosas. Cada rizobio puede formar nódulos solamente con un número restringido de leguminosas y

en forma semejante, cada leguminosa forma nódulos con un número restringido de rizobios. (Figura 6)

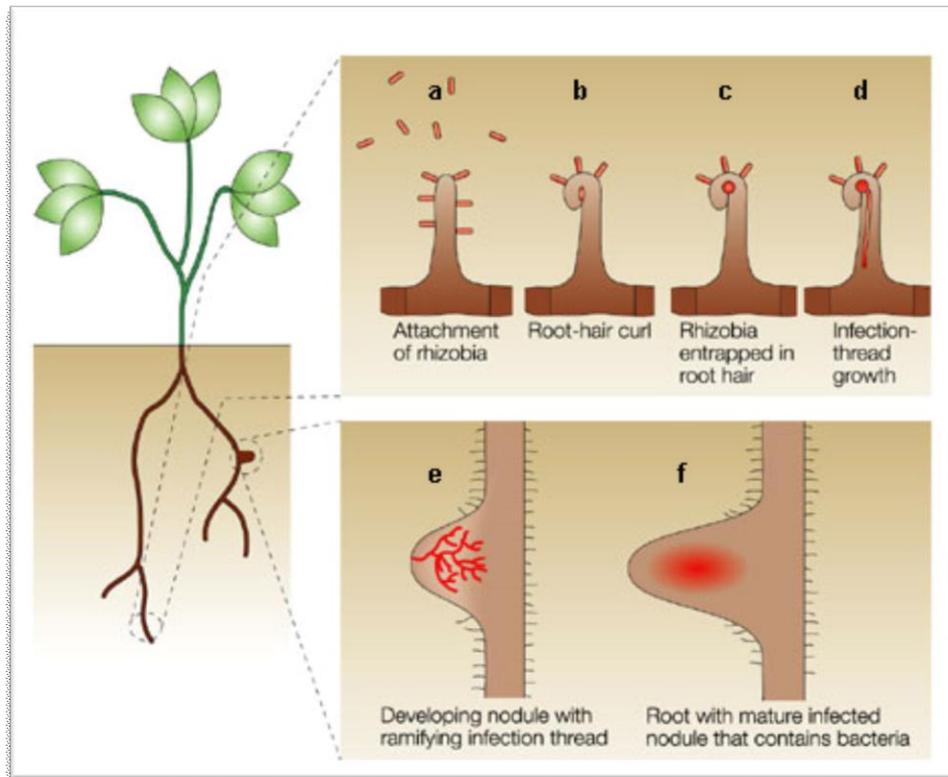
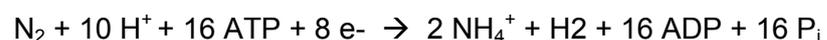


Figura 6. Etapas del desarrollo del nódulo

### 1.4.1 Fijación biológica de nitrógeno

Una vez dentro del nódulo, los bacteroides reducen el nitrógeno atmosférico a amonio mediante la expresión del Complejo Nitrogenasa formado por las proteínas dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa. Dado que el complejo es inactivado irreversiblemente por las concentraciones de oxígeno presentes en la atmósfera (Brewin, 1991), las células infectadas del nódulo mantienen una concentración de oxígeno menor al 1% respecto a su nivel atmosférico gracias a las leghemoglobinas, que son proteínas transportadoras de oxígeno.

La reacción química de reducción de nitrógeno atmosférico a amonio que cataliza la nitrogenasa puede describirse con la siguiente reacción:



El complejo nitrogenasa logra catalizar la reacción a temperatura ambiente y a presión atmosférica, utilizando una gran cantidad de ATP para romper el triple enlace del N<sub>2</sub>. Este sistema biológico de producción de amonio resulta altamente ventajoso si se compara con el proceso de Haber y Bosch, que se utiliza para la producción industrial de amonio mediante un proceso químico muy costoso que utiliza alta presión (150-300 atmósferas) y altas temperaturas (400-500°C).

## **1.5 Los rizobios de *Lotus tenuis***

Hasta hace unos años se pensaba que los rizobios que interaccionaban con *L. tenuis* pertenecían a un grupo filogenético restringido, al género *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997). Sin embargo años más tarde, estudios realizados con aislamientos de nódulos de *L. tenuis* en la región de la Pampa Deprimida, demostraron que los simbioses de esta leguminosa son genéticamente muy diversos (Fulchieri *et al.*, 2001). Posteriormente, un trabajo más exhaustivo realizado con nuevos aislamientos de *L. tenuis* en diferentes suelos de esta región confirmaron la gran diversidad de especies y géneros que conforman al grupo de simbioses que establecen simbiosis mutualista con esta leguminosa (Estrella *et al.*, 2009). Por otra parte, ensayos de nodulación con estos aislamientos nativos de los suelos de la Pampa Deprimida revelaron que algunos de ellos son altamente eficientes en su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis bajo condiciones control y de estrés abiótico como salinidad y son incluso más eficientes que las cepas que actualmente se utilizan para formular inoculantes comerciales para *L. tenuis* (Sannazzaro *et al.*, 2010).

## **1.6 Importancia de los rizobios para mejorar la producción de especies forrajeras como *L. tenuis* en la Pampa Deprimida**

Los suelos bajos salino alcalinos de la Pampa Deprimida, son deficientes en nutrientes como el nitrógeno, que son esenciales para el crecimiento de las plantas. En estos ambientes, este nutriente puede incorporarse con fertilizantes químicos o a través de microorganismos del suelo que tienen capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Tal proceso puede ser llevado a cabo por bacterias de vida libre (Sprent & Sprent, 1990), o bien por bacterias que establecen simbiosis mutualistas con plantas, siendo estas interacciones las que contribuyen en mayor medida al proceso global de fijación de nitrógeno (Gresshoff *et al.*, 1990). En particular, las asociaciones mutualistas entre plantas leguminosas y rizobios desempeñan un rol significativo en el desarrollo de la agricultura.

En general, la incorporación de nitrógeno a través de la simbiosis mutualista con rizobios resulta más eficiente que si se utilizan fertilizantes químicos. Esto se debe a que se establece una interacción específica entre la planta de interés y los rizobios, lográndose una incorporación selectiva de nitrógeno al cultivo de interés. Por el contrario, la aplicación de fertilizantes químicos favorece el crecimiento no sólo de las plantas de interés sino también de malezas que comparten el mismo hábitat y compiten con las mismas, afectando

negativamente su productividad.

En el caso de leguminosas como *L. tenuis*, que presentan un escaso vigor en etapas iniciales de su desarrollo, el uso de fertilizantes químicos las perjudica porque son muy sensibles al desplazamiento por malezas capaces de crecer más rápido. Otra desventaja adicional de los fertilizantes químicos es su alto costo y los riesgos de eutrofización de los cursos de agua (Vitousek *et al.*, 1997).

Es por ello que la interacción de *L. tenuis* con microorganismos como los rizobios, que promueven una respuesta favorable en el crecimiento de esta leguminosa, resulta de gran importancia cuando se trata de buscar herramientas sustentables y eficientes para mejorar la producción forrajera en la región.

## **1.7 Evolución de los sistemas agrícolas para incrementar la productividad en la región**

Durante los últimos cuarenta años, la región Pampeana ha estado expuesta a una creciente intervención humana, marcada por un aumento considerable en la proporción de la superficie cultivada, destinada a cultivos anuales.

Los sistemas agrícolas y ganaderos de la región han co-evolucionado en el tiempo. En general, la agricultura extensiva de principios del siglo XX estuvo acompañada por una ganadería extensiva, de baja productividad y bajo impacto ambiental. A mediados de aquel siglo, proliferó una agricultura más tecnificada, en estrecha rotación con una ganadería semi-intensiva. Esto dio lugar al tradicional planteo mixto agrícola-ganadero integrado, que se impuso en gran parte de la pradera pampeana.

La situación cambió a fines del siglo XX y principios del XXI: aquel sistema fue sustituido, en parte, por uno en el cual la agricultura y la ganadería se desacoplaron y se especializaron individualmente, dentro un planteo aún más intensivo (Viglizzo *et al.*, 2001). La agricultura se adecuó a un paquete tecnológico de alta productividad, integrado por cultivos como soja, siembra directa, mayor uso de fertilizantes y plaguicidas y, en menor medida, agricultura de precisión (Satorre, 2005; Martínez-Ghersa y Ghersa, 2005). La ganadería también se intensificó (particularmente, en la Pampa Ondulada) y siguió patrones y esquemas de producción más cercanos a los industriales como los *feed lots*, que a los agropecuarios tradicionales.

En algunas áreas dedicadas tradicionalmente a la ganadería como en la Pampa Deprimida, desde hace algunos años, se llevan a cabo prácticas que permiten incrementar la producción del ganado bovino en los suelos más restrictivos para el crecimiento vegetal como los bajos salino-alcálinos, combinando el sistema tradicional extensivo con la promoción de especies de alto valor forrajero como *L. tenuis*, presente en los pastizales de la región (Bailleres & Sarena, 2009). La promoción de *L. tenuis* está basada en eliminar a fin del invierno especies de baja calidad forrajera que compiten con la leguminosa, y de este modo favorecer su nacimiento que en esa estación se da naturalmente (Miñon *et al.*, 1990). La eliminación de las especies no deseadas se logra mediante la aplicación de herbicidas,

siendo el más utilizado el glifosato (N-fosfonometilglicina).



**Figura 7.** Potrero de la Chacra Experimental Integrada Chascomús perteneciente al MAA-INTA, en el cual se observa la diferencia en la composición de pasturas en suelos no promocionados, en comparación con suelos donde se realizó la promoción de *L. tenuis* durante 7 años (Foto tomada de Bailleres y Sarena, 2009)

## 1.8 Glifosato, utilización e impacto en los sistemas productivos de la región

El glifosato (N-fosfonometilglicina) es uno de los herbicidas más frecuentemente utilizados en el mundo debido a su efectividad en un amplio espectro de prácticas agronómicas entre las cuales se encuentran el rejuvenecimiento de pasturas y la siembra directa (Bailleres & Sarena, 2009). Este herbicida se suele usar principalmente en forma de sal de isopropilamina, siendo uno de los preparados más vendidos el Roundup-N®.

El glifosato inhibe específicamente la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP, E.C. 2.5.1.19) (Steinruncken & Amrhein, 1984), que cataliza la condensación de shikimato-3-fosfato y fosfoenolpiruvato para formar 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato y fosfato inorgánico (Herrmann *et al.*, 1999). La inhibición de esta enzima en plantas y en microorganismos sensibles resulta en la acumulación de ácido shikímico y/o ciertos ácidos hidroxibenzoicos (Zablotowicz & Reddy, 2004), impidiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano) (Fisher *et al.*, 1986; Jaworski, 1972).

Algunos autores consideran a este herbicida relativamente inofensivo para el medioambiente debido a su rápida inactivación por adsorción a partículas del suelo (Quinn

*et al.*, 1988). Sin embargo, la persistencia en el mismo puede variar en función de sus características fisicoquímicas. La capacidad de adsorción del glifosato en el suelo se incrementa con el contenido de arcilla, la capacidad de intercambio catiónico, los bajos niveles de pH y con el contenido de fósforo (Glass, 1987; Hance, 1976; Nomura & Hilton, 1977; Rueppel *et al.*, 1977; Sprankle *et al.*, 1975). El glifosato libre (no unido al suelo) en algunos casos puede ser degradado rápidamente por los microorganismos del suelo. Por el contrario, el glifosato adsorbido al suelo puede ser degradado a una tasa más lenta. Por este motivo la vida media del glifosato en el suelo es muy variable y depende de las características fisicoquímicas del suelo, sobrepasando en algunos casos los 40 días (Richardson & Gangolli, 1994) o incluso alcanzar años (Anton, 1993; Newton, 1984).

La aplicación de glifosato en el suelo puede tener consecuencias no deseadas sobre los microorganismos que lo habitan y su acción muchas veces depende de las formulaciones comerciales (Tsui y Chu, 2003), de la dosis utilizada (Royuela, 1998) y del tipo de suelo (Silva *et al.*, 2003). Numerosos trabajos han demostrado que el glifosato es capaz de afectar a corto plazo la actividad microbiana y la densidad de bacterias en el suelo (Zabaloy *et al.*, 2008), y en algunos estudios se ha observado una inhibición del crecimiento de ciertas especies bacterianas que habitan el suelo (Fisher *et al.*, 1986). Este herbicida también puede afectar el crecimiento de cepas fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium* que establecen simbiosis con soja (*Glycine max*) (Moorman *et al.*, 1992, dos Santos *et al.*, 2005).

Por todo lo expuesto, y a pesar de los enormes beneficios aparentes que puede tener la aplicación de glifosato sobre la calidad de las pasturas en la Pampa Deprimida del Salado, lo cierto es que la exposición de los suelos de esta región a dicho herbicida y el impacto sobre los microorganismos del suelo como los rizobios, que contribuyen a mejorar el desarrollo y la productividad de *L. tenuis*, es un tema que aún no ha sido abordado y que merece ser estudiado en profundidad antes de promover la implementación de esta práctica agronómica en la zona.

## **2. Hipótesis y objetivos**

---

Basándonos en lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta el potencial productivo de las prácticas agronómicas como la promoción de *L. tenuis* en suelos restrictivos de la Pampa Deprimida de la Provincia de Buenos Aires, se plantea la siguiente hipótesis y los objetivos del presente trabajo.

## 2.1 Hipótesis

- La aplicación de glifosato para promover la especie *L. tenuis* contribuirá a mejorar la producción y la calidad de forraje estival en la Pampa Deprimida.
- La presencia de glifosato en los suelos de la Pampa Deprimida puede afectar la viabilidad y la capacidad fijadora de nitrógeno de los rizobios que establecen simbiosis mutualista con *L. tenuis*.

## 2.2 Objetivo general

Evaluar el impacto del uso del glifosato sobre la microflora de suelos marginales de la Pampa Deprimida destinados a la promoción de la especie *Lotus tenuis*

## 2.3 Objetivos Particulares

- Obtener una colección de rizobios de nódulos de *L. tenuis* aislados de suelos con historia de glifosato.
- Evaluar la tolerancia de los aislamientos de rizobios coleccionados, al herbicida glifosato, en condiciones de cultivo *in vitro*
- Estudiar el efecto del glifosato sobre la supervivencia de rizobios simbiosis de *L. tenuis* en suelos de la Pampa Deprimida destinados a la promoción de esta leguminosa.
- Evaluar el efecto del glifosato sobre la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de rizobios simbiosis de *L. tenuis* aislados en suelos la Pampa Deprimida.

### **3. Materiales y métodos**

---

### 3.1 Área de estudio

Para la selección del área de estudio se tuvo en cuenta una parcela, ubicada en la Chacra Experimental Integrada Chascomús, perteneciente al M.A.A.-INTA (Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), utilizada para la promoción de *L. tenuis*, en la cual se aplicó anualmente 64 mM ea de glifosato a 100l/ha, en el mes de junio, durante 7 años consecutivos (Figura 8).



Figura 8. A. Chacra Experimental Integrada Chascomús B. Ubicación de la Chacra

### 3.2 Muestreo

El muestreo de las plantas de *L. tenuis* se realizó en la parcela antes mencionada, que se caracteriza por presentar suelos de tipo Natracuafes, de baja productividad, dado que es restrictivo para el crecimiento vegetal. Se recolectó un total de 20 plantas en áreas representativas de la parcela. Con el fin de obtener una muestra representativa de la biota, la estrategia de muestreo consistió en recorrer la mayor área posible, a través de un trayecto en forma de zig-zag recogiendo una muestra puntual cada 5 pasos. La toma de muestra se realizó con pala de jardín, buscando extraer las plantas sin afectar las raíces, las cuales se almacenaron en bolsas de polietileno para su transporte hasta el laboratorio.

Las plantas recolectadas en el campo se dispusieron en cajas de Petri de vidrio y se lavaron cuidadosamente con agua para quitarle la tierra. En todas las plantas se observaron nódulos.

Los nódulos de cada planta se extrajeron mediante la ayuda de pinzas y bisturí previamente esterilizados por incineración y se dispusieron en tubos tipo eppendorf.



Figura 9. Recolección de nódulos de *L. tenuis* en la parcela de promoción. A, B. Plantas de *L. tenuis*. C, D. Nódulos de *L. tenuis* recolectados en tubo tipo eppendorf.

### 3.3 Obtención de una colección de rizobios simbiotes de *L. tenuis* en suelos con historia de glifosato

#### 3.3.1 Desinfección de nódulos

La desinfección superficial de los nódulos se realizó mediante un lavado con 10 ml de una solución de etanol 70% durante 20 seg. Luego de lavar los nódulos con agua bidestilada estéril se agregó 10ml de una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 5min. Por último, se realizaron 6 enjuagues con agua bidestilada estéril. La desinfección se realizó bajo condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

#### 3.3.2 Aislamiento de rizobios de nódulos de *L. tenuis*

Los nódulos desinfectados superficialmente se aplastaron y luego se estriaron sobre placas de Petri con medio YEM agarizado (Tabla 1), para aislar colonias de rizobios, utilizando el extremo de una varilla de vidrio estéril. El procedimiento se realizó dentro de una cabina de flujo laminar para evitar contaminación. Las placas se incubaron en estufa de cultivo a 28°C durante 48-72hs.

Tabla 1. Medio de cultivo YEM <sup>1</sup>

Componentes	Composición (gr/l)
Manitol	5
Extracto de levadura	1
NaCl	0,1
MgSO <sub>4</sub>	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,46
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12
Agar (para medio sólido)	15

### 3.3.3 Capacidad infectiva de los aislamientos

La capacidad infectiva de los aislamientos en *L. tenuis*, se evaluó mediante ensayos de nodulación en placas de plástico cuadradas con solución nutritiva agarizada sin nitrógeno (Tabla 3), utilizando semillas que previamente se desinfectaron superficialmente.

#### 3.3.3.1 Germinación de semillas

Las semillas de *L. tenuis* cv Esmeralda (Gentos SA) se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% p/p) en un erlenmeyer de vidrio estéril durante 2min. Luego del tratamiento, se descartó el ácido y las semillas se lavaron sucesivas veces con agua bidestilada estéril. Posteriormente se agregó una solución acuosa al 3% de hipoclorito de sodio durante 5min y se enjuagó sucesivas veces con agua bidestilada estéril. Las semillas desinfectadas se distribuyeron sobre placas de Petri con agar-agua (Tabla 2) mediante el uso de pinzas estériles. Las placas se incubaron entre 4 y 5 días en una cámara de cultivo de plantas a 25°C, hasta que alcanzaron 1cm de raíz aproximadamente (Figura 10).

Tabla 2. Medio Agar-Agua

Componente	Composición (gr/l)
------------	--------------------

<sup>1</sup> Vincent, 1970

Agar	15
------	----

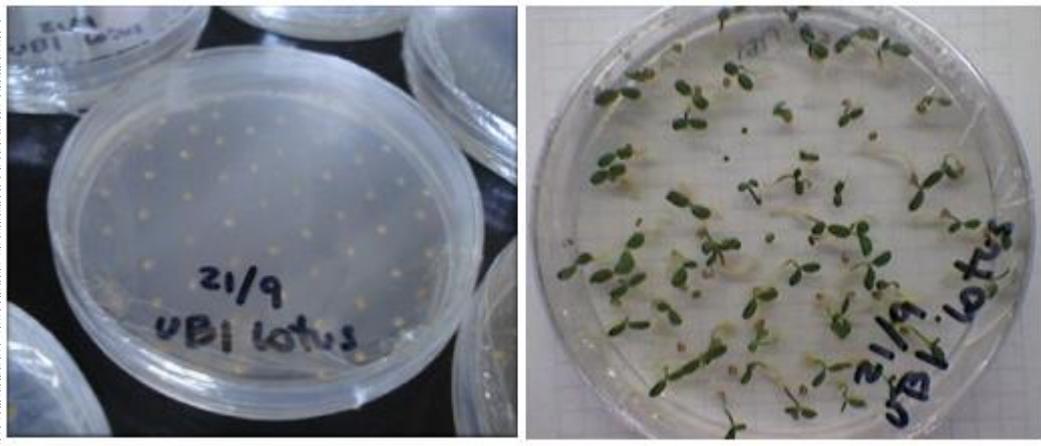


Figura 10. Germinación de semillas de *L. tenuis* cv Esmeralda

### 3.3.3.2 Inoculación de las plántulas germinadas

Los ensayos de nodulación se realizaron en placas de plástico cuadradas con solución nutritiva Evans sin nitrógeno con 1,5% de agar (Tabla 3; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Se colocaron 9 plantas por placa, y se inocularon con 10 $\mu$ l de cultivo de rizobios en fase exponencial, con  $DO_{600nm} = 0,8$  en medio TY (Tabla 4). En los ensayos se incluyeron controles positivos (plantas inoculadas con rizobios infectivos para *L. tenuis*) y negativos (plantas sin inocular).

Tabla 3. Medio de cultivo Evans sin nitrógeno<sup>2</sup>

Componentes	Composición (gr/l)
Soluciones Stock	

<sup>2</sup> Los componentes de la solución fueron descritos en Evans et al. (1972) con algunas modificaciones. Para su mejor conservación y manejo se recomienda la elaboración de 5 soluciones stock, de las cuales, al momento de elaborar el medio, se deberán tomar 1ml por litro de medio a preparar.

Evans 1	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	27,88
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	49,28
Evans 2	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,5
Evans 3	
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	10,33
CaCl <sub>2</sub>	7,35
Evans 4	
Fe-Na-EDTA	0,667
Evans 5	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,143
MnSO <sub>4</sub>	0,069
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,023
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0079
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0055
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,012
De las soluciones stock se toman 1ml por litro de medio a preparar	
Agar (para medio sólido)	15

Tabla 4. Medio de cultivo TY

Componentes	Composición (gr/l)
Triptona	5
Extracto de levadura	3
Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	0,5
Agar (para medio sólido)	15

Las placas se sellaron con film de polipropileno para evitar la deshidratación del medio agarizado y se colocaron en sobres de papel oscuro para cubrir las raíces de la luz, quedando expuesta solo la parte aérea de las plantas. Las placas se colocaron verticalmente y se incubaron durante 40 días en cuarto climatizado, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a 25-21°C (día-noche) y 55/75 ± 5% de humedad relativa. La observación y registro del número de nódulos en raíces se realizó periódicamente luego de la inoculación (Figura 11).



Figura 11. Ensayo de capacidad infectiva de los aislamientos.

### 3.3.4 Conservación a largo plazo de los aislamientos

Los aislamientos de rizobios que formaron nódulos en *L. tenuis* se cultivaron en medio YEM líquido durante 48hs a 28°C en agitación a 180 rpm. Alícuotas de 700µl de cada cultivo se mezclaron con 300 µl de glicerol estéril en tubos de tipo eppendorf de 1,5ml y se conservaron en freezer a -80°C.

### 3.4 Análisis de la variabilidad genética de los aislamientos mediante la técnica de huella digital

La variabilidad genética de los aislamientos de rizobios se determinó por las técnicas de huella digital denominadas rep-PCR y BOX-PCR que permiten amplificar fragmentos de ADN bacteriano de tamaños variables (300- 3000pb) mediante cebadores que se unen a secuencias conservadas distribuidas al azar en el cromosoma. Los fragmentos se separan

por electroforesis en geles de agarosa, y se visualizan patrones de bandas denominados huellas digitales que permiten identificar a los aislamientos bacterianos a nivel de cepa.

### 3.4.1 Obtención de ADN por lisis celular

Las colonias de rizobios se cultivaron en placas de Petri en medio AB sacarosa (Tabla 5) durante 24-48hs a 28°C. Luego se colectaron colonias individuales con la ayuda de un palillo de madera estéril y se resuspendieron en 100µl de agua miliQ estéril. Las células resuspendidas se centrifugaron durante 5min a 12.000rpm. Los sobrenadantes se descartaron y las células se resuspendieron en 100µl de agua miliQ estéril. Las suspensiones celulares se calentaron durante 15min a 100°C en baño seco para permitir la lisis celular. Los lisados se centrifugaron durante 5min a 12.000rpm y los sobrenadantes conteniendo el ADN se utilizaron como templado para reacciones de PCR. Para su conservación los sobrenadantes se almacenaron a -20°C.

Tabla 5. Medio de cultivo AB<sup>3</sup>

Componentes	Composición (gr/l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9908
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
KCl	0,15
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0116
Agar (para medio sólido)	15

Sacarosa 20% p/v	25 ml
FeCl <sub>3</sub> 10% p/v	100 µl

---

<sup>3</sup> La sacarosa y el FeCl<sub>3</sub> se esterilizaron por filtración con filtros de 0,22µm y se agregaron al momento de la utilización del medio de cultivo.

### 3.4.2 Técnicas de huella digital Rep y Box- PCR

3.4.2.1 Rep- PCR. Amplificación de fragmentos del cromosoma bacteriano con cebadores que se unen a secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas (rep)

En la reacción de rep-PCR se utilizaron los siguientes cebadores los cuales fueron incorporados a la mezcla de reacción (Tabla 6):

Rep 1R1: 5'-IIICGICGICATCIGGC-3'

Rep 2I: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

Siendo I el símbolo correspondiente a inosina, una base purínica que tiene la capacidad de unirse a A, C, T o G (Versalovic *et al.*, 1991).

Tabla 6. Mix rep- PCR

Componentes	Volumene en la mezcla de reacción (µl)
H <sub>2</sub> O	6,9
Buffer 10x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	7
dNTPs 25 mM	1,2
Rep1 R1 25 µM	2
Rep2I 25 µM	2
Taq polimerasa 5 U/µl	0,4
ADN	3

El programa de amplificación (Tabla 7) comprende una desnaturalización inicial de 6min a 96°C seguido por 30 ciclos de desnaturalización de un minuto a 94°C, anillado a 40°C por un minuto y extensión a 65°C por 8 min. Luego un ciclo final de extensión a 65°C por 16 min.

Tabla 7. Programa REP

1 ciclo	6 min	96 °C
30 ciclos	1 min 1 min 8 min	94 °C 40 °C 65 °C

1 ciclo	16 min	65 °C
---------	--------	-------

### 3.4.2.2 Box- PCR. Amplificación de fragmentos del cromosoma bacteriano con un cebador que se une a secuencias box

En la reacción de Box-PCR se utilizó un único cebador el cual se detalla a continuación:

BOX – A1R: 5'- CTACggCAAggCgACgCTgACg-3' (Versalovic *et al.*, 1994)

La mix utilizada se describe en la Tabla 8:

Tabla 8. Mix BOX-PCR

Componentes	Volúmenes en la mezcla de reacción (µl)
H <sub>2</sub> O	9,8
Buffer 10x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	7
dNTPs 25mM	1,2
BOX A1R 25 µM	0,5
Taq polimerasa 5 U/µl	0,4
ADN	4

El programa de amplificación (Tabla 9) comprende una desnaturalización inicial de 7 minutos a 95°C seguido por 35 ciclos de desnaturalización de un minuto a 94°C, anillado a 53°C por un minuto y extensión a 65°C por 8 minutos. Luego un ciclo final de extensión a 65°C por 16 minutos.

Tabla 9. Programa BOX- PCR

1 ciclo	7 min	95 °C
35 ciclos	1 min 1 min 8 min	94 °C 53 °C 65 °C
1 ciclo	16 min	65 °C

En ambas reacciones de PCR se incluyeron 2 controles: un control con la mezcla de los reactivos sin ADN molde (control negativo) y uno con la mezcla de reactivos más ADN bacteriano purificado (control positivo).

### 3.4.3 Separación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% durante 2hs a 75V (constante) en tampón TBE (Tris-Borato- EDTA, pH 8,3; Tabla 10) al 0,5%. Para estimar el tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII/EcoRI, con un rango de fragmentos de 564 a 21.226 pb (pares de bases). Los fragmentos separados se visualizaron por tinción con 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, con ayuda de un transiluminador de UV y se fotografiaron con una cámara digital NIKON.

Tabla 10. Medio TBE 0,5 x

Componentes	Composición (gr/l)
TRIS	5,35
EDTA	0,37
Ácido bórico	2,75

### 3.5 Evaluación de la tolerancia de los aislamientos al herbicida glifosato, en medio de cultivo agarizado.

La tolerancia de los aislamientos de rizobios a distintas dosis de glifosato se llevó a cabo utilizando el método de dilución en placa que se utiliza habitualmente para evaluar tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, tal como lo describe Sannazzaro *et al.* (2011). Se realizaron diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de los distintos aislamientos de rizobios. Posteriormente, se sembraron 10 $\mu$ l de cada dilución en placas con medio AB sacarosa suplementadas con glifosato comercial Round Up Full II<sup>4</sup> o Glacoxan Total<sup>5</sup> (0,0066; 0,015; 0,152; 1,52; 3,276mM), tal como se observa en la Figura 12. Finalmente, las placas sembradas con cada dilución se incubaron durante 4 días a 28°C en

---

<sup>4</sup> **Round Up Full II.** Formulado de sal potásica de N-fosfonometil glicina 66,2 % p/v. Adyuvante POEA (mezcla de alquilaminaspolietoxiladas de cadena larga)

<sup>5</sup> **Glacoxan Total.** Formulado de sal isopropilamina N-fosfonometil glicina 48% p/v.

estufa de cultivo.

La tolerancia de los aislamientos se evaluó comparando la menor dilución del cultivo que permitió visualizar colonias aisladas en el medio AB sacarosa (Tabla 5) sin glifosato (control), con la obtenida en los medios suplementados con distintas concentraciones de glifosato comercial. Se consideró que una cepa es tolerante a una determinada concentración de glifosato comercial cuando crece de manera similar al control.

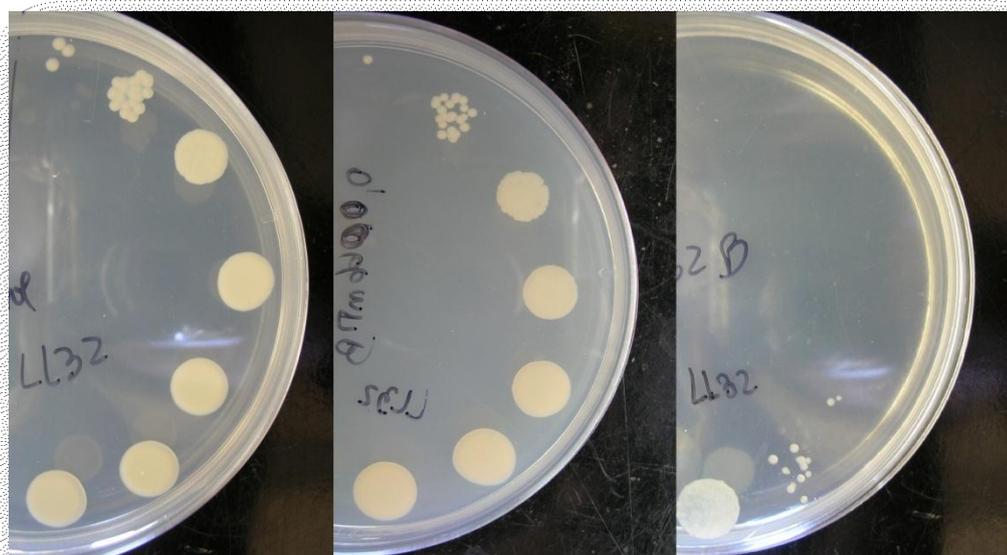


Figura 12. Imagen representativa del ensayo de tolerancia a glifosato comercial

### 3.6 Evaluación de la viabilidad de rizobios al herbicida glifosato aplicado en suelo.

Para evaluar la viabilidad de los aislamientos al glifosato aplicado en suelo, se rellenaron placas de Petri de 0,55mm con 10gr de tierra proveniente de suelos tipo Natracualf, las cuales fueron tratadas con distintas dosis de glifosato comercial Round Up Full II (0; 1,5; 3,2mM) mediante el uso de un aspersor. Posteriormente, cada placa se inoculó con un cultivo en fase exponencial con  $DO_{600nm} = 0,8$  de la cepa *M. loti* BD68 (cepa de rizobio que se aisló de nódulos de *L. tenuis*, en suelos de la Pampa Deprimida sin historia de glifosato (Estrella *et al.*, 2009)) marcada con GFP en el cromosoma, utilizando el sistema de marcado mediado por un mini Tn7 según la metodología descrita por Lambersten *et al.* (2004). Las placas se incubaron en una caja hermética en cuarto climatizado, a 25-21°C (día-noche) con gránulos sílica gel para disminuir la humedad relativa.

A distintos tiempos post inoculación (0, 2, 8, 15 y 30 días) se cuantificó la cantidad de bacterias viables en suelo mediante el recuento de colonias fluorescentes por visualización de las placas con luz UV. Para ello, se tomaron muestras de 1gr de cada placa, se resuspendieron en 10ml de agua bidestilada estéril, se realizaron diluciones seriadas al décimo con agua bidestilada estéril y posteriormente se plaqueó una alícuota de 100µl de cada dilución en medio TY agarizado (Tabla 4). Se utilizaron tres réplicas por cada concentración de glifosato. Las placas se incubaron a 28°C durante 48-96hs y al cabo de ese tiempo se realizó el recuento de colonias (Figura 13).



Figura 13. Imagen representativa del ensayo de tolerancia a glifosato comercial en suelo y viabilidad en el tiempo. En la imagen se observa el recuento en placa a distintas diluciones de la cepa *M. loti* BD68 marcada con GFP en el cromosoma.

### 3.7 Evaluación del efecto del glifosato en la simbiosis *Rhizobium* – *Lotus tenuis*

La evaluación del efecto del herbicida sobre la simbiosis *Rhizobium*- *L. tenuis* se realizó en condiciones semi-controladas, utilizando macetas con 100ml de tierra obtenida de suelos Natracualf de la Pampa Deprimida. Se aplicaron 0,8 ml de distintas concentraciones de glifosato comercial (0, 1,5, 3,2, 6,4, 64 mM) sobre la superficie de las macetas con tierra (*Round Up Full II* o *Glacoxan Total*) utilizando un aspersor. Posteriormente, en cada maceta se trasplantaron 3 plántulas de *L. tenuis* germinadas bajo condiciones controladas siguiendo el procedimiento antes descrito (ver 3.3.1 Desinfección de nódulos). Las plántulas se inocularon con 1ml de un cultivo en fase exponencial con  $DO_{600nm} = 0,8$  de la cepa X24 o BD68.

Se realizaron 6 réplicas por cada concentración y tipo de glifosato comercial. Las macetas se regaron periódicamente con agua de lluvia. El ensayo se realizó bajo condiciones semi controladas en invernáculo, por un período de 8 semanas. Se realizaron

controles sin inocular para cada concentración y tipo de glifosato comercial y también controles con plantas cultivadas sin glifosato e inoculadas (con X24 o BD68).

Al finalizar el ensayo, las plantas se desmontaron de las macetas y se analizó la presencia de nódulos y el peso seco de la parte aérea según el método descrito por *Sannazzaro et al.* (2011).



Figura 14. Imagen representativa del ensayo de nodulación de *L. tenuis*

## 4. Resultados

---

## **4.1 Obtención de una colección de rizobios simbiotes de *L. tenuis* en suelos con historia de glifosato**

Tal como se mencionó en la introducción, estudios previos realizados con aislamientos nativos de los suelos de la Pampa Deprimida determinaron que entre los rizobios que establecen simbiosis con *L. tenuis*, existe una alta diversidad genética (Estrella *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe mencionar que los rizobios caracterizados en dicho estudio provienen de suelos sin historia de glifosato. Para evaluar si la aplicación de este herbicida afecta de modo alguno la diversidad genética de estos simbiotes, decidimos en una primera instancia obtener rizobios de plantas de *L. tenuis* que crecen en suelos donde se ha aplicado anualmente glifosato durante 8 años consecutivos.

Se aislaron 20 plantas que de acuerdo a su distribución resultaron representativas de la parcela de promoción. En todas las plantas muestreadas se observaron nódulos. Se extrajeron 3 nódulos de la raíz principal de cada planta. Los rizobios se recuperaron del interior de los nódulos de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.3. Las colonias de rizobios provenientes de cada nódulo se purificaron mediante 2 a 3 pasajes por estría en medio YEM agarizado, hasta obtener colonias puras. De un total de 60 nódulos se obtuvieron 52 aislamientos.

## **4.2 Capacidad Infectiva de los rizobios aislados de *L. tenuis***

Si bien los aislamientos se obtuvieron a partir de nódulos desinfectados superficialmente, cabe la posibilidad de que alguna de las colonias obtenidas corresponda a aislamientos que no son “verdaderos rizobios”, sino bacterias contaminantes que colonizan la superficie del nódulo, o bien bacterias oportunistas que lograron ingresar al interior del nódulo con la ayuda de un rizobio. Por ello, para descartar posibles contaminantes entre las cepas aisladas, se decidió evaluar su capacidad infectiva en plantas de *L. tenuis*. El ensayo de infectividad se realizó en condiciones axénicas con plantas cultivadas en medio Evans agarizado sin nitrógeno. Este sistema es adecuado para realizar este tipo de evaluación dado que permite visualizar periódicamente las raíces inoculadas y registrar la aparición de nódulos luego de inocular con cada uno de los aislamientos.

Los resultados obtenidos demuestran que la capacidad infectiva varía significativamente entre los aislamientos. Los mismos se clasificaron en 3 grupos, de acuerdo a la velocidad de formación de nódulos en las condiciones ensayadas. La mayoría de los aislamientos formaron nódulos entre los 14 y 22 días post- inoculación y se clasificaron como cepas de infectividad alta e intermedia respectivamente. Un grupo minoritario de aislamientos formó nódulos después de 26 días post- inoculación y se clasificó como grupo de infectividad baja (Tabla 11).

Tabla 11. Capacidad infectiva de rizobios aislados de un suelo con historia de glifosato.

N° de nódulos	
0	
1-5	
6-10	
11-15	
16-20	
21-30	
31-40	
41-50	
+51	

Infectividad	Perfil	Nombre	Días pos-inoculación													
			14	18	22	26	30	34	38	42	46					
Baja	x2	A15	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4		
	x5	A18	0	0	0	2	2	2	3	6	6	6	6	6		
	x2	A26	0	0	0	4	4	5	6	9	9	9	9	9		
	x24	A214	0	0	0	1	1	5	3	7	10	10	10	10		
	x21	F11	0	0	0	1	1	3	2	4	11	12	12	12		
	x12	A19	0	0	0	2	2	2	3	11	11	11	11	11		
	x2	A16	0	0	0	1	1	2	3	11	11	11	11	11		
	x4	A213	0	0	1	1	1	2	3	4	5	5	5	5		
	x7	F113	0	0	1	2	2	3	4	4	10	10	10	10		
	x1	A215	0	0	1	4	4	5	8	10	10	10	10	10		
Intermedia	x13	F12	0	0	1	1	1	4	4	10	12	12	12	12		
	x5	A113	0	0	1	4	5	7	10	10	10	10	10			
	x19	F114	0	0	2	3	5	6	8	9	9	9	9			
	x14	F211	0	0	1	1	3	7	7	9	11	11	11			
	x6	A25	0	0	1	2	2	7	7	11	13	13	13			
	x28	F210	0	0	2	4	6	7	9	9	9	9	9			
	x17	A27	0	0	3	5	6	7	7	9	9	9	9			
	x23	A115	0	0	5	6	6	7	9	12	12	12	12			
	x3	A21	0	0	1	6	7	9	11	13	13	13	13			
	x22	A110	0	0	1	8	9	10	13	15	15	15	15			
	x2	F21	0	0	1	9	9	10	13	13	13	13	13			
	x21	F13	0	0	4	6	8	11	14	16	16	16	16			
	x27	A23	0	0	2	9	9	14	21	21	21	21	21			
	x21	A22	0	0	3	9	11	15	17	20	20	20	20			
	x8	A24	0	0	3	13	13	17	17	18	18	18	18			
Alta	x16	F22	0	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5			
	x28	F111	0	1	1	1	1	3	3	5	5	5	10			
	x29	F27	0	1	1	2	2	4	4	5	5	5	12			
	x11	F17	0	4	4	4	4	5	6	13	13	13	13			
	x27	F23	0	3	4	5	5	6	6	9	9	9	9			
	x2	F19	0	1	3	4	4	7	8	8	10	10	10			
	x1	F25	0	1	4	4	4	6	7	7	7	7	11			
	x9	A14	0	3	3	5	5	9	10	10	10	10	11			
	x21	F112	0	4	4	11	11	14	15	15	15	17	17			
	x25	A28	0	4	7	10	10	10	12	12	12	12	12			
	x26	A29	0	3	6	6	10	10	13	13	13	13	18			
	x2	A17	0	10	10	12	15	15	19	19	19	19	19			
	x19	F29	0	9	17	24	44	44	61	61	61	61	93			
	x2	F115	2	2	2	4	4	7	7	9	9	9	9			
	F15	F15	1	4	4	5	5	6	6	9	9	9	9			
F213	F213	2	4	5	5	10	12	12	12	12	17	17				
x2	F18	1	1	2	6	6	9	10	10	10	13	13				
x19	A13	3	4	5	6	6	9	9	11	11	11	11				
x18	F212	2	3	3	7	7	9	9	15	15	15	15				
x28	F26	2	3	4	6	6	9	11	11	11	16	16				
x2	F24	2	4	5	9	10	11	11	16	16	16	16				
x10	F16	1	7	7	9	10	11	11	14	14	14	14				
x15	A212	3	8	9	11	14	14	14	14	14	14	14				
x1	F215	4	6	9	12	12	17	18	18	18	18	22				

### 4.3 Análisis de variabilidad genética de los aislamientos mediante la técnica de huella digital

Una vez obtenida la colección de aislamientos nos propusimos analizar si existía una alta variabilidad genética entre los mismos, como se observó previamente en aislamientos de *L. tenuis* provenientes de suelos sin historia de glifosato (Estrella *et al.*, 2009), o si por el contrario la aplicación del herbicida afectaba dicha variabilidad. Para ello utilizamos las técnicas REP y BOX-PCR que permiten identificar a las bacterias aisladas, mediante un patrón de bandas de ADN genómico (perfil REP o BOX) que es característico y propio de cada cepa. Decidimos utilizar esta metodología porque es simple, reproducible y tiene la ventaja de poder evaluar un gran número de aislamientos de forma rápida ya que se puede utilizar ADN no purificado obtenido por lisis celular, como templado.

Luego de comparar los perfiles REP de los aislamientos se observó que 55% de los mismos presentaban perfiles no redundantes. A su vez, con los aislamientos que tuvieron perfiles REP similares se realizó una nueva comparación utilizando la técnica BOX-PCR para confirmar dicha similitud. Entre los 52 aislamientos evaluados, se identificaron 29 con perfiles REP no idénticos que corresponden a 29 cepas diferentes. El análisis de los perfiles REP/BOX reveló que existe redundancia de algunos aislamientos, dado que de los 29 perfiles detectados, 7 están repetidos en más de un aislamiento. El perfil 2 resultó ser el más redundante dado que se encontró en 10 aislamientos, mientras que los perfiles 1, 19, 21, 22, 27 y 5 tuvieron una representación menor y se detectaron en 2 a 4 aislamientos (Tabla 11).

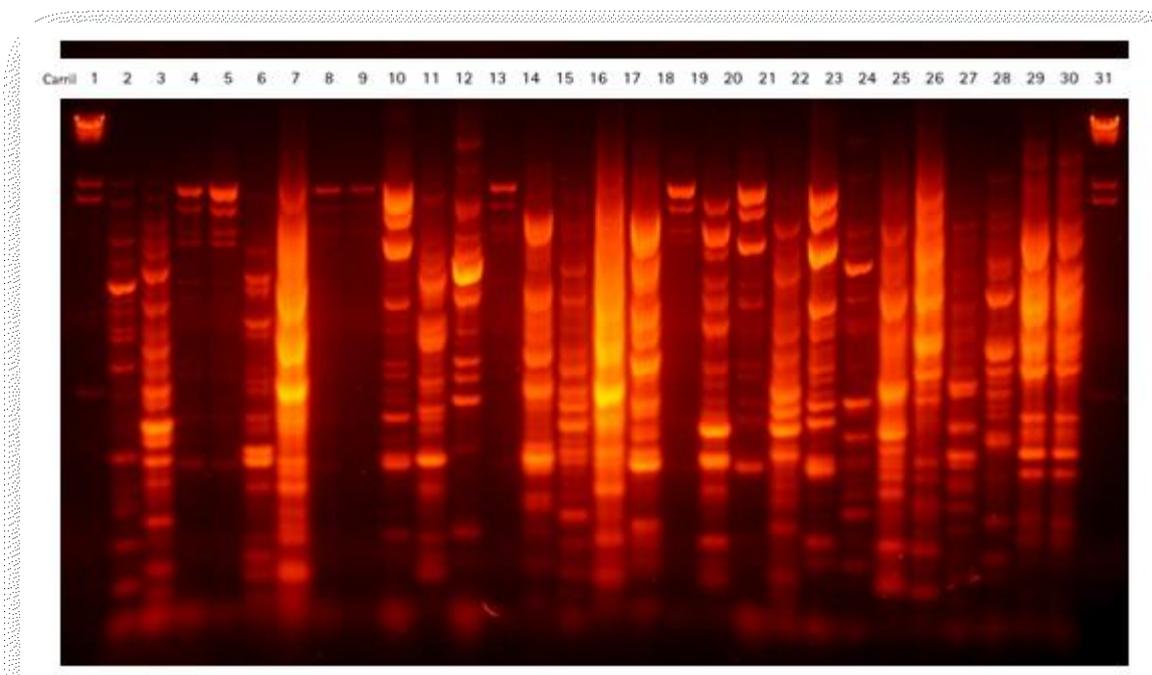


Figura 15. Fragmentos de ADN genómico de distintos aislamientos, amplificados por PCR con cebadores REP-1R1 y REP2I (carril 2-30), marcador de PM  $\lambda$  EcoRI/HindIII (carril 1 y 31).

A pesar de haber encontrado redundancia de algunos aislamientos, la comparación de los perfiles de cada aislamiento reveló que más de la mitad de los aislamientos corresponden a cepas distintas (55%). Estos resultados son menores a los obtenidos con simbioses de *L. tenuis* aislados de distintos tipos de suelos de la misma región, sin historia de glifosato (Estrella *et al.*, 2009), donde se hallaba un 77% de perfiles únicos. Por lo cual se puede considerar que la aplicación de glifosato afectaría la variabilidad genética de los rizobios presentes en el suelo.

Tabla 12. Identificación de los aislamientos en perfiles

Aislamiento	Perfil	Aislamiento	Perfil
A215	1	F211	14
F215		A212	15
F25		F22	16
F250		A27	17
A15	2	F212	18
A16		A13	19
A17		F114	
A26		F213	
F115		F29	20
F15		F14	
F18		A22	21
F19		F11	
F21		F112	
F24		F13	
A21	3	A110	22
A213	4	F214	
A113	5	A115	23
A18		A214	24
A25	6	A29	25
F113	7	A28	26
A24	8	A23	27
A14	9	F23	
F16	10	F111	28
F17	11	F210	
A19	12	F26	
F12	13	F27	29

#### 4.4 Evaluación de la tolerancia de los aislamientos de rizobios al

## herbicida glifosato, en condiciones de cultivo *in vitro*

Una de las hipótesis que nos planteamos al comenzar este estudio era que la presencia de glifosato en el suelo podía afectar la viabilidad de los rizobios nativos de la región de la Pampa Deprimida. Para abordar este tema decidimos evaluar si el crecimiento de los 29 aislamientos que tuvieron perfiles REP y BOX no redundantes se veía afectado en presencia de glifosato. Para ello, decidimos realizar ensayos de tolerancia cultivando los aislamientos en medio de cultivo sintético agarizado suplementado con distintas dosis de herbicidas comerciales. Se utilizaron formulaciones comerciales del herbicida glifosato porque nos interesaba evaluar el efecto que tenían las formulaciones habitualmente utilizadas en el campo.

Las concentraciones de glifosato que evaluamos se establecieron teniendo en cuenta dosis inferiores a las que se utilizan habitualmente en los suelos donde se cultiva o promociona *L. tenuis* (2% de Round Up Full II, que equivale a una concentración de 64mM equivalente ácido (ea) de glifosato). En un primer ensayo se testeó la tolerancia de los 29 aislamientos a 1,52; 3,276; 7,6 y 15,23mM del principio activo del herbicida comercial Round Up Full II (Anexo II) en el medio de cultivo AB sacarosa.

Se observó que el 93% de los aislamientos resultaron sensibles a concentraciones mayores o iguales a 1,52mM ea de glifosato<sup>6</sup> (Tabla 13Tabla 13). Teniendo en cuenta estos resultados se decidió repetir el ensayo de tolerancia ampliando el rango de concentraciones inferiores a 3,276mM, (0,0066; 0,015; 0,152; 1,52) para poder precisar el nivel de tolerancia de los aislamientos. Además en dicho ensayo, se incluyó la evaluación de tolerancia a otra formulación de glifosato comercial, Glacoxan Total.

En la Tabla 13 se observa que la tolerancia de los aislamientos es diferente para las dos formulaciones del herbicida, siendo mayor el nivel de tolerancia para Glacoxan Total que a Round Up Full II. Del total de aislamientos, un 44% tolera niveles superiores o iguales a 1,5mM de Glacoxán Total, mientras que solamente un 6,8% tolera esa misma concentración de Round Up Full II. Si se compara la tolerancia de cada aislamiento a ambos herbicidas se observa que solamente un 24% tienen un comportamiento similar (Tabla 13). Si tenemos en cuenta que la concentración del principio activo es la misma en el ensayo para ambos formulados, podemos suponer que las diferencias de tolerancia observada entre ambos herbicidas estarían relacionadas con los adyuvantes que conforman la formulación.

---

<sup>6</sup> Equivalentes a 256.880 µg/L del principio activo en el formulado de glifosato Round Up Full II.

Tabla 13. Tolerancia de los aislamientos de rizobios a distintos glifosatos comerciales.

Aislamientos	Glifosato Comercial									
	Round Up Full II					Glacoxan Total				
	0,0066mM	0,015mM	0,152mM	1,52mM	3,276mM	0,0066mM	0,015mM	0,152mM	1,52mM	3,276mM
x24	T				S	T				S
x4	T				S	T				S
x25	T			S		T				
x1	T			S		T				
x6	T			S		T				
x8	T			S		T				
x10	T			S		T				
x11	T			S		T				
x12	T			S		T				
x17	T			S		T				
x27	T			S		T				
x7	T			S		T				S
x13	T			S		T				S
x22	T			S		T				S
x2	T		S			T				S
x3	T		S			T				S
x20	T		S			T				S
x9	T		S			T				S
x15	T		S			T				S
x16	T		S			T				S
x5	T		S			T				S
x28	T		S			T				S
x21	T		S			T				S
x18	T		S			T				S
x19	T		S			T				S
x23	T		S			T				S
x14	T		S			T				S
x26	T		S			T				S
x29	S					T				

#### 4.5 Evaluación de la tolerancia de los aislamientos de rizobios, al herbicida glifosato aplicado en suelo.

La aplicación del herbicida glifosato en el sistema de promoción de *L. tenuis* se realiza mediante pulverizador tipo mochila, aplicándose una concentración de 64mM, a razón de 100L/ha<sup>7</sup>. Su forma de aplicación introduce un factor de dilución relevante para el estudio de su efecto en las bacterias que habitan en el suelo.

Dado que los resultados de tolerancia al herbicida en medio sintético sugirieron que los aislamientos de rizobios de *L. tenuis* toleran concentraciones inferiores a las utilizadas en el campo (3,2mM, ver Tabla 13), quisimos evaluar si el nivel de tolerancia es similar cuando el herbicida se agrega directamente en suelo y está sujeto a las interacciones con esta matriz.

Para esto se aplicó glifosato comercial en tierra a concentraciones 0; 1,5; 3,2 mM<sup>8</sup>, manteniendo la tasa de aplicación de campo. Luego de la aplicación del herbicida, se

<sup>7</sup> Equivalente a una concentración superficial de 6400mmoles de ea de glifosato por hectárea de tierra pulverizada.

<sup>8</sup> Equivalente a 0, 150 y 320 mmoles/ha

agregó un volumen de cultivo de *M. loti* BD68, un simbiote de *L. tenuis* que se seleccionó para este tipo de ensayo, dado que ha sido previamente caracterizado en el laboratorio (Estrella *et al*, 2009) y evaluado su comportamiento simbiótico en *L. tenuis* (Sannazzaro *et al.*, 2011).

Para facilitar la evaluación de tolerancia de esta cepa, se decidió marcarla con un gen reportero, la proteína fluorescente verde, de manera tal de poder aislarla e identificarla fácilmente de otros microorganismos que estuvieran en el suelo, mediante ensayos de recuento de colonias. En la Figura 16 se observa que la cantidad de colonias aisladas del suelo sin glifosato, que corresponden a la cepa *M. loti* BD68 GFP, es estadísticamente similar a la presente en suelos con Glifosato, en las dos dosis evaluadas, al menos hasta los 30 días. Estos resultados sugieren que la tolerancia al herbicida es mayor en la matriz suelo que en medio sintético agarizado.

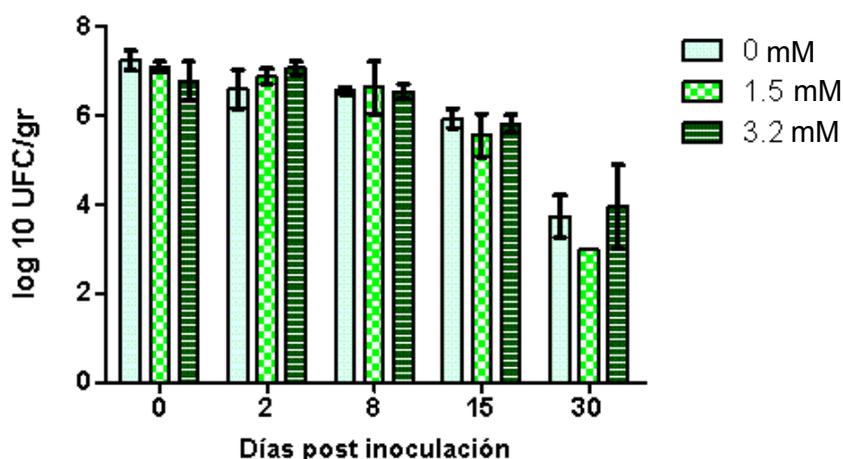


Figura 16. El número de rizobios se expresó en  $\log_{10}\text{UFC.gr}^{-1}$  de suelo. Para las concentraciones mencionadas se mantuvo una tasa de aplicación de 100L/ha

#### 4.6 Evaluación del efecto del glifosato en la simbiosis *Rhizobium* – *Lotus tenuis*

Luego de analizar la viabilidad de los rizobios de *L. tenuis* en suelo con glifosato, decidimos evaluar si dicho herbicida afectaba la capacidad de los mismos para establecer una simbiosis efectiva con plantas de *L. tenuis* en tierra.

Para ello, inoculamos plantas de *L. tenuis* con cultivos de dos cepas de rizobios aisladas de nódulos de *L. tenuis*, que toleran niveles similares de glifosato (Tabla 13), pero

procedentes de distintos tipos de suelos. La cepa X24 proviene de suelos con historia de glifosato, mientras que la cepa BD68 se aisló de suelos sin historia del herbicida.

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados del ensayo anterior que sugieren que los simbioses de *L. tenuis* en suelo toleran dosis superiores a 3,2mM de glifosato, decidimos extender el rango de concentraciones del herbicida a evaluar hasta alcanzar la concentración que habitualmente se utiliza para los ensayos de promoción de *L. tenuis* manteniendo la misma tasa de aplicación. En este ensayo comparamos el crecimiento de las plantas inoculadas con cada una de las cepas de rizobios, con el de las plantas sin inocular, cuantificando el peso seco (PS) de la parte aérea como parámetro de eficiencia de los rizobios (Sannazzaro *et al.*, 2011).

La comparación de los valores de PS de plantas sin inocular e inoculadas tratadas con los distintos glifosatos comerciales (Round Up Full y el Glacoxan Total) reveló que no existen diferencias significativas para las dos formulaciones comerciales del herbicida. Esto permitió analizar en conjunto los datos obtenidos con ambos glifosatos y en consecuencia darle una mayor solidez estadística a los resultados.

Antes de analizar el efecto del glifosato sobre la eficiencia simbiótica de los rizobios evaluamos si el herbicida afectaba el crecimiento de *L. tenuis*. El análisis de la biomasa aérea de plantas de *L. tenuis* sin inocular, cultivadas en suelo con distintas concentraciones de glifosato, reveló que la aplicación del herbicida en dosis mayores o iguales a 3,2 mM afecta la producción de biomasa aérea (Figura 17).

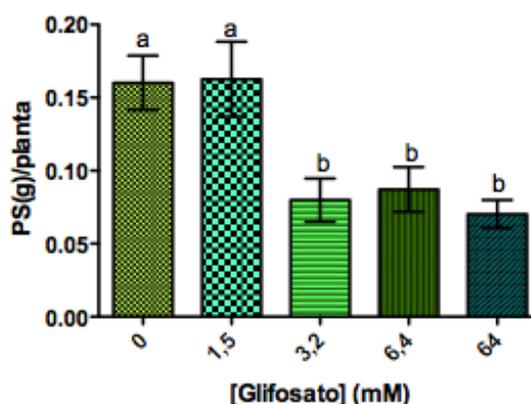


Figura 17. Producción de Biomasa aérea de plantas de *L. tenuis* cultivadas con distintas concentraciones de glifosato comercial.

Una vez que evaluamos el efecto del herbicida sobre el desarrollo de las plantas, decidimos analizar su efecto sobre la simbiosis con las cepas de rizobios antes mencionadas. Tal como se mencionó en la Introducción, para que los rizobios reduzcan el nitrógeno atmosférico a amonio, deben primero infectar la raíz de la planta hospedante y alojarse en el nódulo. Es por ello que lo primero que se evaluó en las plantas inoculadas, es

la capacidad de los rizobios de formar nódulos en presencia del herbicida. Luego de evaluar detenidamente las raíces de las plantas extraídas de las macetas, observamos que la cantidad y el aspecto de los nódulos en las plantas inoculadas era similar, independientemente del tipo y dosis del herbicida presente en el suelo (Figura 18). Este resultado indica que la etapa inicial de señalización que ocurre durante la interacción entre *L. tenuis* y las cepas de rizobios ensayadas, necesaria para la formación de nódulos, no se ve afectada por la presencia de glifosato, en ninguna de las dosis ensayadas.



Figura 18. Presencia de nódulos en plantas de *L. tenuis* a distintas concentraciones de glifosato comercial en suelo.

Si bien observamos que la etapa inicial de formación de nódulos no se afecta por la presencia del herbicida, cabe la posibilidad de que los mismos no sean funcionales debido a alteraciones durante procesos posteriores de la simbiosis que involucran la colonización y diferenciación de los rizobios en bacteroides para fijar el nitrógeno atmosférico y transformarlo a amonio. En nuestro estudio no analizamos la estructura de los nódulos pero evaluamos su funcionalidad a través de un parámetro indirecto que es la producción de biomasa aérea de las plantas inoculadas en comparación con las plantas sin inocular.

En primer lugar evaluamos la eficiencia de ambas cepas comparando su comportamiento simbiótico en plantas no expuestas al glifosato. Como se observa en la Figura 19 la eficiencia de las dos cepas testeadas es diferente, la cepa X24 aislada de suelos con historia de glifosato, si bien desarrolla nódulos no incrementa significativamente la biomasa de *L. tenuis* respecto de la observada en plantas sin inocular, en ausencia de glifosato. Por el contrario, la cepa BD68 mejoró significativamente la producción de biomasa aérea comparado con la de las plantas sin inocular y resultó más eficiente que la cepa X24.

Cuando evaluamos su comportamiento en suelos con glifosato observamos que dosis equivalentes a 1,5mM provocan una disminución significativa del PS de la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa BD68 respecto de la observada en plantas inoculadas con dicha cepa sin glifosato. Más aún, en estas condiciones, la producción de biomasa de plantas inoculadas con la cepa BD68 resultó similar a la obtenida en plantas sin inocular o inoculadas con X24 (Figura 19).

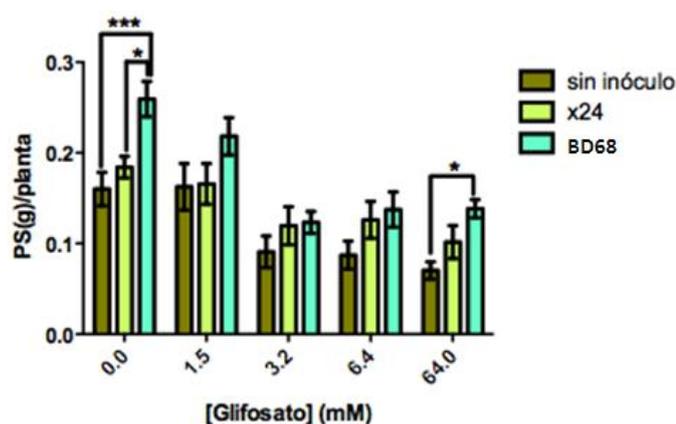


Figura 19. Eficiencia simbiótica de los aislamientos en presencia de glifosato comercial a distintas concentraciones.

Por otro lado, en suelos con 3,2 y 6,4mM se observó que la inoculación con rizobios no mejoró significativamente la producción de biomasa aérea respecto de la observada en plantas sin inocular. Sin embargo, bajo estas condiciones hay que considerar que el glifosato afecta negativamente el desarrollo de las plantas sin inocular. Por lo cual no se puede considerar que el efecto del herbicida sobre la simbiosis sin tener en cuenta el efecto

previo sobre la planta. Por otra parte, resultó llamativo que en los suelos tratados con 64mM de glifosato comercial, la inoculación de *L. tenuis* con DB68 incrementó significativamente la producción de biomasa aérea respecto de la observada en plantas sin inocular. Es posible que, bajo estas condiciones que resultan restrictivas tanto para el crecimiento de la planta como para la simbiosis, la inoculación con una cepa efectiva como BD68 represente una ventaja para la planta por el aporte de los productos de fijación del nitrógeno atmosférico que son asimilados por la misma y le permiten mejorar la producción de biomasa respecto de las plantas no inoculadas o inoculadas con una cepa ineficiente como X24.



## **5. Discusión y conclusiones**

---

El glifosato es el herbicida más usado en el mundo (Woodburn, 2000), con ventas que alcanzan el 11% del valor total del mercado de los productos agroquímicos (Agrow, 2002). En Argentina, su consumo es cada vez mayor, alcanzando los 100 millones de litros solamente en el año 2007 (CASAFE, 2007). Este herbicida es utilizado para el control de malezas anuales y perennes, gramíneas y latifoliadas que pueden competir con cultivos de interés agrícola (Arregui *et al*, 2009).

En la región de la Pampa Deprimida, es frecuente el uso del glifosato para prácticas de promoción de especies de alto valor forrajero como *L. tenuis*, que se basan en eliminar malezas que compiten con la leguminosa, cuya principal desventaja es el escaso vigor en la fase inicial de crecimiento. Esta práctica se realiza para favorecer el desarrollo de *L. tenuis* e incrementar el contenido de proteínas de las pasturas que están destinadas al consumo del ganado vacuno, principal actividad económica de la región.

Al presente, no está claro si la aplicación de formulaciones comerciales de este herbicida puede ocasionar perjuicios a la comunidad microbiana del suelo, particularmente a un grupo específico de bacterias que establecen relaciones mutualistas beneficiosas con plantas, como los rizobios.

Dado que la calidad proteica de *L. tenuis* depende en gran medida, de la interacción con este grupo de bacterias y de la eficiencia de las mismas para fijar el nitrógeno atmosférico, resulta clave determinar si la aplicación del herbicida afecta de algún modo a este grupo funcional de microorganismos, para valorar la conveniencia o no del uso de esta práctica agronómica en la región. Por este motivo, el objetivo del trabajo se focalizó en evaluar el impacto que tiene el uso de formulaciones comerciales de glifosato sobre la viabilidad y funcionalidad de los rizobios que interaccionan simbióticamente con *L. tenuis*

En los suelos de la Pampa Deprimida la cantidad de rizobios nativos que interaccionan específicamente con *L. tenuis* es considerablemente elevada, alcanzando niveles entre  $10^4$  y  $10^6$  rizobios/g de suelo, En estudios previos se ha determinado que esta población nativa es genéticamente muy diversa y variable en relación a su capacidad fijadora de nitrógeno y tolerancia a condiciones de estrés abiótico (Estrella *et al.*, 2009). Dado que la variabilidad genética juega un rol muy importante en la evolución de las interacciones simbióticas nos interesó evaluar si la aplicación de glifosato afectaba de algún modo esta característica. Cuando se comparó la variabilidad genética de rizobios aislados de suelos con historia de aplicación de glifosato, con la de aislamientos de esa misma región, sin historia del herbicida, observamos una baja proporción de rizobios con perfiles REP-PCR únicos. Esos resultados sugieren que el glifosato comercial Round Up Full II,

aplicado anualmente a concentraciones de 64mM a tasa de 100L/ha<sup>9</sup> y durante al menos siete años, reduce la diversidad genética de la población nativa de rizobios que interacciona simbióticamente con *L. tenuis*.

Sin embargo, estudios previos en los que se evaluó el efecto del glifosato sobre las comunidades de microorganismos del suelo, sugieren que las formulaciones comerciales del herbicida son inocuas cuando se aplican en dosis que no superan los 5 kg ea/ha, (Olson y Lindwall, 1991, Stratton, 1990; Stratton y Stewart, 1992; Busse et al, 2001 ). Por otra parte, la aplicación de dosis superiores a la mencionada, puede estimular la respiración basal del suelo (Stratton y Stewart, 1992; Haney et al, 2000; Busse et al, 2001.), y afectar los ciclos de nutrientes (Muller et al, 1981; Carlisle y Trevors, 1986; Stratton, 1990) incrementando la concentración de los microorganismos cultivables del suelo (Chi-chu Lo, 2010; Olson and Lindwall, 1991; Stratton and Stewart, 1992; Ratcliff *et al.* 2006; Zabaloy *et al.* 2012). En algunos casos, incluso se ha observado que tanto las moléculas de glifosato, como de sus principales productos de degradación, quedan disponibles en el suelo para ser utilizadas por algunos microorganismos como fuente de P y C (Borggaard and Gimsing, 2008), lo que conduce a un incremento en la biomasa y actividad microbiana (Haney et al. 2000; Wardle & Parkinson 1990).

Se ha demostrado que la presencia del herbicida produce alteraciones en la estructura de la comunidad microbiana, incrementando la abundancia de algunos microorganismos sobre otros (Ratcliff , 2006, Carlisle y Trevors, 1988; Dick y Quinn, 1995; Busse et al., 2001). En este sentido, es posible que la baja diversidad genética observada en la población nativa de rizobios de *L. tenuis* expuesta durante varios años al glifosato, se atribuya a la baja tolerancia de algunos simbioses a las concentraciones residuales de formulaciones comerciales del herbicida o a los productos de degradación que puedan estar presentes en el suelo.

Como se mencionó en la introducción, el glifosato puede resultar nocivo para las bacterias y hongos debido a que en este grupo de microorganismos está presente la ruta del ácido shikímico, que es el blanco de acción del herbicida. Cabe recordar que el ácido shikímico es necesario para la síntesis de aminoácidos aromáticos y diversos productos secundarios de importancia para el metabolismo microbiano (Bentley, 1990; Franz *et al.*, 1997). Recientes estudios muestran también que el glifosato inhibe el citocromo P450, una

---

<sup>9</sup> Equivalente a 1kg/ha de ea de glifosato

superfamilia de hemoproteínas presente en bacterias, arquea y eucariotas (Lamb *et al.*, 1998; Samsel y Seneff, 2013), intensificando su efecto cuando se utilizan los formulados comerciales. Esto último también quedó demostrado por Tsui y Chu (2003), quien observó que los agentes tensioactivos presentes en las formulaciones comerciales resultaban tóxicos para distintas especies de bacterias y protozoos.

A pesar de la toxicidad que tiene el glifosato, según reportes que se han publicado a la fecha, las bacterias y específicamente los rizobios son capaces de tolerar este herbicida en niveles muy variables. Se ha observado por ejemplo que especies de *B japonicum* y *B elkanii* que interactúan con soja se ven afectadas en su crecimiento en medio sintético suplementado con concentraciones de  $2,55 \cdot 10^{-4}$  mM ea de glifosato comercial (Zapp Qi y Round Up Transorb) y puro (Barbosa dos Santos *et al.*, 2004), mientras que concentraciones de 0.01 mM de ea del herbicida puro pueden ser inhibitorias del crecimiento de *B. japonicum* (Jaworski (1972)). Por otra parte, Eberdach and Douglas, 1989 observaron una reducción del crecimiento para cepas de *Rhizobium trifolii*, simbioses de *Trifolium subterraneum* L. en presencia de 0,06 mM y 0,12 mM de formulaciones de glifosato comercial no especificadas.

En el caso particular de los simbioses de *L. tenuis*, se desconoce el nivel de tolerancia de los formulados comerciales de glifosato. Por esta razón, otro de los objetivos de este trabajo se centró en evaluar tanto en medio sintético como en suelo, si dichos formulados afectaban el crecimiento de estos simbioses. Las evaluaciones realizadas en medio AB sacarosa, revelaron que la mayoría de los aislamientos (93%) son incapaces de crecer en presencia de dosis superiores a 1,5 mM de ea de glifosato comercial. Además, se observó una menor tolerancia al herbicida comercial Round Up Full II que a Glacoxan Total. Aún así, si se compara el nivel de tolerancia de los distintos rizobios, se puede concluir que los simbioses de *L. tenuis*, al menos en condiciones de cultivo in vitro, tienen una tolerancia mayor al herbicida que los simbioses de otras leguminosas.

Para evaluar el efecto del herbicida en una condición que se asemejara más a la real en el campo, decidimos complementar los análisis de tolerancia realizados en medio sintético con un ensayo de viabilidad, en suelo obtenido de las zonas que se destinan a promover *L. tenuis*. Como modelo de estudio de los simbioses de *L. tenuis* utilizamos una cepa de *M. loti*, caracterizada previamente en el laboratorio, que posee una alta eficiencia para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con esta leguminosa. Para facilitar su identificación y recuento en el suelo, se utilizó una variante transformada en el cromosoma que expresa constitutivamente la proteína fluorescente verde (GFP) y es resistente al antibiótico Nm. Luego de cuantificar la viabilidad de la cepa en suelos con el herbicida, observamos que la tolerancia de este simbiote a los formulados comerciales es mayor que en medio sintético. Este resultado puede explicarse en parte por la capacidad del herbicida de ser adsorbido por ácidos húmicos del suelo, tal como ha sido reportado por algunos

autores (Piccolo *et al.*, 1995, 1996; Albers *et al.*, 2009; Banta *et al.*, 2009; Mazzei y Piccolo, 2012), quedando de ese modo menos disponible para los microorganismos. Más aún, estudios presentados por Shehata (2014) revelaron que los ácidos húmicos pueden inhibir el efecto antimicrobiano del glifosato en diferentes bacterias.

En general se ha observado que la biodisponibilidad del glifosato en suelos es muy variable y dependiente de múltiples factores (Mamy *et al.*, 2010; Doublet *et al.*, 2009; Albers *et al.*, 2009; Cox, 1995). En un trabajo reciente Primost (2013), observó que no existe una correlación significativa entre los niveles del herbicida en suelo y la dosis de la última aplicación, pero sí se da una buena correlación con el total de las dosis del herbicida aplicadas en los últimos 7 años.

En el caso particular de la región de la Pampa Deprimida en la Cuenca del Salado, no existe información sobre los niveles de glifosato residual que puedan haberse acumulado en los últimos años, en los suelos donde se promueve el *L. tenuis*, como para determinar si los niveles acumulados se correlacionan o no con los niveles del herbicida que evaluamos tanto en medio sintético como en suelo. Sin embargo, a partir de nuestros resultados podemos concluir que en el caso de que la concentración residual sea inferior o igual 54gr/ha<sup>10</sup>, es altamente probable que no afecte significativamente el número de simbiontes de *L. tenuis*.

Por otra parte, aún en el caso que estos simbiontes permanezcan viables, se desconoce si a esa concentración los rizobios son funcionalmente efectivos, es decir si son capaces de interactuar simbióticamente con *L. tenuis* y promover su crecimiento mediante la fijación del nitrógeno atmosférico.

Por este motivo, se decidió evaluar la capacidad promotora de estos simbiontes en suelos a los que se les aplicó el herbicida comercial en un rango de dosis que incluyó la dosis habitual que se utiliza en el campo para promover *L. tenuis*. En primer lugar observamos que el herbicida comercial en las dosis evaluadas no afectó la formación ni el número de nódulos. Este comportamiento coincide con lo observado en las zonas destinadas a la promoción de la leguminosa, donde la totalidad de las plantas estaban noduladas.

Si bien no se observaron efectos negativos sobre la formación de nódulos, es importante evaluar si los mismos permanecen funcionalmente activos en presencia del herbicida, para descartar posibles efectos sobre la capacidad fijadora de nitrógeno. Por este

---

<sup>10</sup> Equivalente a la concentración superficial de glifosato en una aplicación de 3,2mM de ea de glifosato en una tasa de 100L/ha

motivo analizamos si el glifosato afectaba la producción de biomasa de las plantas de *L. tenuis* inoculadas y no inoculadas con rizobios y observamos que a concentraciones superiores o iguales a 25gr/ha<sup>11</sup> se afecta negativamente la producción de biomasa aérea alcanzada por el tratamiento de inoculación. Estos resultados nos permiten concluir que en el caso que los suelos de la región acumularan los niveles mencionados, se afectaría la actividad promotora del crecimiento, producto de la interacción simbiótica y fijación de nitrógeno de los rizobios de *L. tenuis*.

Por otra parte, observamos que el crecimiento de la leguminosa sin inocular disminuyó de manera significativa en presencia de niveles superiores o iguales a 54 gr/ha de glifosato comercial. Esto limita el análisis para los resultados a concentraciones superiores, visto que no podemos analizar la simbiosis cuando las plantas de *L. tenuis* están siendo afectadas por el glifosato directamente. Más allá de esto, resultó llamativo que en suelos con niveles de 1 kg/ha del herbicida, la interacción simbiótica con rizobios eficientes para fijar nitrógeno, mejoró la producción de biomasa aérea de la leguminosa, superando la producción en ausencia del inoculante. Esto puede atribuirse a que en condiciones de estrés la interacción con rizobios eficiente se ve beneficiada. Una respuesta similar se observa cuando las plantas de *L. tenuis* son expuesta a estrés abiótico, por ejemplo en presencia de medios con elevada salinidad.

El efecto negativo del glifosato sobre la simbiosis con otras leguminosas también ha sido reportada por otros autores (Bohm *et al.* (2008); De Maria *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 1999; Eberdach and Douglas, 1989). Específicamente en rizobios simbiotes de lupín, se observó una disminución de la actividad nitrogenasa 24 hs después de la aplicación de glifosato a dosis subletales (1,25 mM). Esta disminución se atribuye a la inhibición de la mayor parte del fosfoenolpirubato (PEP) producido en la vía del shikimato, privando de ese modo de sustratos energéticos a los bacteroides, e imposibilitando la fijación de nitrógeno (De María *et al.*, 2006).

También se ha reportado que el glifosato, por ser un fuerte quelador de metales (Glass, 1984), inmoviliza micronutrientes como el Fe y el Mn, que son esenciales para distintas vías metabólicas entre ellas la fijación de nitrógeno (Bellaloui *et al.*, 2009, Johal and Huber, 2009). El glifosato también puede disminuir la disponibilidad del Ni en la rizósfera, afectando la enzima hidrogenasa, responsable de asimilar el H<sub>2</sub> producido en la fijación de nitrógeno para la obtención de energía (Zobiolo *et al.* 2010). Incluso en estudios más detallados donde se evaluó el efecto del glifosato sobre la estructura y ultra estructura de

---

<sup>11</sup> Equivalente a la concentración superficial de glifosato en una aplicación de 1,5mM de ea de glifosato en una tasa de 100L/ha

los nódulos, se observó degradación del citosol de los bacteroides y ruptura de la membrana bacteroidal en *Bradyrhizobium sp.* simbioses de *Lupinus* a 2,5mM ea. (De María et al, 2005). En concentraciones superiores (5 – 10mM) se detectó la aparición de una proteína transmembrana, similar a una porina, que provoca la desintegración de la membrana del simbiosoma, un desequilibrio osmótico y una inhibición del transporte entre el bacteroide y el citosol de las células vegetales (De María et al. 2007).

En base a lo expuesto y considerando los resultados obtenidos en este trabajo, sería de gran interés complementar estos estudios con determinaciones de los niveles residuales de glifosato comercial en los suelos de la región de la Pampa Deprimida para evaluar de manera más precisa la conveniencia o no del uso de la práctica de promoción de *L. tenuis* en la región. Además sería importante continuar y profundizar con los estudios de la simbiosis entre rizobios y *L. tenuis* para contribuir al conocimiento de los mecanismos por los cuales el glifosato afecta la fijación de nitrógeno.

## Conclusiones

- Se observó una baja variabilidad genética entre los rizobios de *L. tenuis* aislados en suelos con historia de glifosato.
- La tolerancia de los rizobios simbioses de *L. tenuis* al herbicida glifosato, evaluada *in vitro*, depende de la formulación siendo menor al Round Up Full II que al Glacoxán Total.
- Dosis inferiores o iguales a 3,2mM de Round Up Full II aplicadas a tasas de 100L/ha en suelos de la región de la Pampa Deprimida, no afectan la viabilidad de los simbioses de *L. tenuis*.
- El glifosato aplicado en suelo, en las dosis habituales para eliminar malezas (1kg/ha de ea de glifosato), no afecta la formación de nódulos, producto de la simbiosis mutualista entre rizobios y *L. tenuis*.
- La aplicación de dosis superiores o iguales a 25gr/ha ea del herbicida en suelo, limita la producción de biomasa aérea de plantas de *L. tenuis alcanzada* mediante la interacción simbiótica con rizobios fijadores de nitrógeno.



## 6. Bibliografía

---

- Adam A, Marzuki A, Rahman HA, Ariz MA (1997) The oral and intracranial toxicities of Roundup and its components in rats. *Vet. Human Toxicol.* 39: 147-151.
- Aubin A, Smith AE (1992) Extraction of [14 C] glyphosate from Saskatchewan soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v. 40: 1163-1165.
- Atlas, R & Bartha R (2005) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Cuarta edición. Pearson educación, S.A., Madrid. 97-114p.
- Bailleres M & Sarena D (2009) Promoción Estival de *Lotus tenuis*. Chacra Experimental Integrada Chascomús. Informe INTA
- Barbagallo, J (1960) Recuperación y praderización de un campo bajo en el partido de Bolívar. Series informes técnicos N° 10. INTA.
- Beltran J, Gerritse RG, Hernandez F (1998) Effect of fIRG rate on the adsorption and desorption of glyphosate, simazine and atrazine in columns of sandy soils. *Eur J Soil Sci* 1998; 49:149156
- Bentley R (1990) The shikimate pathway -a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology* 25, 307-384
- Berasategui LA y Barberis LA (1982) Los suelos de las comunidades vegetales de la región de Castelli-Pila, Depresión del Salado (Provincia de Buenos Aires). *Revista Facultad de Agronomía de Buenos aires* 3: 13-25
- Bertonatti C, Corcuera J (2000) Situación Ambiental Argentina 2000. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- Bhuvaneswari T, Bhagwat AA, Bauer WD (1981) Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiology* 68: 1144-1149
- Brewin NJ (1991) Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biology*, 7: 191-226
- Burkart, A. 1952. *Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas*. 2 Ed. Acme. Buenos Aires, 569 pp.
- Caetano-Anollés, G, Wall LG, DeMicheli AT, Macchi EM, Bauer WD and Favelukes G (1988). Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 86: 1228-1235.
- Cambareri G, Castaño J, Maceira N, Fernández O, Vignolio O (2007) Crecimiento, dinámica reproductiva, y rendimiento de semilla cosechable de *Lotus tenuis* en respuesta a tres densidades de plantas. Resultados preliminares. APPA - ALPA - Cusco, Perú, 2007
- Carrillo, J. y Schiersmann, G. 1994. Manejo del rodeo de cría. EEA Balcarce INTA. Materiales didácticos N° 8. 97 Pág. Biblio. FAVE.
- CASAFE (2007) Guía de productos fitosanitarios. Bs. As. 3060 pp.
- Christy SL, Karlander EP, Parochetti JV (1981) Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science* 29, 5-7
- Coria D, Lucesoli R, Maresca S, Obregón E, Olmos G, Pettinari J, Quiroz García J y Rípodas I (2005) Manual para productores ganaderos de la Cuenca del Salado. Ediciones INTA. 150 p.
- D' Mello, J.P.F. (2000) En: J.P.F. D'Mello (Ed.). CABI, Wallingford, Oxon, UK. Pp: 383-403.
- Dallgrave E, Mantese FDG, Dalsenter PR, Langeloh A (2002) Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. *Online J. Vet. Res.* 1: 29-36
- Damario, EA & Pascale AJ (1988). Caracterización agroclimática de la Región Pampeana. *Revista de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires* 9: 41-54.
- De Andrea MM, Peres TB, Luchini LC, Bazarin S, Papini S, Matallo MB, Savoy VLT (2003) Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesq. Agropec. Bras, Brasilia* 38 (11): 1329 – 1335
- De Maria, N., Becerril, L.M., Garcia-Plazaola, J.I., Hernandez, A., De Felipe, M.R., Fernandez-Pascual, M., 2006. New insights on glyphosate mode of action in nodulant metabolism: role of shikimate accumulation. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2621–2628.

- Deschamps JR; Otero O y Tonny EP (2003). Cambio climático en la pampa bonaerense: las precipitaciones desde los siglos XVIII al XX. Documento de trabajo n°109. Universidad de Belgrano.
- Dick RE, Quinn JP (1995) Glyphosate - degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology & Biotechnology* 43, 545-550
- Eberbach PL, Douglas LA (1983) Persistence of glyphosate in a sandy loam. *Soil Biol Biochem* 15: 485-487
- Etchevehere, P (1961) Bosquejo de regiones geomorfológicas y de drenaje de la República Argentina. *IDIA* 162: 7-25.
- European Commission (2002) Health and consumer protection directorate general. Glyphosate 65 11-VI-99
- Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, Ruiz O, Sanjuan J (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *lotu tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology* vol 75, n 4. P 1088-1098
- Evans HJ, Koch B, Klucas R (1972) Preparation of nitrogenase from nodules and separation into components. *Methods in Enzimology* (A. San Pietro, ed.) 24: 470-476. Academic Press, New York.
- Fidalgo, F (1983). Algunas características de los sedimentos superficiales en la cuenca del río salado y en la pampa Ondulada. Coloquio Internacional sobre Hidrología de Grandes Llanuras. Comité Nacional Programa Hidrológico Internacional, 2. Olavarría, Argentina.
- Fisher RS, Berry A, Gaines CG y Jensen RA, 1986. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy in eubacteria. *J. Bacterial.* 168: 1147-1154.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA (1997) Glyphosate: a unique global herbicide. *American Chemical Society Monograph* 189. American Chemical Society, Washington DC.
- Frenguelli J (1950). Rasgos generales de la morfología y la geología de la Provincia de Buenos Aires. *LEMIT, Serie II, N°33, La Plata,* 72 p.
- Fulchieri M, Estrella MJ, Iglesias AA (2001) Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 119-125.
- Gimsing AL, Borggard O K, Jacobsen O S, Aamand J, Sorensen J (2004) Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* 27: 233-242.
- Gustavo Gualtieri & Ton Bisseling (2000) The Evolution of Nodulation. In: Doyle J.J., Gaut B.S. (eds.), *Plant Molecular Evolution*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. *Plant Molecular Biology* (special issue) 42:181-194.
- Gutierrez Elorza et al. 2005
- Haney RL, Senseman SA, Hons FM, Zuberer DA (2000) Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*, Champaign, 48: 89-93
- Hernandez A, Garcia-Plazaola JI, Becerril JM (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Agric. Food Chem.* 47: 2920-2925.
- Herrman KM y Weaver LM (1999). The shikimate pathway.. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50: 473-503.
- Hotter GS & Scott DB (1991). Exopolysaccharide mutants of rhizobium-loti are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host. *Journal of bacteriology.* 173(2), 851-859
- Huss-Danell, K. (1978) Nitrogenase Activity Measurements in Intact Plants of *Alnus incana*. *Physiologia Plantarum*, 43: 372-376. doi: 10.1111/j.1399-3054.1978.tb01597.x
- Iriondo M (1999): Climate changes in the south American plains: Records of a continent-scale oscillation. *Quaternary International*, 57/58: 93-112
- Jacobsen CS, Van der Keur P, Iversen BV, Rosenberg P, Barlebo HC, Torp S, Vosgerau H, Juhler RK, Ernstsén V, Rasmussen J, Brinch UC, Jacobsen OH (2008) Variation of MCPA metribuzine, methyl triazine-amine and glyphosate degradation, sorption, mineralization and leaching in different soil horizons. *Environmental Pollution* 156: 794-802

- Jarvis BDW, Pankhurst CE y Patel JJ (1982) *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. Journ. of Sys. Bact.*, 32: 378-380. 0020-7713/82/030378-03
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (3): 895–898. doi:10.1099/00207713-47-3-895
- Jaworski EG (1972) Mode of action of N-Phosponomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agr. Food Chem.*, v 20 n6.
- Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:136-139.
- Jordan DC (1984). Family III. *Rhizobiaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I, pp. 234–242. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- Kaneko T, Nakamura Y, Salto S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watane A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumo A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sgimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7:331-338
- King CA, Purcell LC, Vories ED (2001) Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. *Agron. J.* 93, 79-186.
- Kjaer J, Olsen P, Barbebo HC, Juhler RJ, Planbourg F, Grant R, Gudmundsson L, Brüh W (2004) The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme 1999-2003 Geol. Survey of Denmark and Greenland. Ministry of the Environment. Danish Inst of Agric. Sci. Ministry of Agric. And Fisheries, 101-107
- Krzysko-Lupicka T, Orlik A (1997) The use of glyphosate as the sole source of phosphorus of carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* 34, 2601-2605
- Laitinen P, Rämö S, Nikunen U, Jauhiainen L, Siimes K, Turtola E (2009) Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant soil.* 323: 267 – 283
- Lavado RS y Alconada M (1994) Soil properties behavior on grazed and ungrazed plots of a grassland sodic soil. *Soil Technology* 7: 75-81.
- Lemcoff JH (1992). Río de la Plata Grasslands. Climate. In Coupland, R.T. (ed.). *Ecosystems of the World 8A: Natural Grasslands*, Elsevier, Amsterdam. 376-377.
- León, R. (1975) Las comunidades herbáceas de la Región de Castelli-Pila. Monografía 5. CIC, La Plata, Pcia. de Bs. As. Pg. 75-107.
- León, R.J.C., Movia, C. y Valencia, R. (1975) Relación entre unidades de paisaje, suelo y vegetación, en un área de la región Castelli-Pila. Monografías, CIC, La Plata. , v.5: 110 - 132.
- León, R.; Burkart, S. y Movia, C. (1979) Relevamiento Fitosociológico del Pastizal del Norte de la Depresión del Salado. La Vegetación de la República Argentina, Serie Fitogeográfica N° 17. Sec. de Est. de Agricultura y Ganadería – INTA, 94 Pg.
- Liu CM, McLean PA, Sookdeo CC, Cannon FC (1991) Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied & Environmental Microbiology* 57, 1799-1804.
- Mallory-Smith CA & Retzinger EJ Jr (2003) Revised Classification of Herbicides by Sites of Action for Weed Resistance Management Strategies. *Weed Technology* 17(3): 605-619.
- Maqueda C, Morillo E, Undabeytia T, Martín F. (1998) Sorption of glyphosate and Cu II on a natural fulvic acid complex: mutual influence. *Chemosphere* 1998; 37:10631072
- Maresca S. 2010. Presente y futuro en la Cuenca. *Revista Ida y Vuelta Rural*. Ediciones INTA 27: 14-15.
- Martensson AM (1989). Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil. Biol. Biochem.* 24: 435-445
- Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J (1996) *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci* 15: 113-114
- Maxwell CA, Phillips DA (1990) Concurrent synthesis and release of nod-gene-inducing flavonoids from alfalfa roots. *Plant Physiol* 93: 1552-1558

- Miñón DP, Sevilla GH, Montes L y Fernández ON, 1990. Lotus tenuis: leguminosa forrajera de la Pampa Deprimida. Unidad Integrada Balcarce. FCA-EEA Boletín técnico nº 98. ISSN: 0522-0548
- Montes L (1988). Lotus tenuis. Rev Arg. Prod. Anim. 8: 367-376
- Moorman TB (1989). A review of pesticide effects on microorganisms and soil fertility. J. Prod. Agric. 2: 14-22
- Moorman TB, Becerril JM, Lydon J, Duke SO (1992). Production of hydroxybenzoic acids by Bradyrhizobium japonicum strains after treatment with glyphosate. J. Agric. Food Chem. 40: 289-293.
- Motekaitis RJ, Martell AE. (1985) Metal chelate formation by N-phosphonomethylglycine and related ligands. J Coord Chem 1985; 14:139149.
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995). Symbiotic nitrogen fixation. Plant Cell 7, 869–885.
- Nomura NS & Hilton HW (1977). The absorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. Weed Research 17: 113-121
- Paruelo JM, JP Guerschman y SR Verón (2005). Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. Fac de Agron, UBA. Ciencia hoy. v 15 N° 87: 14-23
- Piccolo A, Celano G. (1994) Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. Environ Toxicol Chem 1994; 13:17371741
- Piccolo A, Celano G, Arienzo M, Mirabella A. (1994) Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. J Environ Sci Health B 1994; 29:11051115
- Quinn JP, Peden JMM, Dick RE (1988) Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. Applied Microbiology & Biotechnology 29, 511-516
- Quinos P, Insausti P y Soriano A (1998). Facilitative effects of Lotus tenuis on Paspalum dilatatum in lowland grassland of Argentina. Oecología 114: 427-431.
- Quiros R, Boveri MB, Petracchi CA, Rennella AM, Rosso JJ, Sonnsnovsky A y von Bernard HT (2006) Los efectos de la agriculturización del humedal pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas. Eutrofização na América do Sul. 1-16
- Ratcliff AW, Busse MD, Shestak CJ (2006) Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. Appl. Soil. Ecol. 34 114-124
- Reddy KN, Hoagland RE, Zablotowicz RM (2000). Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (Glycine max) varieties. J. new Seeds 2, 37-52.
- Reddy KN, Rimando AM, Duke SO (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosateresistant soybean. J. Agric. Food Chem. 52, 5139–5143.
- Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer J, Marvel T (1977) Metabolism and Degradation of Glyphosate in Soil and Water. J. Agric. Food Chem., 25 (3): 517–528
- Salazar Lea Plaza JC y Moscatelli G (1989). Mapa de suelos de la Pcia. de Bs. As. SAGyP- INTA. Buenos Aires. 525 p.
- Sannazzaro AI<sup>1</sup>, Bergottini VM, Paz RC, Castagno LN, Menéndez AB, Ruiz OA, Pieckenstein FL, Estrella MJ. (2010) Comparative symbiotic performance of native rhizobia of the Flooding Pampa and strains currently used for inoculating Lotus tenuis in this region. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011 Feb;99(2):371-9. doi: 10.1007/s10482-010-9502-9. Epub 2010 Sep 2. PubMed PMID: 20811776.
- Santos A y Flores M (1995). Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. Letters in Applied Microbiology 20, 349-352.
- Sawicka A & Selwet M (1998). Effect of active ingredients on Rhizobium and Bradyrhizobium legume dinitrogen fixation. Polish Journal of Environment Studies v7 n5: 317-320
- Sprankle P, Meggitt WF, Penner D (1975) "Rapid Inactivation of Glyphosate in Soils". Weed Sci., 23: 224-228.
- Sprankle P, Meggitt WF, Penner D (1975) "Adsorption, Mobility, and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil". Weed Sci. 1975b, 23: 229-234.

- Sprent JI & Sprent P (1990) Nitrogen-fixing Organisms: pure and applied aspects, Chapman and Hall, London, UK.
- Steinrücken HC & Amrhein N (1984). 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. 1. Purification and properties. Eur. J. Biochem. 143: 341-349.
- Tricart JLF (1973). Geomorfología de la Pampa Deprimida. Buenos Aires. INTA. 202p.
- UNL (2010) Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato. Santa Fé. 270 pp.
- Vázquez, P; S Masuelli; G Platzeck & O Boolsen. 2008. Recurrencia de anegamiento en la depresión del Río Salado: Subcencia B4. Revista de Teledetección de la Asociación Española de Teledetección 30: 47-59.
- Veiga F, Zapata JM, Marcos MLF, Alvarez E (2001) Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, northwest Spain. Science of the Total Environment, Amsterdam, v. 271: 135-144
- Vervoorst, FB (1967). Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado. La vegetación de la República Argentina, Serie Fitogeográfica N° 7. Buenos Aires INTA. 259 p.
- Vignolio OR, Maceira NO y Fernandez NO (1994) Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. Ecología austral 4: 19-28
- Vincent JM (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vlassak K M and Vanderleyden J (1997) Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. Crit. Rev. Plant Sci. 16. 163- 229.
- Wardle DA, Nicholson KS, Rahman A (1994) Influence of herbicide application on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter. New Zealand Journal of Agricultural Research, Wellington, v. 37: 29-39
- Waters JK, Hughes BL, Purcell LC, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW (1998) alanine, not ammonia, is excreted from N2-fixing soybean nodule bacteroids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 12038-12042.
- Woodburn, A. T. (2000), Glyphosate: production, pricing and use worldwide. Pest. Manag. Sci., 56: 309–312. doi: 10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<309::AID-PS143>3.0.CO;2-C
- Zabaloy MC, Gomez MA (2005) Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. Biol Fertil Soils 42:83-88
- Zablotowicz RM y Reddy KN (2004). Impact of glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. J Environ Qual 33: 825-831
- Zablotowicz RM y Reddy KN (2005). Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate-resistant soybean. Crop Protection 26: 370-376.
- Zhao B, Zhang J, Gong J, Zhang H, Zhang C (2009) Glyphosate mobility in soil by phosphate application. Laboratory column experiment. Geoderma 149: 209-297
- Zobiole LHS, Oliveira RS, Kremer RJ, Constantina J, Yamada T, Castro C, Oliveira FA, Oliveira A (2010) Effect of glyphosate on symbiotic N2 fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. Applied Soil Ecology, v. 44: 176–180

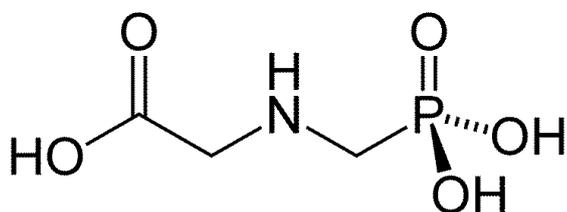
# Anexo I

## Ficha técnica del Glifosato

**Fórmula química del principio:** C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P

**Número de CAS:** 1071-83-6

**Peso molecular:** 169



**Punto de fusión:** 189.5 °C (999 g/Kg)

**Punto de ebullición:** se descompone

**Presión de vapor:** 1.31 x 10<sup>-5</sup> Pa (25°C, acid)

**Constante de disociación:** pKa: 2.34 (20 °C), 5.73 (20 °C), 10.2 (25 °C)

**Solubilidad en agua:** pH 2: 10.5 ± 0.2 g/l (20 °C, 995 g/kg)<sup>12</sup>

**Log Kow:** -0,7 a pH 1; -1,15 a pH 3; -1,30 a pH 5; -2,9 a pH 7; -3,05 a pH 7,5; -1,90 a pH 9; -0,80 a pH 11

**Coefficiente de partición:** Log n-octanol/agua entre 4,59 y 1,70

**Coefficiente de partición agua - sedimento suelo (normalizado):** entre 9 y 600.000 l/kg

**Constante de la ley de Henry:** 5,36 x 10<sup>-15</sup> atm.m<sup>3</sup>/mol (25 °C)

**Coefficiente de reparto carbono orgánico- agua (Koc):** 21000 ml/g.<sup>13</sup>

<sup>12</sup> European Comission, 2002

<sup>13</sup> UNL, 2010

## Anexo II

Datos utilizados para determinar la tolerancia de la colección de rizobios provenientes de suelo con historia de glifosato a los herbicidas comerciales Round Up Full II y Glacoxan Total.

Cepas	Herbicida Comercial														
	Round Up Full II							Glacoxan Total							
	0,0066mM	0,015mM	0,066mM	0,152mM	1,52mM	3,276mM	7,6mM	15,23mM	0,0066mM	0,015mM	0,066mM	0,152mM	1,52mM	3,276mM	
x1				T	S	S							T	T	S
x2		T		S	S		S	S	T		T	T	T	S	
x3		T		S	S		S	S					T	S	
x4		T		T	T	S	S	S	T		T	T	S	S	
x5		T		S	S		S	S	T		T	S	S	S	
x6		T		T	S	S					T	T	T	S	
x7		T		T	S	S			T		T	T	S	S	
x8				T	S		S	S				T	T	S	
x9		T		S							T	T	S	S	
x10				T	S		S	S				T	T	S	
x11				T	S		S	S				T	T	S	
x12		T		T	S		S	S	T		T		T	S	
x13		T		T	S		S	S	T		T	T	S	S	
x14	T	S		S	S		S	S	T	S	S			S	
x15		T		S	S		S	S	T		T	T	S	S	
x16		T		S	S		S	S	T		T	T	S	S	
x17				T	S		S	S				T	T	S	
x18	T	S		?					T		T	T	S	S	
x19	T	S		S	S		S	S	T		T	T	S	S	
x20		T		S	S		S	S	T		T	T	T	S	
x21		T		S	S		S	S	T	T	S			S	
x22		T		T	S	S						S	S	S	
x23	T	S		S							T	T	S	S	
x24		T			T	S	S	S	T		T	T	T	S	
x25				T	S		S	S				T	T	T	
x26	T	S		S	S		S	S	S		S			S	
x27				T	S		S	S				T	T	S	
x28		T		S	S		S	S	T		T	S	S	S	
x29	S	S		S	S		S	S	T	S	S			S	