

INFLUENCIA DE UN PERIODO DE STRESS HIDRICO Y DE ALGUNOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO SOBRE EL GRADO DE NODULACION DE DOS CULTIVARES DE SOJA *

R. W. Racca (1), R. Bottini (2), J. Arguello (1),
A. L. Chessa (2), D. Collino (1) y R. Tizio (2).

INTRODUCCION

Varios autores (2, 6, 11) demostraron que la creación de déficits hídricos inhiben la formación de nódulos y el crecimiento de los preexistentes en numerosas leguminosas determinando, en consecuencia, una apreciable disminución en la fijación de nitrógeno atmosférico. Paralelamente, nódulos de soja en condiciones de "stress" hídrico, disminuyen su actividad reductora de nitrógeno atmosférico por aumento del tenor de etanol a nivel de los nódulos (14).

Por otra parte, otros autores (10, 19, 20) demostraron que el stress hídrico provoca aumentos considerables y súbitos en el tenor de ácido abscísico (ABA) en el follaje de poroto, avena, soja y otras especies no leguminosas. Dichos autores sugieren que la inducción de la síntesis y/o liberación de ABA constituirá un factor de regulación de pérdida de agua causada

por cierre estomático, que efectivamente ocurre cuando dicho inhibidor se aplica al follaje de las mismas plantas (7, 20). Por otra parte, Milborrow y Robinson (9) encontraron aumentos considerables de ABA en raíces de plantas sometidas a stress hídrico, hecho que sugeriría un proceso de migración de dicho inhibidor desde el follaje hacia aquellos órganos.

Los resultados obtenidos por Phillips (11), parecen confirmar dicha presunción,

(*) *Trabajos realizados con subsidios de la Secretaría de Estado de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Río Cuarto (Programa 477) y de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Córdoba.*

(1) *Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.*

(2) *Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.*

ya que en arveja este autor obtuvo inhibición de la nodulación con aplicaciones de ABA a partir de $3.8 \times 10^{-7}M$ sin alterar el crecimiento de los pelos absorbentes ni su infección por *Rhizobium*. Dicho autor sugiere que la inhibición de la nodulación ocurre por inhibición de la división celular y de la poliploidización de células corticales de la raíz, fenómeno que es estimulado por citocininas (1).

No existen por el momento trabajos que hayan estudiado la posibilidad de antagonizar o revertir los efectos detrimentales producidos por ABA, mediante la acción de otros reguladores del crecimiento (citocininas y giberelinas), cuya acción antagónica se conoce en relación a otros fenómenos fisiológicos tales como dormición de yemas y semillas (4, 8, 12, 15, 16, 17).

El presente trabajo tuvo por objeto estudiar la evolución de sustancias inhibidoras en follaje y raíz de plantas del cv. Halesoy 71 sometidas o no a un período de stress hídrico, y la posible alteración de los patrones evolutivos de tales sustancias por acción del ácido giberélico (AG_3) aplicado por vía foliar.

En una segunda etapa se trató de reproducir el efecto detrimental de un período de sequía sobre la nodulación, mediante aplicaciones por vía foliar de ABA en plantas del cv. Lee crecidas continuamente en capacidad de campo (c. c.). Por último, se trató de establecer si dicho presunto efecto inhibitorio podía ser revertido mediante aspersiones simultáneas de AG_3 .

MATERIALES Y METODOS

a) Ensayo 1:

Se estudió la evolución de inhibidores y su posible desaparición o disminución a nivel foliar y radical por acción de AG_3 en plantas sometidas o no a un período de "stress" hídrico.

El ensayo se estructuró de la siguiente manera:

- Variante I: plantas mantenidas continuamente en condiciones de c. c.
- Variante II: plantas sometidas a un período de "stress" hídrico hasta punto de marchitez permanente (PMP) durante el proceso de nodulación.

Para cada una de dichas variantes se estructuraron 2 subvariantes:

1. Plantas testigo no asperjadas con AG_3
2. Plantas asperjadas con AG_3 100 ppm al final del período de sequía, cuando las hojas inferiores mostraron signos de marchitez permanente.

El ensayo se realizó en condiciones de invernáculo, bajo luz continua y a temperaturas de $30^\circ C$ durante el día y $15^\circ C$ durante las horas correspondientes a la noche.

Se sembraron 6 macetas por tratamiento, con 2 plantas por maceta, utilizándose semillas seleccionadas del cultivar Halesoy 71 previamente inoculadas con *Rhizobium japonicum* CKC.

El medio edáfico se compuso de una mezcla de tierra de cultivo, vermiculita y arena en proporción 2: 1: 1 v/v, el que manifestó una c.c. de 16,7% de agua (-0.3 atm) y un PMP de 7,0% (-15 atm). La determinación de los respectivos potenciales agua se efectuó mediante el método de membrana de presión.

Cuarenta y cuatro días después de la siembra, se suspendió el riego en las variantes "sequía". Seis días después las plantas mostraron síntomas de marchitez permanente. En ese momento las subva-

riantes "AG₃" fueron asperjadas con una solución hormonal de 100 ppm hasta primer escurrimiento. A continuación las plantas de todas las variantes se regaron hasta c.c. Cuarenta y ocho horas después se extrajeron muestras de follaje (hojas sin pecíolo, yema apical y axilares) y de raíces de 6 plantas por variante. Las muestras, previamente homogeneizadas, fueron biofilizadas de inmediato.

La extracción, purificación y separación de sustancias inhibitoras se efectuó mediante particiones en solventes orgánicos y cromatografía en capa delgada según técnica descrita por Correa *et al.* (5) y Bottini *et al.* (3). La evaluación biológica de los extractos se efectuó mediante la prueba del crecimiento recto de secciones de coleóptilos de trigo (3,5). Pruebas en blanco con ABA puro (Sigma Chem. Co) se realizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas a los efectos de determinar sus valores de R_f.

En los restantes lotes de plantas se procedió al recuento del número de nódulos a los 4 y 11 días después de haber finalizado el período de sequía.

b) Ensayo 2:

Se utilizaron plantas de 44 días de edad del cv. Lee, crecidas a partir de semillas seleccionadas, previamente inoculadas

con *Rhizobium japonicum* CKC. El ensayo se realizó en las mismas condiciones ambientales y de temperatura que el descrito anteriormente.

Se sembraron 3 macetas por tratamiento, dejándose 2 plantas por maceta en ensayo completamente aleatorizado que comprendió:

- a) 4 grupos de plantas sometidas a un período de "stress" hídrico (según se detalla en el cuadro 1), y tratadas de la siguiente manera:
- b) 4 grupos de plantas tratadas como en a), pero mantenidas permanentemente en c. c. hasta el final del experimento.

Grupo 1: plantas asperjadas con ABA 10 ppm.

Grupo 2: plantas asperjadas con AG₃ 75 ppm.

Grupo 3: plantas asperjadas con ABA 10 ppm + AG₃ 75 ppm.

Grupo 4: plantas asperjadas con agua destilada.

En todos los casos las soluciones contuvieron Tween 20 a razón de 7 gotas por litro.

CUADRO 1: Tratamientos, condiciones de humedad del suelo y fechas de aspersiones de ABA y AG₃.

Tratamientos	Aspersiones (fechas)	Condiciones hídricas del suelo	Días desde la siembra
1°	11 - 10 - 78	- 0.3 atm (16.7 %)	44
2°	14 - 10 - 78	- 8.0 atm (10.3 %)	47
3°	17 - 10 - 78	- 15.5 atm (6.8 %)	50

Los tratamientos se efectuaron en 3 oportunidades, según el cuadro 1, también indicativo de la duración del período de sequía y las fechas de aspersión de ABA y de AG₃.

Luego del tercer tratamiento todas las variantes se regaron hasta c.c. Cuarenta y ocho horas después se efectuó la cosecha de las plantas, realizándose las determinaciones que figuran en el Cuadro 3.

El medio edáfico fue el mismo que se empleó en el Ensayo 1.

RESULTADOS

Ensayo 1:

Del análisis de los histogramas de la Figura 1 se desprende que no hubo mayores variaciones en el contenido de inhibidores en el follaje de plantas sometidas o no a sequía. No obstante, en la zona de Rf. 0,32 - 0,45, correspondiente a ABA, se observa una mayor actividad en las variantes sometidas a "stress" hídrico. Es interesante destacar la existencia de actividad auxínica en Rfs adyacentes a los correspondientes al inhibidor.

Las variantes tratadas con AG₃ mostraron una fuerte actividad inhibidora en Rfs probablemente correspondientes a ABA endógeno, pero observándose desaparición de la misma actividad a Rfs más altos.

En los histogramas de extractos de raíz se observa que los correspondientes a "sequía" muestran una actividad inhibidora, presuntamente debida a ABA, que es semejante en ambas condiciones hídricas.

Las diferencias más apreciables surgen al analizar los correspondientes a las variantes "sequía" y "c.c." tratadas con fuerte disminución de la actividad inhibi-

dora en todos los Rfs, y desaparición casi total de la misma actividad en la correspondiente a "sequía" con aparición de una moderada actividad auxínica.

El Cuadro 2 muestra que la sequía provoca una fuerte disminución en el número de nódulos en relación a las plantas mantenidas en c.c. En éstas, la nodulación continúa, si se comparan las cifras del primer y segundo recuento.

El AG₃ ejerce sobre la variante "c.c.", el mismo efecto que la sequía en cuanto al número de nódulos, pues parece causar una disminución a la mitad en el número de ellos, teniendo en cuenta el primer y segundo recuentos. Resulta también evidente que el AG₃ y la sequía ejercen un efecto sinérgicamente antagonista sobre el número de nódulos del primer recuento, ya que aquél resulta un 50% inferior a los correspondientes a las variantes "sequía" y "c. c. + AG₃".

También se observa una marcada reducción del diámetro de los nódulos en condiciones de sequía, que se acentúa en el caso de la variante "sequía + AG₃".

Ensayo 2:

El Cuadro 3 muestra que el ABA, en lugar de inhibir nodulación en el cv. Lee en condiciones de c.c., simulando un efecto detrimental de sequía, anuló el efecto parcialmente inhibidor del "stress" hídrico, expresado en una disminución del 53% en el número de nódulos.

El efecto estimulante del regulador también se manifiesta en condiciones de c.c., expresado en un 30% de aumento en relación al testigo de la misma condición.

El AG₃ ejerce un efecto semejante al ABA bajo condiciones de "stress" hídrico. No obstante, en condiciones de c.c. prácticamente no afecta el grado de nodulación.

CUADRO 2: Efecto de un período de "stress" hídrico y del AG₃ sobre el grado y modalidad de nódulos en soja cv. Halesoy 71.

Tratamientos	c.c.		sequía		c.c. + AG ₃		sequía + AG ₃	
	24-10	31-10	24-10	31-10	24-10	31-10	24-10	31-10
Fechas de recuento de nódulos								
Nº de nódulos	97	240	106	59	98	51	45	46
Diámetro promedio de nódulos (en mm)	4,5	4,0	2,5	3,5	5,0	4,5	2,5	1,0

CUADRO 3: Número total y peso fresco de nódulos.

Tratamientos	Nº de nódulos y % en relación al testigo sequía	Peso fresco de nódulos cada 2 plantas (gr)	Peso fresco promedio de cada nódulo (mg)
Sequía			
H ₂ O (T)	112-100 %	0,84-100 %	7,5
ABA	187-167 %	1,13-135 %	6,0
AG ₃	200-179 %	2,29-273 %	11,3
ABA + AG ₃	350-313 %	3,24-388 %	9,0
Capacidad de campo			
H ₂ O (T)	171-153 %	1,54-184 %	9,0
ABA	222-198 %	2,02-240 %	9,1
AG ₃	183-163 %	1,79-214 %	9,8
ABA + AG ₃	234-209 %	1,92-230 %	8,2-

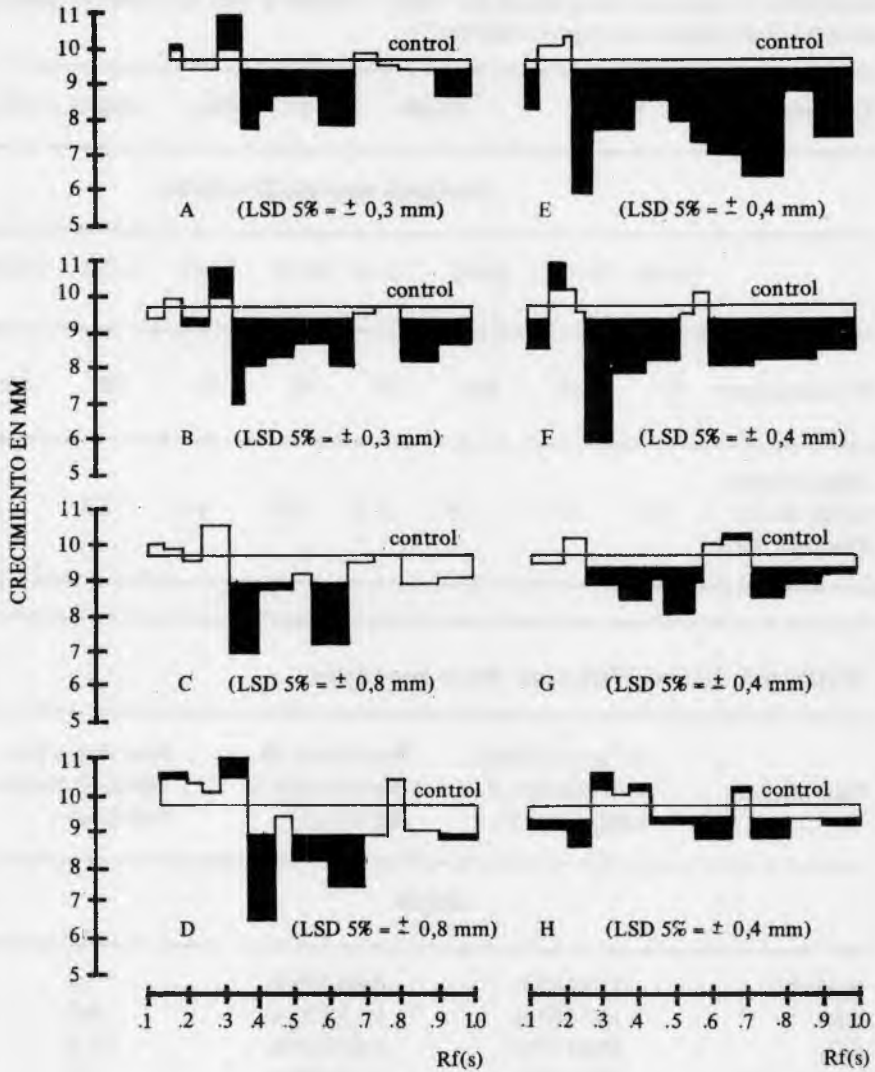


Figura 1: Evolución del grado de inhibición manifestado por extractos de follaje y raíces, medida mediante la prueba de crecimiento recto de secciones de coleoptilos de trigo, de plantas sometidas o no a un período de sequía y tratadas o no con AG₃. A, B, C y D: extractos de follaje; E, F, G y H: extractos de raíces. A y E: plantas mantenidas en c.c.; B y F: plantas sometidas a sequía; C y G: id. id. tratadas con AG₃; D y H: id. id. tratadas con AG₃.

Por último, se constata que los efectos de ambos reguladores en "sequía" se adicionan. Tal efecto aditivo no se observa en condiciones de c.c. Es necesario precisar que el ABA no indujo amarillamiento ni caída de hojas, ni frenó el crecimiento caulinar como ocurre en ciertos cultivares de soja (13).

DISCUSION

Ensayo 1:

La disminución del número de nódulos por sequía no se correlacionó con un aumento de los niveles de ABA endógeno a nivel radical en el cv. Halesoy 71. Por el contrario, la fuerte acción détrimental provocada por el AG_3 , tuvo lugar en ausencia de actividad inhibidora a nivel radical, ausencia que precisamente se correlaciona con la aplicación del regulador.

Los resultados de los histogramas no permiten deducir si la ausencia de actividad de ABA endógeno en las raíces de las variantes tratadas con la giberelina se debe a: metabolización del inhibidor, o a una inhibición del transporte del mismo desde el follaje.

Los resultados del Cuadro 2, confirman los obtenidos por otros autores (2, 6 y 11) en el sentido que la sequía inhibe fuertemente la nodulación.

La acción détrimental ejercida por el AG_3 sobre el mismo fenómeno ha sido señalada con anterioridad por Chailakhyan *et al.* (1971, citado por Artamonov (1)).

Ensayo 2:

La aplicación de ABA, en lugar de simular un efecto de sequía en c.c. señalado por otros autores (7, 20), revirtió por el contrario el efecto détrimental provocado por esa condición hídrica. Este hecho indica, a nuestro entender, que el efecto del "stress" hídrico no es causado

por mayores niveles endógenos de dicho regulador, sino que tiene otro origen, máxime teniendo en cuenta que aún en c.c. el ABA ejerce una actividad moderadamente estimulante sobre la nodulación.

El hecho que los efectos del AG_3 y del ABA se adicionen, sugiere que ambos actúan a través de mecanismos diferentes sobre la estimulación de la nodulación.

Los resultados opuestos obtenidos en relación a la acción del AG_3 sobre la nodulación en los cultivares estudiados, sugiere la necesidad de no generalizar mecanismos fisiológicos en relación a ese fenómeno en la especie *Glycine max* (L.) Merrill. Abona esta presunción el hecho que ciertos cultivares de soja muestran una respuesta fisiológica muy diferente a la acción del ABA según la demostraron Sloger y Caldwell (13). En efecto, de los 34 cultivares estudiados por estos autores, 6 resultaron muy sensibles en cuanto a la acción sobre la senescencia y crecimiento caulinar de las plantas; 8 resultaron moderadamente afectadas y 20 no manifestaron ninguna anomalía.

Por otra parte, se conoce que dentro de la especie *Glycine max* hay formas o cultivares de diferente reacción fotoperiódica (18) y formas de crecimiento definido e indefinido, hecho que sugiere un amplio espectro genético a partir del cual es dable esperar reacciones fisiológicas diferentes bajo la acción de un único factor.

En consecuencia, consideramos que las conclusiones sobre la acción de reguladores en relación a la nodulación y bajo diferentes regímenes hídricos, deben circunscribirse sólo al cultivar en estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Artomonov, V. I. 1975. "Some aspects of practical use of kinetin". *Fiziol. Rast.* 22: 1283-1290.

- 2) Bergersen, F. J. 1965. "Anmonia: an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules". *Australian J. Biol. Sci.* 18(1): 1-9.
- 3) Bottini, R.; G. A. de Bottini & N. S. Correa. 1976. "Changes in the levels of growth inhibitions and gibberellin like substances during dormancy of peach flower buds. II". *Phyton* 34 (2): 157-167.
- 4) Bradbeer, J. W. 1968. "Studies in seed dormancy. IV. The role of endogenous inhibitions and gibberellin in the dormancy and germination of *Corlylus avellana* (L.) seeds". *Planta* 78: 266.
- 5) Correa, N. S.; R. Bottini; G. A. de Bottini; M. Goleniawski y L. Gordon. 1975. "Cambios en los niveles de inhibidores del crecimiento y geberelinas endógenas durante el reposo vegetativo de yemas de duraznero". *Phyton* 33 (2): 193-204.
- 6) Hardy, R. W. F.; R. C. Burns; R. R. Herbert; R. D. Holsten & E. K. Jackson. 1971. "Biological nitrogen fixation: a key to world protein". In: T. A. Lie & E. G. Wulder, eds. "Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats". *Plant & Soil Spec.* pp. 561-590.
- 7) Jones, R. J. & T. A. Mansfield. 1970. "Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscissic acid". *J. Exp. Bot.* 21: 714-719.
- 8) Khan, A. A. 1968. "Inhibitions of gibberellic acid induced germination by abscissic acid and reversal cytokinins". *Plant Physiol.* 43: 1463.
- 9) Wilborrow, B. V. & D. R. Robinson. 1973. "Factors affecting the biosynthesis of abscissic acid". *J. Exp. Bot.* 24: 537-548.
- 10) Mizraki, Y.; A. Blumenfeld & A. E. Richmond. 1970. "Abscissic acid and transpiration in leaves in relation to osmotic root stress". *Plant Physiol.* 46: 169.
- 11) Phillips, D. A. 1971. "Abscissic acid inhibitions of root nodule initiation in *Pisum sativum*". *Planta* 100: 181-190.
- 12) Sankhla, N. & D. Sankhla. 1968. "Interaction between growth regulators and (+) -abscissic II in seed germination". *Z. Pflanzenphysio.* 58: 402.
- 13) Sloger, C. & B. E. Caldwell. 1970. "Responce of cultivars of soybean to synthetic abscissic acid". *Plant Physiol.* 45: 634.
- 14) Sprent, J. & A. Gallacher. 1976. "Anaerobiosis in soybean root nodules under water stress". *Soil Biol. & Biochem.* 8(4): 317.
- 15) Tizio, R. & E. Maneschi. 1973. "Different mechanism for tuber initiation and their dormancy in the potato *Solanum tuberosum* (L.)". *Phyton* 31: 51.
- 16) Wareing, P.F. 1969. "The control of bud dormancy in seed plants". pp 241-262, in "Dormancy and survival" by Woolhouse, H. W. (Symp. Soc. Exptl. Biol. 23).
- 17) Wareing, P.F. y P.F. Saunders. 1971. "Hormones and dormancy". *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22:261.
- 18) White, R.O. 1947. "Crop production and environment". Faber y Faber Ltd. London.
- 19) Wright, S.T.C. 1969. "An increase in the "inhibitor BETA" content of detached wheat leaves following a period of wilting". *Planta* 86:10.
- 20) Wright, S.C.T. y R.W.P. Hiron. 1969. "Abscissic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting". *Nature* 224:719.