

# Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua

ADRIANA M. ALIPPI<sup>1</sup>\*, ANA C. LÓPEZ<sup>2</sup>, PEDRO A. BALATTI<sup>1</sup>

*Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales,  
Universidad Nacional de La Plata, Calles 60 y 119 S/N, 1900, La Plata Argentina.*

<sup>1</sup>*Investigadores de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina;*

<sup>2</sup>*Investigadora de CONICET (CCT La Plata), Argentina.*

\*Correspondencia. E-mail: alippi@biol.unlp.edu.ar

## RESUMEN

El género *Agrobacterium* incluye especies fitopatógenas que inducen la formación de agallas en el cuello o la proliferación de raíces en cabecera en más de 600 especies de dicotiledóneas, y especies no patógenas cuyo hábitat natural es el suelo. Como no es posible erradicar a las especies patógenas y habida cuenta de que más del 80 % de las infecciones puede provenir de viveros, es importante evitar la diseminación de la enfermedad. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar técnicas sensibles y precisas que, aisladamente o combinadas, permitan detectar la presencia de especies y biovaras de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. Se comprobó que con la estrategia combinada de realizar aislamientos en los medios semiselectivos D1, D1-M y YEM-RCT; PCR multiplex sobre el gen 23S ADNr; PCR específica sobre los genes *virC1* y *virC2* y bioensayos en plántulas de pimiento cv. California Wonder y en hojas cortadas de kalanchoe, se reduce la posibilidad de obtener falsos negativos y/o falsos positivos. Por lo expuesto, esta combinación de técnicas constituye una herramienta adecuada para el diagnóstico de cepas patógenas de *Agrobacterium* a partir de distintos tipos de muestras.

**Palabras clave:** *Agrobacterium*, técnicas de detección, suelo, agua, agalla de corona, PCR

## ABSTRACT

**Methods for the detection of *Agrobacterium* from plant, soil and water samples.** The genus *Agrobacterium* includes phytopathogenic bacteria that induce the development of root crown galls and/or aerial galls at the base of the stem or hairy roots on more than 600 species of plants belonging to 90 dicotyledonous families and non-pathogenic species. These bacteria being natural soil inhabitants are particularly difficult to eradicate, which is a problem in nurseries where more than 80% of infections occur. Since early detection is crucial to avoid the inadvertent spread of the disease, the aim of this work was to develop sensitive and precise identification techniques by using a set of semi-selective and differential culture media in combination with a specific PCR to amplify a partial sequence derived from the *virC* operon, as well as a multiplex PCR on the basis of 23SrDNA sequences, and biological assays to identify and differentiate species and biovaras of *Agrobacterium* obtained either from soil, water or plant samples. The combination of the different assays allowed us to reduce the number of false positive and negative results from bacteria isolated from any of the three types of samples. Therefore, the combination of multiplex PCR, specific PCR, isolations in semi-selective D1, D1-M and YEM-RCT media combined with bioassays on cut leaves of Kalanchoe and seedlings of California Wonder pepper cultivar constitute an accurate tool to detect species and biovaras of *Agrobacterium* for diagnostic purposes.

**Key words:** *Agrobacterium*, soil, water, crown gall disease, detection techniques, PCR

## INTRODUCCIÓN

*Agrobacterium* es un género polifilético que pertenece a la subdivisión alfa de la subclase *Proteobacteria*, familia *Rhizobiaceae*. Incluye tanto especies fitopatógenas que inducen la formación de agallas en el cuello o la proliferación de raíces en cabecera, según contengan el plásmido Ti o Ri, respectivamente, como especies no patógenas cuyo hábitat natural es el suelo (3, 13, 19, 20, 22). *Agrobacterium* infecta a más de 600 especies ubicadas dentro de 90 familias de dicotiledóneas, que incluyen cultivos de importancia económica como frutales (ciruelos, durazneros, perales, frambuesos, nogales, cerezos, arándanos),

hortícolas (tomate, pimiento, berenjena), industriales (girasol, olivo, soja), ornamentales (rosales, crisantemos) y forestales (álamos, sauces) (13, 22).

Las especies patógenas de *Agrobacterium* comparten una característica: contienen un plásmido de entre 200 y 800 pb denominado plásmido Ti (*tumor-inducing*) o Ri (*root-inducing*), según su capacidad de inducir en el hospedante la formación de agallas en la zona del cuello o la corona y/o agallas aéreas en la parte inferior del tallo, o la proliferación de raíces en cabecera, respectivamente. Esto es el resultado de un mecanismo complejo y único codificado en el plásmido, por medio del cual la bacteria transfiere ADN del plásmido Ti o Ri, que se expresa y por

ello afecta a las células vegetales. La virulencia está determinada por diferentes regiones presentes en estos plásmidos; estas incluyen el ADN de transferencia (T-DNA) y los genes de virulencia (*vir*) (7). Si bien los plásmidos Ti y Ri varían en gran medida entre las diferentes cepas bacterianas, siempre contienen genes *vir* similares (15).

Tradicionalmente, las especies del género se clasificaban de acuerdo con su capacidad patogénica; estas comprendían *A. tumefaciens*, especie polífaga que induce la formación de agallas en cuello y raíz; *A. rubi*, que induce la formación de agallas sobre un rango de hospedantes limitado, principalmente frambueso; *A. vitis*, específico de vid; *A. larrymorei*, que provoca agallas aéreas en *Ficus benjamina*, y *A. rhizogenes*, que induce el desarrollo de raíces en cabellera. Por otra parte se ubicaban las especies no patogénicas, como *Agrobacterium radiobacter* (5, 9). Posteriormente, el género aparece dividido en 4 especies, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* y *A. vitis*, las cuales, con excepción de *A. rubi*, se subdividen a su vez en biovaries sobre la base de características fisiológicas y bioquímicas (9, 22).

Este género almacena un considerable nivel de diversidad, que tal vez sea el resultado de la transferencia horizontal de ADN que ocurre naturalmente en los suelos (11). Por esta razón, las características tumorigénicas y rizogénicas de las especies se pueden transmitir al transferirse los plásmidos en forma separada, lo que genera una dinámica que determina la aparición de estirpes de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* no patogénas, por haber perdido sus respectivos plásmidos. De este modo, pueden coexistir cepas de *A. tumefaciens* que contienen el plásmido Ri y cepas de *A. rhizogenes* que contienen el plásmido Ti, que inducen la formación de raíces o de agallas, respectivamente. Esta movilidad de plásmidos no ha sido descrita ni en *A. rubi* ni en *A. vitis*, en donde solo se ha encontrado el plásmido Ti (15, 22).

Más allá de estas denominaciones, Young *et al.* (23) propusieron incluir a *Agrobacterium* dentro del género *Rhizobium*. Sin embargo, otros autores como Farrand *et al.* (6) discuten que *Agrobacterium* constituye un grupo definido y distinto dentro de la familia *Rhizobiaceae*. Por su parte, Pulawska *et al.* (18) desarrollaron una clasificación más simple basada en las diferencias encontradas en la secuencia del gen 23S ARNr. Esta metodología permite discriminar por un sistema de PCR multiplex 4 taxones, *Agrobacterium* bv. 1, *Agrobacterium* bv. 2, *Agrobacterium* *vitis* (bv. 3) y *A. rubi*, que se correlacionan con la primitiva diferenciación en biovaries manteniendo a *A. larrymorei* como una especie separada. Esta última será la nomenclatura que se empleará en este trabajo.

Si bien las agrobacterias son comunes en la microbiota del suelo, tanto en forma saprobicia como patógena, se conoce muy poco sobre la estructura de estas poblaciones bacterianas, principalmente debido a la dificultad de detectar su presencia en el suelo, la rizosfera y el material vegetal asintomático (16). Parte de esta dificultad se debe

a la presencia en el suelo de agrobacterias no patógenas y bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, que comparten características similares. Si se emplea una técnica única de detección pueden generarse falsos positivos o falsos negativos. En el caso de los medios semiselectivos o selectivos, no todos los biovaries y/o especies de *Agrobacterium* desarrollan en ellos y, por el contrario, pueden desarrollar muchas especies de rizobios presentes en el suelo, superficies vegetales y agua de riego. De esta forma, muchas especies patógenas de *Agrobacterium* pueden pasar desapercibidas al dar lugar a falsos negativos (8, 10, 13, 14, 16) cuando se emplean medios con insuficiente o con demasiada selectividad. Por otra parte, si solo se emplean métodos moleculares para su detección, pueden originarse resultados contradictorios, como ha sucedido al emplearse los primers A-C desarrollados por Haas *et al.* (8), que amplifican una secuencia del gen *virD2* presente en los plásmidos Ti y Ri. Con este sistema se ha observado entre un 12 y un 15 % de falsos positivos y un 7 % de falsos negativos (8).

Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar técnicas sensibles y precisas que, aisladamente o combinadas, permitan detectar la presencia de especies patógenas de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

Para el presente estudio se seleccionaron aislamientos de diversos hospedantes herbáceos y leñosos que presentaron síntomas de agalla en la zona del cuello o corona, aislamientos de muestras de suelo y suelo rizosférico en contacto directo con el rizoplane y aislamientos obtenidos de agua de riego provenientes de diversas regiones de la Argentina (Tabla 1). Se incluyeron cepas de colecciones internacionales de *A. tumefaciens* (ATCC 15955, LBA 958), *A. radiobacter* (K1026) y *A. vitis* (K 306 y S4), y una cepa previamente caracterizada y secuenciada de *A. rubi* (F 210) (Genbank GU580894) (2). Como controles adicionales se emplearon cepas de *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (CFN4), *Rhizobium galegae*, *Bradyrhizobium japonicum* (E109), *Synorhizobium meliloti* (2011) y *Synorhizobium freedii* (1031 HH).

### Aislamientos de bacterias a partir de plantas con síntomas

Los aislamientos a partir de plantas con síntomas de agalla en el cuello o corona se obtuvieron luego de desinfectar las agallas sin cortar (previo lavado con agua corriente para eliminar restos de suelo) por inmersión en hipoclorito de sodio al 1 %, durante 15 min en el caso de plantas leñosas (olivo, arándano, flor de cera, frambueso) y durante 5 min para las herbáceas (tomate, pimiento), y posterior enjuague por 3 pasajes en agua destilada estéril (5 min c/u). Luego del último enjuague, las agallas se cortaron en dados de 2 x 2 mm en forma aseptica. Estos se colocaron en 15 ml de agua destilada estéril, se maceraron y dejaron durante 45 min, al cabo de los cuales se agitó en un agitador tipo vórtex; con ese material se efectuaron estrías en los siguientes medios: D1 (12); D1-M (20) y YEM rojo congo (21) adicionado con telurito de potasio (Britania®, Argentina) (YEM-RCT) a una concentración final de 60 µg/ml, para aumentar la selectividad (14). Las placas se incubaron a 27 ± 1 °C por el término de 7 días como mínimo; cada 24 h se observaron para determinar desarrollo bacteriano.

### Aislamientos de suelo y suelo rizosférico en contacto directo con el rizoplano

Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad de entre 5 y 10 cm. Cada submuestra de 1 g de suelo se suspendió en 10 ml de agua destilada estéril; esta suspensión se mantuvo en agitación constante a 10 °C durante 30 min. Luego la suspensión se decantó y se mantuvo 5 min a la misma temperatura. Posteriormente se efectuaron 6 diluciones seriadas en agua destilada estéril, para luego sembrar en placas, alícuotas de 100 µl de cada una de las 3 últimas diluciones, en todos los medios de cultivo antes detallados, que se suplementaron con 50 µg/ml de cicloheximida para evitar el desarrollo de especies fúngicas presentes en las muestras de suelo. Las placas se incubaron a 27 °C ± 1 por el término de 7 días como mínimo; cada 24 h se observaron para detectar desarrollo bacteriano.

En el caso de muestras de suelo rizosférico, se trabajó con el suelo en contacto directo con el rizoplano. Las plantas se descalzaron cuidadosamente y el suelo adherido a las raíces y la zona del cuello se recolectó dentro de bolsas plásticas, luego de separarlo del material vegetal. Se tomaron submuestras de 5 g de suelo y se suspendieron en 50 ml de agua destilada estéril dentro de frascos con tapa a rosca, se mantuvo en agitación a 10 °C durante 30 min. Posteriormente se procedió de la misma manera que para las muestras de suelo.

### Aislamientos de agua de riego

Para el análisis a partir de agua, se tomaron alícuotas de 25 ml y se centrifugaron a 10 °C durante 45 minutos. Se eliminó el sobrenadante dejando el *pellet* formado en un volumen de 5 ml, este se homogeneizó por agitación en agitador tipo vórtex durante 5 min, para posteriormente efectuar diluciones seriadas en agua destilada estéril y sembrar alícuotas de 100 µl por placa en todos los medios de cultivo detallados anteriormente para suelo. Las placas se incubaron a 27 ± 1 °C por el término de 7 días como mínimo, cada 24 h se observaron para detectar desarrollo bacteriano.

### Mantenimiento de la colección bacteriana

Todas las colonias que presentaron morfología similar a la exhibida por *Agrobacterium* en los distintos medios se purificaron en medio YDC (13). Los aislamientos Gram negativos, oxidasa positivos, cuando eran cultivados en medios sin glucosa y que presentaron metabolismo oxidativo de glucosa (13, 22), se emplearon para los estudios posteriores, para lo cual se hicieron stocks en medio YEM líquido con 20 % de glicerol v/v y se mantuvieron a -80 °C.

### Bioensayos sobre kalanchoe empleando agua del lavado del material

A partir del agua de lavado del material vegetal y del concentrado de agua de riego, del suelo y del suelo rizosférico en contacto directo con el rizoplano, se efectuaron bioensayos sobre hoja cortada de kalanchoe (*Bryophyllum daigremontiana*), de acuerdo con la metodología propuesta por Beriam *et al.* (4), con las siguientes modificaciones: se seleccionaron las hojas más jóvenes, de por lo menos 4 cm de largo, provenientes de plantas de entre 10 y 20 cm de alto, las que luego del lavado en agua corriente se desinfectaron superficialmente por inmersión en etanol al 70 % durante 2 min y se dejaron en una solución comercial de hipoclorito de sodio (5 % v/v) durante 15 min. Despues se realizaron 3 lavados en agua destilada estéril, de 10 min cada uno. Las hojas se lesionaron en su parte basal mediante un corte con escalpelo estéril y se colocaron con pinzas estériles en cada suspensión de lavado o concentrado (3 repeticiones por muestra); como control se utilizó agua destilada estéril. Las hojas se dejaron en contacto con la suspensión durante 45 min, al cabo de los cuales se llevaron a tubos de Roux estériles previamente preparados con algodón y 10 ml de agua destilada estéril en la parte inferior, para mantener la humedad. Los tubos se mantuvieron en condiciones de laboratorio bajo una fuente

de iluminación conformada por 8 tubos GRO KLUX MP100 con un fotoperíodo de 12 h de luz y a una temperatura de 24-28 °C. La presencia de agallas en la zona lesionada se evaluó a partir de los 10 días de la inoculación mediante la comparación con la muestra de kalanchoe control lacerada con escalpelo. El sistema se mantuvo por espacio de 4 semanas; las muestras libres de proliferaciones se consideraron negativas. A partir de las agallas desarrolladas se efectuaron aislamientos según lo detallado anteriormente.

### Bioensayo semicuantitativo sobre hoja cortada de kalanchoe a partir de cultivos bacterianos.

Con el objeto de determinar la virulencia relativa de los aislamientos de *Agrobacterium* obtenidos en los medios semiselectivos, se empleó un bioensayo semicuantitativo en hoja cortada de kalanchoe, usando una modificación de la técnica descrita por Minnemeyer *et al.* (12). Se emplearon las hojas más jóvenes de plantas de kalanchoe desinfectadas de la forma detallada anteriormente. Estas se lesionaron empleando el extremo distal de una punta de micropipeta desechable estéril, sin atravesarlas. Se realizaron 4 lesiones por hoja, sobre las que se colocaron 5 µl de cada suspensión bacteriana en agua destilada estéril, preparada a partir de un cultivo en YEM rojo congo (YEM-RC) desarrollado a 28 °C durante 24-48 h; la concentración bacteriana fue del orden de 10<sup>9</sup> UFC/ml. Las hojas así inoculadas se colocaron dentro de placas de Petri que contenían agar agua al 2 % y 50 µg/ml de cicloheximida, para evitar la proliferación de hongos, y se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 12 h de luz a una temperatura que osciló entre los 24 y los 28 °C. A partir de los 10-12 días se evaluó la formación de tumores en el área lesionada.

### Pruebas de patogenicidad

Adicionalmente, con el fin de evaluar la patogenicidad de todos los aislamientos, se emplearon plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) cv. California Wonder de 4 semanas, obtenidas de semillas desinfectadas superficialmente y cultivadas en macetas con sustrato estéril. Se realizaron 2 repeticiones por cepa y controles. La inoculación se efectuó por lesión del tallo con aguja estéril, previamente sumergida en cada suspensión bacteriana preparada como ya se describió. Luego, cada lesión se rodeó con un trozo de Parafilm® (Pechinny Plastic Packaging Company, Chicago, EE.UU.). Las plantas inoculadas se mantuvieron dos días en cámara húmeda y después se llevaron a invernáculo durante un período de 45 días a una temperatura de 24 ± 4 °C; semanalmente se fueron registrando los síntomas observados.

### Producción de 3-cetolactosa

Para efectuar una diferenciación primaria entre los biovaries 1 y 2, se evaluó la producción de 3-cetolactosa en medio agar levadura-lactosa (13). Brevemente, se sembraron en placas cultivos de 24 h y se incubó a 28 °C; a los 3 días las placas se cubrieron con 15 ml de reactivo de Benedict y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora. La presencia de 3-cetolactosa se detectó por formación de un anillo amarillo de CuO<sub>2</sub> alrededor de las colonias bacterianas (13).

### Obtención de ADN molde para las reacciones de PCR

Se obtuvo ADN bacteriano a partir de los siguientes tipos de muestras: cultivo bacteriano puro, material vegetal con síntomas, agua de riego y agua de lavado de suelo y de lavado de suelo rizosférico.

En el caso de los cultivos puros, la extracción de ADN se efectuó a partir de colonias individuales desarrolladas en medio sólido empleando una técnica de extracción rápida mediante resina de intercambio iónico (1). Brevemente, se tomaron una a dos colonias bacterianas mediante un palillo estéril y se suspendieron en 300 µl de NaCl 1M. Cada muestra se agitó en un agitador tipo vórtex y se centrifugó a 16 000 g durante 3 minutos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* bacteriano se resuspendió

en 150  $\mu$ l de una suspensión acuosa de una resina de intercambio iónico (Chelex®, Sigma-Aldrich, Argentina) preparada al 6 % p/v. La mezcla se incubó a 56 °C durante 20 min, se agitó en agitador vórtex durante 30 segundos y se incubó a 99 °C durante 8 min. Los restos bacterianos junto con la resina se eliminaron por centrifugación y se empleó como templado de ADN 5  $\mu$ l del sobrenadante. Para la obtención de ADN molde a partir de material vegetal con síntomas, se tomaron 100  $\mu$ l del agua de difusión luego de 45 minutos y se transvasaron a un tubo Eppendorf con 900  $\mu$ l de agua bidestilada. Se mezcló vigorosamente (agitador vórtex) durante 30 segundos y se transvasaron alícuotas de 50  $\mu$ l de la dilución realizada a nuevos tubos Eppendorf. Se incubó en un baño seco a 56 °C durante 20 minutos, luego se mezcló en agitador vórtex durante 1 min y se incubó a 95 °C durante 15 minutos. En el caso del agua de riego o del lavado de suelo, el molde fue el mismo que el mencionado para el material vegetal, con la diferencia de que la segunda incubación fue a una temperatura de 99 °C durante 8 minutos.

#### Identificación por PCR

Se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de 730 pb correspondiente a las secuencias del operón *virC* localizado en los plásmidos Ti y Ri de las cepas patógenas de *Agrobacterium*. A tal fin se siguió la metodología descrita por Sawada *et al.* (19), pero se emplearon 5  $\mu$ l de ADN molde (obtenido según se detalló en el apartado correspondiente) en un volumen total de reacción de 25  $\mu$ l. Previamente se probaron diferentes cantidades de ADN, y se determinó que la óptima para esta *premix* era aquella contenida en 5  $\mu$ l del fluido sobrenadante de la preparación cruda de ADN. Se empleó un ciclador marca Eppendorf modelo Mastercycler personal®.

Para la diferenciación entre los biovar 1 y 2 y entre las especies *A. rubi* y *A. vitis*, se empleó la técnica de PCR multiplex basada en las diferencias en el gen 23S ADNr. Se utilizó para ello un primer universal forward UF y 4 primers

especies/biovar-específicos: B1R para el bv. 1; B2R para el bv. 2, AvR para *A. vitis* y ArR para *A. rubi*, respectivamente (18). Se siguieron las especificaciones de Pulawska *et al.* (18), pero empleando 5  $\mu$ l de ADN molde para un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l.

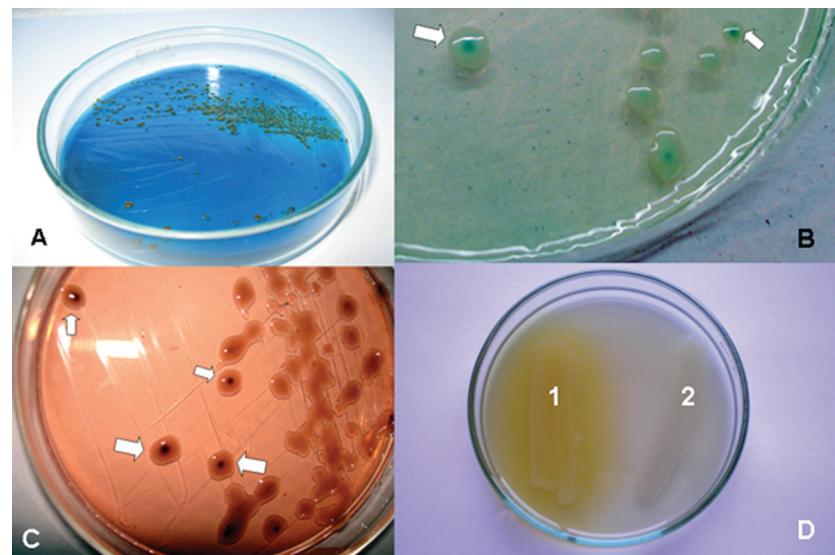
En todos los casos, los resultados de las reacciones de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,6 %; el ADN fue teñido con bromuro de etidio y observado mediante un transiluminador UV (UVP®, Instrumentación Científica Técnica, S.L., La Rioja, España). Las imágenes de los geles se digitalizaron y fotografiaron empleando el sistema de captura digital de geles Digi Doc-it, UVP v.1.1.25.

## RESULTADOS

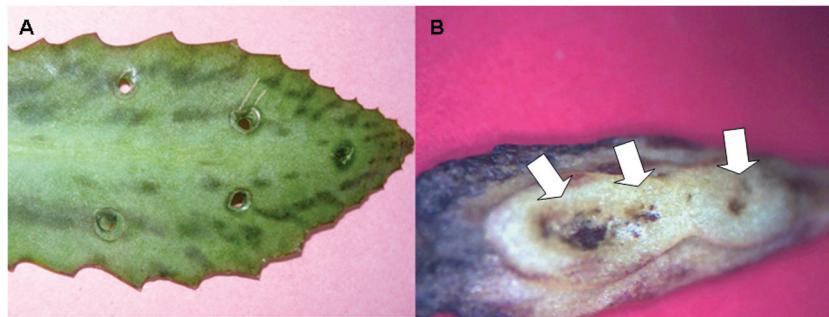
### Aislamiento de cepas de *Agrobacterium* en medios semiselectivos y diferenciales

La metodología utilizada para aislar cepas de *Agrobacterium* resultó efectiva cuando se emplearon los medios semiselectivos D1, D1-M y YEM-RCT, tanto en la evaluación de muestras vegetales provenientes de plantas con síntomas de agalla de la corona como de muestras de suelo, de suelo rizosférico en contacto directo con el rizoplano y de agua de riego.

En los medios D1 y D1-M, las colonias presentaron coloración y características típicas del género *Agrobacterium*. En el medio D1, las colonias observadas eran circulares y convexas, de color verdoso-amarillento con centros más oscuros y bordes de color blanco cremoso; a las 48-72 h de incubación presentaron un color azul muy claro y con



**Figura 1.** A. Colonias de *Agrobacterium tumefaciens* bv. 1 en medio D1, luego de 6 días de incubación. Un aislamiento de agallas (cepa F241) dio lugar a estas colonias, que son de forma convexa, mucosas, brillantes, de color verde oliva B. Colonias de *Agrobacterium rubi* desarrolladas en medio D1-M a partir de un aislamiento de agallas (cepa F253). Las colonias típicas se indican con una flecha, estas aparecen circulares, convexas, mucosas, brillantes, de color verde azulado con centros más oscuros por absorción del colorante verde de malaquita, a los 4 días de incubación. C. Colonias de *Agrobacterium* bv. 2 desarrolladas en YEM- RCT a partir de una muestra de agua de riego (cepa 100/09M1). Las colonias aparecen como muy mucosas, convexas y con los centros de color negro por acumulación de cristales de telurito metálico, a las 48 h de incubación. Las colonias típicas se indican con una flecha. D. Producción de 3-cetolactosa: 1: positivo, *Agrobacterium tumefaciens* bv. 1 cepa F268; 2: negativo, *Agrobacterium rubi* F 253.



**Figura 2.** Bioensayo semicuantitativo en hoja cortada de kalanchoe (*Bryophyllum daigremontiana*). A. Control lesionado más agua destilada estéril. B. Inoculada con la cepa F 241 de *Agrobacterium tumefaciens* bv. 1, a los 14 días.



**Figura 3.** Plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* cv. California Wonder): A. Control. B. Plántula de pimiento inoculada artificialmente con la cepa F 241 de *A. tumefaciens* bv. 1. Las flechas indican las lesiones positivas a los 45 días de efectuada la inoculación.

el correr del tiempo se tornaron de color verde oliva, pero siempre con bordes más claros, estas tomaron el color del azul bromotimol (Figura 1A).

Por otra parte, las colonias desarrolladas en el medio D1-M resultaron circulares, convexas, mucosas, brillantes, de color azul verdoso, tenue al principio, pero con centros de color azul más oscuro, debido a que metabolizan el verde de malaquita, y bordes más claros. A veces resultaron ser grisáceas o blancuzcas, pero con los centros azulados (Figura 1B).

En YEM-RCT, las colonias aparecen mucosas, convexas, circulares, con márgenes enteros y de color negro más marcado en la parte central, probablemente debido a una acumulación de cristales negros de telurito metálico (Figura 1C).

Los medios D1, D1-M y YEM-RCT restringieron el crecimiento de otras bacterias saprofíticas, con excepción de algunas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Synorhizobium*, lo que en el caso del medio YEM-RCT se debería a que son resistentes al telurito. Con respecto a los medios D1 y D1-M, las células de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Synorhizobium* que pueden estar presentes en las muestras de suelo y suelo rizosférico desarrollan en estos medios, pero luego de un período de incubación de más de 7 días pueden presentar una coloración diferente (de acuerdo con la cepa probada); asimismo, en el medio D1 pueden verse inhibidas por el LiCl.

En el medio D1-M, todas las cepas de *Agrobacterium* identificadas como bv. 1 y bv. 2, lo mismo que *A. rubi* y *A. radiobacter*, mostraron un activo crecimiento, con excepción de las cepas control de *A. vitis* K 306 y S4. No obstante, estas últimas presentaron un muy buen desarrollo al cultivarlas en YEM-RCT.

#### Bioensayos y pruebas de patogenicidad

Todas las cepas de *Agrobacterium* bv. 1, *Agrobacterium* bv. 2 y *A. rubi* provocaron la formación de agallas esféricas y esponjosas en los puntos de inoculación en hojas cortadas de kalanchoe; estas se visualizaron entre los 7 y 14 días de efectuada la inoculación (Figura 2). Las cepas de *A. vitis* K 306 y S4 indujeron zonas necróticas alrededor de los puntos de lesión, que no evolucionaron a proliferaciones celulares. La cepa de *A. radiobacter* K 1026 y los rizobios no produjeron síntomas, solo se observaron los puntos de lesión, al igual que en el testigo colocado en agua.

El pimiento cv. California Wonder respondió rápidamente a la inoculación, ya que en los puntos de lesión del tallo generó a los 7 días agallas esféricas, de color blanco-rosado a castaño claro y de aspecto verrugoso (Figura 3). Todas las cepas probadas de *Agrobacterium* bv. 1, bv. 2 y *A. rubi* indujeron lesiones en pimiento, las cepas de *A. vitis* K 306 y S4 solamente manifestaron aparición de áreas necróticas en los puntos de inoculación.

Tal cual era de esperar, las cepas de *A. radiobacter* K 1026 y los rizobios no provocaron la aparición de ningún tipo de síntoma.

En todos los casos en los que se observaron lesiones o sintomatología típica, se procedió a efectuar los reaislamientos de las cepas inoculadas y se cumplimentaron los postulados de Koch.

### Producción de 3-cetolactosa

La habilidad de las cepas de utilizar 3-cetolactosa permitió efectuar una diferenciación primaria entre los diferentes biovaras y la especie *A. rubi*. Solo las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* bv. 1 mostraron que su metabolismo da lugar a la formación de un anillo amarillo de óxido cuproso alrededor de las colonias luego del agregado del reactivo de Benedict (reacción positiva) (Figura 1D). Todas las cepas de *A. rubi*, *Agrobacterium* bv. 2, *A. radiobacter*, *A. vitis* y los rizobios dieron reacción negativa (Tabla 1).

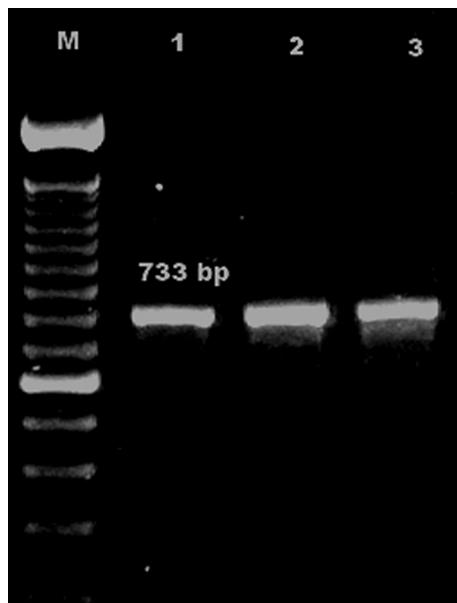
### Identificación por PCR

El 100 % de los aislamientos sospechados de ser *Agrobacterium* mostraron el producto de amplificación esperado de 730 pb mediante una PCR específica empleando los primers VCF/VCR, homólogos a una secuencia parcial del operón *virC* (genes *virC1* y *virC2*) presente en los plásmidos Ti y Ri (Figura 4). Este resultado permitió identificar con precisión la totalidad de los aislamientos que inducían la formación de agallas en *kalanchoe* y en pimiento, tanto de aquellos recuperados del agua de lavado de lesiones y/o de suelo como de los que fueron previamente aislados en los medios semiselectivos. De acuerdo con lo esperado, las cepas de *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (CFN4), *Rhizobium galegae*, *Bradyrhizobium japonicum* (E109), *Synorhizobium meliloti* (2011) y *Synorhizobium freedi* (1031 HH) y la cepa control de *A. radiobacter* no generaron producto de amplificación alguno.

Los resultados obtenidos mediante el empleo de PCR multiplex basada en las diferencias del gen 23S ADNr con-

**Tabla 1.** Denominación, hospedante, origen geográfico y algunas características de las cepas de *Agrobacterium* y las cepas de referencia utilizadas en este trabajo.

Cepa	Género, especie y/o biovar	Fuente de aislamiento	Región de origen	3-ceto-lactosa	PCR	Multiplex
ATCC 15955	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N/D	N/D	-	+	bv. 2
LBA 958	<i>A. tumefaciens</i>	N/D	N/D	+	+	bv. 1
K 1026	<i>A. radiobacter</i>	N/D	N/D	-	-	N/D
K 306	<i>A. vitis</i>	vid	Australia	-	+	vitis
S4	<i>A. vitis</i>	vid	Hungría	-	+	vitis
F 266	<i>A. rubi</i>	arándano	Morón, Argentina	-	+	rubi
F 210	<i>A. rubi</i>	arándano	Pilar, Argentina	-	+	rubi
F 236	<i>A. tumefaciens</i>	flor de cera	La Plata, Argentina	+	+	bv. 1
F 241	<i>A. tumefaciens</i>	framueso	Mar del Plata, Argentina	+	+	bv. 1
F 253	<i>A. rubi</i>	arándano	Tucumán, Argentina	-	+	rubi
F 268	<i>A. tumefaciens</i>	arándano	Concordia, Argentina	+	+	bv. 1
F 272	<i>A. rubi</i>	arándano cv. O'Neil	Entre Ríos, Argentina	-	+	rubi
F 342	<i>A. tumefaciens</i>	tomate cv. He Man	La Plata, Argentina	+	+	bv. 1
F 350	<i>A. tumefaciens</i>	suelo rizosférico de cerezo	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
F 351	<i>A. tumefaciens</i>	suelo rizosférico de cerezo	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
F 352	<i>A. tumefaciens</i>	suelo	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
F 353	<i>A. tumefaciens</i>	suelo	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
F 359	<i>A. rubi</i>	suelo	La Rioja, Argentina	-	+	rubi
F 362	<i>Agrobacterium</i> bv. 2	Olivo cv. Picual	La Rioja, Argentina	-	+	bv. 2
F 382	<i>A. tumefaciens</i>	Olivo cv. Barnea	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
F 400	<i>Agrobacterium</i> bv. 2	arándano	Buenos Aires, Argentina	-	+	bv. 2
F 448	<i>A. tumefaciens</i>	pimiento	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
F 450	<i>A. tumefaciens</i>	suelo rizosférico de duraznero	Córdoba, Argentina	+	+	bv. 1
100/09M1	<i>Agrobacterium</i>	agua de riego	La Rioja, Argentina	-	+	bv. 2
100/09M2	<i>A. tumefaciens</i>	agua de riego	La Rioja, Argentina	+	+	bv. 1
110/10	<i>A. tumefaciens</i>	agua de riego	Mendoza, Argentina	+	+	bv. 1



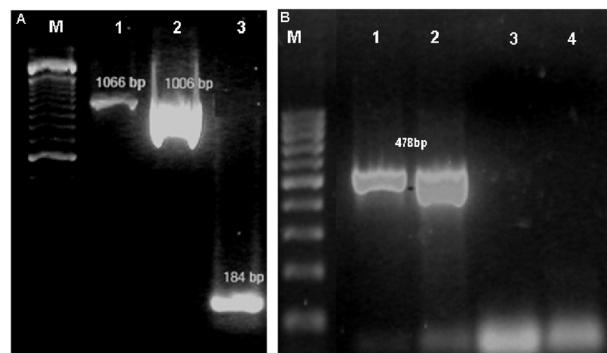
**Figura 4.** Productos de amplificación obtenidos por PCR empleando los *primers* VCF/VCR, homólogos a una secuencia parcial del operón *virC* (genes *virC1* y *virC2*) con ADN de las siguientes cepas bacterianas: calle 1, *Agrobacterium tumefaciens* bv. 1 cepa LBA958; calle 2, *Agrobacterium rubi* cepa F 266; calle 3, *Agrobacterium* bv. 2 cepa F 362. M, marcador de peso molecular *ladder* 100 bp Promega®.

firmaron que las cepas que pertenecían al biovar 1, que resultaron cetolectosa positivas, exhibieron un amplicón de 184 pb. Dentro de las cepas cetolectosa negativas, las pertenecientes al biovar 2 exhibieron un amplicón de 1066 pb. En las cepas de *A. rubi* el amplicón característico correspondió a 1006 pb (Figura 5A), en tanto que las cepas de *A. vitis* K306 y S4 exhibieron un amplicón de 478 pb (Figura 5B). Como era previsible, ninguna de las cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Synorhizobium* generaron productos de amplificación con la multiplex (Figura 5B).

## DISCUSIÓN

Uno de los aspectos claves para el diagnóstico y el control de las enfermedades de origen bacteriano en los vegetales es disponer de metodologías precisas que no generen falsos positivos y/o falsos negativos, para una correcta identificación de los agentes patógenos y el análisis de potenciales fuentes de inóculo, tanto en el suelo como en el material vegetal.

Con respecto al aislamiento y la posterior identificación de cepas de *Agrobacterium*, con la combinación de las reacciones de PCR empleadas, el aislamiento en los medios semiselectivos D1, D1-M y YEM-RCT y los bioensayos en kalanchoe y pimiento cv. California Wonder se obtuvo una efectividad mayor del 99 % en la identificación de cepas patógenas provenientes de agallas, suelo, suelo rizosférico y agua.



**Figura 5.** Productos de amplificación obtenidos por PCR multiplex basada en las diferencias del gen 23s ADNr entre especies y biovaras de *Agrobacterium*, empleando el *primer* universal UF (*forward*) y 4 *primers* especies/biovar-específicos (B1R para el bv. 1; B2R para el bv. 2, AvR para *A. vitis* y ArR para *A. rubi*), con ADN de las cepas bacterianas que se detallan a continuación. 5A: calle 1, *Agrobacterium* bv. 2 cepa F 362; calle 2, *Agrobacterium rubi* cepa F 266; calle 3, *Agrobacterium tumefaciens* bv. 1 cepa LBA 958; 5B: calle 1, *Agrobacterium vitis* cepa K306; calle 2, *Agrobacterium vitis* cepa S4; calles 3 y 4, controles negativos (*Rhizobium galegae* y *Synorhizobium fredii* 1031HH, respectivamente). M, marcador de peso molecular *ladder* 100 bp Promega®.

La amplificación por PCR con los *primers* VCF/VCR, al igual que la reacción PCR multiplex, permitió identificar con precisión la totalidad de los aislamientos que inducían la formación de agallas en kalanchoe y pimiento. En ambos casos, ninguno de los rizobios ni la cepa control de *A. radiobacter* dieron producto de amplificación alguno con ninguna de las combinaciones de *primers* probadas. Adicionalmente, se probaron también los *primers* A-E y A-C para amplificar dos fragmentos de 338 pb y de 224 pb, respectivamente, correspondientes a la secuencia parcial del gen *virD2* presente en los plásmidos Ti y Ri de las cepas patógenas de *Agrobacterium*, de acuerdo con la metodología descrita por Hass *et al.* (8). Se halló un 30 % de falsos negativos y tres cepas de *Rhizobium* arrojaron resultados positivos (datos no mostrados), por lo que esta combinación de *primers* no sería útil para el diagnóstico ni podría emplearse por sí sola para caracterizar poblaciones de agrobacterias.

Los medios semiselectivos D1, D1-M y YEM-RCT resultaron efectivos para aislar cepas de *Agrobacterium*, no solo cuando el material de partida fueron plantas con síntomas de agalla, sino también al tratarse de muestras de suelo, suelo rizosférico y agua de riego. Tanto en el medio D1 como en el D1-M, las colonias presentaron coloración y características típicas del género *Agrobacterium*, de acuerdo con lo descrito por Kado y Heskett (10) y Perry y Kado (17), respectivamente. En el medio D1, las colonias de todas las especies y biovaras de *Agrobacterium* presentaron forma convexa y coloración verdoso-amarillenta con centros más oscuros, porque metabolizan el azul de bromotimol, y bordes de color blanco cremoso; con el correr del tiempo las colonias se tornan de color verde

oliva, pero siempre mantienen los bordes más claros. En este medio, ciertas especies de *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Acidovorax* pueden desarrollar, pero con una coloración diferente a la observada en *Agrobacterium*, dado que no metabolizan el colorante y pueden dar una coloración amarilla en el medio de cultivo debido a un cambio de color del indicador, que vira al amarillo al bajar el pH del medio. Al efectuar aislamientos en el medio D1, se encontró una eficiencia mayor del 90 % para la recuperación de *Agrobacterium* a partir de poblaciones mixtas; esta eficiencia mejora con el enriquecimiento previo en D1 líquido y también con el agregado de telurito de potasio al medio, lo que aumenta la selectividad a tal punto que algunas cepas de *Agrobacterium* bv. 2 no desarrollan o lo hacen en forma limitada. En el medio D1-M, las colonias de *Agrobacterium* presentaron color azul verdoso con centros más oscuros y bordes más claros, también hubo colonias grisáceas o blancuzcas con centros azulados (por su capacidad de metabolizar el verde de malaquita), circulares, convexas, mucosas y brillantes. En algunos casos, se observaron colonias con bordes irregulares, probablemente debido a una excesiva producción de mucopolisacárido. En este medio el crecimiento de saprobios es limitado, aunque algunas especies de *Pseudomonas* y géneros afines desarrollan, pero sin las características de pigmentación particulares observadas en *Agrobacterium*. Cuando se emplea YEM-RCT, las colonias son muy mucosas, circulares, convexas y de color negro más intenso en la parte central debido a la acumulación de cristales de telurito metálico. Por lo observado, cuando se realizan estudios epidemiológicos que incluyen la distribución espacial del patógeno, es recomendable utilizar los tres medios de cultivo para aumentar la eficiencia de recuperación, puesto que en una misma agalla pueden cohabitar diversas cepas pertenecientes a especies o biovarias diferentes (13). Los medios con telurito contribuyeron a identificar a las agrobacterias sobre la base de la característica típica de sus colonias. Mougel *et al.* (14) demostraron que la resistencia a telurito no es de carácter plasmídico, dado que todas las especies y biovarias de *Agrobacterium* y aquellas cepas que han perdido el plásmido Ti o el Ri desarrollan en presencia de telurito acumulando cristales de telurito metálico en sus células, como fue observado en cepas curadas del plásmido Ti y otros plásmidos crípticos (14). No obstante, es importante destacar que los rizobios, organismos estrechamente relacionados con las agrobacterias, generan colonias de aspecto similar cuando se cultivan en YEM-RCT, lo que no ocurre en los medios D1 y D1-M, en los que los rizobios no desarrollan o lo hacen en forma extremadamente lenta (más de 7 días). En el medio D1 pueden ser inhibidos por el cloruro de litio presente, que afecta el modo de unión del aminoacil ARN de transferencia y altera la síntesis de proteínas bacterianas (10).

Si bien las cepas de *A. radiobacter* y las cepas no patógenas de *Agrobacterium* desarrollaron en todos los

medios de cultivo probados, con morfología similar a las presentadas por las cepas patógenas, ninguna de ellas indujo la formación de agallas en kalanchoe ni en pimiento. En el caso de los rizobios, si bien desarrollaron en YEM-RCT con las mismas características que los aislamientos de *Agrobacterium*, se diferenciaron posteriormente tanto por PCR (multiplex y específica) como por bioensayo, dado que en ningún caso indujeron síntomas ni presentaron los productos de amplificación correspondientes al gen *virD2* presente en los plásmidos Ti y Ri; de esta forma, se evitó la posibilidad de detectar falsos positivos, particularmente en el caso de muestras de suelo. No obstante, empleando esta metodología sería imposible diferenciar entre rizobios y cepas de *Agrobacterium* que hubieran perdido los genes de virulencia.

Con respecto a las pruebas de patogenicidad, el pimiento California Wonder demostró ser un hospedante diferencial en el que es posible visualizar los síntomas en menor tiempo que en otras especies herbáceas usualmente empleadas como indicadoras, como por ejemplo girasol y tomate. La respuesta a la inoculación en pimiento se generó rápidamente, a los 7 días, bajo la forma de agallas esféricas en los puntos de lesión del tallo, de color blanco-rosado a castaño claro y aspecto verrugoso, tras la inoculación de todas las cepas de *Agrobacterium* bv. 1, *Agrobacterium* bv. 2 y *A. rubi*. En estos ensayos, las cepas de *A. vitis* K 306 y S4 no interactuaron con el pimiento, lo que quedó en evidencia porque únicamente aparecieron zonas necróticas alrededor de los puntos de inoculación. No obstante, en otras plantas de la familia Solanaceae, como tomate y tabaco, se han encontrado diferencias en la producción de agallas en inoculaciones con diferentes cepas de *A. vitis* (15). Por ello sería interesante evaluar el comportamiento de un mayor número de aislamientos de *A. vitis*, con el fin de determinar si el pimiento cv. California Wonder es un hospedante diferencial con potencial en el diagnóstico de cepas virulentas de esta especie. En el caso de *A. radiobacter* K 1026 y de las cepas control de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Synorhizobium*, estas no indujeron ningún tipo de síntoma en pimiento, lo cual es lógico, considerando que carecen de genes de virulencia. Por otra parte, el bioensayo cuantitativo sobre kalanchoe desarrollado en este trabajo resultó una prueba económica, sencilla y fácil de manejar en condiciones de laboratorio. Además, demanda poco espacio, por lo que es ideal para realizar screenings de un alto número de cepas y especies de *Agrobacterium*.

En conclusión, el empleo combinado de PCR multiplex, PCR específica, aislamientos en medios semiselectivos y bioensayos en kalanchoe y pimiento redujo significativamente la posibilidad de obtener resultados falsos negativos a partir de muestras de agallas, suelo, suelo rizosférico y agua. Este conjunto de métodos representa una herramienta adecuada para la detección de cepas patógenas de *Agrobacterium* en estudios fitopatológicos y ecológicos.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a los Dres. DH Grasso (Instituto de Suelos, INTA Castelar, Argentina) y S Süle (Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungría) por facilitar las cepas de referencia LBA 956 de *A. tumefaciens* y K 306 y S4 de *A. vitis*, respectivamente. Esta investigación fue parcialmente subsidiada por la CIC (Provincia de Buenos Aires, Argentina).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alippi AM, Dal Bo E, Ronco LB, López MV, López AC, Aguilera OM. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathol* 2003; 52: 287-302.
2. Alippi AM, López AC, Balatti PA. First report of *Agrobacterium rubi* and *Agrobacterium rhizogenes*, causing crown and root gall and hairy root on blueberry in Argentina. *Plant Dis* 2010; 94: 1064.
3. Bautista-Zapanta J-N, Arafat HH, Tanaka K, Sawada H, Suzuki K. Variation of 16S-23S internally transcribed spacer sequence and intervening sequence in rDNA among the three major *Agrobacterium* species. *Microbiol Research* 2009; 164: 604-12.
4. Beriam LOS, Malavolta Jr VA, Romeiro RS. Metodología simple para isolamento indireto de *Agrobacterium tumefaciens*. *Fitopatol Brasileira* 1995; 20: 282.
5. Bouzar H, Jones JB. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1023-6.
6. Farrand SK, van Berkum P, Oger P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 1681-7.
7. Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2010; 51: 223-56.
8. Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2879-84.
9. Holmes B, Roberts P. The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. *J Appl Bacteriol* 1981; 50: 443-67.
10. Kado, CI, Heskett, MG. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 1970; 60: 969-76.
11. Kechris KJ, Lin JC, Bickel PJ, Glazer AN. Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9584-9.
12. Minnemeyer SL, Lightfoot R, Matthysse AG. A semiquantitative bioassay for relative virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains on *Bryophyllum daigremontiana*. *J Bacteriol* 2006; 173: 7723-4.
13. Moore LW, Bouzard H, Burr T. *Agrobacterium*. En: Schaad NW, Jones JB, Chun W, editors. *Laboratory guide for the identification of Plant Pathogenic Bacteria*, APS Press, St. Paul, Minnesota, 2001; p 17-35.
14. Mougel C, Cournoyer B, Nesme X. Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 65-74.
15. Palacio-Bielsa A, González-Abolafio R, Alvarez B, Lastra B, Cambra MA, Salcedo CI, López MM, Penyalber R. Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumors. *Plant Pathol* 2009; 58: 584-93.
16. Peluso R, Raio A, Morra F, Zoina A. Physiological, biochemical and molecular analyses of an Italian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Eur J Plant Pathol* 2003; 109: 291-300.
17. Perry KL, Kado CI. Characteristics of Ti plasmids from broad-host range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains for *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1982; 151: 343-50.
18. Pulawska J, Willems A, Sobiczewski P. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Syst Appl Microbiol* 2006; 29: 470-9.
19. Sawada H, Ieki H, Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmids for phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61: 828-31.
20. Sawada H, Leki H, Oyaizu H, Matsumoto S. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 694-702.
21. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell, Oxford, 1970.
22. Young JM, Kerr A, Sawada H. Genus II. *Agrobacterium*. En: Garrity GM; Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer – Verlag. Volume Two: The Proteobacteria, Parts A – C, 2005; p. 340-5.
23. Young JM, Kuykendall, LD, Martínez-Romero E, Kerr A, Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 89-103.