

**BIOFERTILIZANTES  
MEJORADOS PARA  
LA INOCULACIÓN DE  
CULTIVOS DE SOJA**

.....

**LIC. ESTEBAN TOMÁS ITURRALDE**

Directora: Dra. Julieta Pérez Giménez

MARZO 2020

Diseño de portada: Lic. Valeria Hegel (mamá de María Emilia y futura doctora)  
Agradezco al señor Dardo Iturralde por permitirme fotografiar su cultivo de soja (gracias Papá)



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***  
**Biofertilizantes mejorados  
para la inoculación de  
cultivos de soja**

---

***Tesista:***

**Lic. Esteban Tomás ITURRALDE**

***Directora:***

**Dra. Julieta PÉREZ GIMÉNEZ**

***Año: 2020***



El presente Trabajo de Tesis  
para optar al grado de  
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas  
ha sido realizado en el  
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata – CCT – La Plata – CONICET  
bajo la dirección de la  
Dra. Julieta Pérez Giménez



En memoria de mi querida abuela  
Liria Emma Dietrich "Yiya",  
la luz de mis ojos,  
que hace que este vasquito alemán  
tenga una sonrisa todos los días en el alma



*“La lucha contra el hambre reclama imperiosamente una generosa financiación, la abolición de las barreras comerciales y, sobre todo, el incremento de la resiliencia frente al cambio climático, las crisis económicas y los conflictos bélicos”*

*“Podemos soñar un futuro sin hambre, pero eso solo es legítimo si nos empeñamos en procesos tangibles, relaciones vitales, planes operativos y compromisos reales”*

Papa Francisco



Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han formado parte de:

- Publicaciones en revistas científicas internacionales con referato:

**Iturralde ET, Covelli JM, Alvarez F, Pérez-Giménez J, Arrese-Igor C and Lodeiro AR. Soybean-nodulating strains with low intrinsic competitiveness for nodulation, good symbiotic performance, and stress-tolerance isolated from soybean-cropped soils in Argentina (2019).**  
Frontiers in Microbiology. 10:1061.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.01061.

**Iturralde ET, Stocco M, Faura A, Monaco A, Cordo C, Pérez-Giménez J, Lodeiro AR. Coinoculation of soybean plants with *Bradyrhizobium japonicum* and *Trichoderma harzianum*: coexistence of both microbes and relief of nitrate inhibition of nodulation (2020).**  
Biotechnology Reports. 26.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00461>.

- Congresos:

### **III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (III CAMAyA).**

Carácter de participación: Póster.

“Selección de variantes más móviles de dos cepas alóctonas con buena capacidad fijadora de N”.

**Iturralde ET, Pérez Giménez J, Covelli JM, Lodeiro AR.**

Lugar: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Fecha de realización: 25 al 27 de noviembre de 2015.

Premio: Segundo premio al mejor trabajo presentado en formato Poster.

### **V Jornadas Bonaerense de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable (V JOBMAS).**

Carácter de participación: Expositor.

“Identificación genética y selección de cepas más móviles a partir de rizobios aislados de suelos sojeros”.

**Iturralde ET, Lodeiro AR, Pérez Giménez J.**

Lugar: La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Fecha de realización: 30 de junio y 1 de julio de 2016.

### **XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología 2016.**

Carácter de participación: Póster.

“Análisis filogenético de cepas de *Bradyrhizobium* spp. aisladas de suelos sojeros argentinos”.

**Iturralde ET**, Lodeiro AR, Pérez Giménez J.

Lugar: Rosario, Santa Fe, Argentina.

Fecha de realización: 26 al 30 de septiembre de 2016.

### **III Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas Planta – Microorganismo – Medio ambiente (IBEMPA).**

Carácter de participación: Póster.

“Efecto de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum* sobre soja en ausencia y presencia de N”.

**Iturralde ET**, Stocco MC, Mónaco C, Pérez Gménez J, Lodeiro AR.

Lugar: Lima, Perú.

Fecha de realización: 6 al 10 de noviembre de 2017.

### **IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (IV CAMAyA).**

Carácter de participación: Póster.

“Caracterización de la cepa de *Trichoderma harzianum* Th5cc frente a patógenos de soja y en la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* E109”.

**Iturralde ET**, Stocco MC, Faura A, Mónaco C, González Anta G, Pérez Giménez J, Lodeiro AR.

Lugar: Mar de Plata, Buenos Aires, Argentina.

Fecha de realización: 11 al 13 de abril de 2018.

Premio: Tercer premio al mejor trabajo.

### **VI Jornadas Bonaerense de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable (VI JOBMAS).**

Carácter de participación: Expositor.

Coinoculación de plantas de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum*: coexistencia de ambos microorganismos y nodulación en presencia de nitratos”.

**Iturralde ET**, Colla D, Lodeiro AR, Pérez Giménez J.

Lugar: La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Fecha de realización: 25 y 26 de abril de 2019.

### **XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019).**

Carácter de participación: Póster.

“Nodulación de soja en altas concentraciones de KNO<sub>3</sub> al coinocularla con *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum*.”

**Iturralde ET**, Colla D, Cotabarren A, Hegel VA, Lamelza, F, Lodeiro AR, Pérez Giménez J.

Lugar: Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Fecha de realización: 25 al 27 de septiembre de 2019.

## **Mi reconocimiento**

A la Universidad Nacional de La Plata y en especial, a la Facultad de Ciencias Exactas, por la educación pública, gratuita y de calidad durante mi formación de grado y de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la beca que permitió que me pudiera dedicar en forma exclusiva a investigar.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) por brindarme el espacio físico y el equipamiento para la realización de este trabajo.

## **Mi agradecimiento**

A la Dra. Julieta Pérez Giménez, mi directora, por estar presente durante toda la tesis doctoral, por la motivación constante, por esforzarte para que las cosas sucedieran, por estar disponible para cada consulta, cada duda y sobre todo para tratar de salvar todas las metidas de patas. Gracias por incentivar a pensar y superarme para buscar soluciones que logren dar un salto de calidad. Gracias por aceptar este paquete y lograr que se forme un equipo y un grupo de trabajo. Gracias por todos los kilómetros manejados hasta Pergamino o CABA y por todas tus anécdotas. De todo corazón, muchísimas gracias.

Al Dr. Aníbal Lodeiro, por discutir los experimentos de la tesis y por siempre dar una devolución interesante y oportuna. Gracias por no oponerte a que la tesis no sea en biología molecular sino en un tema más agronómico.

Al Dr. Gonzalo Torres Tejerizo, por enseñarme a hacer filogenia a la distancia, por tu buena predisposición estando en Alemania o en Argentina. Gracias por estar presente y ser una parte fundamental del equipo y que, gracias a vos, el IBBM funcione. Gracias por hacer correcciones desinteresadas en el manuscrito de esta tesis doctoral.

A la Dra. Marina Stocco, por tu excelente predisposición. Gracias por enseñarme a trabajar con *Trichoderma* y por siempre estar disponible para una consulta, incluso con Milo en brazos.

A mis compañeras de tesis, Dra. Florencia Lamelza, Dra. Carolina Dardis, Dra. Carolina Cogo y las futuras doctoras Florencia Mengucci, Valeria Hegel y Gabriela López Guerra. Gracias por todos estos años compartidos, todas las alegrías, pérdidas, por todos los abrazos. Gracias por la amistad que construimos y por la llegada de los pequeños Benja y María Emilia. Sin dudas, nada hubiera sido igual sin su compañía.

A Delfina Colla y Aixa Cotabarren, por las renovadas energías que incorporaron en el grupo. Hice lo mejor que podía como tutor en sus tesina de grado, fue un placer y un honor haber formado parte de su formación académica. Gracias por todas las risas y perdón por todas las macanas.

A Andrés Faura de Rizobacter, por la rápida ayuda cada vez que la solicitamos.

A la Dra. Silvina Laura López García, por tu criterio microbiológico y tus tortas.

A los investigadores del laboratorio LIRyS, Dr. Elías Mongiardini y Dra. Julia Althabegoiti, por los momentos compartidos, las ideas y las devoluciones en los seminarios durante estos cinco años.

A los miembros de RPS (y ex RPS), por estar siempre, por todos los mates en el cuartito, por salvarnos cuando nos quedábamos sin material. En especial a Juliet, Ileana, Lucas y Abril, con los que he compartido congresos, fiestas y experimentos. Gracias por toda la ayuda.

Al Dr. Antonio Lagares y a la Dra. María Florencia del Papa, por siempre demostrar interés y hacer preguntas pertinentes cada vez que escucharon mi trabajo. Además, gracias Flor por las tablas del NMP.

A Paula Giménez, Silvina Tongiani, Claudio Mazo y Luciana Cayuela, por toda la ayuda en el desarrollo de los experimentos, por todas las corridas a último momento para que los materiales llegaran a la hora del autoclave, por todas las risas en el cuartito. Gracias por toda la ayuda.

A Abel Bortolameotti y Alejandro Nocetti, por arreglarme las luces cada vez que se rompían para que las plantas pudieran crecer.

A Juliana Latorraca y Gisela Verdecanna, por toda la ayuda administrativa que requiere estar en un laboratorio, desde la compra de insumos hasta como completar papales en el CCT. Muchas gracias por toda la ayuda.

A Nahuel Prymak, por ser un excelente fotógrafo y capturar las mejores fotos de los nódulos de soja.

A todos los integrantes del IBBM por escuchar con atención en los seminarios institucionales y aportar sugerencias y críticas.

Doy gracias a Dios, por haber tenido un techo donde vivir, alimento y amor para nutrirme y educación para superarme. Soy un afortunado y se debe a mi familia que se han esforzado trabajando y transmitiendo valores.

Agradezco a mis padres, Dardo Mario Iturralde y María Gabriela Arouxet, por criarnos en el campo, lo que despertó mi pasión hacia la naturaleza y un sentido de pertenencia. Gracias por ser ejemplo de vocación, trabajo, esfuerzo y superación. Muy orgulloso de lo que han logrado, no tengo palabras de agradecimiento para todo lo que han hecho por nosotros. Gracias por todo, los amo.

A Juan Matías Iturralde y Alejandra Goldberg, por transmitir pasión y amor hacia el campo. Y, en especial a mi hermano mayor, que me enseñó otra rama de la biotecnología, la inseminación de vacas. Orgulloso de lo que logran y gracias por darme uno de los títulos más lindos, el de tío. Ansioso de ver tu sonrisa.

A Cruci Arouxet, mi tía, por acompañarme y ser fan de cada cosa que realizo. Gracias por estar presente inmediatamente en todos los momentos de mi vida y siempre alentar a mejorar. Gracias por todo el amor Tiuh y por transmitirme tu pasión de viajar y descubrir cosas nuevas. Gracias por todo.

A Liliana Iturralde y Luis Bucciarelli, mis tíos, por estar siempre presentes y ser excelentes personas. A mis primos, Fabio, Julia y Celia Bucciarelli y a los más pequeños (y no tanto) miembros de la familia, Santiago, Clarita, Felipe, Juani y Lupe.

A todos mis tíos abuelos. En especial a Chito, Delia, Edith, Nelly y Pochola. Ustedes siempre nos han tratado como nietos y nosotros los amamos como abuelos. Gracias por cada risa, los infinitos torneos de cartas, las accidentadas cabalgatas a caballo, las travesías por canteras y arroyos, todas las comidas caseras, los uniformes a medida para el colegio y muchísimos recuerdos más.

A Maia Maitena Morales, mi gran amiga, por estar siempre presente y ser la hermana que me dio la visa. Gracias por todas las horas compartidas de risas y escritura.

A mis amigas de la Facultad, Fiorella, Bárbara y Laura. Gracias por todas las anécdotas que tenemos en común.

A mis amigos de gimnasia artística de Gimnasia y Esgrima de La Plata, por siempre incentivarne a superarme.

A mi abuelita platense, Elsa Santanera, la dulce y gran artista, por siempre regalarme una sonrisa cada vez que te visitaba. Agradecido de que haya podido formar parte de tu vida. Te recuerdo siempre.

A Alejandro Iaccarino, por ser un ejemplo de la gracia de Dios y por las interesantes charlas que hemos tenido que han marcado mi corazón.

A la gran familia de Cuidadores del Casa Común y al Papa Francisco, por hacer que mi vocación tenga sentido, por querer lograr un mejor lugar y preocuparse por el prójimo. Gracias por todo lo que he crecido y aprendido. En especial a todos los jóvenes de la Escuela "Trabajadores gráficos" de Barracas: Martín, Camila, Diego, Clara, Elvis, Leila, Azul, Valentina, Walter, Nayla, Cristian, Katharina, Emanuel y María.

A Monseñor Jorge Lugones, por siempre tener hermosas palabras y experiencias para compartir. Gracias por el hermoso encuentro que tuvimos con el Papa.

A Silvia González, por transmitir tu amor a tu Patria. Gracias por tus anécdotas, mates y pasión hacia los animales.

A Marthita Arriola, por la fortaleza y la capacidad de trabajo hacia los más desprotegidos y olvidados, por ser un ejemplo a seguir. Gracias por las emocionantes charlas compartidas en la carretera, los momentos de risas y de emoción. Gracias por tu sensibilidad.

A Sonia Herrera y Lucho Lugones, por abrirme las puertas de su hogar, compartir hermosos momentos y siempre tenerme en cuenta. Gracias por confiar en mí y motivarme a la superación.

A Teresita y Milagros Lugones, por hacerme reír siempre. Gracias por todo lo compartido, desde cumpleaños hasta visitas a Barracas o al Delfín. Son geminianas de pura cepa y, evidentemente, artistas 360.

A Juan Nazar y a Lucía Dalla Tea, por traer al mundo a Sofía y Teo. Gracias por todos los momentos hermosos que hemos vivido entre comidas y dibujos de cocodrilos.

A Estela Barragán, por ser una excelente persona. Gracias por abrirme las puertas de tu hogar y poder compartir momentos con todos ustedes.

A Maricel Tettamanti y Ana Belén Gastiazoro, por todos los increíbles momentos y viajes compartidos. Gracias por todas las risas (y perdón por las películas malas que les he hecho ver o peor, por todas las veces que me he quedado dormido).

A Juan Pablo Tettamanti, por la estimulación hacia la superación, el incentivo constante para ser mejor persona, por siempre buscar soluciones innovadoras y por introducirme en Cuidadores de la Casa Común.

El agradecimiento más grande es para mis abuelos.

Gracias a Urbano Iturralde, René “Tota” Rachou, Alberto “Coco” Arouxet y, en especial, a Liria Emma “Yiya” Dietrich. Gracias por todo. Hoy ya no los tengo físicamente conmigo, pero están en mi corazón, en mi mente y en mi alma. Los extraño y los amo.

## Índice general

<b>Capítulo I: Introducción</b> .....	1
I.1 Historia de un cultivo que viene desde lejos.....	4
I.2 La soja en los campos argentinos.....	5
I.3 Hacia la agricultura sustentable como motivación y objetivo de trabajo.....	7
I.4 El suelo tiene vida .....	8
I.5 Microbioma del nódulo.....	10
I.6 Simbiosis rizobio-leguminosa.....	13
I.6.1 El diálogo molecular y el reconocimiento simbiótico .....	15
I.6.2 Adhesión a la superficie de las raíces y colonización.....	16
I.6.3 Invasión de los tejidos del hospedador .....	17
I.6.4 Organogénesis e invasión del nódulo.....	18
I.6.5 Diferenciación de las bacterias en bacteroides y fijación biológica de N <sub>2</sub> .....	19
I.7 Fijación biológica de nitrógeno para una agricultura sustentable.....	20
I.7.1 Problema de la competencia para la nodulación .....	20
I.7.2 Control de calidad de los inoculantes.....	22
I.8 Inoculantes combinados .....	23
I.8.1 Control biológico .....	23
I.8.2 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico .....	24
I.9 Resumen .....	25
Objetivo de este Trabajo de Tesis.....	25
<b>Capítulo II: Materiales y métodos</b> .....	27
II.1 Material biológico utilizado .....	29
II.1.1 Cepas bacterianas .....	29
II.1.2 Cepas fúngicas.....	30
II.1.3 Plantas.....	30
II.2 Medios de cultivos bacterianos, para hongos y plantas.....	30
II.2.1 Medios de cultivos para bacterias .....	30
II.2.2 Medios de cultivos para hongos.....	32
II.2.3 Conservación de los microorganismos .....	32
II.2.4 Antibióticos y antifúngicos .....	33
II.2.5 Soluciones para regar plantas .....	33

II.2.6 Medios de cultivo para control de calidad .....	33
II.3 Procedimientos microbiológicos.....	34
II.3.1 Cultivo de rizobios .....	34
II.3.2 Estimación de la biomasa y recuento de células viables.....	34
II.3.3 Estimación del número de rizobios en muestras de suelo (número más probable) .....	34
II.3.4 Cultivos duales .....	35
II.3.5 Preparación de suspensión de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc.....	35
II.3.6 Recuento de <i>Trichoderma</i> spp. en raíces.....	35
II.3.7 <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc como endófito en raíces de soja.....	35
II.4 Técnicas de biología molecular .....	35
II.4.1 Obtención de ADN total mediante resina.....	35
II.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	36
II.4.3 Electroforesis en geles de agarosa .....	36
II.4.4 Revelado de los geles y fotografía .....	37
II.4.5 Estimación de los pesos moleculares de fragmentos por electroforesis en gel de agarosa.....	37
II.4.5 Purificación en taco de agarosa.....	37
II.4.6 Secuenciación de los fragmentos de ADN .....	37
II.5 Ensayos biológicos .....	38
II.5.1 Ensayos de natación ( <i>swimming</i> ) en agar semisólido.....	38
II.5.2 Proteínas extracelulares.....	38
II.5.2.1 Extracción de proteínas extracelulares .....	38
II.5.2.2 Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	38
II.5.2.3 Tinción de las proteínas extracelulares.....	38
II.5.3 Esterilización superficial y germinación de semillas .....	39
II.5.4 Ensayo de nodulación en macetas .....	39
II.5.5 Ensayo de coinoculación en macetas .....	39
II.5.6 Ensayo de coinoculación en macetas suplementadas con KNO <sub>3</sub> .....	40
II.5.7 Ensayo de <i>fungal highway</i> .....	40
II.5.8 Determinación de auxinas.....	40
II.6 Microscopías.....	40

II.6.1 Microscopía óptica .....	40
II.6.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	40
II.7 Procedimientos del inoculante granulado .....	41
II.7.1 Desarrollo del inoculante granulado .....	41
II.7.2 Evaluación del control de calidad .....	41
II.7.2.1 Preparación del homogenato .....	41
II.7.2.2 Preparación de las diluciones de trabajo .....	41
II.7.2.3 Siembra de las diluciones.....	42
II.7.2.4 Determinación del pH.....	42
II.7.3 Cálculo de dosis del inoculante granulado .....	42
II.7.4 Recuento de rizobios en el soporte débilmente adherido a las raíces .....	42
II.8 Análisis estadísticos y bioinformáticos.....	42
II.8.1 Análisis estadísticos.....	42
II.8.2 Análisis bioinformáticos.....	43
<b>Capítulo III: Caracterización de cepas noduladoras de soja aisladas de suelos argentinos</b> .....	<b>45</b>
III.1 Caracterización genotípica de la población autóctona .....	49
III.1.1 Estudio de la diversidad de la población autóctona mediante <i>fingerprint</i> .....	49
III.1.2 Análisis del cladograma del <i>fingerprint</i> de ADN .....	52
III.2 Identificación de los aislamientos .....	54
III.2.1 Secuenciación del ARN ribosomal 16S (ARNr16S) .....	54
III.2.2 Transferencia horizontal de genes para la fijación biológica de nitrógeno.....	56
III.2.3 Identificación mediante MALDI-TOF-MS .....	57
III.2.4 Identificación mediante genes <i>housekeeping</i> concatenados .....	58
III.3 Caracterización fenotípica de las cepas .....	61
III.3.1 Supervivencia de las cepas autóctonas frente a estreses abióticos .....	61
III.3.1.1 Estrés térmico.....	61
III.3.1.2 Estrés hídrico .....	62
III.3.2 Movilidad .....	62
III.4 Evaluación de parámetros simbióticos de los aislamientos .....	63
III.5 Resumen .....	64

<b>Capítulo IV: Selección y caracterización de cepas más móviles .....</b>	<b>67</b>
IV.1 Obtención de las cepas más móviles de los aislamientos CAS/N-10 y SAA/S-48 ...	71
IV.2 Caracterización de las cepas más móviles .....	73
IV.2.1 Cinética de crecimiento de las cepas parentales y sus derivadas más móviles	73
IV.2.2 Caracterización de los sistemas de flagelos.....	74
IV.2.3 Interacción simbiótica de las cepas con mayor movilidad.....	75
IV.2.4 Estabilidad del fenotipo más móvil luego de la interacción simbiótica. ....	77
IV.3 Ensayo a campo en la campaña 2017/2018.....	78
IV.4 Resumen.....	81
<b>Capítulo V: <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>: coexistencia de ambos microorganismos y coinoculación de plantas de soja.....</b>	<b>83</b>
V.1 Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> en la coinoculación con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	87
V.1.1 Antagonismo entre <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc y <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	87
V.1.2 Antagonismo con las cepas de rizobios seleccionadas: CAS/N-10, CAS/N-10 m <sup>+</sup> , SAA/S-48 y SAA/S-48 m <sup>+</sup> .....	90
V.1.3 Coinoculación de plantas de soja con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> .....	90
V.1.4 Supervivencia de <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc en las raíces de plantas de soja .....	94
V.1.5 <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc no es endófito de raíces de soja .....	95
V.1.6 Competición para la nodulación cuando se adiciona <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc.....	96
V.2 <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc como biocontrol de distintos patógenos de soja ...	98
V.3 Dispersión de los rizobios mediante las hifas del hongo <i>Trichoderma harzianum</i>	101
V.4 Resumen.....	106
<b>Capítulo VI: Coinoculación de plantas de soja con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>: alivio de la inhibición de la nodulación por nitratos .....</b>	<b>107</b>
VI.1 Coinoculación sobre plantas de soja de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> en presencia de distintas concentraciones de nitratos .....	110
VI.2 Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre la nodulación de soja en presencia de concentraciones de nitratos similares a las del suelo .....	111

VI.3 Plantas de soja coinoculadas con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> nodulan en 10 mM de KNO <sub>3</sub> .....	113
VI.4 Posible inducción de nodulación por Ácido Indol-3-Acético (AIA) en presencia de KNO <sub>3</sub> .....	115
VI.5 Resumen.....	118
<b>Capítulo VII: Desarrollo del inoculante granulado para cultivos de soja .....</b>	<b>119</b>
VII.1 Los rizobios en el inoculante granulado.....	122
VII.1.1 Selección del medio de cultivo para los rizobios .....	123
VII.1.2 Selección del aglutinante .....	125
VII.2 Determinación de la temperatura de almacenamiento.....	126
VII.3 Capacidad simbiótica del inoculante granulado .....	128
VII.3.1 Obtención del inoculante granulado para ensayo con plantas .....	128
VII.3.2 Disminución de los contaminantes en el inoculante granulado .....	129
VII.3.3 Evaluación de parámetros simbióticos.....	130
VII.4 Permanencia de los rizobios del inoculante granulado en el soporte.....	132
VII.5 Desarrollo del inoculante granulado con las cepas seleccionadas .....	133
VII.6 Resumen.....	134
<b>Discusión y perspectivas.....</b>	<b>137</b>
Discusión.....	139
Perspectivas.....	144
<b>Anexos .....</b>	<b>145</b>
Anexo 1: Tabla para calcular el número más probable (NMP).....	146
Anexo II: Número de acceso de las secuencias de genes.....	148
Anexo III: Patógenos de soja .....	150
Anexo IV: Estructura y ultraestructura de los nódulos al ser coinoculados con <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc en concentraciones de KNO <sub>3</sub> .....	152
Anexo V: Parámetros para ensayos simbióticos con el inoculante granulado .....	154
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>157</b>



## Índice de figuras

Figura I.1: Soja sembrada en el campo .....	3
Figura I.2: <i>Shu</i> , símbolo chino arcaico para la planta .....	4
Figura I.3: Área sembrada con soja en Argentina .....	6
Figura I.4: Hectáreas cultivables en Argentina desde 1960 hasta 2016.....	8
Figura I.5: Nódulos en raíces de plantas de soja .....	10
Figura I.6: Representación de las interacciones entre las raíces de una leguminosa y su microbioma .....	11
Figura I.7: Triángulo de relación entre plantas, microorganismos y geoquímica del suelo .....	12
Figura I.8: Etapas del desarrollo de nódulos de leguminosas determinado .....	14
Figura I.9: Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando bacterias sobre las hifas .....	17
Figura I.10: Zonas de la raíz de las leguminosas.....	17
Figura I.11: Etapas que podrían limitar la competencia de los rizobios inoculados sobre semilla con los de la población autóctona del suelo ... ..	21
Figura II.1: Marcador de peso molecular 100 pb ADN <i>Ladder</i> .....	37
Figura III.1: Lugar de procedencia de las cepas noduladoras de soja de la colección del laboratorio LIRyS .....	48
Figura III.2: Perfil de bandas de ADN de distintas cepas noduladoras de soja amplificadas con el primer BOX-A1R .....	51
Figura III.3: Cladograma de las cepas de la población autóctona .....	53
Figura III.4: Árbol filogenético con las secuencias del ARNr16S de las cepas aisladas.....	55
Figura III.5: Análisis filogenético mediante el método <i>Maximun likelihood</i> para los genes <i>nodC</i> y <i>nifH</i> .....	56
Figura III.6: Amplicones de genes <i>housekeeping</i> .....	59
Figura III.7: <i>Maximun likelihood</i> de los genes <i>recA</i> , <i>atpD</i> y <i>glnII</i> concatenados .....	60
Figura IV.1: Esquema de la selección de cepas más móviles.....	71
Figura IV.2: Cinética de crecimiento de las cepas CAS/N-10 y SAA/S-48.....	72
Figura IV.3: Diámetro de los halos de natación en las distintas rondas de selección.....	72
Figura IV.4: Comparación de los halos de natación entre las cepas parentales y sus derivadas más móviles .....	73
Figura IV.5 Cinética de crecimiento de las cepas parentales y sus derivadas más móviles .....	74
Figura IV.6: SDS-PAGE de proteínas extracelulares .....	75

Figura IV.7: Esquema del ensayo de nodulación con las cepas más móviles .....	76
Figura IV.8: Movilidad de las cepas utilizadas para inocular soja y recuperarlas de los nódulos.....	77
Figura IV.9: Análisis genético de las cepas más móviles y sus cepas parentales .....	78
Figura IV.10: Rendimiento (Kg/hectárea) a campo de las cepas más móviles .....	80
Figura V.1: Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc en medio YEM.....	88
Figura V.2 Cultivo dual entre <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 y <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc.....	88
Figura V.3: Zona de contacto entre el micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc y <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109.....	89
Figura V.4: Cultivo dual entre las cepas seleccionadas y <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc .....	90
Figura V.5: Esquema del experimento de coinoculación de plantas de soja .....	91
Figura V.6: Nódulos en raíces de soja coinoculadas con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> .....	92
Figura V.7: Nódulos producto de la coinoculación con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> .....	92
Figura V.8: Estructura y ultraestructura del interior de los nódulos producto de la coinoculación.....	93
Figura V.9: Recuento de <i>Trichoderma harzianum</i> en la rizosfera de soja.....	94
Figura V.10: <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc no es endófito en raíces de soja.....	95
Figura V.11: Esquema del experimento de competición para la nodulación con <i>Trichoderma harzianum</i> .....	97
Figura V.12: Escala de Bell.....	99
Figura V.13: Antagonismo in vitro de <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc frente a distintos patógenos de soja.....	100
Figura V.14: Esquema del experimento de <i>funga highway</i> .....	102
Figura V.15: Ensayo de <i>funga highway</i> .....	103
Figura V.16: Nódulos de soja infectados con <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 GFP ...	104
Figura V.17: Corte de los nódulos de soja infectados con <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 100 GFP.....	105
Figura VI.1: Esquema experimental de la coinoculación de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> en presencia de nitratos.....	110
Figura VI.2: Nodulación de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 cuando es inoculada o coinoculada con <i>Trichoderma harzianum</i> Th5cc en presencia de distintas concentraciones de nitratos.....	111
Figura VI.3: Nódulo en planta de soja coinoculada en presencia de 10 mM de KNO <sub>3</sub> .....	113

Figura VI.4: Nódulo de la coinoculación en alta concentración de nitratos.....	114
Figura VI.5: Estructura y ultraestructura de los nódulos producto de la coinoculación en presencia de 10 mM de KNO <sub>3</sub> .....	114
Figura VI.6: Esquema de coinoculación con agregado de Ácido 3-Indol Acético exógeno.....	116
Figura VI.7: Efecto del Ácido 3-Indol Acético sobre la nodulación de soja en presencia de altas concentraciones de nitratos .....	116
Figura VI.8: Estructura y ultraestructura de los nódulos encontrados cuando se adiciona Ácido 3-Indol Acético exógeno al inóculo de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 .....	117
Figura VII.1: Cinéticas de crecimiento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 en medio Balatti con distintas fuentes de C .....	124
Figura VII.2: Cinética de crecimiento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 y <i>Bradyrhizobium japonicum</i> LP3018 en medio Balatti modificado Glicerol. ....	124
Figura VII.3: Supervivencia de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> LP3018 en presencia o ausencia de polímero industrial.....	125
Figura VII.4: Inoculante granulado .....	126
Figura VII.5: Esquema del ensayo con plantas .....	130
Figura VII.6: Colocación del inoculante granulado .....	131



## Índice de tablas

Tabla II.1 Cepas bacterianas utilizadas .....	29
Tabla II.2: Cepas noduladoras de soja aisladas de suelos argentinos .....	30
Tabla II.3: Patógenos de soja.....	31
Tabla II.4 Ciclado utilizado en la PCR con el <i>primer</i> BOX-A1R .....	36
Tabla II.5: <i>Primers</i> empleados para amplificar los genes ARNr16S, <i>recA</i> , <i>atpD</i> y <i>glnII</i> .....	36
Tabla II.6 Ciclado utilizado en la PCR con los <i>primers</i> Tabla II.3.....	36
Tabla III.1: Comparación entre la identificación con MALDI-TOF MS con el software Biotyper y las secuencias del ARNr16S .....	57
Tabla III.2: Porcentaje de supervivencia de los aislamientos frente al estrés térmico e hídrico.	61
Tabla III.3: Movilidad de las cepas en placas de <i>swimming</i> en medio semisólido .....	62
Tabla III.4: Fijación biológica de nitrógeno de las cepas CAS/N-02, CAS/N-10 y SAA/S-48 .....	63
Tabla IV.1: Número de nódulos generados por las cepas más móviles y sus parentales .....	76
Tabla IV.2: Peso seco de las plantas inoculadas con las cepas parentales y sus respectivas más móviles.....	77
Tabla IV.3: Precipitaciones y temperatura desde diciembre de 2017 a junio de 2018.....	80
Tabla V.1: Recuento de <i>T. harzianum</i> Th5cc.....	95
Tabla V.2: Competición para la nodulación.....	97
Tabla VI.1: Número de nódulos al coinocular con <i>B. japonicum</i> E109 y <i>T. harzianum</i> Th5cc en concentraciones de nitratos similares a las del suelo.....	112
Tabla VI.2: Peso seco promedio por nódulo al coinocular con <i>B. japonicum</i> E109 y <i>T. harzianum</i> Th5cc en concentraciones similares a las del suelo.....	112
Tabla VI.3: Peso seco promedio de la parte aérea al coinocular con <i>B. japonicum</i> E109 y <i>T. harzianum</i> Th5cc en concentraciones similares a las del suelo .....	113
Tabla VI.4: Mediciones de parámetros de la FBN al coinocular <i>B. japonicum</i> E109 y <i>T. harzianum</i> Th5cc en 10 mM de KNO <sub>3</sub> .....	115
Tabla VI.5: Producción de AIA de <i>T. harzianum</i> .....	116
Tabla VI.6: Nodulación con <i>B. japonicum</i> E109 y AIA en presencia de 10 mM de KNO <sub>3</sub> .....	117
Tabla VII.1: Resultados del análisis de control de calidad de los inoculantes granulados .....	127
Tabla VII.2: Control de calidad del inoculante granulado G4 .....	128
Tabla VII.3: Control de calidad del inoculante granulado G5 .....	129
Tabla VII.4: Parámetros simbióticos del inoculante granulado .....	131

Tabla VII.5: Permanencia en la zona de interacción de las raíces con el sustrato.....132

Tabla VII.6: Parámetros simbióticos del inoculante granulado versus inoculante líquido ....134

# CAPÍTULO I



**Introducción**



**E**n el contexto político, económico y social en el que vivimos, la soja está estrechamente relacionada con la historia de las últimas décadas de Argentina. Es imposible pensar en el panorama agropecuario actual sin el cultivo de soja (**Figura I.1**). Sin embargo, esta situación no siempre fue así y han tenido que pasar siglos para que el cultivo de soja afectara nuestras vidas.



**Figura I.1: Soja sembrada en el campo.** La fotografía fue tomada en un campo sembrado con soja en la localidad de Colonia Hinojo (36°53'53.0"S 60°13'08.4"O), provincia de Buenos Aires, Argentina.

## I.1 Historia de un cultivo que viene desde lejos

Las evidencias históricas y geográficas sugieren que la soja fue domesticada en China entre los siglos XVII y XI a.C. (Hymowitz, 1970). El cultivo de la soja nació en el norte y en el centro de la antigua China y está considerado como uno de los cultivos más antiguos. Los pueblos chinos eran nómades, recolectores de comida, hasta la llegada del Emperador Shen Nung. Él, según la tradición, fue el Padre de la Agricultura y de la Medicina, y les enseñó a los pobladores a arar y sembrar granos. Fue tal la importancia del cultivo, que en el libro “*Shen nung pen ts’ao*” hay una referencia hacia la soja por el valor medicinal que se le daba en la época (Hymowitz, 1970).

La evidencia de los cultivos de soja en la antigüedad está basada en el análisis pictográfico de la antigua palabra china utilizada para nombrarla. Al analizar el carácter arcaico de la soja (*shu*) se refleja la observación y el conocimiento que tenían sobre la soja los antiguos chinos. El carácter *shu* representa pictográficamente el siguiente concepto (**Figura I.2**): la línea horizontal en el medio simboliza la tierra, las partes superior e inferior representan el tallo y la raíz, respectivamente. Mientras que las tres líneas similares a lágrimas alrededor de la raíz ilustran los nódulos (**Figura I.2**). Hu (1963) considera que el pictograma *shu* se remonta aproximadamente al siglo XI a.C.



**Figura I.2: *Shu*, símbolo chino arcaico para la planta de soja.** En el pictograma, los antiguos pobladores de China representaban los nódulos de soja sobre las raíces. Extraído de Hymowitz, 1970.

Desde el siglo I d.C. hasta comienzos del siglo XV, la soja se introdujo en Japón, en el sudeste de Asia y en el centro-sur de Asia. El movimiento de la soja durante este período de tiempo se basó en el establecimiento de rutas comerciales marítimas y terrestres, como la ruta de la seda. También influyó la migración de ciertas tribus de China como los tailandeses. Además de que ciertas culturas, como los indonesios, aceptaron rápidamente la soja como alimento básico (Hymowitz, 1970).

Las semillas de soja habrían llegado a Holanda en el año 1737. A su vez, misioneros en China enviaron semillas de soja para que fueran plantadas en el *Jardin des Plantes* en París. Además, existen reportes de 1790 donde fueron plantadas en el *Royal Botanic Gardens* en Kew, Inglaterra (Shurtleff *et al.*, 2014).

En el año 1753, Carl Nilsson Linnæus describió la soja cultivada como *Phaseolus max*, basada en los especímenes que él había visto y como *Dolichos soja*, a los que

recopiló de las descripciones de otros escritores. No fue hasta varios años después que obtuvo unas semillas de *Dolichos soja* y las creció en Uppsala, Suecia. Así concluyó que *Phaseolus max* y *Dolichos soja* eran la misma planta (Shurtleff *et al.*, 2015). Linnæus fue quien introdujo el nombre *Glycine* en la primera edición de *Genera Plantarum*. En 1753, en *Species Plantarum* enlistó 8 especies *Glycine*. Sin embargo, estas especies con el paso del tiempo fueron identificadas en otros géneros (Hitchcock *et al.*, 1947).

Los primeros reportes de la introducción de la soja en Sudamérica fueron publicados en 1882 (Shurtleff *et al.*, 2014).

*Glycine max* es el nombre científico de la soja que los productores agropecuarios siembran en los campos.

## **I.2 La soja en los campos argentinos**

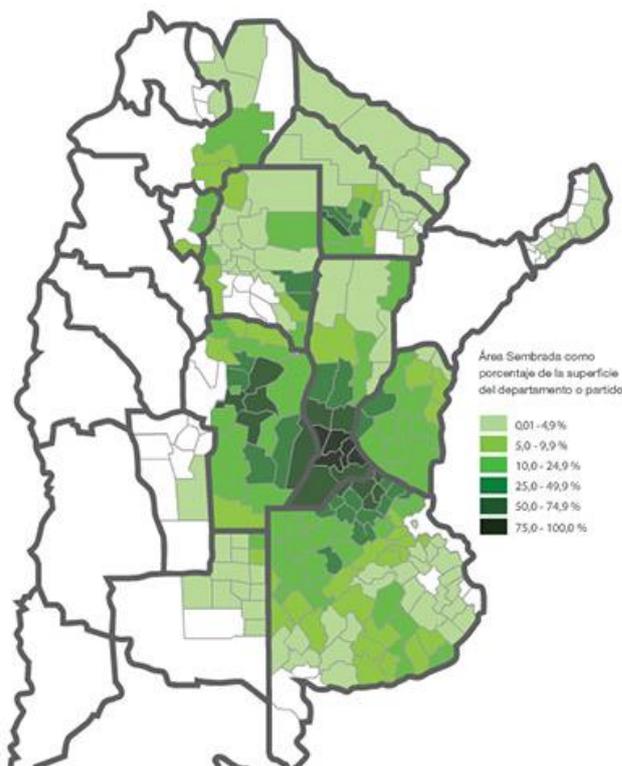
En Argentina, los primeros cultivos de soja se iniciaron en el año 1909 en la Estación Experimental Agronómica de Córdoba. Allí, se evaluó su posible utilización como forrajera y la factibilidad técnica y económica de su cultivo. En el año 1924, el Ministerio de Agricultura introdujo nuevas variedades de semillas, las cuales fueron difundidas en distintas regiones para evaluar su adaptación a diversas zonas del país, siendo este el primer impulso para su difusión. No obstante, recién en 1940 comienza el registro estadístico de la cantidad de hectáreas ocupadas por la leguminosa, no superando las 1000 hectáreas (ha). A su vez, algunos productores comienzan a evaluarla como una posible opción para la industria aceitera, ya que sus semillas contienen un alto porcentaje de aceite. Sin embargo, las condiciones climáticas, las variedades de semillas utilizadas, el desconocimiento sobre el manejo del cultivo, la baja demanda externa y el apoyo a otros cultivos de leguminosas, fueron algunas de las variables que hicieron que el cultivo de soja permaneciera casi ignorado hasta mediados de la década del '50. Hasta ese entonces, a la soja se la consideraba como una leguminosa exótica y su cultivo era tomado como una especie de abono verde, lo que la convertía en un cultivo marginal (Martínez Alvarez, 2012).

A partir de 1960, el cultivo de soja comienza su etapa como grano de exportación y, en la década del '70, diversos factores tanto externos como internos, terminan de definir el rumbo de la soja en nuestro país. Por un lado, luego de la Segunda Guerra Mundial, el mercado europeo comienza a demandar una mayor producción de suplementos alimentarios para la producción ganadera. Por el otro, se registra en esa época una fuerte caída de la oferta de harina de pescado, que hasta entonces era utilizada como fuente de proteínas por la industria de los alimentos balanceados. Estos dos factores condicionan el aumento de la demanda de los granos de soja como fuente proteica en la industria ganadera. Además, un creciente precio en alza y una fuerte demanda estimularon a algunos productores a volcarse al cultivo de soja. Por último, en 1973 se produce una caída de la exportación de soja desde Estados Unidos, lo cual da la oportunidad a Argentina y Brasil para insertarse en el mercado mundial como grandes productores de soja. A partir de allí, la región pampeana comienza a expandirse como

productora de soja, desplazando los cultivos de girasol y luego la producción ganadera, de la mano de los precios internacionales siempre en alza (Covelli, 2013).

El verdadero auge de la soja comienza en la década de los '90, cuando los cultivos de esa leguminosa, para ese entonces, ya ocupan la misma superficie que el total de los cereales. Dos factores internos terminan de determinar el salto de Argentina como potencia mundial. Por un lado, la estimulación de los productores mediante políticas de apoyo a la soja y, por otro lado, un fuerte cambio a nivel técnico, caracterizado por la introducción de distintas variedades de semillas transgénicas resistentes a glifosato. Este cambio permitió la adopción de la siembra directa y la extensión del cultivo desde la región pampeana hacia diversas zonas incluyendo el noreste y el noroeste argentino (NEA y NOA, respectivamente). Además, impulsó el desarrollo de nuevas maquinarias para la siembra directa, que a su vez contribuyeron a una mayor reducción de costos. Así, la rápida expansión territorial y el aumento de la productividad son los dos factores clave que explican el crecimiento exponencial de la producción de soja en nuestro país. De esta forma, Argentina logró convertirse en el tercer productor mundial de grano de soja, el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina de soja, generando una gran incidencia en el producto bruto agropecuario y por ende impactando significativamente en la generación de divisas.

Hoy en día, el cultivo de soja se distribuye en gran parte de nuestro país, desde la región pampeana, sobre todo en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, y hasta, aunque con una menor producción, las regiones del NOA y NEA, en donde las provincias que más aportan son Entre Ríos, Santiago del Estero, Chaco, Salta y Tucumán (Figura I.3).



**Figura I.3: Área sembrada con soja en Argentina.** Mapa parcial de Argentina donde se muestran las regiones sembradas con soja. La intensidad del color verde es proporcional al área sembrada. Modificado de la Bolsa de Comercio de Rosario. Corrientes es una provincia donde se siembra soja, pero no existen datos disponibles.

### I.3 Hacia la agricultura sustentable como motivación y objetivo de trabajo

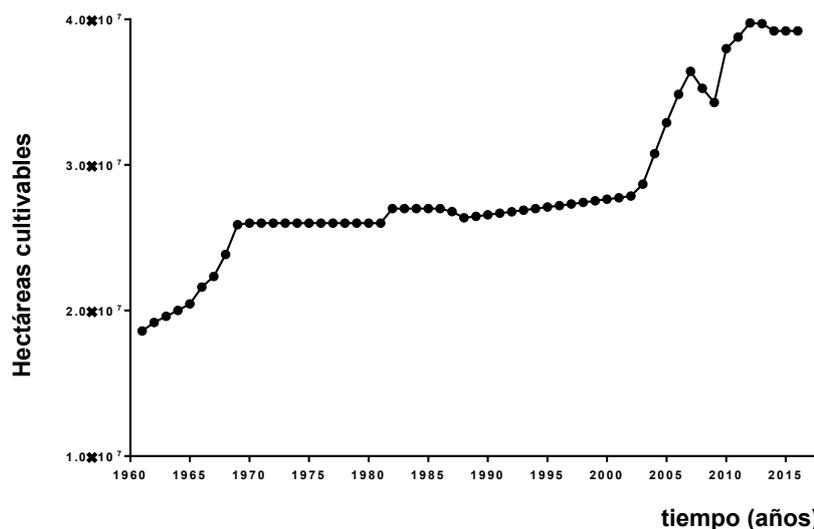
La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés, *Food and Agriculture Organization*) (<http://www.fao.org/>) es una agencia de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) que lidera el esfuerzo internacional para poner fin al hambre. Su principal objetivo es “lograr la seguridad alimentaria para todos los ciudadanos, y al mismo tiempo garantizar el acceso regular a alimentos suficientes y de buena calidad para llevar una vida activa y sana”.

Para lograr erradicar el hambre y la pobreza en el mundo, proponen cinco actividades:

- Ayudar a eliminar el hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición.
- Hacer que la agricultura, la actividad forestal y la pesca sean más productivas y sustentable.
- Reducir la pobreza rural.
- Propiciar sistemas agrícolas y alimentarios inclusivos y eficientes.
- Incrementar la resiliencia de los medios de vida ante las amenazas y crisis.

Desde el lugar que nos compete, nuestro foco está puesto en la necesidad que la agricultura sea una actividad sustentable además de productiva. Esto se entiende como un sistema de producción que tenga la capacidad de mantener su productividad y rentabilidad generando desarrollo en sus comunidades a largo plazo, cumpliendo los requisitos de abastecer adecuadamente alimentos de calidad a precios justos y, al mismo tiempo, promover ecosistemas saludables y apoyar la gestión sostenible de la tierra, el agua y los recursos naturales (Salcedo *et al.*, 2014).

La actividad agropecuaria es uno de los pilares de la economía argentina. Siendo el cultivo de soja uno de sus principales ejes. La soja es la leguminosa con mayor superficie sembrada en nuestro país, con una cantidad estimable de hectáreas cultivadas para la campaña 2019/2020 de aproximadamente 17,3 millones (Tejeda Rodríguez *et al.*, 2019). El Banco Mundial (<https://datos.bancomundial.org/>) registra los datos de cuantas hectáreas cultivables tiene cada país hasta el año 2016. En la **Figura I.4** se grafica la cantidad de hectáreas cultivables de Argentina desde el año 1960 hasta el año 2016.



**Figura I.4: Hectáreas cultivables en Argentina desde 1960 hasta 2016.** La gráfica muestra la cantidad de hectáreas cultivables de Argentina en función de los años, desde 1960 hasta 2016. Los datos fueron extraídos de la página web del Banco Mundial. (<https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.LND.ARBL.HA?end=2016&locations=AR&start=1964&view=chart>)

El Banco Mundial cuenta con datos hasta el año 2016. En esa campaña, Argentina registró 39,2 millones ha. cultivables. Siendo la cantidad de hectáreas cultivables en el país, a partir del año 2011, superior a los 39 millones. Por lo tanto, si de soja se siembran aproximadamente 17 millones ha., esto significa que, durante la campaña de verano, el 44% de los campos cultivables están sembrados con soja.

Al ser uno de los pilares de la economía de Argentina, la soja se siembra como monocultivo. Este sistema de producción acarrea consecuencias negativas en la fertilidad y en el microbioma de los suelos por el uso de productos químicos en los cultivos para controlar las enfermedades e intentar aumentar el rendimiento. Como se siembra casi la mitad de las hectáreas fértiles de nuestro país con soja, es necesario que el cultivo se convierta en una práctica sustentable para conservar la fertilidad de los suelos.

#### I.4 El suelo tiene vida

El suelo de los campos, además de su rol protagónico en la producción agrícola, es el hábitat para una gran diversidad de organismos. La importancia del microbioma del suelo ha sido reconocida por más de un siglo a través de una larga historia de investigaciones que la describen. La biomasa microbiana del suelo rivaliza con la biomasa aérea de las plantas o, incluso, los animales. El suelo, a menudo, contiene más de 1000 kg de carbono de biomasa microbiana por hectárea (Fierer *et al.*, 2009; Serna-Chavez *et al.*, 2013). Estos microorganismos del suelo tienen funciones cruciales en el ciclo de nutrientes, el mantenimiento de la fertilidad y el ciclo del carbono. A su vez tienen efectos tanto directos como indirectos sobre la salud de las plantas y los animales en los ecosistemas terrestres.

El suelo no se puede considerar como un único ambiente; sino que abarca una amplia gama de entornos que pueden contener comunidades microbianas distintas. Los ambientes distintivos del suelo pueden estar separados por micrómetros a milímetros, pero pueden diferir considerablemente en sus características abióticas, abundancia microbiana, tasas de actividad microbiana y composición de la comunidad microbiana (Fierer, 2017).

Las propiedades de los suelos, incluido el pH, la concentración de carbono orgánico, la salinidad, la textura y la concentración de nitrógeno disponible hacen que las condiciones ambientales pueden variar considerablemente entre los distintos hábitats microbianos. Es decir, las comunidades bacterianas que se encuentran cerca de la raíz de una planta o redes de hifas pueden diferir sustancialmente de las que se encuentran en ambientes de suelo que estén ubicados a sólo unos centímetros de distancia (Philippot *et al.*, 2013). Además del pH del suelo, los factores más importantes que tienen influencias notables en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo son la disponibilidad de nitrógeno (Cederlund *et al.*, 2014), el contenido de carbono orgánico (Sul *et al.*, 2013), la temperatura (Oliverio *et al.*, 2017) y el estado redox (Pett-Ridge *et al.*, 2005).

La supervivencia y el crecimiento de los microorganismos en el ambiente del suelo, a menudo, están severamente limitados. Esto se puede deber a factores abióticos persistentes como la baja disponibilidad de agua, la limitada disponibilidad de sustratos de carbono orgánico o condiciones ácidas. Además, hay que incluir el alto grado de competencia con otros taxones microbianos del suelo, eventos de secado y rehumectación, la depredación por lombrices u otra fauna y una distribución desigual de los recursos en el espacio y el tiempo (Kuzyakov *et al.*, 2015).

Es complicado para los microorganismos sobrevivir y crecer en un ambiente como lo es el suelo. Por más que el suelo se inocula artificialmente con numerosas bacterias, es poco probable que la mayoría de esas bacterias persistan en el suelo por períodos prolongados de tiempo (Acea *et al.*, 1988; Bashan *et al.*, 2014). Además, a pesar de las grandes cantidades de biomasa microbiana encontradas en el suelo, mucho menos del 1% de la superficie disponible del suelo está típicamente ocupada por microorganismos (Young *et al.*, 2004), lo que sugiere que existen restricciones bióticas o abióticas en la colonización microbiana de las superficies del suelo (Fierer, 2017). También es probable que muchos de los microorganismos encontrados en el suelo estén latentes, con un porcentaje mayor al 95% del total de la biomasa microbiana representada por microorganismos que están inactivos en un momento dado (Blagodatskaya *et al.*, 2013).

No todos los taxones microbianos son igualmente abundantes en el suelo. Las bacterias y los hongos son generalmente los microorganismos dominantes que se encuentran en el suelo; estos grupos generalmente tienen entre 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> veces más biomasa que los otros componentes principales del microbioma del suelo (protistas, arqueas y virus). Además, incluso los grupos de hongos del suelo ubicuos pueden contener grandes cantidades de diversidad novedosa (Rosenthal *et al.*, 2017). Aunque

se esté lejos de poder describir el alcance completo de la diversidad microbiana del suelo, y de comprender las capacidades metabólicas y la ecología de la mayoría de los taxones microbianos del suelo, los esfuerzos de investigación recientes han ampliado enormemente nuestro conocimiento sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo y sus roles en los ecosistemas terrestres (Fierer, 2017).

A *priori*, no se puede predecir la composición de la comunidad microbiana del suelo simplemente sabiendo qué especies de plantas están creciendo en cada suelo. Sin embargo, hay taxones microbianos específicos del suelo que se asocian preferentemente con especies de plantas. Específicamente, esto se da entre las bacterias fijadoras de nitrógeno (por ejemplo, *Rhizobium* spp y *Bradyrhizobium* spp.) que se asocian con leguminosas (Berg *et al.*, 2009). Entre las especies de rizobios y las leguminosas se establece una simbiosis en la que se genera un nuevo órgano, el nódulo, donde se produce la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Figura I.5) (Patriarca *et al.*, 2004).



**Figura I.5: Nódulos en raíces de plantas de soja.** La foto muestra una raíz de plantas de soja sembradas en el campo. Dentro de los nódulos se encuentran los rizobios que reducen el  $N_2$  atmosférico a amonio. Foto extraída de <https://www.valorsoja.com/>.

Durante décadas, se pensó que los rizobios eran los únicos habitantes de nódulos de leguminosas que fijan nitrógeno. Sin embargo, otras bacterias, que no son rizobios típicos, a menudo se detectan dentro o asociados a los nódulos obtenidos del suelo (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017).

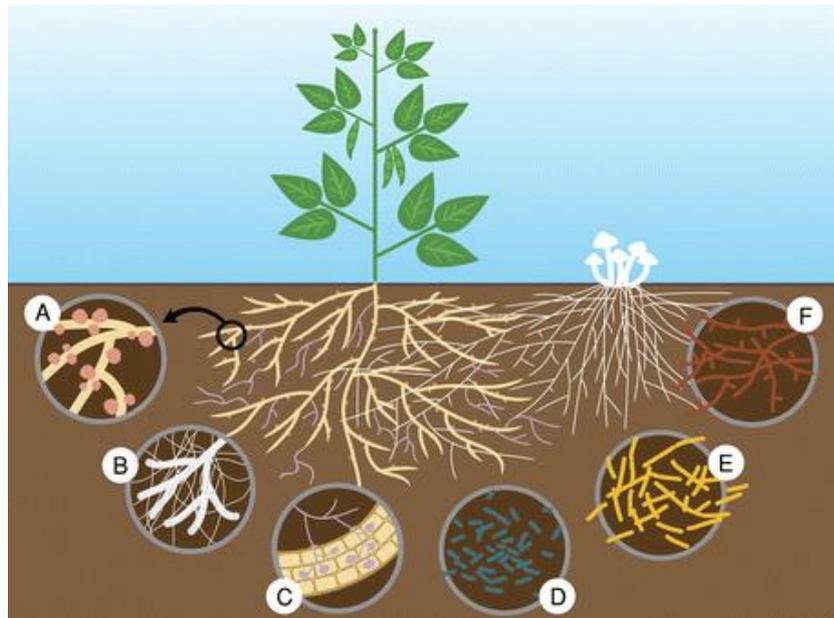
### **I.5 Microbioma del nódulo**

Es sorprendente la diversidad de bacterias que residen dentro o asociadas a los nódulos que no disparan el desarrollo de este órgano radical, ni son capaces de realizar FBN. Dentro de los microorganismos que viven en los nódulos, los más abundantes son los rizobios. Sobre los otros miembros de la comunidad microbiana que existe dentro del nódulo se han realizado pocos estudios en relación a su rol y, hasta la fecha, no se sabe si su presencia en los nódulos es biológicamente importante (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017).

La FBN por parte de las bacterias es esencial para la productividad de las plantas, especialmente en suelos pobres en N. Alrededor del 60% del N en la Tierra resulta de la FBN, mientras que los fertilizantes químicos representan aproximadamente el 25%

(Zahran, 1999). La Revolución Verde del siglo pasado dio como resultado cultivos que produjeron mayores rendimientos. Sin embargo, los cultivos mejorados dependían en gran medida de fertilizantes químicos, particularmente fertilizantes de nitrato. Esto resultó en la contaminación del agua subterránea con los consecuentes efectos negativos sobre la salud humana (McCasland *et al.*, 1985).

El fitomicrobioma o microbioma vegetal se define como los microorganismos que colonizan el espacio conectado al cuerpo de la planta, es decir, la rizosfera y la filosfera, e incluye todos los endófitos y epífitas que están directamente asociados (Quiza *et al.*, 2015). Por lo tanto, el fitomicrobioma es un subconjunto del fitobioma, que se ha descrito como plantas, su entorno y los organismos que interactúan con ellos, y que juntos influyen en la salud y la productividad de las plantas (Leach *et al.*, 2017). Tomar una perspectiva centrada en el fitomicrobioma con respecto al nódulo y mirar más allá de la interacción de una leguminosa con una sola especie fijadora de nitrógeno puede ayudarnos a comprender mejor cómo cultivar, fertilizar y proteger los cultivos de manera sustentable. Además de los rizobios, y los otros microorganismos que habitan en el interior de los nódulos, se encuentran presentes microorganismos que se asocian con las raíces (**Figura I.6**).



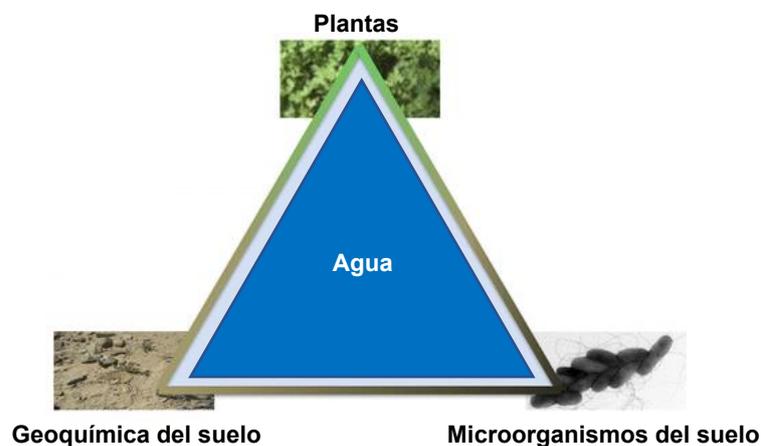
**Figura I.6: Representación de las interacciones entre las raíces de una leguminosa y su microbioma.** a) Nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de la planta debido a la interacción con rizobios. b) Hongos asociados a la raíz, por ejemplo, *Trichoderma* spp. c) Hongos micorrícicos arbusculares que interactúan con las raíces de las leguminosas utilizando la misma vía simbiótica utilizada por *Rhizobium*. d) Bacterias Gram negativas en el suelo, como *Pseudomonas*, que se establecen en la rizosfera y algunas especies pueden incluso nodular leguminosas. e) Microorganismos Gram positivos, como *Bacillus*, *Paenibacillus* y otros en la rizosfera y también dentro de los nódulos. f) Actinomicetes, por ejemplo, *Micromonospora*, *Streptomyces*, y *Frankia* que es fijadora de nitrógeno. Extraído de Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017.

Con respecto a los hongos, se encontró que las comunidades asociadas a los nódulos de las leguminosas difieren de las que se encuentran en otros tejidos de la

planta (Scheublin *et al.*, 2004). Bacterias Gram positivas y Gram negativas, algunas de las cuales tienen la capacidad de fijar  $N_2$ , son los miembros más comúnmente aislados de la comunidad de nódulos de leguminosas, fuera de los rizobios (Muresu *et al.*, 2008; Aserse *et al.*, 2013). Microorganismos como *Rhizobium radiobacter* y *Rhizobium rhizogenes* son habitantes comunes de los nódulos de leguminosas (Velázquez *et al.*, 2013). Estos otros microorganismos aislados de nódulos se llamaron originalmente bacterias de nódulo en la raíz pero ahora se conocen como microorganismos asociadas a nódulos (Rajendran *et al.*, 2012).

Debido a que desde hace tiempo se sabe que la coinoculación de rizobios con otras bacterias, por ejemplo *Bacillus* spp., promueve no sólo la nodulación (Schwartz *et al.*, 2013), sino también la disponibilidad de N en sistemas agrícolas sustentables (Rajendran *et al.*, 2012). Se supone que muchos de los microorganismos no patógenicos que se encuentran dentro de los nódulos o en los tejidos vegetales como endófitos o asociados a la raíz, podrían ser socios seguros y efectivos para mejorar la fijación de nitrógeno en las leguminosas (Sturz *et al.*, 2000). Otro ejemplo, es el uso de *Trichoderma* como promotor de crecimiento vegetal (Shukla *et al.*, 2012). La inoculación a campo con *T. harzianum* T-22 sobre cultivos de soja generó un aumento de la superficie radical y del rendimiento al momento de la cosecha (Harman, 2000).

En su libro, “*Suciedad, la erosión de las civilizaciones*”, Montgomery plantea que la relación entre plantas, microorganismos, geoquímica del suelo, y, por supuesto, agua (que permite que estos componentes interactúen), puede visualizarse como un triángulo (Figura I.7).



**Figura I.7: Triángulo de relación entre plantas, microorganismos y geoquímica del suelo.** Diseño de la figura modificado de Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017.

Este triángulo representa las interacciones benéficas entre las diversas entradas. Si el equilibrio entre los componentes se pierde, la tierra fértil, junto con la agricultura que sustenta, se erosiona y hace que las civilizaciones se desmoronen (Montgomery, 2012). Comprender que el fitomicrobioma, es un tercio del triángulo, es esencial, no sólo para preservar la salud del suelo y promover el crecimiento de las plantas, sino también para mantener nuestro planeta y sus habitantes (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017).

Desde finales del siglo XX, la investigación científica se ha centrado principalmente en la biotecnología de las plantas para mejorar la productividad de los cultivos, pero en este siglo, los científicos han renovado el interés en los microbios fijadores de nitrógeno y en los microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Martínez-Hidalgo propone que los rizobios y los otros microorganismos actúan juntos como una comunidad dentro del nódulo para facilitar la salud y la supervivencia de las plantas, particularmente en condiciones de estrés ambiental.

## I.6 Simbiosis rizobio-leguminosa

Las bacterias fijadoras de nitrógeno comprenden la mayor parte de la población microbiana de los nódulos de las leguminosas. Las  $\alpha$ -proteobacteria (como *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp.) y  $\beta$ -proteobacteria (como *Cupriavidus* spp. y *Burkholderia* spp.; Gyaneshwar *et al.*, 2011) son las más conocidas y estudiadas. Aunque los  $\alpha$  y  $\beta$  rizobios son divergentes evolutivamente, sus genes simbióticos (*nod* y *nif*) son muy similares, lo que sugiere una transferencia horizontal de genes (Bontemps *et al.*, 2010; Andrews *et al.*, 2018).

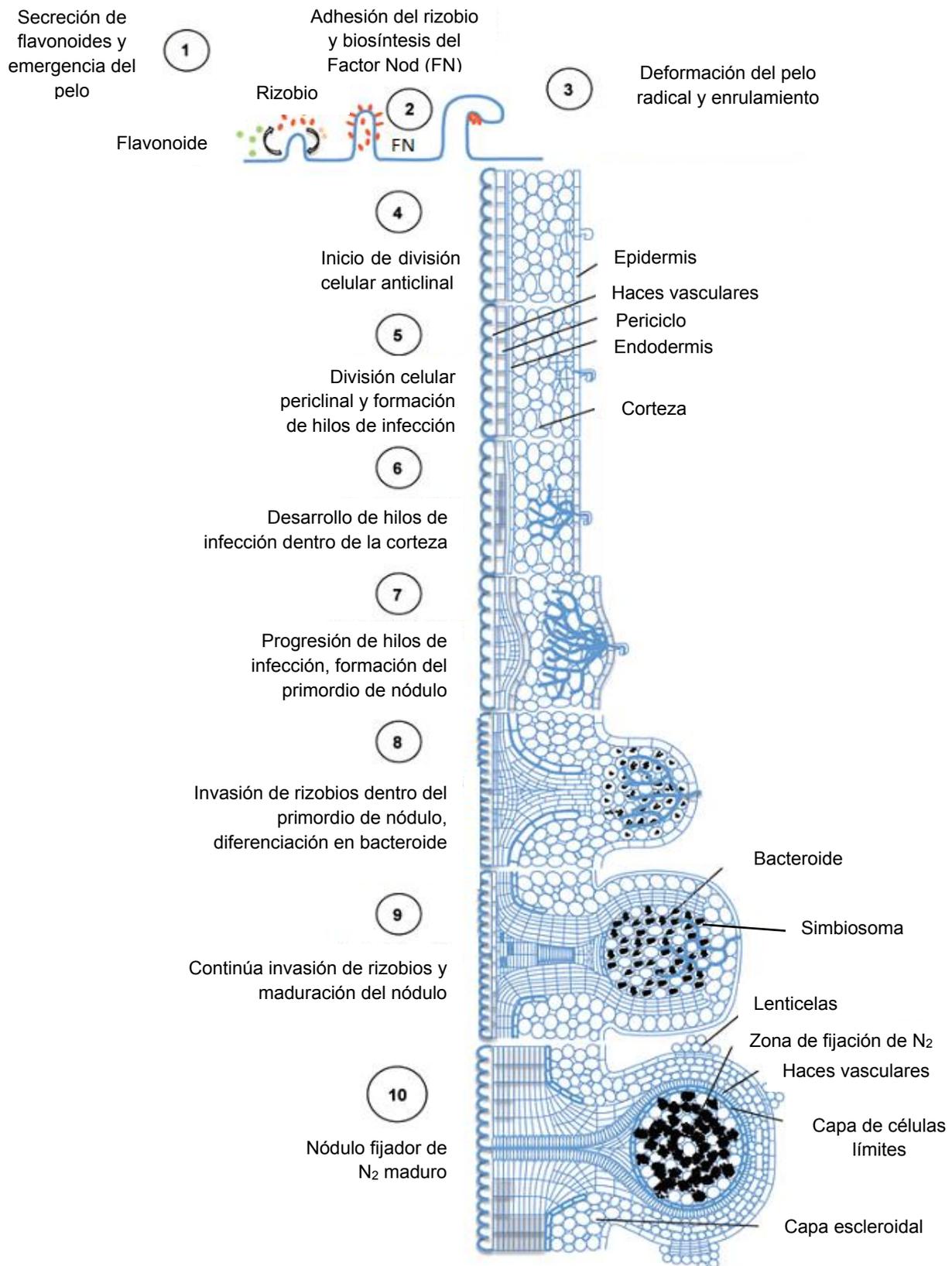
En el caso de la soja, esta leguminosa puede establecer simbiosis con pocas especies de rizobios. Estas especies son *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium elkanii* (Delamuta *et al.*, 2012) o *Ensifer fredii* (Albareda *et al.*, 2009).

A su vez, el desarrollo de los nódulos inducido por rizobios, se ve inhibido cuando en los suelos hay presencia de compuestos nitrogenados. Por lo tanto, la escasez de N, al menos en el ambiente rizosférico, es un requerimiento para establecer la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas (Ferguson *et al.*, 2019).

De esta forma, se inicia una interacción que culminará en una asociación en la cual las bacterias habitarán en órganos nuevos (nódulos) donde reducirán el nitrógeno atmosférico a amonio. Esta fijación biológica de N<sub>2</sub> beneficia a la planta, pero el costo energético para hacerlo no es despreciable, por el contrario, alrededor 13-28% de los fotosintatos totales se utilizan para alimentar a los nódulos (Vance, 2008).

Las etapas simbióticas implicadas en este proceso están muy bien caracterizadas, y suelen dividirse para abordar su estudio en (**Figura I.8**):

- El diálogo molecular y el reconocimiento simbiótico (**Figura I.8.1 y 2**)
- Adsorción superficial a raíces y colonización (**Figura I.8.3,4 y 5**)
- Invasión de la raíz (**Figura I.8.6**)
- Organogénesis del nódulo e invasión (**Figura I.8.7**)
- Diferenciación de las bacterias en bacteroides y fijación biológica de N<sub>2</sub> (**Figura I.8.8, 9 y 10**).



**Figura I.8: Etapas del desarrollo de nódulos de leguminosas determinados.** En el esquema, se ilustra las etapas de desarrollo del nódulos de soja. Los detalles se describen en el texto (Ferguson *et al.*, 2010).

### I.6.1 El diálogo molecular y el reconocimiento simbiótico

El establecimiento de una simbiosis entre la planta hospedadora y su simbiote bacteriano requiere un proceso con múltiples pasos que consisten en la percepción de señales, transducción y respuestas a esas señales (Broughton *et al.*, 2000) y también necesita una precisa regulación espacio-temporal de los genes implicados (Schlaman *et al.*, 1997). En un comienzo, moléculas fenólicas, flavonoides, producidas en el exudado radical de las leguminosas disparan la activación específica de factores transcripcionales de los genes de nodulación en los rizobios. Estos genes codifican en rizobios proteínas involucradas en disparar el desarrollo y la organogénesis del nódulo. La mayoría de estos genes de nodulación (*nod*, *noe*, y *nol*) están ubicados en un operón y sus productos inician la síntesis por parte del microbio de lipo-quito-oligosacáridos denominados factores Nod los cuales son necesarios para la infección de los pelos radicales (Downie, 1998; Perret *et al.*, 2000) (**Figura I.8.1**).

En este diálogo molecular no sólo influyen las moléculas arriba descritas, sino también otras menos estudiadas, entre ellas betaínas, ácidos aldónicos, xantonas y jasmonatos que son secretadas por la planta y que actúan como inductores de los genes *nod*, y también polisacáridos de superficie, proteínas de secreción tipo I, II y IV, homoserinlactonas, bradyoxetinas, hopanoides, lumícromos, y ácido indol acético secretadas por los rizobios (Cooper, 2007; Dalla Via *et al.*, 2016).

Existen profusas investigaciones sobre los genes implicados en la síntesis y regulación de los factores Nod, debido a su importancia en la especificidad simbiótica. Sin embargo, no pudo dilucidarse hasta el momento por qué dos especies de rizobios que sintetizan un mismo factor Nod nodulan dos hospedadores diferentes. Tal es el caso de los factores Nod sintetizados por *Rhizobium etli* y *Mesorhizobium loti*, noduladores de *Phaseolus vulgaris* y *Lotus japonicus* (entre otras) respectivamente. En caso contrario, especies de rizobios pertenecientes al mismo género que nodulan la misma leguminosa, presentan factores Nod con diferencias en sus grupos sustituyentes (Perret *et al.*, 2000).

En todas estas bacterias, el rango de hospedantes es determinado por los genes *nod* presentes en el cromosoma y/o en plásmidos (Mergaert *et al.*, 1997). Sin embargo, estos genes no se correlacionan con la filogenia (Andrews *et al.*, 2018) sugiriendo que tal vez la transferencia horizontal de material genético haya jugado un rol importante en la evolución de la simbiosis (Suominen *et al.*, 2001).

Los factores Nod inician el enrollado de los pelos radicales, la formación del primordio nodular a través de la expresión de nodulinas tempranas y permite la entrada de las bacterias a través del pelo (Patriarca *et al.*, 2004) (**Figura I.8.3**). Aquellos rizobios incapaces de formar factores Nod son incapaces de penetrar el pelo radical (Rélíc *et al.*, 1993). Así, los flavonoides y los factores Nod constituyen el primer conjunto de señales moleculares intercambiadas por los participantes que fueron muy bien estudiadas (**Figura I.8.1**).

Se ha demostrado que en respuesta a la señalización del factor Nod, en las leguminosas se establece un máximo de auxina durante el inicio del primordio de un

nódulo (Mathesius *et al.*, 1998; van Noorden *et al.*, 2007; Takanashi *et al.*, 2011; Suzaki *et al.*, 2012). Durante mucho tiempo se ha postulado que el inicio de este máximo está regulado por cambios en la capacidad de transporte de auxina (Hirsch *et al.*, 1989; Mathesius *et al.*, 1998). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales esto se logra aún no se comprenden acabadamente. Un factor que contribuye a que no ocurra es que la mayoría de las leguminosas están lejos de ser modelos de plantas ideales (Kohlen *et al.*, 2017). Sin embargo, se sabe que la síntesis y el transporte de auxina regulan el alargamiento de los pelos radicales (Velázquez *et al.*, 2013), y la acumulación local de auxina es esencial para el desarrollo de nódulos (Liu *et al.*, 2018). La nodulación requiere un equilibrio en la relación auxina/citoquinina (Caba *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2015).

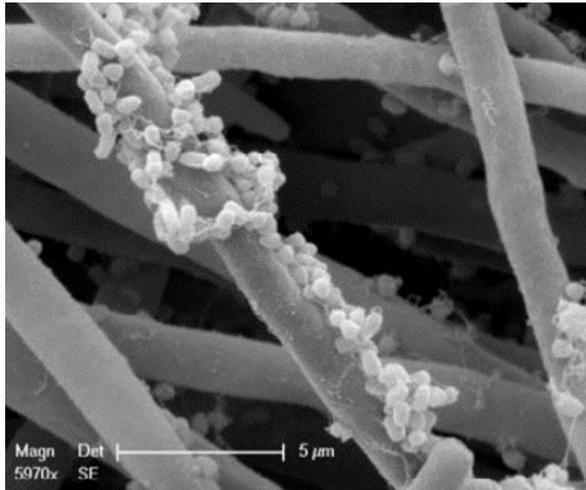
### **I.6.2 Adhesión a la superficie de las raíces y colonización**

La adhesión a raíces también es un proceso que involucra diferentes tipos de moléculas secretadas por ambos simbioses. Entre ellos, podemos citar compuestos de origen vegetal, como las lectinas vegetales y compuestos de origen bacteriano, como adhesinas, fimbrias, fibrillas de celulosa y polisacáridos de superficie (**Figura I.8.2**).

Las raíces de las plantas secretan entre un 5-20 % de los productos de fotosíntesis en sus exudados (Walker *et al.*, 2003) y así, el microhábitat inmediatamente contiguo a las raíces (rizósfera), supone un nicho ecológico rico en nutrientes con respecto al suelo circundante, siendo factible de ser colonizado por diversos microorganismos (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017).

En este sentido, muchas bacterias edáficas, además de los rizobios, han desarrollado mecanismos de adhesión a raíces, por lo que este paso de la simbiosis es compartido por diversos linajes de procariotas, no asegurando por ello una libre entrada a la leguminosa. Los microorganismos que se unen a raíces suelen permanecer adheridas promoviendo el crecimiento de las plantas (Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

Los micelios de los hongos representan la mayor parte de la biomasa microbiana del suelo y se ha demostrado que pueden crecer a través de los poros del mismo formando una red micelar que se conoce como autopista fúngica (*fungus highway*) (**Figura I.9**) (Kohlmeier *et al.*, 2005). La quimiotaxis bacteriana impulsada por los exudados radicales no puede explicar la dispersión rizobial a larga distancia (Bais *et al.*, 2004). A su vez, es imposible que los rizobios crucen los poros de aire entre los agregados del suelo mediante un movimiento activo de flagelo en ausencia de flujo de agua u otros vectores (Vicario *et al.*, 2015; Horiuchi *et al.*, 2005). Entonces, los micelios podrían constituir redes de dispersión ideales ayudando a la colonización rizosférica de las leguminosas.

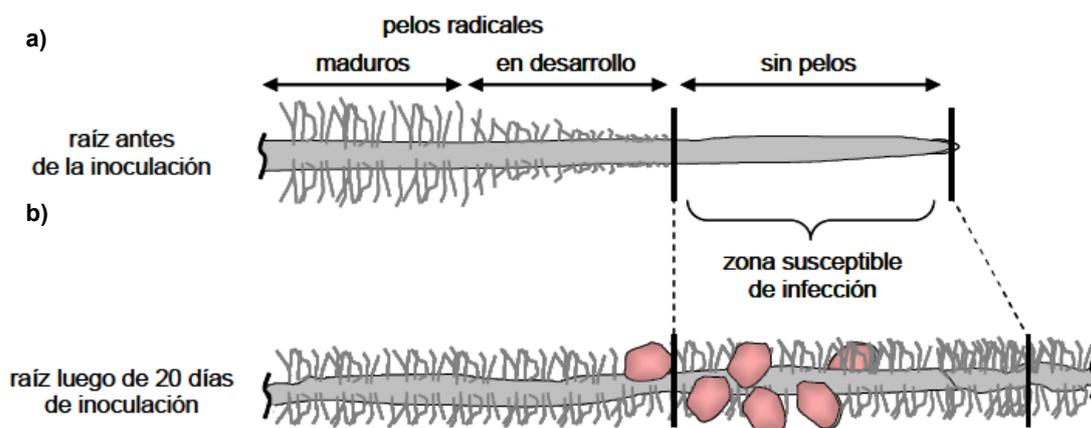


**Figura I.9: Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando bacterias sobre las hifas. *Stenotrophomonas maltophilia* sobre las hifas del hongo *Fusarium oxysporum*. Extraído de Simon *et al.*, 2015.**

Con todos estos antecedentes, ciertas cepas, tales como *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y *Enterobacter cloacae* se comercializan para incrementar la producción, pudiéndose encontrar junto con cepas de rizobios en formulaciones de inoculantes mixtos para leguminosas (Harman, 2000; Lucy *et al.*, 2004; Nelson, 2004).

### I.6.3 Invasión de los tejidos del hospedador

Existen tres zonas con diferente desarrollo de los pelos radicales a lo largo de la raíz en cuanto a su crecimiento y arquitectura celular. Sólo los pelos radicales de la zona más apical de la raíz, donde se encuentran los pelos emergentes, responden a los rizobios o a los factores Nod por deformación o enrutado (Patriarca *et al.*, 2004). En la **Figura I.10** se muestra un detalle de estas zonas sobre la raíz.



**Figura I.10 Zonas de la raíz de las leguminosas.** Representación esquemática de raíces de soja antes (a) y después de la inoculación con rizobios compatibles (b). En a) se muestran las zonas de la raíz en desarrollo en base a la zonificación de los pelos radicales y en b) se muestra el lugar de aparición de nódulos sobre la raíz madura. Modificado de Bhuvaneshwari *et al.*, 1980.

La adhesión de los rizobios a la punta de los pelos radicales provoca un cambio en la dirección de su crecimiento, de manera que se forma una especie de bolsillo donde una o muy pocas bacterias quedan atrapadas (**Figura I.8.3**). Así, a partir de este bolsillo

se originan los hilos de infección que crecerán a lo largo del pelo radical en busca del nódulo en formación. Estos hilos de infección se ramifican a nivel de la base del pelo, pasando entre las células corticales (**Figura I.8.5,6 y 7**). El pasaje del hilo de infección de una célula a otra implica degradación local de la pared celular, fusión de ésta con el hilo e iniciación de una nueva invaginación que permite el crecimiento del mismo (Ferguson *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que altos niveles de nitrato inhibieron la producción de flavonoides involucrados en la síntesis del factor Nod, infección rizobial, iniciación de nódulos, crecimiento de nódulos y actividad de fijación de nitrógeno (Carroll *et al.*, 1983; Streeter, 1985; Coronado *et al.*, 1995). Además, el alto contenido de nitrato acelera la senescencia o desintegración de los nódulos (Matamoros *et al.*, 1999). En soja, el crecimiento de los nódulos y la actividad de fijación de nitrógeno se detienen inmediatamente después de la aplicación de nitrato, y estas respuestas son rápidamente reversibles cuando se elimina el nitrato (Fujikake *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2014). Estas observación parecen estar relacionadas con que el nitrato interfiere con la acumulación de auxinas en los pelos radicales de las plantas de soja luego de la inoculación con rizobios (Caba *et al.*, 2000).

A lo largo de todo el crecimiento del hilo de infección, las respuestas de defensa de la planta deben ser suprimidas de tal manera que permitan un libre acceso de las bacterias en división y no sean reconocidas éstas como parásitos (Brechenmacher *et al.*, 2008).

#### **I.6.4 Organogénesis e invasión del nódulo**

Una vez alcanzado el nódulo en formación, las bacterias se descargan dentro de las células vegetales corticales englobadas en una vesícula por un proceso similar a la endocitosis, lo cual usualmente genera una nueva membrana vegetal llamada membrana peribacteroidal (MPB) (Patriarca *et al.*, 2004), que rodea a una o pocas bacterias formando el simbiosoma (**Figura I.8.8**). La síntesis de la MPB es compleja y se diferencia progresivamente bajo una estricta regulación. Así, en todas estas interacciones, sean parasíticas o mutualistas, se forma un simbiosoma como característica distintiva (Coba de la Peña *et al.*, 2018).

Dependiendo del genotipo de la leguminosa, el primordio del nódulo se forma en alguna de las tres capas de células de la corteza radical: interna, media y externa. Estas células, una vez invadidas, detienen su crecimiento, pero comienzan a diferenciarse en conjunción con los bacteroides para la posterior fijación de N<sub>2</sub> (**Figura I.8.8, 9**).

Los rizobios que nodulan soja producen nódulos determinados (**Figura I.5**). Los nódulos determinados, son estructuras cilíndricas sin meristema persistente en los cuales aparentemente no existe distinción zonal entre las células invadidas jóvenes y maduras (**Figura I.8.10**).

### I.6.5 Diferenciación de las bacterias en bacteroides y fijación biológica de N<sub>2</sub>

Uno de los pasos más fascinantes de las etapas simbióticas, es el que culmina en la diferenciación de la bacteria en bacteroide (**Figura I.8.8**). Numerosos genes son regulados de manera positiva y negativa una vez alcanzada la célula hospedante, tanto por el tejido radical de la planta (Libault, 2018) como por la bacteria diferenciada (Brechenmacher *et al.*, 2008).

Una vez que se completado el proceso de diferenciación de los rizobios en bacteroides dentro del simbiosoma, una cascada de señales regula la expresión del complejo de la nitrogenasa y el comienzo de la fijación biológica de N<sub>2</sub> (**Figura I.8.10**) (Fischer, 1994). La nitrogenasa es un complejo multienzimático constituido por varias metaloproteínas que se inactivan irreversiblemente en presencia de oxígeno. Tres procesos se entrecruzan para producir un ambiente microaerobio alrededor de los rizobios dentro del nódulo. Una barrera para la difusión gaseosa en las capas celulares externas de los nódulos que limita la velocidad de entrada del oxígeno al tejido central infectado. Los bacteroides y las mitocondrias vegetales que, con sus altas tasas de respiración, consumen oxígeno tan rápido como puede entrar en los nódulos; y las hemoglobinas vegetales que se unen al oxígeno en el citoplasma con alta afinidad y lo entregan rápidamente a las mitocondrias y a los bacteroides de las células infectadas. Las concentraciones en estado estacionario de oxígeno libre en las zonas infectadas de los nódulos de las leguminosas están típicamente en decenas de nanomolar, 57 nM en soja, aproximadamente cuatro órdenes de magnitud más bajos que los niveles de equilibrio en el agua (Kuzma *et al.*, 1995). Las leghemoglobinas son las proteínas vegetales más abundantes en los nódulos. Su papel, crucial en la fijación simbiótica de nitrógeno, se ha demostrado mediante genética reversa (Ott *et al.*, 2005).

Dentro de la bacteria, diversos reguladores transcripcionales, entre los cuales se encuentran NifA, FixL y FixJ, son imprescindibles para la expresión diferencial de genes que culminarán en el patrón de diferenciación y metabolismo típico de los bacteroides (Patriarca *et al.*, 2004; Brechenmacher *et al.*, 2008). Así, en este estadio terminal en que la bacteria es encerrada por una membrana de origen vegetal, la bacteria pierde el/los flagelos, es incapaz de reproducirse, expresa la enzima nitrogenasa y fija N<sub>2</sub> atmosférico, cuyo producto es cedido íntegramente a la planta. A cambio, los bacteroides reciben fotosintatos en forma de ácidos dicarboxílicos (Udvardi y Poole, 2013). Típicamente, el C ingresa a través de la membrana bacteriana vía la proteína integral transportadora de ácidos dicarboxílicos DctA (por sus siglas en inglés *C4-Dicarboxylic Acid transport protein*). Este C se canaliza mayormente hacia el ciclo de Krebs para la generación de ATP que será utilizado posteriormente por la enzima nitrogenasa. En los bacteroides que forman nódulos determinados, parte de este C es canalizado hacia PHB, mientras que en los nódulos indeterminados esto no ocurre (Liu *et al.*, 2018).

## **I.7 Fijación biológica de nitrógeno para una agricultura sustentable**

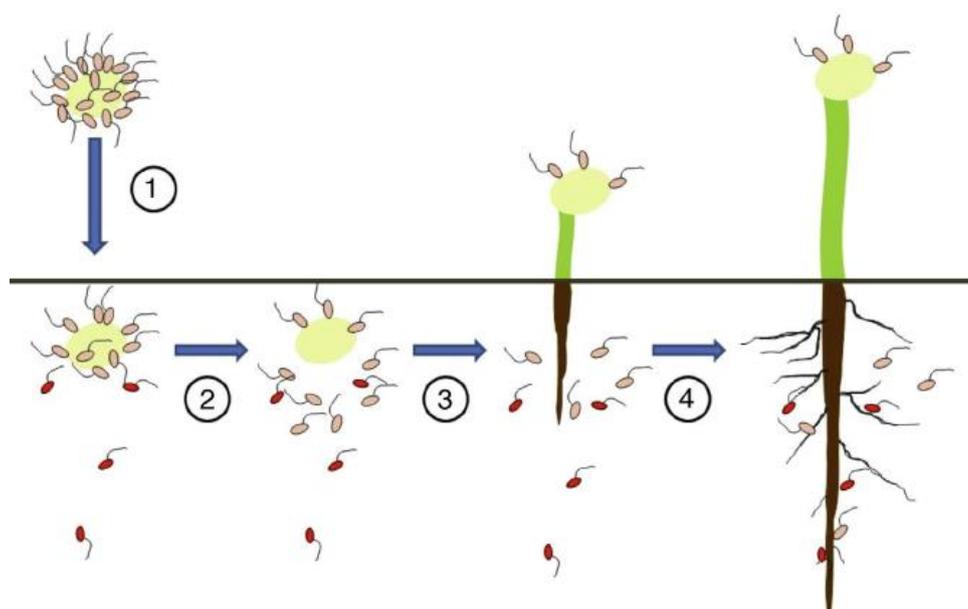
Los cultivos de soja son inoculados por los productores agropecuarios con rizobios. Hoy en día, hay cientos de empresas en nuestro país que producen inoculantes comerciales para soja.

La manera más usual de inocular la soja es mezclando las semillas con el inoculante inmediatamente antes de la siembra. De esta manera, las semillas quedan recubiertas con el inoculante, aunque la distribución suele ser heterogénea (Piccinetti *et al.*, 2013). Esta técnica tiene la característica de ser simple y práctica, ya que no requiere labores adicionales de pre o post siembra. Otra de las ventajas que presenta es que no requiere un equipamiento especial en la sembradora, por lo que todo tipo de productores la pueden implementar.

### **I.7.1 Problema de la competición para la nodulación**

El éxito de la biofertilización requiere que los inoculantes contengan cepas de rizobios de alta eficiencia en la FBN, con alta viabilidad y estabilidad, y que sean capaces de ocupar la mayor parte de los nódulos fijadores de  $N_2$  aún en presencia de la población autóctona de rizobios del suelo. Los dos primeros requisitos han sido satisfactoriamente alcanzados mediante la selección de cepas y la mejora de las formulaciones, lo que permite hoy disponer de inoculantes de alta calidad. Sin embargo, aún no se ha alcanzado una solución satisfactoria al tercer requisito, debido a la competencia que ejercen los rizobios del suelo para la ocupación de los nódulos (Pérez-Giménez *et al.*, 2011)

En los suelos donde se siembra soja, existe una amplia diversidad de rizobios noduladores de esta leguminosa. Entonces, cuando se inoculan los rizobios sobre las semillas ocurren varias etapas hasta que estas bacterias infectan las raíces de soja (**Figura I.11**) (Lodeiro, 2015).



**Figura I.11: Etapas que podrían limitar la competencia de los rizobios inoculados sobre semilla con los de la población autóctona del suelo.** Los rizobios inoculados se representan en rosa y los autóctonos en rojo. 1) las semillas con los rizobios adheridos se siembran en un suelo que contiene rizobios autóctonos distribuidos uniformemente en el perfil. 2) luego de la inoculación y la siembra ocurre la mortalidad entre los rizobios inoculados. 3) dependiendo del grado de adhesión irreversible alcanzado, algunos rizobios se desprenden de las superficies seminales mientras que otros quedan adheridos a los tegumentos; además, puede ocurrir mortalidad de los rizobios liberados al suelo. 4) parte de los rizobios sobrevivientes pueden trasladarse por movimientos activos o pasivos hasta las zonas infectables de las raíces en crecimiento, mientras que los rizobios de la población autóctona no necesitan hacerlo puesto que ya estaban distribuidos en el suelo. Extraído Lodeiro, 2015.

A pesar de la simpleza que tiene la inoculación sobre semilla, se sabe que es ineficiente para promover una buena ocupación de los nódulos por parte de las bacterias inoculadas en competencia con las de la población del suelo. Esto se debe a que las bacterias inoculadas se adhieren fuertemente a las superficies seminales y luego no se dispersan en el suelo, con lo cual no hay una buena distribución de los rizobios inoculados en la región cercana a las raíces en crecimiento (López-García *et al.*, 2009). El problema de la competencia para la nodulación constituye actualmente el principal cuello de botella para el éxito de la inoculación, especialmente en soja. Está claro que de nada sirve poseer inoculantes con cepas seleccionadas de alta calidad, preparados con formulaciones cuidadosamente desarrolladas y balanceadas, si después los rizobios inoculados no pueden ocupar los nódulos debido a la competencia ejercida por los rizobios del suelo. Más aún, se trata de un problema generalizado, que se observa con independencia de las condiciones agroecológicas locales (Pérez-Giménez *et al.*, 2011).

Por lo tanto, el resultado de la fijación de  $N_2$  total en las plantas va a estar dado parcialmente por la capacidad fijadora de  $N_2$  del biofertilizante, lo cual explica que la biofertilización raramente produzca aumentos estadísticamente significativos del rendimiento en grano.

Bajo estas condiciones es difícil aumentar la productividad por hectárea de los cultivos en forma sustentable sin el uso de agroquímicos y pesticidas.

Sin embargo, hay alternativas a la inoculación de rizobios sobre las semillas. Está demostrado en ensayos a campo que la inoculación directa de los rizobios en el suelo, practicada en el surco de siembra, mejora la distribución de los rizobios y con ello, la competitividad del inoculante para la ocupación de los nódulos (López-García *et al.*, 2009). Sin embargo, por más que la técnica presenta ventajas y existe la tecnología para aplicarla, en el caso del cultivo extensivo de soja plantea dificultades logísticas asociadas. La más condicionante es que se requieren transportar grandes volúmenes de agua ya que muchos campos, que tienen un manejo sólo con agricultura (sin ganadería), no cuentan con el equipamiento adecuado.

Esta problemática tiene solución si se desarrolla un inoculante granulado que pueda incorporarse en conjunto con las semillas al mismo tiempo en el surco de siembra. El mismo podría colocarse en la tolva de las sembradoras que se utiliza para los fertilizantes químicos granulados. Otra ventaja que presenta el inoculante granulado es que, además de estar compuesto por cepas con alta eficiencia en la FBN, podría tener otros microorganismos con capacidad de promoción del crecimiento vegetal.

### **I.7.2 Control de calidad de los inoculantes**

Actualmente, muchas empresas producen inoculantes para el cultivo de soja. Por tal motivo, es importante que los organismos de control del estado tengan normas y pautas bien detalladas que exijan y aseguren a los consumidores la calidad de los productos. Para estos aspectos, se conformó la Red de control de Calidad de Inoculantes (REDCAI), perteneciente a la Asociación Argentina de Microbiología (AAM).

La calidad de los productos ha ganado importancia como consecuencia de la globalización de la economía y del comercio internacional, por los logros alcanzados a nivel científico y a las redes de comunicación, convirtiéndose en un factor determinante en los procesos de producción y servicios. Hoy se busca obtener altos índices de productividad, eficiencia y competitividad con productos o servicios de alta calidad y al menor costo posible. Como los mercados son cada vez más competitivos y cambiantes, sumado a que los consumidores son sumamente exigentes, es necesario gestionar la calidad (REDCAI, 2013).

Cuando se habla de calidad la REDCAI se refiere a “la totalidad de parámetros que debe reunir un producto o un servicio para cumplir con el fin para el que fue fabricado o desarrollado”. Con el fin de lograr eficiencia en el progreso de control, minimizando errores para dar confiabilidad a los resultados, se requiere implementar un sistema de control de calidad (Documento de Procedimientos N° 1, 2006, REDCAI).

La legislación argentina define como Fertilizantes Biológicos a los productos que contienen uno o varios microorganismos como principal componente sobre determinado soporte; líquido, sólido u oleoso. Desde la REDCAI y en conjunto con expertos e investigadores acuerdan llamar inoculantes a “los productos formulados por microorganismos viables benéficos, seleccionados para favorecer la nutrición y/o promover el crecimiento de las plantas” (REDCAI, 2006).

La calidad de un inoculante está determinada en primer término por la eficiencia simbiótica de la cepa presente en el producto, que se elige mediante un riguroso proceso de selección. En segundo lugar, dependerá de la formulación del inoculante, la que deberá garantizar el número mínimo de células viables desde su elaboración y hasta el período de vencimiento en condiciones de almacenamiento determinados y durante el período de vida útil o tiempo de vigencia establecido por los entes de fiscalización (Bedmar *et al.*, 2006).

El período de validez de los inoculantes para el registro y comercialización está condicionado por las características del soporte y la misma va de los 6 a 18 meses, fijado por el fabricante, bajo declaración jurada y siendo las firmas las responsables de cumplir con lo declarado (Resolución N° 0264/2011 del SENASA).

Desde la REDCAI afirman que un criterio microbiológico para un inoculante consiste en “establecer los atributos que resulten de utilidad para analizar el producto, considerando los componentes del mismo que definan su calidad y eficacia”.

## **I.8 Inoculantes combinados**

En Argentina, los daños causados por las enfermedades que afectan a la soja ascienden a cifras millonarias. Para poder migrar desde una agricultura con el uso de agroquímicos a una agricultura sustentable para las próximas generaciones, es necesario incorporar con los inoculantes de rizobios otros microorganismos con otras capacidades.

### **I.8.1 Control biológico**

El control biológico o biocontrol, según la definición de Cook y Baker (1983), “es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, ya sea en su estado activo o latente, mediante uno o más organismos, lograda en forma natural o a través del manejo de las condiciones ambientales, del hospedante o de los antagonistas autóctonos, o por la introducción de uno o más microorganismos antagónicos”.

El control biológico incluye el uso de microorganismos benéficos, tales como hongos (Dal Bello *et al.*, 2001, Perelló *et al.*, 2001, 2004), bacterias (Perelló *et al.*, 2001) y nematodos, los cuales atacan y controlan a patógenos de plantas. Muchos de los antagonistas más efectivos son autóctonos y están adaptados ecológicamente al cultivo, mientras que otros, denominados exóticos, han sido introducidos desde regiones geográficas lejanas al sitio de aplicación (Stocco, 2014) .

Un organismo para ser usado como biocontrolador debe ser (Wilson *et al.*, 1991):

- Genéticamente estable
- Eficaz para un amplio rango de patógenos, aún a bajas concentraciones
- Poseer requerimientos nutricionales simples y desarrollar en sustratos pobres.
- Sobrevivir en condiciones adversas
- No producir metabolitos potencialmente tóxicos para el hombre, animales o plantas
- Resistir a los pesticidas de uso frecuente
- Ser compatible con otros tratamientos químicos o físicos.

La combinación de los agentes de control biológico con niveles reducidos de productos químicos, promueve la reducción de las enfermedades de manera similar al tratamiento tradicional (Monte, 2001).

### **1.8.2 *Trichoderma* spp. como agente de control biológico**

*Trichoderma* es un género de hongos con reproducción asexual cuyas cepas se aíslan de casi todos los suelos templados y tropicales. Además, colonizan la madera y los restos de vegetales herbáceos. En la actualidad el género se concibe como sapótrofo, habitante del suelo, de rápido crecimiento, con micelio verde o blanco, con fiálides hialinas, unicelular, conidios verdes o hialinos. Sin embargo, los conidióforos son difíciles de definir y las diferencias específicas son difíciles de cuantificar (Jaklitsch, 2009). Se caracterizan porque esporulan abundantemente y son resistentes a compuestos químicos nocivos.

En la naturaleza, las formas asexuales de los hongos persisten como clones. Probablemente los individuos y las poblaciones evolucionan de forma independiente bajo la forma asexual del hongo. Las cepas de *Trichoderma* muestran un alto nivel de diversidad genética, y se pueden utilizar para producir una amplia gama de productos de interés comercial y ecológico (Harman *et al.*, 2004)

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre, comunes en el suelo y en la rizósfera de plantas de diferentes ecosistemas (Harman *et al.*, 2004). Se los puede encontrar en un amplio rango de ambientes, como son suelos agrícolas, praderas, bosques, salinas y en zonas de clima desértico. *Trichoderma* prevalece particularmente en resto de materia orgánica húmeda (Danielson *et al.*, 1973).

Estos hongos en general tienen requerimientos nutricionales mínimos y producen una alta variedad de metabolitos secundarios (Patil *et al.*, 2016). Además, poseen la capacidad de utilizar como nutrientes una amplia variedad de materiales orgánicos naturales y de origen xenobiótico. Son reconocidos por producir una gran cantidad de proteínas extracelulares, destacándose por su capacidad para generar enzimas que degradan la celulosa y la quitina (Harman *et al.*, 2004). Por lo tanto, son considerados descomponedores secundarios de la materia orgánica del suelo.

En los últimos años, los hongos filamentosos *Trichoderma* spp. han sido foco de interés para la investigación porque pueden controlar efectivamente una amplia gama de patógenos de plantas (Harman *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007; Hermosa *et al.*, 2012).

Por ejemplo, coloniza rápidamente patógenos que habitan en el suelo, especialmente *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp., por lo que se lo considera un competidor agresivo (Usman Ghazanfar *et al.*, 2018).

Como consecuencia de esto, en Argentina, existen en el mercado una amplia variedad de productos comerciales que tienen a *Trichoderma* spp. como principio activo, tanto para horticultura como para su aplicación en cultivos extensivos.

## I.9 Resumen

Hemos planteado que la inoculación en el surco de siembra, con inoculantes líquidos, posee varias ventajas respecto a la inoculación sobre semillas. Sin embargo, en el caso del cultivo de soja se plantean dificultades logísticas asociadas a transportar grandes volúmenes de agua a distancias considerables cuando se utilizan biofertilizantes líquidos. Estas dificultades podrían resolverse si se desarrolla un biofertilizante granulado que pueda llevarse en forma seca conjuntamente con las semillas. Este biofertilizante podría combinar en el mismo inoculante diversas cepas de rizobios noduladores de soja con microorganismos promotores del crecimiento vegetal y sustancias promotoras del crecimiento bacteriano. De esta manera, mejoraríamos la productividad de los cultivos de una manera sustentable.

Nuestra hipótesis es que *la competencia para la nodulación puede mejorarse mediante el empleo de nuevos biofertilizantes granulados para aplicarse en el surco de siembra. Este desarrollo considera la competitividad intrínseca de los rizobios llevados por el biofertilizante, la incorporación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal y la tecnología de su aplicación.*

## Objetivo de este Trabajo de Tesis

Nuestra propuesta consiste en aumentar, mediante el empleo de biofertilizantes mejorados aptos para ser inoculados en el surco de siembra, la productividad por hectárea de los cultivos de soja.

Para abordar esta propuesta nos planteamos:

- Obtener cepas de *Bradyrhizobium* spp. mejoradas en su competitividad intrínseca para nodular, mediante la manipulación de su movilidad. Estas mejoras se realizarán en acervos genómicos de cepas seleccionadas procedentes de campos con historial de cultivo de soja
- Evaluar la interacción entre los rizobios y el hongo *Trichoderma harzianum* para luego analizar el efecto de la coinoculación de ambos microorganismos en plantas de soja.
- Incluir estas cepas en biofertilizantes granulados para su aplicación en el surco de siembra. Ensayar su capacidad simbiótica en experimentos controlados de laboratorio.



# CAPÍTULO II



**Materiales y métodos**



# A

continuación se describen los materiales y métodos utilizados en los experimentos de esta tesis.

## II.1 Material biológico utilizado

### II.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas de rizobios noduladores de soja que son utilizadas en el desarrollo de este trabajo se citan en la **Tabla II.1** junto a sus características principales.

**Tabla II.1 Cepas bacterianas utilizadas**

Cepas	Características	Referencia/fuente
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA 110	Cepa salvaje, $Cm^R$ , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>
	USDA 110 GFP	$Cm^R$ , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> . Recombinación simple del plásmido pRJPaph-bjGFP (Ledermann et al., 2015)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	E109	Cepa salvaje, $Cm^R$ , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> Denominación anterior USDA 138
	LP3018	$Cm^R$ , $Sm^R$ , $Sp^R$ , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>
	CAS/N-10	Cepa salvaje, $Cm^R$ , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>
	SAA/S-48	Cepa salvaje, $Cm^R$ , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>
	CAS/N-10 m <sup>+</sup>	Cepa más móvil de la cepa CAS/N-10
SAA/S-48 m <sup>+</sup>	Cepa más móvil de la cepa SAA/S-48	

Abreviaturas y símbolos: *Cm*: cloranfenicol, *Sm*: estreptomycin, *Sp*: espectinomycin. Fix: fijación de N<sub>2</sub>, Nod: nodulación. El superíndice <sup>R</sup> denomina la resistencia a un antibiótico y el <sup>+</sup>, la actividad positiva.

Los cincuenta y ocho cepas capaces de nodular soja de la población alóctona se encuentran en la **Tabla II.2** junto a la información del lugar de origen y la forma de aislamiento.

### II.1.2 Cepas fúngicas

Para los ensayos en los que se emplea el hongo *Trichoderma harzianum* se utilizó la cepa Th5cc que fue aislada del filoplano de trigo (Cordo *et al.*, 2007).

Los patógenos de soja que se utilizaron fueron gentileza de la Rizobacter Argentina S.A. y se enumeran a continuación en la **Tabla II.3**.

**Tabla II.3: Patógenos de soja**

Patógeno	Enfermedad	Cepa
<i>Alternaria</i> spp.	Mancha foliar en soja por <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> sp. D18
<i>Cercospora kikuchii</i>	Tizón morado de la hoja y macha púrpura de la semilla	<i>Cercospora kikuchii</i> D33
<i>Phomopsis</i> spp.	Tizón de vaina y el tallo y podredumbre de la semilla	<i>Phomopsis longicolla</i> DP38 <i>Phomopsis longicolla</i> DP41
<i>Rhizoctonia</i> spp.	Podrición de raíz y tallo	<i>Rhizoctonia</i> sp. RM <i>Rhizoctonia</i> sp. R24
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Podredumbre húmeda del tallo	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> L50

### II.1.3 Plantas

Se utilizó *Glycine max* (L.) Merr. (soja), variedad Don Mario 4800, provistas por Rizobacter Argentina S.A.

## II.2 Medios de cultivos bacterianos, para hongos y plantas

### II.2.1 Medios de cultivos para bacterias

Las rizobios fueron crecidos en el medio extracto de levadura-manitol (YEM) (Vincent, 1970) cuya composición es extracto de levadura 0,4 g.l<sup>-1</sup>, manitol 10 g.l<sup>-1</sup>, NaCl 0,1 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g.l<sup>-1</sup>. El medio YEM agarizado se preparó adicionando agar 1,5% (p/v) y rojo Congo 0,25% (p/v).

Las curvas de crecimiento de los rizobios y los inóculos para los ensayos de plantas se realizaron en medio AG (Sadowsky *et al.*, 1987). Contiene Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,125 g.l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g.l<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl 0,32 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,18 g.l<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub> 4 mg.l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 13 mg.l<sup>-1</sup>, HEPES 1,3 g.l<sup>-1</sup> y MES 1,1 g.l<sup>-1</sup>. Se suplementa como fuentes de carbono y energía, extracto de levadura 1 g.l<sup>-1</sup>, L-arabinosa 1 g.l<sup>-1</sup> y gluconato de sodio 1 g.l<sup>-1</sup>. Las soluciones de NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub> se esterilizaron de manera separada en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. La solución de FeCl<sub>3</sub> se esterilizó mediante filtración con membrana (filtros Millipore de 0,22 µm). Estas cuatro soluciones se agregaron en esterilidad luego de autoclavar el medio.

Tabla II.2: Cepas noduladoras de soja aisladas de suelos argentinos

<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>Aislamiento</b>
<b>CAS/S-01</b>	Castelar	Suelo
<b>CAS/S-02</b>	Castelar	Suelo
<b>CAS/S-03</b>	Castelar	Suelo
<b>CAS/S-04</b>	Castelar	Suelo
<b>CAS/S-05</b>	Castelar	Suelo
<b>CAS/S-06</b>	Castelar	Suelo
<b>CAS/N-07</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAS/N-08</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAS/N-09</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAS/N-10</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAS/N-11</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAS/N-12</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAS/N-13</b>	Castelar	Nódulo
<b>CAV/S-14-1</b>	Cavanagh	Suelo
<b>CAV/S-14-2</b>	Cavanagh	Suelo
<b>CAV/S-15</b>	Cavanagh	Suelo
<b>CAV/S-16</b>	Cavanagh	Suelo
<b>CAV/S-17</b>	Cavanagh	Suelo
<b>CAV/S-18</b>	Cavanagh	Suelo
<b>CAV/N-19</b>	Cavanagh	Nódulo
<b>CAV/N-20</b>	Cavanagh	Nódulo
<b>CUR/S-21</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-22</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-23</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-24</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-25-1</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-25-2</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-26</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/S-27</b>	Concepción del Uruguay	Suelo
<b>CUR/N-28</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-29</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-30</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-31</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-32</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-33</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-34</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>CUR/N-35</b>	Concepción del Uruguay	Nódulo
<b>NUJ/S-36</b>	Nueve de Julio	Suelo
<b>NUJ/S-37</b>	Nueve de Julio	Suelo
<b>NUJ/S-38</b>	Nueve de Julio	Suelo
<b>NUJ/S-39</b>	Nueve de Julio	Suelo
<b>NUJ/S-40</b>	Nueve de Julio	Suelo
<b>NUJ/S-41</b>	Nueve de Julio	Suelo
<b>NUJ/N-42</b>	Nueve de Julio	Nódulo
<b>NUJ/N-43</b>	Nueve de Julio	Nódulo
<b>NUJ/N-44-1</b>	Nueve de Julio	Nódulo
<b>NUJ/N-44-2</b>	Nueve de Julio	Nódulo
<b>SAA/S-45</b>	San Antonio de Areco	Suelo
<b>SAA/S-46</b>	San Antonio de Areco	Suelo
<b>SAA/S-47</b>	San Antonio de Areco	Suelo
<b>SAA/S-48</b>	San Antonio de Areco	Suelo
<b>SAA/N-49</b>	San Antonio de Areco	Nódulo
<b>SAA/N-50</b>	San Antonio de Areco	Nódulo
<b>SAA/N-51</b>	San Antonio de Areco	Nódulo
<b>SAA/N-52</b>	San Antonio de Areco	Nódulo
<b>SAA/N-53</b>	San Antonio de Areco	Nódulo
<b>SAA/N-54</b>	San Antonio de Areco	Nódulo
<b>SAA/N-55</b>	San Antonio de Areco	Nódulo

La selección de las cepas más móviles se realizó en el medio mínimo Götz (Götz *et al.*, 1982). Contiene manitol 5 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,06 g.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,53 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,25 g.l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,13 g.l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 15 mg.l<sup>-1</sup>, NaCl 5,85 mg.l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2,42 mg.l<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,28 mg.l<sup>-1</sup>, biotina 20 µg.l<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 20 µg.l<sup>-1</sup>, riboflavina 20 µg.l<sup>-1</sup>, ácido p-aminobenzoico µg.l<sup>-1</sup> y piridoxina 20 µg.l<sup>-1</sup>. La solución con manitol, fosfatos, sulfato de amonio, cloruro de sodio y molibdato de sodio fue esterilizada en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las soluciones de calcio y magnesio fueron esterilizadas en forma separada también por calor húmedo y se agregaron a la solución anterior una vez fría. Las vitaminas y la solución de sulfato ferroso fueron esterilizadas por filtración por membrana (filtros *Millipore* de 0,22 µm) y luego agregadas al resto del medio esterilizado. Para realizar el medio semisólido se colocó un porcentaje de agar de 0,3% (p/v).

Para los experimentos de la formulación del inoculante granulado, los rizobios se cultivaron en el medio Balatti modificado Glicerol (Mariani *et al.*, 2004). Para su preparación se pesaron K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g.l<sup>-1</sup>, NaCl 0,1 g.l<sup>-1</sup>, KNO<sub>3</sub> 0,8 g.l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 4,0 g.l<sup>-1</sup>. Se adicionan 0,1 ml.l<sup>-1</sup> de una solución 10% (p/v) de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O y 0,1 ml.l<sup>-1</sup> de una solución 10% (p/v) de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. Como fuente de carbono se utilizó glicerol, pero por la posibilidad de patentar la formulación no se dejará explicitada la concentración. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Las cepas de rizobios fueron crecidas en todos los medios a 28°C y los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación constante de 180 rpm.

### II.2.2 Medios de cultivos para hongos

Para cultivar los hongos se utilizó el medio Agar Papa Glucosado (APG) (Kapat, 1996). Para prepararlo, se cortaron en rodajas pequeñas 200 gramos de papa pelada y se hirvió en 500 mL de agua destilada durante 20 minutos aproximadamente. Luego se filtró el contenido, se añadió 20 gramos de glucosa y se completó con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1000 mL. Al medio sólido se le añadió agar 1,5% (p/v).

Para realizar los aislamientos de *Trichoderma* spp. se utilizó el Medio Selectivo para *Trichoderma* (TSM). Su composición es: NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> 1 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,9 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,20 g.l<sup>-1</sup>, KCl 0,15 g.l<sup>-1</sup>, cloranfenicol 0,25 g.l<sup>-1</sup>, Rosa de Bengala 0,15 g.l<sup>-1</sup>, glucosa 3,0 g.l<sup>-1</sup> y 20 g.l<sup>-1</sup> de agar. Se completa con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1000 mL. Para preparar la suspensión fungiestática se agrega 0,2 g de pentacloronitrobenceno (PCNB) en 1000 mL de agua destilada estéril. Se agrega 1 mL de la suspensión por placa de Petri.

*T. harzianum* Th5cc también se cultivó en placas de Petri con medio YEM sólido.

### II.2.3 Conservación de los microorganismos

La conservación de las cepas bacterianas a largo plazo se realizó por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica, que fueron suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 25% (v/v)

o 50% (v/v), para preservarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o a  $-20^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Para uso rutinario, alícuotas de estas reservas se hicieron crecer en el medio YEM sólido y se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  por períodos menores a los 60 días.

Para conservar los hongos, se utilizó la técnica del papel de filtro (Stocco *et al.*, 2016) Se colocaron tiras estériles de este papel de 1 cm de ancho, dentro de cajas de Petri con medio APG donde se encontraba cultivando el hongo. Se incubó en estufa durante 7 días. Una vez que el hongo colonizó el papel de filtro, se retiró y se secó a temperatura ambiente durante 7 días. Las tiras fueron conservadas dentro de sobres de papel de estraza de 7x13 cm, protegidas con papel de aluminio, en el freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### II.2.4 Antibióticos y antifúngicos

La concentración final, en los medios de cultivo de los distintos rizobios, del antibiótico cloranfenicol (*Cm*) fue de  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Para los rizobios resistentes a estreptomycin (*Sm*), la concentración final fue de  $400\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Mientras que el antifúngico Cicloheximida (*Ch*), para prevenir el crecimiento de *Trichoderma* spp. fue de  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Para ello, se prepararon soluciones *stock* de *Cm*  $20\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , *Sm*  $400\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  y *Ch*  $100\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### II.2.5 Soluciones para regar plantas

Para regar las plantas se utilizó la solución de Fåhræus modificada libre de nitrógeno (Lodeiro *et al.*, 2000). Está compuesta por  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0,11\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,12\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0,20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,17\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $0,06\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , citrato férrico  $0,005\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y los siguientes micronutrientes:  $\text{KCl}$   $3,73\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $15,5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$   $0,85\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,13\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,58\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $18\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El pH de la solución debe ser neutro. Se prepararon soluciones *stock* mil veces más concentradas (1000x) de todos los componentes y se esterilizaron mediante el uso de autoclave durante 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ , salvo la solución de micronutrientes que fue filtrada (filtros *Millipore* de  $0,22\ \mu\text{m}$ ). Una vez fríos, se incorporaron todas las soluciones en agua desionizada previamente esterilizada.

Cuando fue necesario regar con una solución nitrogenada, se suplementó al Fåhræus una solución de 2M de  $\text{KNO}_3$ . Se agregaron distintas cantidades para llegar a una solución final de 2, 5, 7 y 10 mM de  $\text{KNO}_3$ .

#### II.2.6 Medios de cultivo para control de calidad

La Red de control de Calidad de Inoculantes o REDCAI recomienda los siguientes medios de cultivo utilizados para el control de calidad: YEM, Agar Sabouraud (SABA) y Tripteína Soja Agar (TSA) (Albanesi *et al.*, 2013). Todos se esterilizaron en autoclave por 21 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

La REDCAI recomienda utilizar TSA para recuento de microorganismos heterotróficos, SABA para hongos y YEM para rizobios.

La composición de TSA es: peptona de caseína 17,0 g.L<sup>-1</sup>; peptona de soja 3,0 g.L<sup>-1</sup>; glucosa 2,5 g.L<sup>-1</sup>; NaCl 5,0 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g.L<sup>-1</sup> y agar 15 g.L<sup>-1</sup>.

La formulación del medio SABA es la siguiente, pluripeptona 10 g.L<sup>-1</sup>; glucosa 40 g.L<sup>-1</sup> y agar 15 g.L<sup>-1</sup>.

### **II.3 Procedimientos microbiológicos**

#### **II.3.1 Cultivo de rizobios**

Los cultivos iniciales (*starter*) de rizobios se realizaron inoculando una colonia aislada en los distintos medios, se agitaron a 180 rpm. a 28°C hasta saturación. Luego distintas alícuotas se sembraron en el medio indicado. Este cultivo, se diluyó 1:100 en el mismo medio fresco y se dejó crecer hasta que las células estuvieran en fase exponencial.

El crecimiento en medio de Götz semisólido se realizó inoculando las placas con un palillo en la parte central y permitiendo el crecimiento durante 15 días. Las placas se colocaron en estufa a 28°C con la tapa hacia arriba y cubiertas con parafilm para evitar su desecación.

#### **II.3.2 Estimación de la biomasa y recuento de células viables**

La biomasa de los rizobios se estimó por lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 500 nm (DO<sub>500</sub>). El número de células viables se cuantificó mediante recuento en gota, contando las unidades formadoras de colonia (UFC.mL<sup>-1</sup>) sobre el medio YEM sólido (Hoben *et al.*, 1982). Se colocan gotas de 5 µl en las que se puedan contar entre 5 y 30 UFC. Se colocan entre 10 y 15 gotas por dilución y se realizaron 3 diluciones por placa. Se incubaron a 28°C y las colonias fueron contadas a partir de los 5 días.

#### **II.3.3 Estimación del número de rizobios en muestras de suelo (número más probable)**

Para la estimación del número de rizobios en muestras de suelo, se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP). Para esta técnica, se tomó una muestra del suelo, perteneciente al horizonte comprendido entre los 0 y 20 cm de profundidad donde se realizó el ensayo a campo. 100 g de suelo se resuspendieron en 900 ml de Fåhræus estéril (Dilución 1/10). Se agitó por 30 minutos y de ahí, se practicaron diluciones seriadas (dilución 1/10). Con 1 ml de cada dilución se inocularon las semillas de soja en macetas. Para cada dilución seriada se prepararon cuatro macetas. Se dejaron las macetas en una cámara de plantas con fotoperíodo de 16 horas y temperatura constante de 30°C. Al cabo de 21 días se observaron cuántas plantas poseían nódulos. A partir del porcentaje de plantas noduladas para cada dilución se calculó el NMP de rizobios noduladores de soja presentes en la muestra de suelo mediante el empleo de tablas (**Anexo I**) (Andrade *et al.*, 1994).

### II.3.4 Cultivos duales

Los cultivos duales entre los patógenos de soja y *T. harzianum* Th5cc se realizaron en el medio APG. Se colocaron en extremos opuestos de una placa de Petri de APG discos de 0,5 cm de diámetro de los hongos crecidos y se colocaron en la estufa a 24°C. Se registró luego de 7 días el estadio final del enfrentamiento dual.

### II.3.5 Preparación de suspensión de conidios de *Trichoderma harzianum* Th5cc

Se agregó agua destilada estéril a cultivos con conidios de *T. harzianum* Th5cc cultivadas en placas de Petri con APG. Se resuspendieron los conidios y se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer y se realizaron diluciones hasta llegar a una concentración final de  $10^7$  conidios/mL.

### II.3.6 Recuento de *Trichoderma* spp. en raíces

Las raíces de los ensayos con plantas que tuvieron una condición con *T. harzianum* Th5cc se pesaron y se cortó 1 gramo de raíces y se colocaron en 9 mL de agua destilada estéril. Se agitó durante 20 minutos y se hicieron diluciones seriadas y se plaquearon en el medio TSM. Las placas permanecieron en la estufa a 24°C hasta que se pudieran contar las colonias del hongo.

### II.3.7 *Trichoderma harzianum* Th5cc como endófito en raíces de soja

Se siguió el protocolo descrito en Russo (Russo *et al.*, 2018). Brevemente, las raíces de soja se esterilizaron con etanol, luego con una solución al 10% (v/v) de hipoclorito de sodio y, por último, se enjuagaron con agua destilada. Los pequeños trozos de raíces se colocaron sobre una placa con medio APG y se incubaron a 24°C durante 7 días.

## II.4 Técnicas de biología molecular

### II.4.1 Obtención de ADN total mediante resina

Se realizó la extracción de ADN para su posterior utilización en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de una estría de cultivo, se recogió masa bacteriana con un ansa y se resuspendió en 500  $\mu$ L de NaCl 1M. Se agitó con vórtex y se incubó a 4°C toda la noche. La muestra se centrifugó en microcentrífuga a 14000 X *g* durante 4 minutos y el pellet obtenido se lavó 2 veces con agua bidestilada estéril. Si la cepa tenía mucho exopolisacárido, se retiraba generando turbulencia sobre el pellet con una pipeta automática. Luego, se continuó con el protocolo empleando una resina de calidad para biología molecular que une ADN (Walsh *et al.* 1991). Se agregó 150  $\mu$ L de resina Chelex-100 (Bio-Rad) 5% (p/v) con agitación y se mezcló manualmente. Se incubó durante 20 minutos a 56 °C, se agitó con vórtex y se volvió a incubar durante 8 minutos a 99°C. Se conservó a 4 °C.

### II.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico (*BIOER Life Express*). Para los ensayos de *Fingerprint* se utilizó el cebador (*primer*) BOX-A1R (Koeuth *et al.*, 1995). La composición de las mezclas de reacción fue: *buffer* Tris-HCl 10x, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, dNTPs 200 μM, 20 μM del *primer* BoxAR1 y 2 unidades de Taq polimerasa (*Invitrogen*), llevados a un volumen final de 20 μL. Como molde se utilizó 2 μL de la resina de cada cepa. El ciclado se realizó respetando el esquema básico de una desnaturalización inicial; 35 ciclos de desnaturalización, hibridación (*annealing*) y elongación; y por último una elongación final. En la **Tabla II.4** se detallan los tiempos y temperaturas utilizadas.

**Tabla II.4** Ciclado utilizado en la PCR con el primer BOX-A1R

Ciclado	BOX-A1R
Desnaturalización inicial	95°C – 5 minutos
Desnaturalización	94°C – 1 minuto
35 ciclos	Hibridación 52°C – 1 minuto
	Elongación 65°C – 8 minutos
Elongación final	68°C – 16 minutos

Para amplificar la porciones del gen codificante para el ARNr16S y los genes constitutivos (genes *housekeeping*) se utilizaron los *primers* de la **Tabla II.5**.

**Tabla II.5:** *Primers* empleados para amplificar los genes ARNr16S, *recA*, *atpD* y *glnII*

Primer	Secuencia (5'-3')	Target	Referencia
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ARNr16S (9-29)	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
rD1	CTTAAGGAGGTGATCCAGCC	ARNr16S (1474-1494)	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
TSrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGA	<i>recA</i> (8-32)	(Stępkowski <i>et al.</i> , 2005)
TSrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACC	<i>recA</i> (620-594)	(Stępkowski <i>et al.</i> , 2005)
TSatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	<i>atpD</i> (189-208)	(Stępkowski <i>et al.</i> , 2005)
TSatpDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG	<i>atpD</i> (804-784)	(Stępkowski <i>et al.</i> , 2005)
TSglnIf	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	<i>glnII</i> (13-38)	(Stępkowski <i>et al.</i> , 2005)
TSglnIIf	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCTG	<i>glnII</i> (681-660)	(Stępkowski <i>et al.</i> , 2005)

El ciclado empleado para estas reacciones de PCR se detalla en la **Tabla II.6**:

**Tabla II.6** Ciclado utilizado en la PCR con los *primers* **Tabla II.3**

Ciclado	
Desnaturalización inicial	95°C – 2 minutos
Desnaturalización	95°C – 45 segundos
35 ciclos	Hibridación 58°C – 30 segundos
	Elongación 72°C – 1.5 minutos
Elongación final	72°C – 7 minutos

Al finalizar la reacción en cadena de la polimerasa, los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa.

### II.4.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para observar los productos de la PCR se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. El porcentaje utilizada fue del 2% (p/v) que fue preparado utilizando la solución *buffer* TBE (Tris 89 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2,5 mM, BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 89 mM, pH 8,2). Las muestras producto de la PCR se mezclaron para la siembra con la solución de carga 6x (sacarosa

40% (p/v) y azul de bromofenol 0.25% (p/v) en TBE). Las corridas se realizaron a voltaje constante de 70 volts durante 3 horas, utilizando como solución de corrida la solución *buffer* TBE. Además, se sembró en cada corrida el marcador de peso molecular 100 pb ADN *Ladder* (Promega).

#### II.4.4 Revelado de los geles y fotografía

El agregado de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$  a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 120 (software EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

#### II.4.5 Estimación de los pesos moleculares de fragmentos por electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb ADN *Ladder* de Promega. Se compone de 11 fragmentos individuales purificados por cromatografía (en pares de bases): 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100. El fragmento de 500 bp presenta una intensidad superior y se comporta como banda de referencia.



**Figura II.1:** Marcador de peso molecular 100 pb ADN *Ladder*. Perfil de bandas del *Ladder* en un gel de agarosa 2% (p/v)

#### II.4.5 Purificación en taco de agarosa

Al observar los fragmentos de interés se prosiguió a la purificación de los mismo. Los fragmentos extraídos preferentemente no deben ser expuestos a luz ultravioleta para evitar cualquier tipo de daño en el ADN que queremos utilizar. Luego de cortar la banda del gel con el fragmento que se deseaba se lo colocó en un tubo de plástico de 1,5 ml. La purificación se realizó con el kit comercial *Bioneer Accuprep "Gel Purification kit"*.

#### II.4.6 Secuenciación de los fragmentos de ADN

El ADN fue secuenciado utilizando un analizador ABI3730XL, por encargo en *Macrogen Inc.* (Corea del Sur).

## II.5 Ensayos biológicos

### II.5.1 Ensayos de natación (*swimming*) en agar semisólido

Los ensayos de natación en agar semisólido se realizaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 25 mL de medio Götz o AG y concentración de agar 0,3% (p/v), que se pincharon con un palillo estéril en el centro de cada placa. Las cajas se incubaron hacia arriba en una estufa que mantenía la temperatura a 28°C. Cuando las bacterias comenzaron a nadar, se registró el diámetro del halo de natación (mediante observación de la turbidez producida por las bacterias que se han desplazado desde el centro de la placa) en función de los días.

### II.5.2 Proteínas extracelulares

#### II.5.2.1 Extracción de proteínas extracelulares

Los cultivos se crecieron a 180 rpm y 28°C, durante el tiempo requerido. En el momento de ser procesados se enfriaron en agua-hielo, se agitaron con vórtex cada muestra durante 4 minutos y se centrifugaron a 11000 X *g* durante 30 minutos. El sobrenadante se precipitó con PEG 1,33% y NaCl 16.6 mM finales durante dos a tres horas a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 15000 X *g* durante 40 minutos y el precipitado se resuspendió en el menor volumen posible. En los casos en que el volumen fuera muy grande se volvió a centrifugar en tubos de polipropileno de 1,5 mL a mayor velocidad con el fin de concentrar más la muestra. El precipitado resuspendió en *buffer* de rehidratación (Urea 5M, tiourea 1,5M, isopropanol 2% v/v y Tritón x 100 1% (v/v) y *buffer* de siembra de geles desnaturalizantes (Laemmli, 1970).

#### II.5.2.2 Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se empleó la metodología de Laemmli (1970). Los geles de apilamiento se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 8,8. En ambos casos con el agregado de SDS para obtener desnaturalizantes. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo durante 120 minutos a voltaje constante de 100 volts.

#### II.5.2.3 Tinción de las proteínas extracelulares

Los geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie Blue Coloidal (Neuhoff., *et al.*, 1988 y 1990). La tinción de los geles se realizó con una fijación inicial con la solución de fijación 1 durante 12 horas aproximadamente. Dicha solución 1 contiene 5,14 M de etanol 96% y 0,38 M de ácido fosfórico 85% (v/v). Se hicieron 3 lavados de 20 minutos cada uno, con solución de lavado 0,38 M de ácido fosfórico. Luego se fijó con 15 mL de solución de fijación 2 durante 30 minutos, cuya composición es 1,14 M de sulfato de amonio, 0,38 M de ácido fosfórico y 3,1 M de etanol. Cumplido este tiempo, se adicionó a esta solución 4% de su volumen de una suspensión de Coomassie Blue Coloidal (G-250) 2% (p/v) y se dejó al menos 24 horas para ver desarrollo completo de

la tinción. Finalmente se llevaron a cabo sucesivos lavados con agua bidestilada. El registro digital se realizó con una cámara Dual Pixel 12 MP.

### **II.5.3 Esterilización superficial y germinación de semillas**

Las semillas de soja se lavaron 10 segundos con alcohol 96° y se enjuagaron con agua destilada. Se transvasaron a un Erlenmeyer estéril junto con una solución de hipoclorito de sodio comercial diluida al 20% (v/v) durante 10 minutos con agitación constante. Seguidamente, se lavaron las semillas diez veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron colocadas sobre una placa cuadrada de 30 cm de lado con agar agua al 1,5% durante tres días en oscuridad a 28°C.

### **II.5.4 Ensayo de nodulación en macetas**

Se trabajó con macetas plásticas de 650 cm<sup>3</sup> conteniendo perlita/arena estéril. Las macetas utilizadas eran nuevas y no se volvieron a reutilizar para evitar las contaminaciones. La esterilización de la perlita se realizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Cada maceta se regó con la cantidad necesaria de solución Fåhræus libre de bacterias e inmediatamente se sembró una plántula de soja. Las mismas fueron inoculadas con 1 mL de cultivo de *B. japonicum* E109 con una concentración de 1x10<sup>6</sup> UFC/mL. De cada condición se ensayaron 10 plantas y siempre se colocaron macetas sin inocular como control negativo de cada ensayo. Cada una de las macetas fueron selladas con una tapa plástica con un orificio en el medio por donde la planta pudiera emerger. Las macetas fueron llevadas a una cámara de cultivo a una temperatura de 30°C con un fotoperíodo de 16 horas durante 21 días. Se las regó intercalando agua estéril y solución de Fåhræus.

Los nódulos de cada tratamiento fueron extraídos, contados y para determinar su peso seco, fueron colocados en tubos de plástico de 1,5 mL con un pequeño orificio en la parte superior y llevados a la estufa a 60°C durante 7 días. La parte aérea de cada planta de soja fue ubicada en bolsas estilo *Kraft*® y se llevaron a la estufa a 60°C durante 15 días. Luego de transcurrido el tiempo necesario, se pesaron en una balanza analítica.

### **II.5.5 Ensayo de coinoculación en macetas**

Para los ensayos donde las plantas fueron coinoculadas con *Bradyrhizobium* spp. y *Trichoderma* spp. se realizó el mismo procedimiento explicado anteriormente; con la modificación de que se preparó una solución de esporas de *Trichoderma* spp. con un título de 1x10<sup>7</sup> UFC/mL para inocular las plantas. Para la condición de coinoculación, se empleó una solución de rizobio con 2x10<sup>6</sup> UFC/mL y una solución de suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. con 2x10<sup>7</sup> UFC/mL. Y se preparó luego el inóculo con la mitad de volumen de la solución de rizobio y mitad de volumen de la suspensión de esporas del hongo para que las concentraciones finales sean iguales a la de sus respectivos controles.

### **II.5.6 Ensayo de coinoculación en macetas suplementadas con KNO<sub>3</sub>**

Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, salvo que las macetas fueron humedecidas con una solución de Fåhræus suplementada con distintas concentraciones de KNO<sub>3</sub> (*EMSURE® ISO, Merck*). Las concentraciones ensayadas fueron 2 mM, 5 mM, 7 mM y 10 mM de KNO<sub>3</sub>.

### **II.5.7 Ensayo de *fungus highway***

Se siguió el protocolo descrito por Simon para la observación del *fungus highway* (Simon *et al.*, 2015). Placas con medio YEM se colocaron en la estufa por 48 horas. Con un bisturí se cortó la zona central con un ancho de aproximadamente 0,5 cm. Estas placas se incubaron nuevamente en la estufa para descartar la presencia de contaminantes. Una vez que se comprobó que estaban estériles, se colocó un disco con micelio y conidios de *T. harzianum* en una zona de la placa. Se cultivó durante dos días en la estufa y pasado este tiempo, se colocó un cultivo en fase exponencial del rizobio en la misma zona que estaba el micelio del hongo. En la otra porción, se añadió una semilla de soja pregerminada en condiciones de esterilidad. Una vez que el hongo colonizó toda la placa, la semilla se colocó en una maceta y se desarrolló durante 21 días hasta que se cosechó para observar los nódulos en sus raíces.

### **II.5.8 Determinación de auxinas**

Hifas de *T. harzianum* Th5cc se colocaron en medio YEM líquido sin rojo congo y se agitaron a 180 rpm durante 7 días a 24°C. Pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 13000 X *g* durante 3 minutos y el sobrenadante se usó para la determinación de auxina con el reactivo de Salkowski (Gravel *et al.*, 2007). La cuantificación se realizó a 535nm en comparación con una curva de calibración construida con ácido indolacético purificado (AIA, *Sigma Chemical Co.*) como estándar.

## **II.6 Microscopías**

### **II.6.1 Microscopía óptica**

Las observaciones de bacterias se llevaron a cabo con un microscopio óptico Carl Zeiss Jenaval con aumentos de 500x o 1.000x y se registraron con una cámara digital Canon Powershot A610 acoplada. Alternativamente se usó un microscopio Nikon Eclipse E400 equipado con una cámara digital Nikon CoolPix 4500.

### **II.6.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Se utilizó la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para observar la ultraestructura de los nódulos obtenidos en las raíces de soja. Éstos fueron retirados con mucho cuidado y se colocaron en una placa para el corte. Se bañaron con glutaraldehído al 2% preparado en *buffer* fosfato (PB) para que el material evite la deshidratación y se inicie la fijación del tejido. La solución de glutaraldehído al 2% se prepara colocando

8 mL de glutaraldehído al 25%, 50 mL de *buffer* fosfato y 42 mL de agua destilada. El *buffer* fosfato 0,2M (pH:7.4) lleva cada 500 mL de agua destilada 11,94 g de NaHPO<sub>4</sub> y 2,96 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se realizan los cortes en los nódulos con dos hojas estilo *Gillete*<sup>®</sup>. Y se coloca en un tubo de plástico de 1,5 mL con un volumen 10 veces mayor al volumen total de la muestra colocada. Se le adiciona una membrana de goma para que los nódulos no suban a la superficie y queden en el seno del líquido fijador. A los tubos destapados, se les realiza vacío durante 30 minutos para que la solución fijadora penetre en el tejido vegetal; luego, se rompe el vacío lentamente, se eliminan las burbujas de aire de la solución de fijación y se vuelve a realizar vacío durante 30 minutos. Esta operación se repite cuatro veces a temperatura ambiente.

La muestra se lava con *buffer* PB para eliminar el exceso de fijador. Transcurrido el tiempo de fijación, retirar la solución fijadora y colocar en *buffer* PB. Realizar tres cambios cada 30 minutos a temperatura ambiente. En este paso, los nódulos fueron llevados al Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y TBU Roxana Peralta se encargó de seguir el protocolo.

Una vez que la muestra estaba lista para la observación, se empleó el microscopio JEM 1200 EX (Laboratorio JEOL, Japón Óptica Electron Cot, Ltd) manipulado por la Dra. Susana Jurado.

## **II.7 Procedimientos del inoculante granulado**

### **II.7.1 Desarrollo del inoculante granulado**

Los detalles en referencia al armado del granulado se omitirán en este manuscrito ya que el desarrollo de esta nueva presentación es susceptible de ser patentado.

### **II.7.2 Evaluación del control de calidad**

Se realizaron recuentos al momento de obtención, a la semana, al mes, a los tres meses y a los seis de los inoculantes, siguiendo un protocolo modificado para llevarlo a escala de laboratorio, basándonos en el que propone la REDCAI.

#### **II.7.2.1 Preparación del homogenato**

La REDCAI recomienda utilizar 10 g de producto en 90 mL de solución fisiológica. Debido a que la masa de inoculante granulado que se produce a escala de laboratorio es del orden de 10 g, decidimos evaluar de manera proporcional una cantidad más pequeña que la que sugiere la REDCAI. Por lo que se extrajo 1 g de granulado y se resuspendió en 9 mL de solución fisiológica con 36 µL de solución Tween 80. Esta es la dilución 10<sup>-1</sup>. Se agitó durante 15 a 20 minutos hasta suspensión total del inoculante granulado.

#### **II.7.2.2 Preparación de las diluciones de trabajo**

Se tomó 1 mL de la solución 10<sup>-1</sup> con pipeta automática, y se realizaron diluciones seriadas hasta 10<sup>-7</sup>, homogeneizando en vórtex luego de cada dilución.

### II.7.2.3 Siembra de las diluciones

En medio YEM se sembraron las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , utilizando el método de la gota (Hoben *et al.*, 1982). Las lecturas de rizobios se realizaron a la semana post incubación. En caso de existir una cantidad de rizobios superior se realizaron más diluciones para facilitar la lectura.

En cuanto a microorganismos contaminantes se sembraron 100  $\mu$ L, tomados con pipeta automática, desde la dilución  $10^{-2}$  hasta  $10^{-4}$  por duplicado por extensión en superficie con espátula de Drigalsky, en placas de Petri conteniendo TSA o SABA según corresponda. Se incubaron por 7 días, con lecturas intermedias a las 24 y 48 horas.

### II.7.2.4 Determinación del pH

La REDCAI recomienda realizar un homogenato con 10 g de producto en 25 mL de agua desmineralizada, pero para llevarlo a escala de laboratorio se decidió medirlo en la solución  $10^{-1}$  con un electrodo de vidrio para pH calibrado con soluciones patrón.

### II.7.3 Cálculo de dosis del inoculante granulado

Evaluación de la nodulación y medida de la fijación biológica de nitrógeno (FBN): para determinar la cantidad de inoculante granulado agregado se tomó como referencia una dosis baja de fertilizante de 50 kg/ha (Barbagelata, 2011). Las macetas utilizadas tienen un radio de 4.5 cm (0.045 metros). Por lo que la superficie es  $\pi r^2 = \pi (0.045\text{m})^2 = 6.36 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ .

Con la referencia de la dosis de fertilizante y la superficie de la maceta, se calculó la dosis del inoculante granulado. La cual resultó ser 0.032 g para la superficie de la maceta. Sin embargo, como es una cantidad pequeña (aproximadamente lo que pesa un gránulo), decidimos agregar 4 veces más: 0.128 g.

### II.7.4 Recuento de rizobios en el soporte débilmente adherido a las raíces

Al retirar las plantas de las macetas, las raíces tenían adheridas en sus raíces parte del soporte. Este soporte débilmente adherido a las raíces se recolectó, se pesó y se hizo una dilución  $10^{-1}$  en solución fisiológica. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio YEM suplementado con *Ch* y *Cm* mediante el método de la gota (Hoben *et al.*, 1982).

## II.8 Análisis estadísticos y bioinformáticos

### II.8.1 Análisis estadísticos

En los ensayos de plantas se utilizó el análisis de varianza (ANOVA). Para establecer entre qué medias existían diferencias significativas se utilizó el test de Tukey. Para evaluar el ensayo de competición para la nodulación se realizó una transformación angular de los porcentajes de ocupación de nódulos antes de aplicar un ANOVA (Lison *et al.*, 1976). Para tener en cuenta la posibilidad de que los nódulos estuvieran ocupados por ambas cepas competidoras al mismo tiempo (doble ocupación), se utilizó un análisis de  $\chi^2$ . Esta misma prueba fue utilizada en el análisis de clados obtenidos mediante la

tipificación molecular con BOX-A1R, en donde se evaluó la distribución de los agrupamientos observados.

### **II.8.2 Análisis bioinformáticos**

Para el análisis del perfil de bandas obtenido con los cebadores BOX-A1R, se utilizó el software *Gelcompar II 4.0* (*Applied. Maths*, Kortrijk, Belgica). Los geles fueron normalizados por medio del marcador de peso molecular y analizados por presencia o ausencia de bandas. A su vez, al perfil de bandas obtenido se le aplicó una optimización y una tolerancia de 1,5%. El cladograma se obtuvo con el algoritmo UPGMA (Sneath and Sokal, 1975) y el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1912).



# CAPÍTULO III



**Caracterización de cepas noduladoras de  
soja aisladas de suelos argentinos**



**A**rgentina no es el centro de origen de las plantas de soja. Hoy en día, es imposible pensar en los paisajes campestres de Argentina, en temporada de verano, sin cultivos de soja. Debido a esto, se conjetura que, antes de la introducción del cultivo, los suelos del país deberían haber estado desprovistos de rizobios con la capacidad de nodular esta leguminosa (Lodeiro, 2015).

A partir de la revolución verde, se han introducido en el sistema agropecuario muchas mejoras a nivel tecnológico, una de ellas ha sido la incorporación de los inoculantes con rizobios. Esta práctica, está ampliamente distribuida en dicho sector basada en la creencia de que la población autóctona de rizobios noduladores de esta leguminosa son menos eficientes en la fijación biológica de nitrógeno (FBN) que aquellas bacterias que forman parte del inoculante seleccionadas por su alta capacidad en la FBN (Lodeiro, 2015).

Tal ha sido el impacto de los inoculantes en el mercado que, en la actualidad, el 94% de los productores agropecuarios del país los emplean en sus cultivos de soja. Estos inoculantes poseen diversas cepas de rizobios noduladores de soja (Piccinetti *et al.*, 2013). Se han incorporado en los suelos de los campos inoculantes basados principalmente en cepas identificadas como *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *Bradyrhizobium elkanii*. A medida que se sucedieron campañas de siembra e inoculación, estas cepas se han establecido como los componentes autóctonos de la microbiota del suelo local. Dentro de las especies que

forman parte de esta población alóctona noduladora de soja, se han producido diversos cambios genéticos que se han ido acumulando y esto llevó a que divergieran de los inoculantes originales, adaptándose a los suelos que habitan (Melchiorre *et al.*, 2011).

Con el objetivo de estudiar la diversidad de la población alóctona de microorganismos noduladores de soja en los suelos argentinos, nuestro laboratorio obtuvo, una colección de cepas aisladas de distintos suelos con historial de cultivo de soja de Argentina (Covelli, 2015). Para esto se colectaron muestras de zonas representativas dentro de nuestro país con alta productividad en los cultivos de soja (Figura III.1):

- **INTA Castelar (CAS)**, provincia de Buenos Aires (34°36'15"S; 58°40'27"O).
- **Kilgruman en Cavanagh (CAV)**, provincia de Córdoba (33°27'42"S; 62°17'9"O).
- **INTA Concepción del Uruguay (CUR)**, provincia de Entre Ríos 32°23'17"S; 58°45'20"O).
- **INTA Nueve de Julio (NUJ)**: provincia de Buenos Aires (35°30'54"S; 61°00'04"O).
- **INTA San Antonio de Areco (SAA)**: provincia de Buenos Aires (34°15'00"S; 59°28'00"O).



**Figura III.1:** Lugar de procedencia de las cepas noduladoras de soja de la colección del laboratorio LIRyS. Mapa satelital con las localidades donde se sembraron las plantas trampa y se tomó muestra de suelo para componer la colección de cepas de rizobios noduladores de soja. Los lugares son, de norte a sur: INTA Concepción del Uruguay, Kilgruman en Cavanagh, INTA San Antonio de Areco, INTA Castelar e INTA Nueve de Julio.

En la confección del cepario se tuvieron en cuenta, por un lado, aquellas cepas que eran capaces de generar nódulos en las raíces de plantas de soja en las condiciones edafoclimáticas de cada una de las localidades seleccionadas. Y por el otro, aquellas cepas que conformaban la población alóctona pero que no formaron nódulos en las mencionadas condiciones. Las primeras cepas de la colección se obtuvieron mediante el empleo de plantas trampa de soja que fueron sembradas, sin inocular, en los suelos de las distintas localidades. Consecuentemente, los nódulos que se encontraron sobre las raíces de estas plantas provenían de cepas pertenecientes a la población alóctona. Estas

cepas, que en las condiciones edafoclimáticas fueron capaces de nodular las plantas de soja, se identificaron como N (provenientes de nódulos).

Para seleccionar los microorganismos con capacidad de nodular soja, que se encontraban en la población autóctona y que no fueron capaces de hacerlo en las condiciones en las que se hallaban en el campo, se tomaron muestras de suelo en las mismas localidades donde se habían sembrado las plantas trampa. En el laboratorio el suelo fue resuspendido y distintas diluciones fueron utilizadas como inóculo para plantas de soja que se cultivaron en condiciones controladas en el laboratorio. Se recuperaron de los nódulos radicales las bacterias que eran capaces de ser cultivables. Estos microorganismos que formaban parte de la población autóctona capaz de nodular soja en macetas, pero no el campo, se las identificó como S (provenientes del suelo).

En total se recuperaron 55 cepas noduladoras de soja las cuales se agrupan en dos poblaciones de rizobios: aquellos que provenían de los nódulos recuperados de plantas trampa (N) y los rizobios noduladores de soja que se encontraban en el suelo (S) y que en un principio no habían tenido la capacidad de nodular en las condiciones edafoclimáticas del suelo.

Un conocimiento más detallado de la población autóctona de bacterias noduladoras de soja podría conducirnos a mejorar la estrategia y el rendimiento de la inoculación. Estos estudios podrían proveernos cepas con mejores características simbióticas, y así incorporarlas al inoculante granulado.

**Por eso, en este capítulo se estudiará la diversidad en la población autóctona de cinco lugares de importancia productiva de soja en Argentina. Se seleccionará un grupo representativo para estudiarlo en detalle, tanto genotípica como fenotípicamente. Además, se evaluará su desempeño simbiótico para incorporarlas al inoculante granulado.**

### **III.1 Caracterización genotípica de la población autóctona**

#### **III.1.1 Estudio de la diversidad de la población autóctona mediante *fingerprint***

Para el análisis de diversidad de las poblaciones bacterianas se han empleado diversas técnicas, entre las que se encuentran:

- Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Williams *et al.* 1990).
- Análisis de fragmentos de restricción con polimorfismo de longitud (RFLP) (Qin Li *et al.*, 2011).
- Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Fischer y Lerman en el año 1983).
- Huella genética (*fingerprint*) (Jeffreys *et al.*, 1985).

Este último método se emplea para la detección de secuencias genómicas repetitivas en genomas bacterianos por amplificación mediante PCR (Versalovic *et al.*, 1994). Permite la obtención de un patrón de bandas característico para cada cepa

bacteriana. Existen, al menos, tres tipos principales de elementos repetitivos de ADN utilizados para genotipificación, REP, ERIC y BOX, que posibilitan analizar la diversidad de poblaciones bacterianas.

Los *fingerprints* se han utilizado para caracterizar la diversidad de poblaciones autóctonas de bacterias noduladoras de leguminosas en numerosas publicaciones científicas (Angelini *et al.*, 2011; Estrella *et al.*, 2009; Grange *et al.*, 2004; Laguerre *et al.*, 1994; Loureiro *et al.*, 2007; Menna *et al.*, 2006; Rademaker *et al.*, 2000; Thomas-Oates *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 1998). Esta técnica, puede utilizarse en forma complementaria al análisis de secuencias que codifican al ARNr16S, o de genes como *nodC* (gen de la N-acetilglucosamina transferasa), *nifH* (gen de una dinitrogenasa reductasa), *glnA* (gen que codifica para la glutamina sintetasa I), *glnII* (gen codificante para la glutamina sintetasa II), *recA* (gen de la proteína RecA) y *dnaK* (gen de una proteína chaperona), permite identificar e inferir las relaciones filogenéticas de las cepas entre sí (Delamuta *et al.*, 2012).

El cebador (*primer*) BOX-A1R (Koeuth *et al.*, 1995) amplifica las secuencias conservadas del mosaico BOX en el reino bacteriano. El mismo *primer* se emplea como *forward* y *reverse*. y se ha utilizado con éxito esta técnica en rizobios (Batista *et al.*, 2007; Gomes Germano *et al.*, 2006; Loureiro *et al.*, 2007; Melchiorre *et al.*, 2011). Por tal motivo, se empleó el *primer* BOX-A1R para el desarrollo del *fingerprints* para observar la diversidad de la colección de cepas de bacterias noduladoras de soja.

Las cepas autóctonas de la colección se nombraron utilizando tres letras que representan a la localidad de la que provienen (CAS para Castelar, CAV para Cavanagh, CUR para Concepción del Uruguay, NUJ para Nueve de Julio y SAA para San Antonio de Areco) separadas con una barra (/) del origen del aislamiento (S para suelo y N para nódulo) y un número, desde el 1 hasta el 58. Por ejemplo, la cepa CAS/N-10 proviene de Castelar fue aislada de un nódulo en el lugar de procedencia y le corresponde el número 10 de la colección. En cambio, la cepa SAA/S-48 proviene de San Antonio de Areco de una muestra de suelo y su número, dentro de la colección de cepas, es el 48.

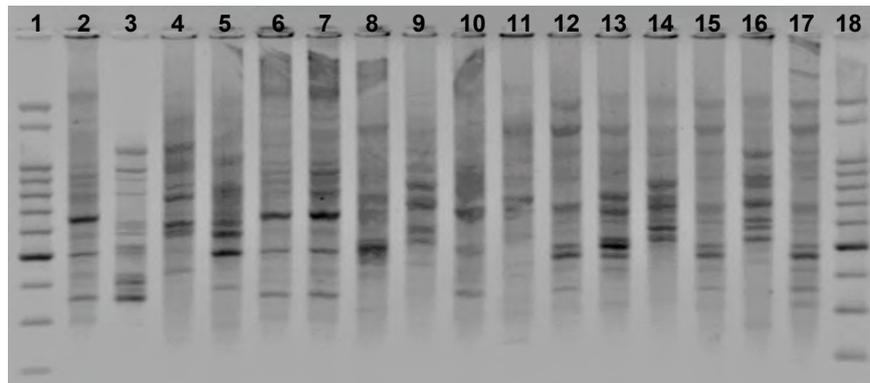
Las 55 cepas que estaban criopreservadas se cultivaron en cajas de Petri y de cada una se obtuvo una colonia aislada. Así, se realizaron tres aislamientos independientes para cada una de las cepas.

Dos tipos de colonias se observaron cuando se aisló el material correspondiente a los crioviales identificados como CAV/S-14, CUR/S-25 y NUJ/N-44. A cada una se las denominó CAV/S-14-1 y CAV/S-14-2, CUR/S-25-1 y CUR/S-25-2 y NUJ/N-44-1 y NUJ/N-44-2. Posteriormente, se evaluó la capacidad de los nuevos aislamientos para nodular soja. Así, las cepas se inocularon en semillas pregerminadas de soja. A excepción de las plantas inoculadas con el aislamiento CUR/S-25-1, luego de 21 días todas las plantas cosechadas desarrollaron nódulos en sus raíces de los cuales se pudo recuperar material microbiológico. Sin embargo, en otros experimentos de nodulación observamos que cuando las plantas de soja fueron coinoculadas con cultivos de CUR/S-25-1 y CUR/S-25-2, se generaban nódulos y ambas cepas se recuperaron de los

mismos. La cepa CUR/S-25-1 es capaz de colonizar los pelos e ingresar a las raíces cuando es acompañada por otro microorganismo nodulador. De esta manera, el tamaño de la colección aumentó a 58 aislamientos.

A partir de una colonia de cada uno de los aislamientos, se realizó la extracción de ADN total empleando una resina (*Chelex*). Por lo tanto, hubo tres extracciones de ADN independientes. Cada una de las extracciones de ADN se utilizó como molde para PCR con el *primer* BOX-A1R para amplificar las porciones del genoma que permitirán obtener un perfil de bandas de ADN específico. Es decir, para cada uno de los aislamientos, se realizaron tres réplicas biológicas de cada extracción de ADN y se ejecutaron tres PCR independientes con el *primer* BOX-A1R.

La visualización de las bandas de ADN amplificadas se realizó mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa con todos los parámetros estandarizados. Los registros fotográficos de todos los geles se analizaron con el software *GelCompar II 4.0* (*Applied Maths*, Kortrijk, Bélgica). En la **Figura III.2** se muestra la foto de un gel representativo de los perfiles de bandas obtenidos para las distintas cepas.



**Figura III.2: Perfil de bandas de ADN de distintas cepas noduladoras de soja amplificadas con el *primer* BOX-A1R.** En las calles 1 y 18 del gel se sembró el patrón de peso molecular *ladder* 100 pb. Las calles restantes corresponden a los perfiles de bandas de las cepas CUR/S-25-2 (calle 2), CUR/S-25-1 (calle 3), NUJ/N-44-1 (calle 4), NUJ/S-40 (calle 5), CAV/S-14-1 (calle 6), CAV/S-14-2 (calle 7), *B. japonicum* USDA 6 (calle 8), *B. elkanii* USDA 76 (calle 9), *B. elkanii* USDA 94 (calle 10), *B. diazoefficiens* USDA 122 (calle 11), *B. diazoefficiens* USDA 110 (calle 12), *B. japonicum* SEMIA 5079 (calle 13), *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 (calle 14), *B. japonicum* E109 (calle 15), NUJ/N-43 (calle 16) y SAA/N-53 (calle 17). Gel de agarosa 1.5% (p/v) revelado con bromuro de etidio.

El análisis fue realizado utilizando el *software* *GelCompar II 4.0*, el cual permite estandarizar los tamaños de cada banda de los perfiles de los diferentes fragmentos de ADN por el uso de los marcadores de pesos moleculares. Además, permite la elección de los porcentajes de los parámetros de tolerancia y posición. Estos dos parámetros hacen referencia a los límites del programa para interpretar si dos bandas son diferentes. En tal sentido, la bibliografía considera aceptable utilizar valores de optimización y tolerancia de 1,5% a 2% (Vinuesa *et al.*, 1998). Entonces, con todos los perfiles de bandas de ADN generados con el *primer* BOX-A1R para cada aislamiento, utilizando el valor de 1,5% de optimización y tolerancia, se obtuvo el cladograma de la **Figura III.3**; utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method* con

*Arithmetic averages*) (Sneath *et al.*, 1975) y evaluando las distancias con el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1912).

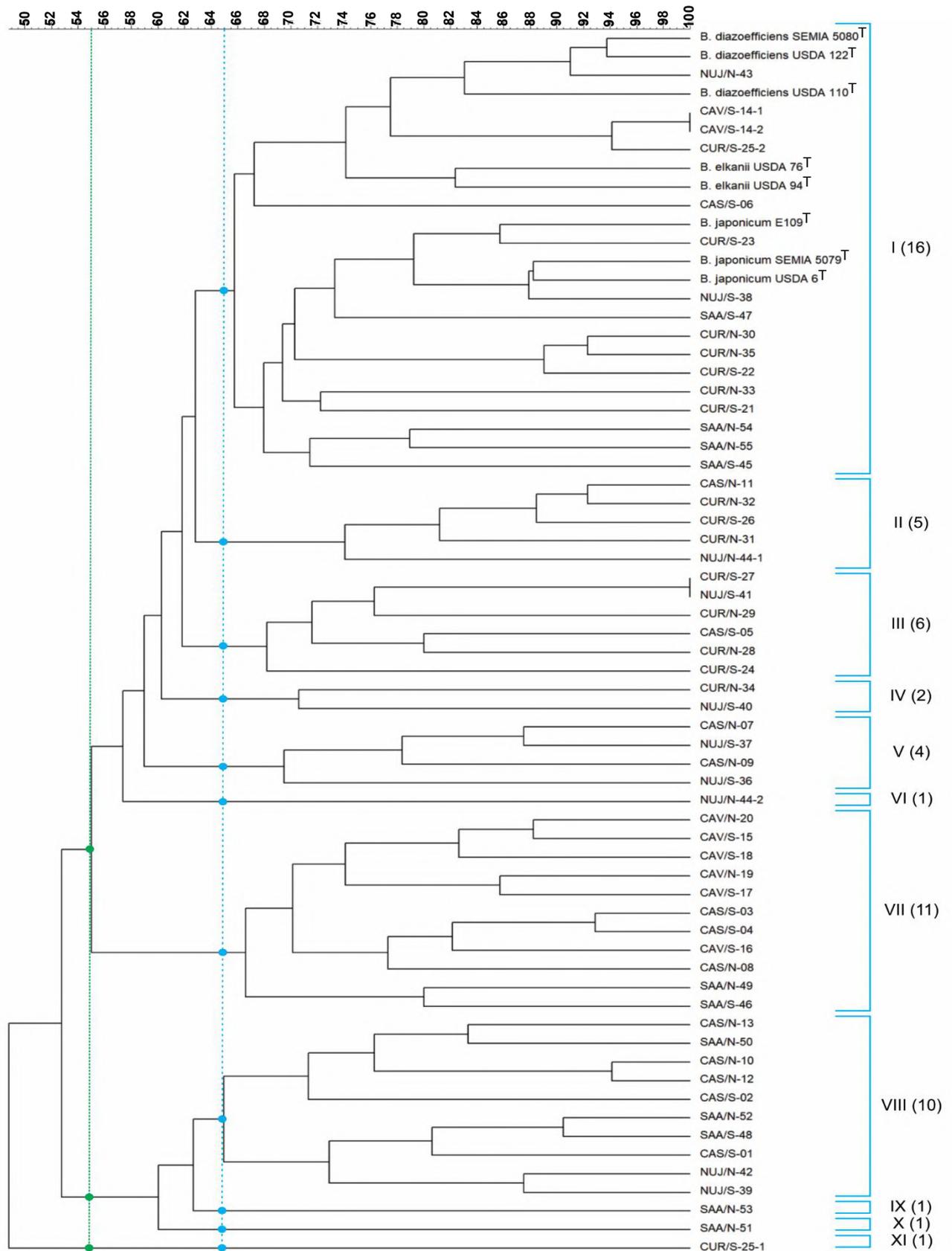
Los 58 aislamientos fueron clasificados en un cladograma manteniendo el aislamiento que no es capaz de nodular CUR/S-25-1, como grupo externo, *outgroup* (Figura III.3). Utilizando un corte del 65% de similitud (Chibeba *et al.*, 2017), los aislamientos se agruparon en diez clados diferentes más el *outgroup*.

### III.1.2 Análisis del cladograma del *fingerprint* de ADN

De los diez clados que se separaron, tres tuvieron más de nueve aislamientos cada uno (clados I, VII y VIII). A su vez, los siete clados restantes fueron más pequeños. Las cepas que se utilizaron de referencia se agruparon estrechamente en el clado I. Además, las cepas de colección de *B. diazoefficiens* y *B. elkanii* se asociaron dentro de ese clado en una rama con un 74% de similitud, mientras que las cepas de colección de *B. japonicum* se asociaron en otra, rama cercana con 79% de similitud. Un total de ocho aislamientos (incluidos CAV/S-14-1 y CAV/S-14-2) se asociaron a las cepas de referencia en estas dos ramas que incluyen otros nueve aislamientos, mientras que los 42 aislamientos restantes se distribuyeron en los otros 10 clados.

Las cepas CAV/S-14-1 y CAV/S-14-2 discreparon en los perfiles de banda del *fingerprint* en una sola banda que estaba presente en algunas réplicas y ausente en otras. Por tal motivo, se consideró que eran la misma cepa. La variabilidad entre las cepas CUR/S-25-1 y CUR/S-25-2 fue más pronunciada. Lo mismo sucedió con las cepas denominadas NUJ/N-44-1 y NUJ/N-44-2. Indicio de que efectivamente eran cepas diferentes.

Con el fin de determinar si la distribución de los aislamientos entre los clados responde al sitio de aislamiento o a la capacidad de nodular en las condiciones locales, se realizó una prueba  $\chi^2$  no paramétrica. Se seleccionaron sólo aquellos clados que tienen al menos diez aislamientos (clados I, VII y VIII), para permitir la presencia aleatoria todos los sitios de muestreo. La hipótesis nula fue una distribución aleatoria de los aislamientos en cada clado. Por lo tanto, los valores esperados se obtuvieron multiplicando las proporciones de los aislamientos (discriminados según el sitio: CAS: 13/58; CAV: 8/58; CUR: 16/58; NUJ: 10/58; SAA: 11/58, o por método de aislamiento: N: 28/58; S: 30/58) por el número total de aislamientos de cada clado. Este análisis indicó que la procedencia de las muestras no se distribuía aleatoriamente en el clado VII, con los datos de CAV sobrerrepresentados ( $\chi^2 = 18.295$ ; significativo con  $p < 0.01$ ). Además, los aislamientos de CUR, la fuente más abundante, estaban ausentes en los clados VII y VIII.



**Figura III.3: Cladograma de las cepas de la población autóctona.** Cladograma a partir de los perfiles de bandas de las cepas con capacidad de nodular soja obtenidos con el primer BOX-A1R. Fue analizado con el software *Gel Compare II 4.0* con un valor de tolerancia de 1,5%. Se utilizó el algoritmo UPGMA y las distancias se evaluaron con el coeficiente de Jaccard. T indica las cepas de referencia.

## III.2 Identificación de los aislamientos

Enfocados en seleccionar, de estos aislamientos, cepas para ser incorporadas en el inoculante granulado, consideramos necesario realizar un estudio más profundo con respecto a su posición taxonómica y sus propiedades fenotípicas y simbióticas. Consecuentemente, se seleccionó un grupo de doce aislamientos, que comprenden los que resultaron de la separación de las dos morfologías de colonias, así como representantes de cinco clados y el *outgroup*.

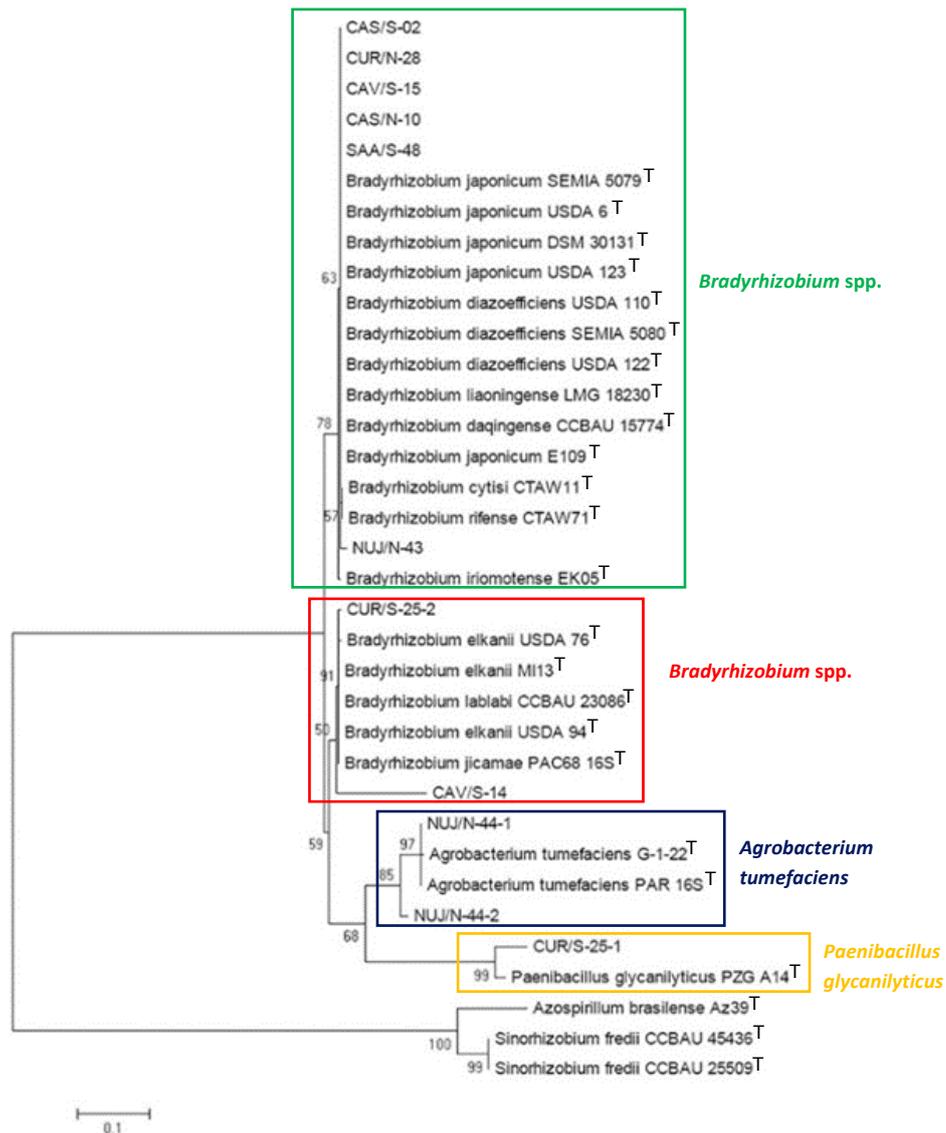
Las cepas con las que se trabajó fueron:

- CAS/S-02
- CAS/N-10
- CAV/S-14-1
- CAV/S-14-2
- CAV/S-15
- CUR/S-25-1
- CUR/S-25-2
- CIUR/N-28
- NUJ/N-42
- NUJ/N-44-1
- NUJ/N-44-2
- SAA/S-48

### III.2.1 Secuenciación del ARN ribosomal 16S (ARNr16S)

Como primera aproximación para la identificación de las cepas, se realizó la secuenciación de un fragmento del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr16S) de cada cepa con los *primers* fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991). Se alinearon las secuencias, generando una secuencia consenso y se realizó un *Blast-N* para comparar las secuencias encontradas contra las bases de datos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias que se registraron y los números de acceso de cada una de ellas se pueden consultar en el **Anexo II**, al igual que los porcentajes de similitud de las secuencias consenso en comparación con cepas identificadas. Dado que las secuencias de CAV/S-14-1 y CAV/S-14-2 fueron idénticas, se mostrarán los resultados para CAV/S-14-1, que se denominará CAV/S-14.

Con la información de las secuencias de ARNr16S y con las secuencias del gen en bases de datos, se realizó un árbol filogenético utilizando el programa *MEGA7* (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias se adaptaban mejor al modelo *General Time Reversible* (GTR) con *Gamma distributed* (G) y con *Invariant sites* (I) (GTR+G+I) según lo que predijo el software *JModelTest*. El árbol filogenético resultante se muestra en la **Figura III.4**.



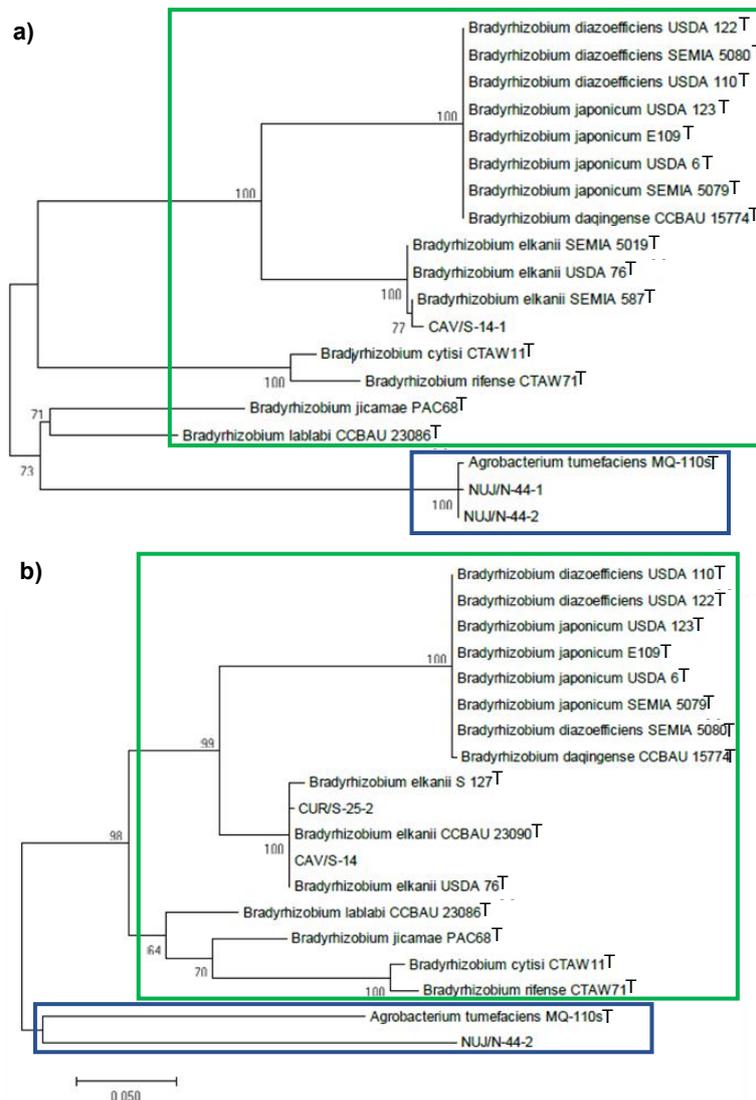
**Figura III.4: Árbol filogenético con las secuencias del ARNr16S de las cepas aisladas.** Se realizó mediante un *Maximum likelihood* siguiendo el modelo GTR+I+G con un *bootstrap* de 1000. Con los distintos recuadros de color se marcan aquellos aislamientos que agrupan con las cepas identificadas como *Bradyrhizobium* spp. (recuadro verde y colorado), *Agrobacterium tumefaciens* (recuadro azul marino) y *Paenibacillus glycanilyticus* (recuadro anaranjado). T indica las cepas de referencia.

En primer lugar, el análisis del árbol resultante de las secuencias del ARNr16S permitió clasificar los aislamientos noduladores de soja según el género. Además, permitió observar que las distintas cepas de referencia de *Bradyrhizobium* se agrupan en dos clados independientes. Seis de nuestros aislamientos agruparon en uno de los clados con cepas identificadas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* (**Figura III.4** recuadro verde). Mientras que otras dos cepas agruparon con otras especies diferentes dentro del género *Bradyrhizobium* (**Figura III.4** recuadro rojo). Con respecto a los otros aislamientos, dos cepas agruparon con especies identificadas como *Rhizobium radiobacter* (anteriormente *Agrobacterium tumefaciens*) y el aislamiento no nodulante CUR/S-25-1 como *Paenibacillus glycanilyticus* (**Figura III.4**).

### III.2.2 Transferencia horizontal de genes para la fijación biológica de nitrógeno

Para conocer si los aislamientos identificados como *R. radiobacter* podrían haber adquirido la capacidad de FBN, se eligieron dos genes involucrados en el proceso de nodulación y FBN. Como gen marcador de la nodulación, se escogió *nodC*, que codifica para una N-acetilglucosamina transferasa que está involucrada en el primer paso del ensamblaje del factor Nod y es esencial para la nodulación en todas las especies de rizobios estudiadas hasta el momento (Perret *et al.*, 2000). Como marcador de la FBN, se utilizó el gen *nifH* que codifica para una dinitrogenasa reductasa y hay varias secuencias en bases de datos para comparar (Haukka *et al.*, 1998).

Las secuencias de los genes *nodC* de NUJ/N-44-1 y NUJ/N-44-2 presentaron un 99,62 y 98,66% de similitud, respectivamente, con *R. radiobacter* MQ-110. Las secuencias de *nifH* de NUJ/N-44-2 mostraron un 89.78% de identidad con *R. radiobacter* gx-178. No se pudo amplificar el gen *nifH* de NUJ/N-44-1. Con las secuencias de los fragmentos de genes amplificados y secuencias de bases de datos de *nodC* y *nifH* se elaboraron los análisis filogenéticos correspondientes (Figura III.5 a y b).



**Figura III.5: Análisis filogenético mediante el método de *Maximum likelihood* para los genes *nodC* y *nifH*.** En a) se muestra el agrupamiento del gen *nodC* de *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) NUJ/N-44-1 y NUJ/N-44-2. En b), se muestra el agrupamiento del gen *nifH* de *R. radiobacter* NUJ/N-44-2. Las longitudes de las ramas en el árbol están escaladas en las mismas unidades que las distancias evolutivas (barra de escala) utilizadas para inferir el árbol filogenético. T indica las cepas de referencia.

Los árboles filogenéticos construidos con estos genes posicionaron ambos aislamientos de *R. radiobacter* NUJ/N-44-1 y NUJ/N-44-2 junto con *A. tumefaciens* (*R. radiobacter*) MQ-110 (**Figura III.5** recuadro violeta). Mientras que las cepas de *Bradyrhizobium* spp, para sus correspondientes genes *nodC* y *nifH*, agruparon entre sí (**Figura III.5** recuadro verde).

### III.2.3 Identificación mediante MALDI-TOF-MS

Además de utilizar el ARN ribosómico 16S, se corroboraron las posiciones taxonómicas mediante el método alternativo de identificación fenotípica basado en MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry*, en español: desorción ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) (Ferreira *et al.*, 2011). Se utiliza el *software* Biotyper para analizar los espectros de masas (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemania). Los resultados se observan en la **Tabla III.1**. Las clasificaciones se realizaron teniendo en cuenta los valores (*score*) menores a 1.69, identificación no confiable; *score* en el rango 1.70–1.99, probable identificación de género; *score* en el rango 2.0–2.29, segura identificación de género y probable identificación de especie; *score* mayor a 2.3: muy probable identificación de especie (Ferreira *et al.* 2011).

**Tabla III.1: Comparación entre la identificación con MALDI-TOF MS con el *software* Biotyper y las secuencias del ARNr16**

Cepa	Biotyper		Secuenciación del ARNr16S	
	ID	Score	ID	Porcentaje similitud de secuencia
CAS/S-02	<i>B. japonicum</i> USDA 6	2.507	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	93
CAS/N-10	<i>B. japonicum</i> USDA 6	2.585	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	91
CAV/S-14	<i>B. elkanii</i> USDA 76T	2.417	<i>B. elkanii</i>	96
CAV/S-15	<i>B. japonicum</i> USDA 6	2.409	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	93
CUR/S-25-1	<i>P. glycanilyticus</i> DSM 17608T	1.862	<i>P. glycanilyticus</i>	99
CUR/S-25-2	<i>B. elkanii</i> USDA 76T	2.456	<i>B. elkanii</i>	96
CUR/N-28	<i>B. japonicum</i> E109	2.122	<i>Bradyrhizobium</i> spp	93
NUJ/N-43	<i>B. diazoefficiens</i> SEMIA 5080	2.229	<i>Bradyrhizobium</i> spp	91
NUJ/N-44-1	<i>Rhizobium radiobacter</i> B178	2.274	<i>Rhizobium radiobacter</i>	97
NUJ/N-44-2	<i>Rhizobium radiobacter</i> B178	1.933	<i>Rhizobium radiobacter</i> .	97
SAA/S-48	<i>B. japonicum</i> USDA 6	2.369	<i>Bradyrhizobium</i> spp	93

Esta técnica fue más sensible en la identificación de las cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Los *score* altos probablemente identificaron el género y la especie para las cepas de *Bradyrhizobium*. Sin embargo, como las identificaciones se sustentan en las bases de datos, son sólo probables identificaciones de género y especie.

Las cepas identificadas como *B. elkanii* según el Biotyper, al realizar un *BlastN* de la secuencia del ARNr16S presentan un alto porcentaje de similitud con cepas identificadas como *B. elkanii*. Debido a esto designamos a las cepas CAV/S-14 y CUR/S-25-2 como cepas pertenecientes a *B. elkanii*.

### III.2.4 Identificación mediante genes *housekeeping* concatenados

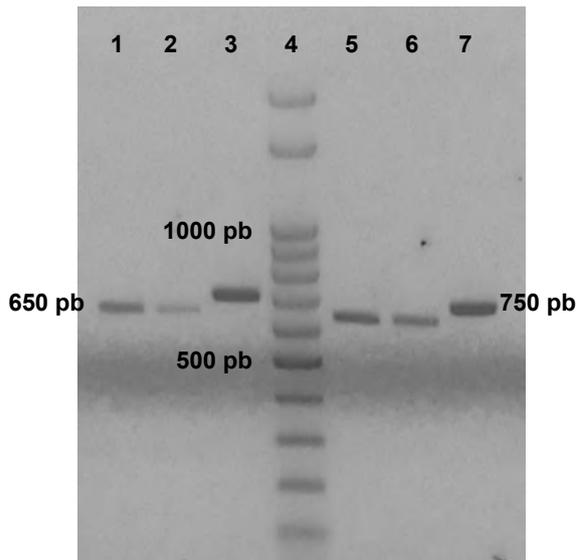
Si bien el análisis de los ARNr16S ha sido de mucha utilidad en la clasificación de las bacterias, no es la única ni la mejor solución a este problema. Se han utilizado otros genes ribosomales o regiones, como el ARNr23S o el espacio transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés *Internal Transcribed Spacer*) ARNr16S-23S, porque estos evolucionan a una tasa más rápida que el ARNr16S (Menna *et al.*, 2009; Tesfaye *et al.*, 1998). Sin embargo, la proximidad de los genes ribosomales no puede indicar adecuadamente la filogenia correcta en el caso de la transferencia horizontal de genes (Van Berkum *et al.*, 2003).

Para solucionar todos estos inconvenientes, actualmente, se utiliza el método de Análisis de Secuencia de MultiLocus (*MultiLocus Sequence Analysis*, MLSA por sus siglas en inglés). Este método consiste en el análisis de varios genes constitutivos (genes *housekeeping*) conservados que se encuentran dispersos al menos en 100 kb del genoma (Cooper *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2003; Maiden *et al.*, 1998). Estos genes se secuencian y luego se concatenan para elaborar un árbol filogenético comparando con otras cepas conocidas. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente con cepas de *Bradyrhizobium* (Delamuta *et al.*, 2012, Menna *et al.*, 2009; Moulin *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009).

Los genes *housekeeping* que se han utilizado para realizar el MLSA de *Bradyrhizobium* son:

- **recA**: gen codificante para la proteína RecA encargada de la recombinación y reparación del ADN.
- **atpD**: gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa.
- **glnII**: gen codificante para la glutamina sintetasa II.
- **gyrB**: gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa.
- **rpoB**: gen codificante para la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa.

En este trabajo se emplearon tres genes *housekeeping* de los cinco posibles: *recA*, *atpD* y *glnII*. Se amplificaron los tres genes para cada una de las cepas con el par de *primers* correspondiente. A continuación, se muestra, a modo de ejemplo, en la **Figura III.6**, los amplicones para los genes *recA*, *atpD* y *glnII* de las cepas CAS/N-10 y SAA/S-48.

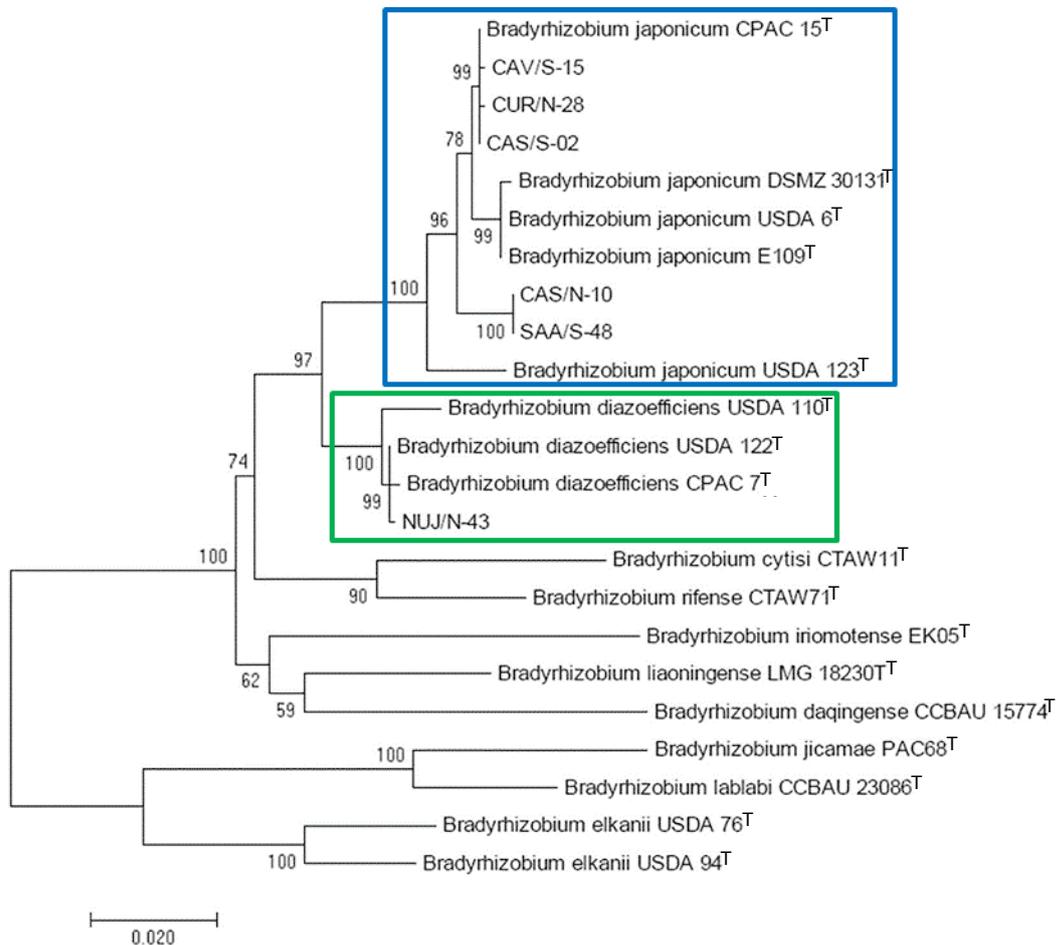


**Figura III.6: Amplicones de genes housekeeping.** Producto de PCR de los genes *housekeeping recA*, *atpD* y *glnII* de la cepa CAS/N-10 en las calles 1,2 y 3, respectivamente. La calle 4 es el marcador de peso molecular *ladder plus* 100pb, están resaltadas las bandas correspondientes a los pesos moleculares de 500 pb y 1000 pb. En las calles 5, 6 y 7, se distinguen las bandas correspondientes a los genes *recA*, *atpD* y *glnII* de la cepa SAA/S-48. Los tamaños esperados para cada uno de los genes son: *recA* 650 pb, *atpD* 650 pb y *glnII* 750 pb. Gel de agarosa 1.5 % p/v.

Los amplicones fueron purificados y secuenciados con los mismos *primers* que fueron utilizados para su amplificación. Se generó la secuencia consenso de cada fragmento para cada uno de los tres genes que se secuenciaron a partir del ADN de los aislamientos. Utilizando las bases de datos de los genomas completos o parciales de cepas de bacterias pertenecientes a las distintas especies del género *Bradyrhizobium*, se realizó una búsqueda bioinformática de los genes *housekeeping recA*, *atpD* y *glnII*. Para cada gen, independientemente, se alinearon las secuencias, se depuraron y luego, los huecos (o *gaps*) producidos, fueron eliminados. Como último paso, se concatenaron las secuencias alineadas para todas las especies de interés, primero el gen *recA*, luego *atpD* y, para finalizar, el gen *glnII*.

Para evaluar el mejor modelo evolutivo que tenían el conjunto de secuencias concatenadas, se utilizó el programa *JModelTest*. El modelo predicho fue el *General Time Reversible* (GTR) con *Gamma distributed* (G) y con *Invariant sites* (I) (GTR+G+I).

En la **Figura III.7** se puede observar el árbol filogenético de *Maximun Likelihood* realizado con un *bootstrap* de 1000.



**Figura III.7: *Maximun likelihood* de los genes *recA*, *atpD* y *glnII* concatenados.** Se siguió el modelo GTR+I+G con un *bootstrap* de 1000. Con un recuadro azul, se delimitan las cepas que están en el mismo *cluster* que cepas identificadas como *Bradyrhizobium japonicum*. Mientras que, con recuadro verde, se agrupan aquellas identificadas como *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Realizado con el programa MEGA7. T indica las cepas de referencia.

Este análisis indicó que cinco aislamientos de *Bradyrhizobium* spp. (CAV/S-15, CUR/N-28, CAS/S-02, CAS/N-10 y SAA/S-48) se agruparon con especies identificadas como *B. japonicum* (**Figura III.7** recuadro azul). Mientras que sólo uno (NUJ/N-43) agrupó con cepas identificadas como *B. diazoefficiens* (**Figura III.7** recuadro verde).

Al comparar el árbol filogenético obtenido por la metodología MLSA (**Figura III.7**) con el *fingerprint* de ADN de la **Figura III.3**, se encontró que la relación de NUJ/N-43 con *B. diazoefficiens* se correlaciona con su posición en el *fingerprint* de ADN en la misma rama con las cepas de *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, USDA 122 y USDA 110 con un 83% de similitud. Mientras tanto, CAV/S-14 y CUR/S-25-2 compartieron la rama con *B. elkanii* USDA 76 y USDA 94 con un 74% de similitud, pero estuvieron más relacionados con el *fingerprint* de ADN de *B. diazoefficiens* a las que estos aislamientos tenían 77% de similitud. Por lo contrario, los aislamientos relacionados con *B. japonicum* se dispersaron más a través del cladograma del *fingerprint* de ADN.

### III.3 Caracterización fenotípica de las cepas

Para los microorganismos es complicado sobrevivir en un ambiente hostil como lo es el suelo. Existen restricciones bióticas y abióticas que restringen la cantidad de biomasa en este ambiente (Fierer, 2017).

#### III.3.1 Supervivencia de las cepas autóctonas frente a estreses abióticos

##### III.3.1.1 Estrés térmico

Durante los meses de verano y dependiendo de la cobertura de la superficie del suelo, su temperatura puede alcanzar 40°C entre los 5 y 10 cm de profundidad. En este perfil del suelo, en el que ocurre la nodulación de soja, la temperatura en promedio aumenta de 25 a 28°C entre las 8:00–9:00 am para alcanzar su pico a las 2:00–3:00 pm y luego disminuye nuevamente durante la tarde.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las cepas autóctonas de resistir el estrés térmico, cultivos en fase exponencial de las bacterias fueron incubadas a diferentes temperaturas con una tasa de cambio simulando al que ocurriría en el campo. Desde una temperatura de 28°C se incrementó progresivamente hasta llegar a los 40°C y luego se produjo un descenso leve de temperatura hasta llegar nuevamente hasta los 28°C. Todo este proceso duró 6 horas. Se evaluó el porcentaje de supervivencia mediante el recuento de gotas en placas de YEM (Hoben *et al.*, 1982) entre las unidades formadoras de colonia (UFC) de rizobios antes y después del estrés térmico (**Tabla III.2**).

**Tabla III.2: Porcentaje de supervivencia de los aislamientos frente al estrés térmico e hídrico**

Aislamiento	Identificación	Porcentaje de supervivencia al estrés térmico	Porcentaje de supervivencia al estrés hídrico
CAS/N-10	<i>B. japonicum</i>	90.05 ± 3.63	1.50 ± 0.38
CAS/S-02	<i>B. japonicum</i>	92.78 ± 5.52	0.96 ± 0.19
CAV/S-14	<i>B. elkanii</i>	86.76 ± 3.60	1.68 ± 0.36
CAV/S-15	<i>B. japonicum</i>	109.18 ± 4.45	0.38 ± 0.10
CUR/N-28	<i>B. japonicum</i>	92.62 ± 3.80	0.85 ± 0.19
CUR/S-25-2	<i>B. elkanii</i>	92.41 ± 3.99	1.48 ± 0.27
NUJ/N-43	<i>B. diazoefficiens</i>	98.17 ± 1.84	0.55 ± 0.11
NUJ/N-44-1	<i>R. radiobacter</i>	94.32 ± 4.24	0.35 ± 0.11
NUJ/N-44-2	<i>R. radiobacter</i>	94.23 ± 2.05	1.02 ± 0.26
SAA/S-48	<i>B. japonicum</i>	83.43 ± 4.08	0.81 ± 0.12
E109	<i>B. japonicum</i>	91.21 ± 3.68	0.85 ± 0.16
USDA 110	<i>B. diazoefficiens</i>	112.36 ± 6.75	1.00 ± 0.17

Se observó que todos los aislamientos, así como las cepas de referencia *B. diazoefficiens* USDA 110 y *B. japonicum* E109, toleraron el calentamiento, que incluyó un período de 3 horas a temperaturas superiores a 35°C con más del 80% de supervivencia.

### III.3.1.2 Estrés hídrico

La sequía es un estrés abiótico al que pueden estar sometidas las bacterias de la población autóctona porque por las altas temperaturas se puede desecar la capa superior del suelo durante los períodos de escasez de lluvias.

Para evaluar el estrés hídrico, gotas de cultivos líquidos en fase exponencial se colocaron en una placa de Petri vacía en un desecador con una mezcla de sales que son capaces de captar la humedad del ambiente quedando una atmósfera con un porcentaje de humedad del 17%. Además, gotas de los mismos cultivos se colocaron en otras placas de Petri vacías, pero con humedad ambiente. Tanto el desecador como las placas con humedad ambiente se colocaron en la estufa a 28°C. Luego de cuatro días bajo estas condiciones, se evaluaron las UFC de las muestras incubadas en el desecador y se compararon con aquellas que lo hacían con humedad ambiente.

A diferencia del estrés por calor, todos los aislamientos fueron sensibles a la sequía después de cuatro días con una humedad relativa del 17%, con un porcentaje de supervivencia sólo de alrededor del 1% (**Tabla III.2**).

### III.3.2 Movilidad

El incremento de la movilidad de los rizobios permitiría una mejor distribución en el suelo (Quelas *et al.*, 2016). Es por tal motivo, que se evaluó la movilidad de los aislamientos midiendo el diámetro del halo de natación o *swimming* que se produce en el medio Götz (Götz *et al.*, 1982) semisólido (agar blando 0,3% p/v) luego de 7 días de incubación a 28°C (Althabegoiti *et al.*, 2008) (**Tabla III.3**).

**Tabla III.3: Movilidad de las cepas en placas de *swimming* en medio semisólido**

Aislamiento	Identificación	Diámetro del halo (mm ± SD)
CAS/N-10	<i>B. japonicum</i>	23.0 ± 0.8
CAS/S-02	<i>B. japonicum</i>	19.0 ± 1.4
CAV/S-14	<i>B. elkanii</i>	40.0 ± 2.0
CAV/S-15	<i>B. japonicum</i>	17.0 ± 1.0
CUR/N-28	<i>B. japonicum</i>	11.7 ± 1.5
CUR/S-25-2	<i>B. elkanii</i>	33.7 ± 1.1
NUJ/N-43	<i>B. diazoefficiens</i>	30.7 ± 2.1
NUJ/N-44-1	<i>R. radiobacter</i>	39.0 ± 1.0
NUJ/N-44-2	<i>R. radiobacter</i>	32.3 ± 0.6
SAA/S-48	<i>B. japonicum</i>	22.3 ± 0.6
E109	<i>B. japonicum</i>	24.4 ± 0.8
USDA 110	<i>B. diazoefficiens</i>	21.6 ± 1.3

Aunque todos los aislamientos fueron móviles, los cinco que fueron identificados como *B. japonicum* (CAS/N-10, CAS/S-02, CUR/N-28, CAV/S-15 y SAA/S-48) mostraron halos de *swimming* más pequeños en comparación con la cepa *B. japonicum* E109. El aislamiento *B. diazoefficiens* NUJ/N-43 fue más móvil que la cepa de referencia *B. diazoefficiens* USDA 110. A su vez, los dos aislamientos identificados como *B. elkanii* (CAV/S-14 y CUR/S-25-2) fueron más móviles que todas las cepas de la colección y las de

referencia. Los aislamientos de *R. radiobacter* también fueron más móviles, pero su tasa de crecimiento más rápida también podría contribuir a su dispersión. La cepa de referencia *B. diazoefficiens* USDA 110 tuvo una movilidad similar a la de *B. japonicum* E109.

### III.4 Evaluación de parámetros simbióticos de los aislamientos

La competición intrínseca es la capacidad que tiene una cepa para formar nódulos cuando compete con otra cepa en iguales condiciones de cantidad de UFC del inóculo inicial y estado fisiológico (López-García *et al.*, 2002). Los aislamientos de campo se enfrentaron a una cepa derivada de *B. japonicum* E109 con resistencia espontánea al antibiótico estreptomycin (*Sm*), *B. japonicum* LP3018 (López-García *et al.*, 2009), con el objetivo de evaluar su competitividad intrínseca.

Sólo las cepas *B. japonicum* CAS/S-02, *B. japonicum* CAS/N-10 y *B. japonicum* SAA/S-48 demostraron tener una competitividad intrínseca similar a *B. japonicum* LP3018. Cabe destacar que estos tres aislamientos se agruparon en el árbol filogenético resultante del *fingerprint* (Figura III.3) en un clado lejano (clado VIII) al de las cepas de referencia (clado I). Debido a esto, se inocularon plantas de soja con cada una de estas cepas con el fin de evaluar la cantidad de nódulos y el peso seco de los mismos, además del peso seco de la parte aérea, como medidas indirectas de las FBN. Los controles positivos se inocularon con *B. japonicum* E109 y negativo, sin inocular (Tabla III.4).

Tabla III.4: Fijación biológica de nitrógeno de las cepas CAS/N-02, CAS/N-10 y SAA/S-48

Cepa	Nódulos totales por planta	Peso seco (mg)	
		Nódulos (mg)	Tallo (g)
<i>B. japonicum</i> CAS/N-02	21 ± 4 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> CAS/N-10	13 ± 3 <sup>c</sup>	1.44 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>c</sup>
<i>B. japonicum</i> SAA/S-48	14 ± 3 <sup>c</sup>	1.51 ± 0.24 <sup>c</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>c</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	14 ± 4 <sup>c</sup>	1.46 ± 0.19 <sup>c</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>c</sup>
Sin inocular	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$ .

De todas las cepas ensayadas, *B. japonicum* CAS/N-02 formó una mayor cantidad de nódulos con respecto a la cepa de referencia *B. japonicum* E109. Por otro lado, las cepas *B. japonicum* CAS/N-10 y *B. japonicum* SAA/S-48 produjeron una cantidad de nódulos que no difirieron de los de la cepa de referencia. Sin embargo, por más que *B. japonicum* CAS/N-02 fue la cepa que más nódulos produjo, eran los que menos pesaban al evaluar su peso seco. Esto podría ser indicio indirecto que los nódulos producidos por esta cepa no son buenos fijadores de nitrógeno. En cambio, en *B. japonicum* CAS/N-10 y *B. japonicum* SAA/S-48 los peso seco de nódulos individuales fueron similares en masa seca al de la cepa de referencia.

Al realizar el riego de las plantas con solución Fåhræus modificada libre de nitrógeno (Lodeiro *et al.*, 2000), la medida del peso seco de la parte aérea permite estimar cuán eficiente es la FBN según cada cepa. CAS/N-10 y SAA/S-48 fueron las cepas que generaron plantas con un mayor peso seco de la parte aérea con respecto a los testigos sin inocular, lo que implica una mejor eficiencia en la FBN.

En su conjunto, las cepas *B. japonicum* CAS/N-10 y SAA/S-48 fueron las que presentaron mejores características simbióticas en comparación con cepa la recomendada por el INTA para formar parte de los inoculantes, *B. japonicum* E109.

### III.5 Resumen

De localidades de Argentina con alta productividad en cultivos de soja, se recuperaron 58 aislamientos provenientes de la población autóctona de bacterias que fueron capaces de nodular soja. Los aislamientos de la población autóctona presentaron una gran diversidad de genotipos en un análisis de *fingerprint* de ADN. Sin embargo, esta diversidad no abarcó los genotipos de las cepas de referencia que incluyen los más utilizados como inoculantes, que se restringieron a las cepas en el clado I.

Tal como explica Delamuta en su publicación del año 2012, por más que la secuenciación del ARNr16S ha sido uno de los métodos más utilizados para realizar filogenia bacteriana (Weisburg *et al.*, 1991; Woese, 1987), en muchos géneros, incluido *Bradyrhizobium*, la variación en el ARNr16S es frecuentemente baja. Por lo tanto, no se ve reflejada la diversidad que es detectada por otros métodos genéticos o fisiológicos (Gomes Germano *et al.*, 2006; Menna *et al.*, 2006; Parker 2004; Vinuesa *et al.*, 1998; Willems *et al.*, 2001).

A pesar de la escasa coincidencia de genotipos entre los aislamientos y las cepas de referencia, la mayoría de las cepas analizadas pertenecían a los géneros *B. diazoefficiens*, *B. elkanii* y *B. japonicum*. Todas estas especies han sido y son utilizadas en la formulación de inoculantes.

También se identificaron cepas como *R. radiobacter* que, hasta donde sabemos, nunca fue utilizado como un inoculante comercial en Argentina. Lo que no excluye la posibilidad que haya empresas productoras que estén utilizando cepas identificadas con este género y especie para la formulación. Este hallazgo podría sugerir, también, que hayan adquirido la capacidad de nodular la soja de otras cepas de *Bradyrhizobium* spp. utilizadas en inoculantes mediante transferencia horizontal (Andrews *et al.*, 2018). Existen reportes de eventos de transferencia horizontal de genes simbióticos desde *B. japonicum* a *B. elkanii* (Minamisawa *et al.*, 2002); eventos similares sucedieron en suelos de Brasil (Batista *et al.*, 2007). Sin embargo, el porcentaje de similitud de las secuencias de los genes *nodC* y *nifH* de nuestros aislamientos de *R. radiobacter* con los de *R. radiobacter* MQ-110s y *R. radiobacter* gx-178, respectivamente, y su menor relación con *Bradyrhizobium* spp. argumenta en contra de esta posibilidad.

Teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra es pequeño en comparación con la diversidad que probablemente existe en los suelos, la presencia de *R. radiobacter* y *P. glycanilyticus* en esta pequeña colección sugiere que estas especies no son miembros poco comunes de la población autóctona. Anteriormente, se han reportado la presencia de más de una especie en un mismo nódulo, incluidas *R. radiobacter* y *P. glycanilyticus* (Ampomah *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2002; Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2011) lo que indica que estas especies podrían ser parte

de la microbiota del suelo capaz de ocupar nódulos de soja o en asociación de los mismos.

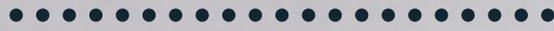
Incluso teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra es pequeño, es significativo que no se puedan encontrar fenotipos altamente competitivos para la nodulación frente a una cepa derivada de la cepa más utilizada en la formulación de inoculante en Argentina (*B. japonicum* E109). Siete aislamientos eran competidoras pobres y, sólo tres aislamientos eran igualmente competitivos que la cepa de referencia (CAS/S-02, CAS/N-10 y SAA/S-48). Curiosamente, estos tres aislamientos estaban estrechamente relacionados en el clado VIII del *fingerprint* de ADN obtenido con la utilización del *primer* BOX-A1R. El clado VIII es el más distante del clado I que es el que contiene las cepas de colección.

Los resultados de competición sugieren que la falta de genotipos altamente competitivos en los aislamientos no es un error de muestreo. En cambio, la prevalencia de los genotipos observados en el suelo podría explicarse por un éxito competitivo extrínseco, de acuerdo con la noción de que los factores externos, como la condición fisiológica o la distribución de las bacterias en el suelo, son importantes en la alta competitividad de las poblaciones del suelo (López-García *et al.*, 2009). Las cepas de los inoculantes, aunque sean intrínsecamente competitivas, tienen una baja competitividad extrínseca y una persistencia deteriorada en el suelo. La competitividad extrínseca del inoculante puede mejorarse mediante el uso de tecnologías de inoculación alternativas en lugar de la inoculación de semillas para garantizar una mejor distribución de los rizobios en el suelo (Lodeiro, 2015; López-García *et al.*, 2009) y la baja persistencia del inoculante puede evitarse con la inclusión en las formulaciones de inoculantes de cepas con alto rendimiento de fijación de N<sub>2</sub> seleccionadas de la población alóctona.

Del total de cepas evaluadas de la colección, se eligió para seguir investigando las cepas CAS/N-10 y SAA/S-48 porque compiten para la formación de nódulos igual que la cepa *B. japonicum* E109 y son buenas en la FBN. Estas cualidades son las deseables en la búsqueda de los rizobios que formarán parte del inoculante granulado.



# CAPÍTULO IV



**Selección y caracterización de  
cepas más móviles**



Los rizobios que forman parte de los inoculantes, cuando se mezclan con las semillas de soja, deben alcanzar las raíces de la planta, ser capaces de colonizarlas, infectarlas y, también, de formar nódulos (Lodeiro, 2015). Como se discutió en el capítulo anterior, los suelos están provistos de microorganismos noduladores de soja, y es por esta razón que se produce una competencia entre los rizobios del inoculante y la población autóctona por la formación de nódulos. Se ha demostrado que cuando ambas poblaciones se enfrentan, tanto a nivel de laboratorio (López-García *et al.*, 2002) como en ensayos a campo (Althabegoiti *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2009) los rizobios inoculados en semilla están en desventaja para competir contra la población autóctona.

La zona de la raíz de las leguminosas susceptible de ser infectada por rizobios está constituida por los pelos emergentes de activo crecimiento. Esta región, susceptible de ser infectada, cercana al ápice de la raíz, permanece en dicho estado durante aproximadamente 5 o 6 horas. Pasado este tiempo, los pelos radicales emergentes maduran y dejan de ser infectables por los rizobios (Bhuvaneshwari *et al.*, 1980). A medida que la raíz crece, la zona infectable se mueve, y los rizobios deberían desplazarse por la tortuosidad de los microcanales del suelo para alcanzarla (Quelas *et al.*, 2016). Las bacterias se pueden mover en el suelo por movimiento pasivo, llevadas por el movimiento del agua o utilizando otros organismos que habitan en el suelo para moverse (foresis), entre los que se encuentran los nematodos y los micelios de hongos (Horiuchi *et al.*, 2005; Kohlmeier *et al.*, 2005). O por movimiento autopropulsado mediado por flagelos, natación (*swimming*) y verbeneo (*swarming*), o por pili (*twitching*).

La natación es un movimiento mediado por flagelos. Las especies *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* tienen dos sistemas de flagelos, uno subpolar y uno lateral (Kanbe

*et al.*, 2007). La existencia de estos sistemas de flagelos duales en *B. diazoefficiens* y *B. japonicum* resulta llamativa aún si se considera que *B. elkanii*, que también nodula soja y está ampliamente distribuida en los suelos del país, sólo posee un tipo de flagelo (semejante al subpolar de *B. diazoefficiens*) (Barcellos *et al.*, 2007). Un análisis de las trayectorias de natación de *B. diazoefficiens* indicó que las funciones de ambos sistemas flagelares se integran en una propiedad emergente para ejecutar la natación (Quelas *et al.*, 2016). A partir de este trabajo también se propuso un modelo según el cual los rizobios con sistemas flagelares duales podrían nadar en forma persistente cerca de las superficies y así desplazarse más eficientemente siguiendo las superficies internas de los poros del suelo.

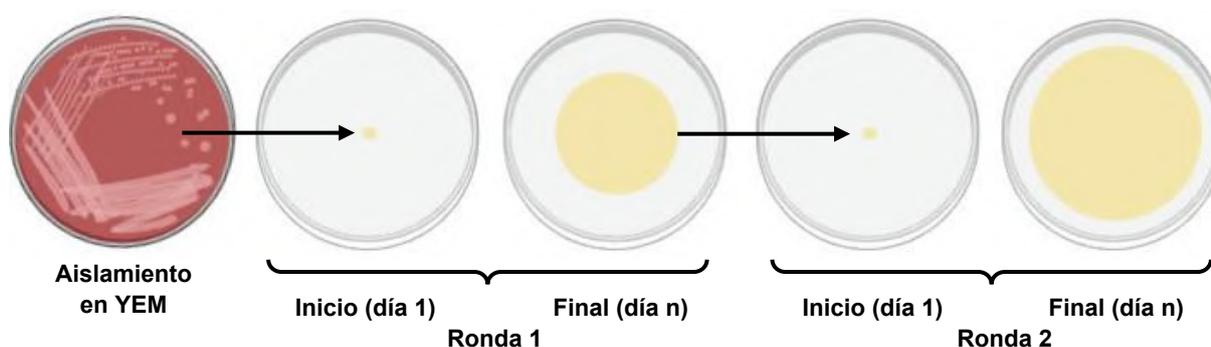
Sin embargo, la natación en el suelo es en general escasa por los caminos tortuosos y depende fuertemente del contenido de agua del mismo (Althabegoiti *et al.*, 2011). A su vez, parece ser este el único movimiento relevante para el desplazamiento de los rizobios en el suelo y para su asociación simbiótica con soja (Althabegoiti *et al.*, 2008). Esto se ha demostrado mediante la inoculación de cultivos de soja con una cepa de rizobios más móvil, *B. diazoefficiens* LP3008. Esta cepa, en cultivos de soja a campo en suelos con poblaciones densas de rizobios noduladores de soja, ocupó más nódulos que la cepa parental de la cual derivaba (López-García *et al.*, 2009). Además, promovió aumentos del rendimiento en grano (Althabegoiti *et al.*, 2008). Por todo lo expuesto, parecería que un aumento en la movilidad de la cepa del inoculante haría más eficiente la distribución de los rizobios en el suelo y, como consecuencia, mejoraría su competencia para la nodulación.

El análisis de la población autóctona de bacterias noduladoras de soja arrojó que las cepas *B. japonicum* CAS/N-10 y SAA/S-48 son buenas competidoras para la nodulación en comparación con la cepa recomendada por INTA, *B. japonicum* E109. A su vez, ambas cepas resultaron eficientes en la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Por todas estas características, nos pareció interesante seleccionar sus variantes más móviles. Una mayor movilidad de estas cepas autóctonas podría mejorar la distribución de estos rizobios en el suelo si formaran parte de un inoculante y, por lo tanto, la competencia para la nodulación.

**En este capítulo se desarrollará la selección y caracterización de cepas más móviles que las parentales autóctonas de las cuales derivan, CAS/N-10 y SAA/S-48. Estas podrían ser utilizadas en el inoculante granulado para mejorar la competencia para la nodulación del producto.**

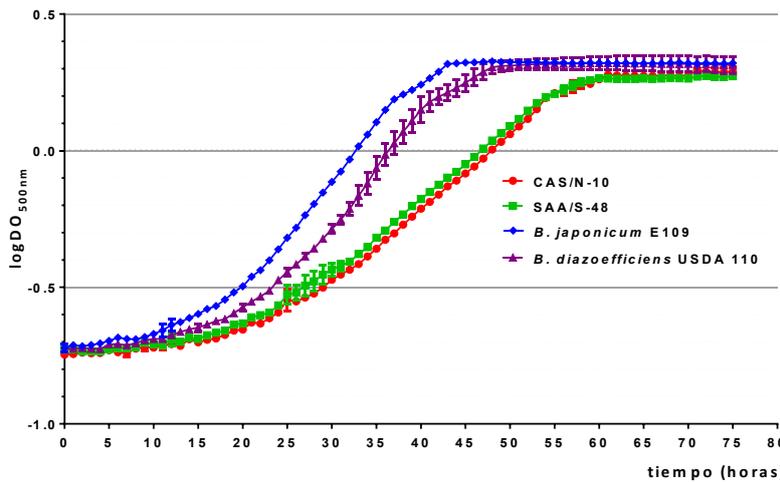
## IV.1 Obtención de las cepas más móviles de los aislamientos CAS/N-10 y SAA/S-48

Enfocados en que estas cepas más móviles formen parte de un producto para su aplicación en el campo, se descartó la obtención de mutantes mediante técnicas de ADN recombinante. En cambio se consideró adecuado utilizar un método de selección artificial puesto a punto previamente en el laboratorio (Althabegoiti *et al.*, 2008). El método busca promover la elección de aquellas bacterias que son capaces de nadar más rápido en placas de agar semisólido. El procedimiento para la selección comienza a partir de una colonia individual, con un palillo estéril se toman bacterias y se pinchan sobre una placa de movilidad. Las bacterias nadarán durante un período de tiempo definido de acuerdo al tamaño de la placa. Establecido el halo de movilidad, con un palillo estéril, se toca la porción externo del halo y se pincha en el centro de una nueva placa de agar semisólido. La zona externa del halo de movilidad es donde se encuentran aquellas bacterias de mayor movilidad por unidad de tiempo. Se repite el procedimiento hasta obtener el fenotipo deseado (**Figura VII.1**).



**Figura IV.1: Esquema de la selección de cepas más móviles.** A partir de una colonia bacteriana se pincha con un palillo estéril en un medio semisólido 0.3% (p/v), iniciando la primer ronda de selección. Luego de una determinada cantidad de días de *swimming* en las placas, se toman como inicio de la segunda ronda, aquellas bacterias que estaban en una parte del halo externo. Este proceso se realiza de manera sucesiva hasta lograr la cepa más móvil.

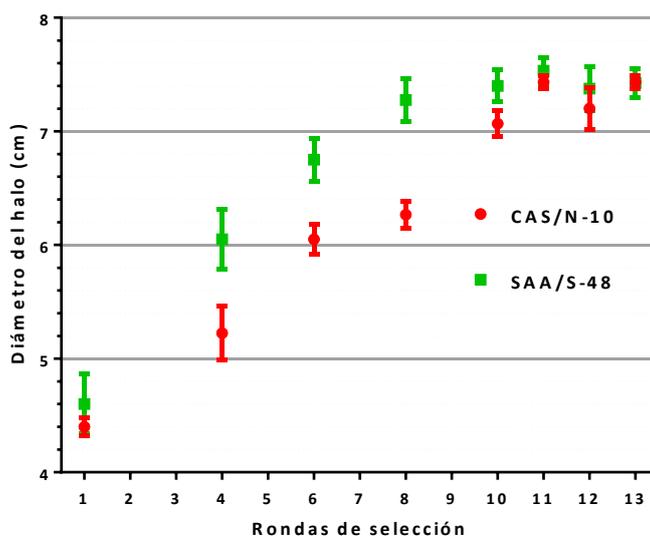
En las placas de movilidad de agar semisólido las bacterias pueden nadar además de reproducirse. Entonces, es importante para optimizar el experimento de selección artificial de bacterias más móviles, conocer la cinética de crecimiento de las cepas parentales. Así, caracterizamos la cinética de crecimiento de las cepas *B. japonicum* CAS/N-10 y SAA/S-48, mediante las mediciones de la  $DO_{500nm}$  para estimar la biomasa de cada cepa en función del tiempo. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada cepa, en la **Figura IV.2** se grafica en cada punto el promedio y la desviación estándar.



**Figura IV.2: Cinética de crecimiento de las cepas CAS/N-10 y SAA/S-48.** Las cepas ensayadas fueron CAS/N-10 (círculo colorado) y SAA/S-48 (cuadrado verde) en el medio AG a pH=7. Se utilizaron como cepas de referencia *B. diazoefficiens* USDA 110 (triángulo fucsia), y *B. japonicum* E109 (rombo azul). Se registraron las medidas de la DO<sub>500nm</sub> para estimar la biomasa de cada cepa en función del tiempo. Para cada punto de la curva, se calculó el promedio y la desviación estándar de las réplicas biológicas.

Evaluando la cinética de crecimiento se aprecia que las velocidades correspondientes a los rizobios de crecimiento lento, *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* USDA 110 son similares,  $0,0419 \text{ h}^{-1}$  y  $0,0406 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. *B. japonicum* CAS/N-10 y *B. japonicum* SAA/S-48, tienen velocidades de crecimiento muy similares ( $0,0273 \text{ h}^{-1}$  y  $0,0265 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente), siendo levemente más lentas que las cepas tipo arriba mencionadas. A partir de estos datos decidimos que, para *B. japonicum* CAS/N-10 y *B. japonicum* SAA/S-48, el tiempo de incubación de cada ronda en la selección de las cepas más móviles sería el mismo.

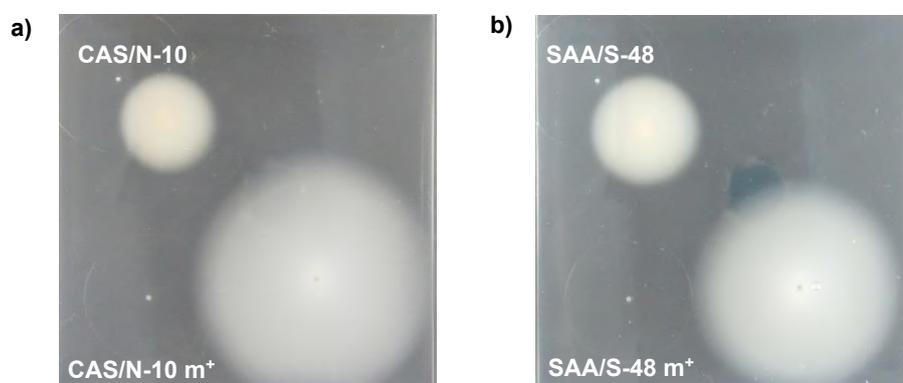
Siguiendo el procedimiento mostrado en la **Figura IV.1**, se escogieron para ambas cepas, aquellas bacterias capaces de nadar más rápido y esas se utilizaron como punto de partida para la siguiente ronda. Se estableció para cada ronda un tiempo de 15 días. En la **Figura IV.3** se aprecia la progresión del halo de natación de las cepas CAS/N-10 y SAA/S-48 a medida que se realizaron las rondas de selección.



**Figura IV.3: Diámetro de los halos de natación en las distintas rondas de selección.** Cada punto representa el diámetro del halo de movilidad medido al tiempo final de las diferentes rondas. La cepa CAS/N-10 está representada con un círculo colorado, mientras que SAA/S-48, con un cuadrado verde. Los experimentos de movilidad en placa se hicieron en medio Götz. Para cada punto se calculó el promedio y la desviación estándar de 10 réplicas biológicas.

Los resultados muestran que, en las últimas cuatro rondas de selección, rondas 10, 11, 12 y 13, no se apreciaba un incremento en el tamaño del diámetro del halo de natación de ambas cepas. A partir de esta observación consideramos que habíamos obtenido el fenotipo de cepas más móviles. A las cepas derivadas más móviles se las denominó CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>, para las que procedían de las cepas parentales CAS/N-10 y SAA/S-48, respectivamente.

Seguidamente, se caracterizó la movilidad de las cepas obtenidas luego de 13 rondas de selección comparándolas en su capacidad de nadar en agar semisólido con las de sus respectivas cepas parentales. En la **Figura IV.4.a** se aprecia la diferencia entre los diámetros de los halos de natación entre CAS/N-10 y CAS/N-10 m<sup>+</sup> y en la **Figura IV.4.b** para SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup>. Las fotos muestran un claro incremento en el tamaño del diámetro del halo de natación de las cepas más móviles CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>.

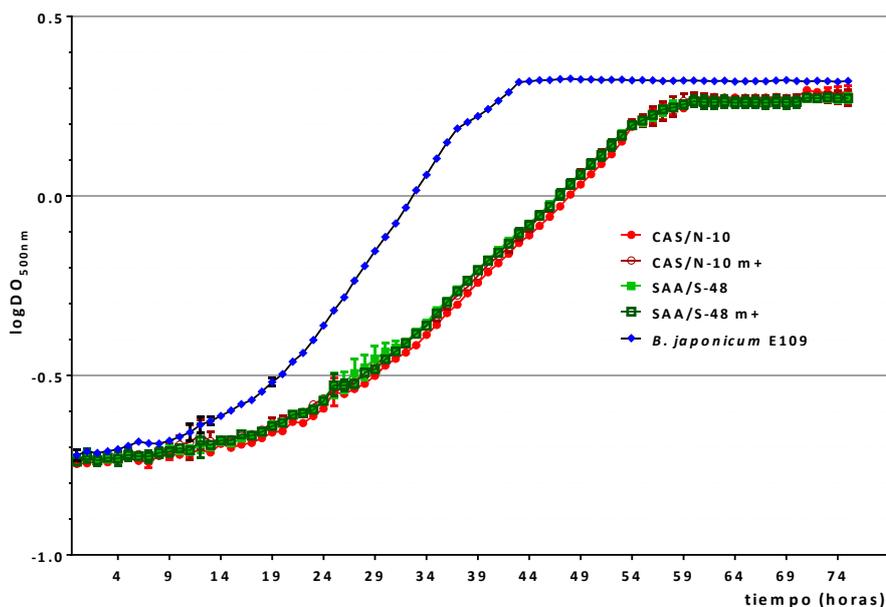


**Figura IV.4: Comparación de los halos de natación entre las cepas parentales y sus derivadas más móviles.** Se muestran los halos de a) CAS/N-10 (ronda 1, cepa parental) y CAS/N-10 m<sup>+</sup> (cepa obtenida en la ronda 13, cepa más móvil). b) SAA/S-48 (ronda 1, cepa parental) y SAA/S-48 m<sup>+</sup> (cepa aislada en la ronda 13, cepa más móvil).

## IV.2 Caracterización de las cepas más móviles

### IV.2.1 Cinética de crecimiento de las cepas parentales y sus derivadas más móviles

Las cepas más móviles seleccionadas CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup> muestran un diámetro del halo de movilidad mayor que la de sus cepas parentales. Sin embargo, esto podría deberse a que se hayan seleccionado cepas que tengan un menor tiempo de duplicación. Para descartar esta hipótesis se realizaron las cinéticas de crecimiento de las cepas que se seleccionaron como más móviles y se las comparó con la de sus cepas parentales. En la **Figura IV.5** se muestran las cinéticas de crecimiento de tres réplicas biológicas para cada cepa.



**Figura IV.5: Cinética de crecimiento de las cepas parentales y sus derivadas más móviles.** Las cepas ensayadas fueron CAS/N-10 (círculo colorado) y su cepa derivada más móvil CAS/N-10 m<sup>+</sup> (circunferencia colorada) y SAA/S-48 (cuadrado verde) y SAA/S-48 m<sup>+</sup> (cuadrado sin relleno verde oscuro) usando como cepa de referencia *B. japonicum* E109 (rombo azul). Los cultivos bacterianos se realizaron en el medio AG y se midió la DO<sub>500nm</sub> de tres replicas biológicas para estimar la biomasa promedio de cada cepa en función del tiempo.

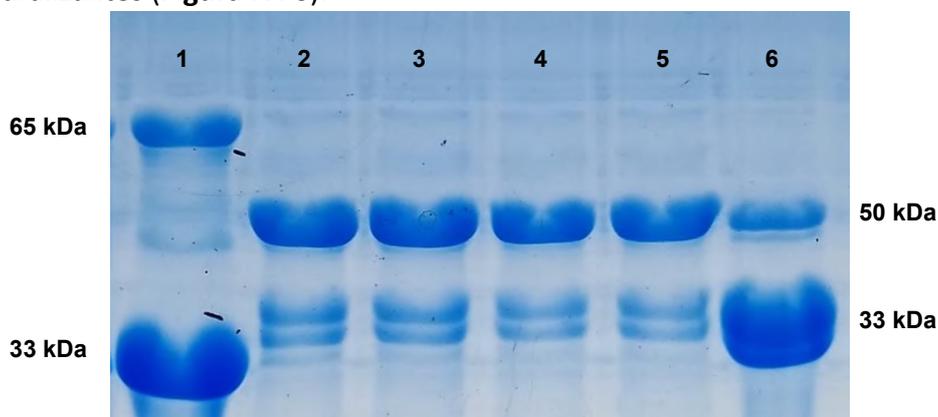
Como se aprecia en la figura de la cinética de crecimiento, las cepas más móviles CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup> tienen la misma velocidad de crecimiento que sus cepas parentales (0,0273 h<sup>-1</sup> y 0,0260 h<sup>-1</sup>, respectivamente). Por lo que efectivamente, son cepas con un fenotipo de mayor movilidad.

## IV.2.2 Caracterización de los sistemas de flagelos

Como se mencionó anteriormente, *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* poseen dos sistemas de flagelos, uno subpolar y uno lateral (Kanbe *et al.*, 2007). Los flagelos de cada sistema están formados por un filamento que contiene diferentes flagelinas. Para la especie *B. diazoefficiens* USDA 110 los tamaños de las flagelinas son de 65 kD para las del sistema subpolar y 33 kD para las flagelinas del sistema lateral (Althabegoiti *et al.*, 2011). Si bien la síntesis del flagelo subpolar es constitutiva, se detectó que una de las señales para la síntesis de flagelos laterales en *B. diazoefficiens* y en *B. japonicum* es cultivar los rizobios en medios líquidos que contengan L-arabinosa como fuente de carbono (Covelli *et al.*, 2013).

Con el objetivo de constatar que las cepas alóctonas *B. japonicum* CAS/N-10 y SAA/S-48 y sus variantes más móviles expresan los dos sistemas de flagelos en las mismas condiciones que las cepas tipo, se extrajeron las proteínas extracelulares de estas cepas y se precipitaron las flagelinas. Así, brevemente, se cultivaron estas cepas en el medio HME-Arabinosa, se procedió al desprendimiento de las flagelinas mediante acción mecánica y se extrajeron las proteínas extracelulares (Mengucci *et al.*, 2019).

Como controles se agregaron las cepas *B. diazoefficiens* USDA 110 y la cepa *B. japonicum* E109. Las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante el método de Bradford, e igual cantidad se sembró en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (**Figura IV. 6**).



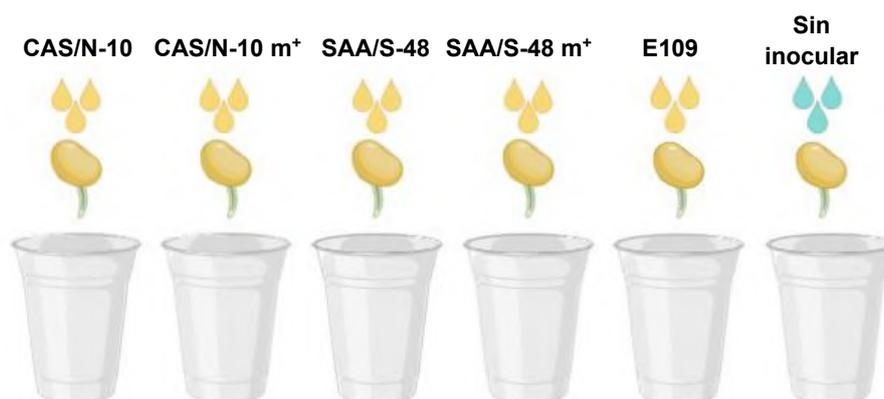
**Figura IV.6: SDS-PAGE de proteínas extracelulares.** Gel de poliacrilamida con SDS teñido con Coomassie Brilliant Blue Coloidal. En las calles se ven los perfiles de flagelina de las cepas *B. diazoefficiens* USDA 110 (calle 1), *B. japonicum* CAS/N-10 (calle 2), *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup> (calle 3), *B. japonicum* SAA/S-48 (calle 4), *B. japonicum* SAA/S-48 m<sup>+</sup> (calle 5) y *B. japonicum* E109 (calle 6).

Como el medio de cultivo HME-Arabinosa tiene como fuente de carbono L-arabinosa, las cepas parentales y las cepas más móviles presentan los dos sistemas de flagelos, el flagelo lateral y el flagelo subpolar. Esto se ve reflejado en las dos bandas que se observan en el gel desnaturizante. Las flagelinas de la cepa *B. diazoefficiens* USDA 110 del sistema subpolar tienen un tamaño de 65 kDalton y las laterales de 33 kDalton (calle 1 en la **Figura IV. 6**). Para la especie *B. japonicum*, los tamaños de las flagelinas se han inferido y la banda superior correspondiente a las flagelinas del flagelo subpolar muestran un tamaño aproximado de 50 kDalton y la banda inferior son las flagelinas del flagelo lateral cuyo tamaño es 33 kDalton (calles 2, 3, 4, 5 y 6 de la **Figura IV. 6**) (Garrido-Sanz *et al.* 2019).

Las cepas aisladas de la población alóctona CAS/N-10 y SAA/S-48 y sus derivadas más móviles son capaces de expresar ambos sistemas de flagelo cuando se las cultiva con L-arabinosa y los tamaños de las flagelinas que los componen coinciden con las de una cepa tipo para su especie.

### IV.2.3 Interacción simbiótica de las cepas con mayor movilidad

El siguiente paso en la caracterización de las cepas más móviles fue evaluar su capacidad para corroborar que mantuvieran la capacidad de nodular soja. Para esto se realizó un ensayo de nodulación siguiendo el esquema de trabajo que se muestra en la **Figura IV.7**. Se inocularon semillas pregerminadas de soja con cultivos de las cepas más móviles, CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>, y sus cepas parentales, CAS/N-10 y SAA/S-48, respectivamente. Además, se agregó un control positivo del experimento al inocular con *B. japonicum* E109 y, se añadió una condición de plantas sin inocular.



**Figura IV.7: Esquema del ensayo de nodulación con las cepas más móviles.** Las condiciones son CAS/N-10 y CAS/N-10 m<sup>+</sup>, además de SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup>. Como controles se añadió la inoculación con *B. japonicum* E109 y una condición sin inocular. Por cada condición se inocularon 10 plantas (réplicas técnicas) y se realizaron 3 réplicas biológicas. Las plantas se regaron con solución Fähræus modificado libre de nitrógeno (Lodeiro *et al.*, 2000)

Luego de 21 días después de la inoculación, había nódulos en todas las plantas inoculadas con las distintas cepas de rizobios y los controles negativos no estaban nodulados. Los nódulos de cada condición se contaron y se calculó el promedio y el desvío estándar. En la **Tabla IV.1** se muestran los resultados para una réplica biológica, pero son representativos de las otras dos repeticiones.

**Tabla IV.1: Número de nódulos generados por las cepas más móviles y sus parentales**

Condiciones	Número de nódulos por planta
<i>B. japonicum</i> CAS/N-10	16 ± 4 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> CAS/N-10 m <sup>+</sup>	17 ± 4 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> SAA/S-48	18 ± 3 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> SAA/S-48 m <sup>+</sup>	17 ± 3 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	15 ± 2 <sup>b</sup>
Sin inocular	0 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un p<0,0001.

El número de nódulos no varió entre las cepas más móviles y sus cepas parentales. Además, no hay diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de nódulos de estas cepas con respecto a las inoculadas con *B. japonicum* E109.

A su vez, se evaluó el peso seco de la parte aérea como una medida indirecta de la FBN (**Tabla IV.2**).

**Tabla IV.2: Peso seco de las plantas inoculadas con las cepas parentales y sus respectivas más móviles.**

Cepa	Peso seco de la parte aérea (g) por planta
<i>B. japonicum</i> CAS/N-10	0.23 ± 0.02 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> CAS/N-10 m <sup>+</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> SAA/S-48	0.23 ± 0.02 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> SAA/S-48 m <sup>+</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	0.24 ± 0.02 <sup>b</sup>
Sin inocular	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$ .

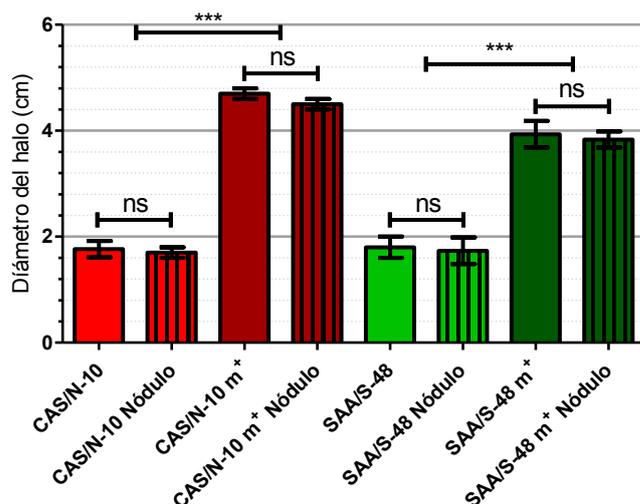
Todas las plantas inoculadas con rizobios tuvieron un mayor peso seco con respecto a las plantas sin inocular. Sin embargo, no hay diferencias significativas en el peso seco entre las cepas parentelas y sus respectivas cepas más móviles.

De este modo, demostramos que las cepas más móviles que seleccionamos mantuvieron la capacidad de nodular soja. Así, en las condiciones ensayadas, las características simbióticas mencionadas no difirieron de las de las cepas parentelas de las cuales derivan.

#### IV.2.4 Estabilidad del fenotipo más móvil luego de la interacción simbiótica.

Con el fin de corroborar que el fenotipo más móvil era estable aún luego de infectar las plantas de soja, se recuperaron los rizobios que estaban dentro de los nódulos radicales y se evaluó su capacidad de natación (López-García *et al.*, 2002; Althabegoiti *et al.*, 2008).

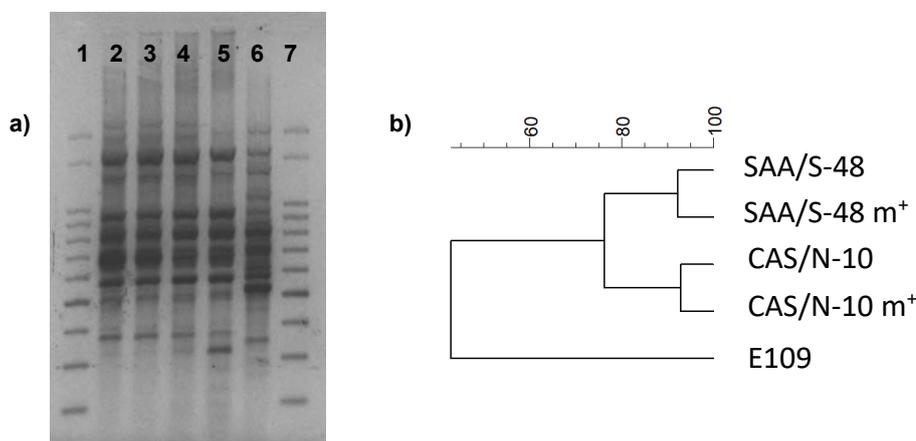
En la **Figura IV.8** se muestran los resultados del ensayo de movilidad con los aislamientos de las cepas que se liberaron de los nódulos.



**Figura IV.8 Movilidad de las cepas utilizadas para inocular soja y recuperadas de los nódulos.** Las barras lisas corresponden a las cepas con las que se inocularon las plantas de soja. Las barras rayadas verticalmente corresponden a las cepas recuperadas de los nódulos de las raíces. El experimento de natación se realizó en medio AG 0.3% p/v. La estadística se hizo mediante un One-way ANOVA con un test de Tukey, (\*\*\*)  $p < 0.001$ . (ns) representa que no hay diferencias significativas.

La medida en el diámetro del halo de natación, antes y después de ser aisladas del nódulo, es igual para todas las cepas. Entonces, todas las cepas conservaron el fenotipo en relación con la movilidad después de ocupar los nódulos de soja.

Con el fin de evaluar que las cepas más móviles que ocuparon los nódulos fueran derivadas de CAS/N-10 y SAA/S-48, se realizó un *fingerprint* con el *primer* BOX-A1R (Koeuth *et al.*, 1995). Se agregó como control ADN de *B. japonicum* E109 (Figura IV.9.a). Utilizando la imagen de los perfiles de banda en el gel de agarosa, se analizó utilizando el software *GelCompar II* (Figura IV.9.b).



**Figura IV.9: Análisis genético de las cepas más móviles y sus cepas parentales.** En a) se observa el perfil de bandas con el *primer* BOX-A1R de las cepas más móviles y sus cepas parentales. En las calles 1 y 7 se sembró el marcador de peso molecular. En la calle 2, CAS/N-10; en la calle 3, CAS/N-10 m<sup>+</sup>; en la calle 4, SAA/S-48; en la calle 5 SAA/S-48 m<sup>+</sup> y en la calle 6, *B. japonicum* E109 como control positivo de la reacción. En b) está el cladograma comparativo de las cepas más móviles y sus parentales. Se realizó utilizando el programa *GelCompar II* con el perfil de bandas producto de la reacción de PCR con el *primer* BOX-A1R y el algoritmo Jaccard.

Al analizar los perfiles de banda con el programa *GelCompar II* se observa que estos coinciden entre la cepa parental y su derivada más móvil. Por lo que, efectivamente se seleccionaron cepas más móviles de CAS/N-10 y SAA/S-48.

### IV.3 Ensayo a campo en la campaña 2017/2018

Experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo en cuatro localidades diferentes de nuestro país han demostrado que, la cepa con mayor movilidad, *B. diazoefficiens* LP3008 ocupó más nódulos que la cepa parental de la cual provenía cuando era inoculada en semillas y en el surco de siembra (Althabegoiti *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2009). En esos experimentos, la cepa *B. diazoefficiens* LP3008 se inoculó en zonas donde había poblaciones autóctonas de rizobios noduladores de soja en más de 10<sup>5</sup> UFC/g de suelo.

Esta característica observada es de gran interés para las cepas objeto y fundamento de nueva presentación del inoculante granulado para soja. Por tal motivo, para observar el comportamiento de las cepas más móviles obtenidas, se realizó un ensayo a campo con inoculación sobre semilla en la campaña 2017/2018 en la localidad de Pergamino.

Se empleó un sistema de siembra en parcela cuya medida fue de 6 metros de largo por 4 surcos distanciados a 0.52 metros entre sí. Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizados con 3 repeticiones por tratamiento.

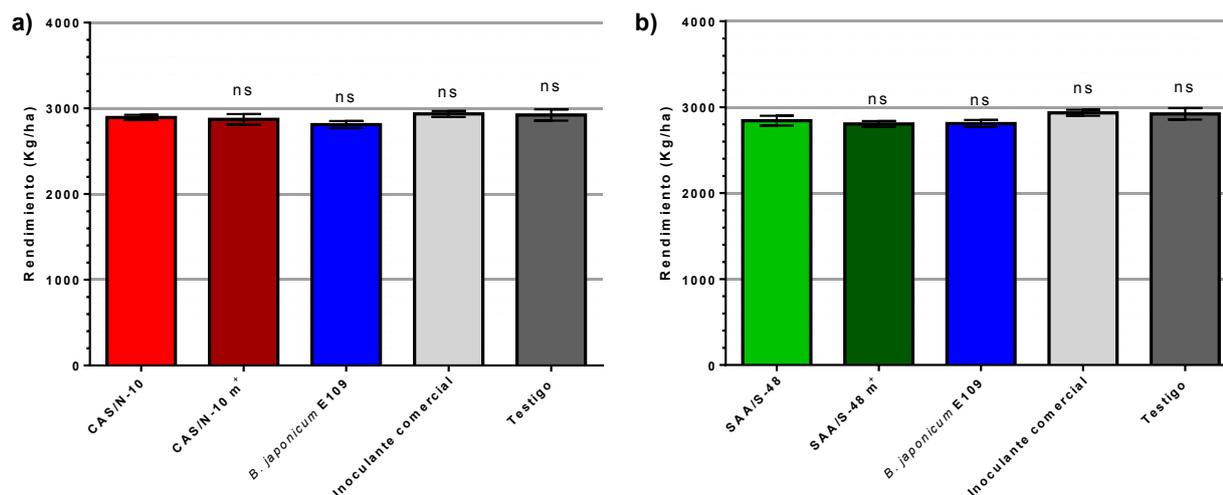
Los tratamientos ensayados fueron la inoculación sobre semillas con:

- *B. japonicum* CAS/N-10
- *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup>
- *B. japonicum* SAA/S-48
- *B. japonicum* SAA/S-48 m<sup>+</sup>
- *B. japonicum* E109
- Inoculante comercial
- Testigo sin inocular

Se añadió un inoculante comercial para comparar la eficiencia simbiótica de las cepas seleccionadas con algún producto existente en el mercado.

El predio donde se realizó el ensayo tenía historial de cultivo de soja, por lo que se realizó una estimación de la cantidad de rizobios noduladores de soja con un ensayo de Número Más Probable (NMP) (Howieson *et al.*, 2006). Para ello, se recolectó tierra del perfil de suelo de 0 cm a 20 cm y se refrigeró hasta llegar al laboratorio. La tierra se resuspendió como indica el protocolo y se hicieron diluciones seriadas. Con las diluciones se inocularon plantas de soja. Según la cantidad de plantas que nodularon en cada dilución, se estimó la concentración de rizobios utilizando las tablas del NMP (**Anexo I**). La concentración de rizobios noduladores es de aproximadamente  $1.10^6$  UFC/g de suelo.

En el mes de junio del año 2018 se cosecharon las parcelas y se evaluó el rendimiento en grano de soja para cada uno de los tratamientos. Los resultados se muestran en la **Figura IV.10**. En la **Figura IV.10.a** se muestran los rendimientos para CAS/N-10 y CAS/N-10 m<sup>+</sup> y en **b**, los de SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup>.



**Figura IV.10: Rendimiento (Kg/hectárea) a campo de las cepas más móviles.** Se grafican los rendimientos a campo (Kg/hectárea). Se separaron los gráficos según la cepa parental y su derivada más móvil. En el panel a) CAS/N-10 y CAS/N-10 m<sup>+</sup> y en b) SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup>. Los controles que agregaron fueron tratamientos con *B. japonicum* E109, un inoculante comercial y un testigo sin inocular como control negativo. La estadística se hizo mediante un *One-way ANOVA* con un test de Tukey. (ns) representa que no hay diferencias significativas.

Los resultados no muestran diferencia significativa entre los tratamientos en ninguno de los casos. Lo sorprendente es que el rendimiento en grano del tratamiento testigo, parcelas sin inocular, fue igual a las parcelas inoculadas. Una posible explicación puede ser que el NMP de rizobios en el perfil de suelo al momento de la siembra fue del orden de  $1 \times 10^6$  UFC/g, que corresponde a suelos con un alto número de rizobios (Howieson, *et al.*, 2006).

En la **Tabla IV.3** se muestran los valores registrados de la temperatura atmosférica promedio en los meses que duró el ensayo y de las precipitaciones totales del mes.

**Tabla IV.3: Precipitaciones y temperatura desde diciembre de 2017 a junio de 2018**

Mes	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Temperatura (°C)	24.3	24.9	24.2	20.6	20.8	15.2	9.1
Precipitaciones (mm)	124.5	18.0	29.0	12.0	199.5	235.5	15.0

Sucedieron dos situaciones críticas durante el ensayo. En los meses de enero y febrero donde la soja tiene que recibir importantes cantidades de agua, hubo una fuerte sequía en todo el país. Por otro lado, en la zona de Pergamino, la cosecha de soja ocurre en el mes de abril, sin embargo, las grandes precipitaciones que se produjeron en el mes, que llegaron aproximadamente a los 200 mm, no permitieron la recolección de los granos. Lo mismo sucedió en el mes de mayo, por lo que se postergó la cosecha hasta el mes de junio.

Quizás los particulares factores climáticos y edafológicos en la campaña en la que se realizó el ensayo, hayan pesado en demasía sobre los resultados obtenidos ya que ni el inoculante comercial, ampliamente probado, generó un efecto positivo sobre el rendimiento en grano.

Al momento de la escritura de esta tesis, en la campaña 2019/2020, se están realizando ensayos a campo con las cepas seleccionadas y sus parentales. Se eligieron tres localidades: Pergamino, provincia de Buenos Aires; Rufino, provincia de Santa Fe y Monte Buey, provincia de Córdoba.

#### IV.4 Resumen

Del total de cepas aisladas del suelo que son capaces de nodular soja, se determinó que *B. japonicum* CAS/N-10 y SAA/S-48 eran las que contenían las mejores características para formar parte del inoculante granulado ya que eran buenas competidoras para nodular y su actuación en la FBN era similar a la de *B. japonicum* E109.

Con el precedente que cepas de rizobios con mayor movilidad al ser inoculadas en semilla (Althabegoiti *et al.*, 2008) y en el surco de siembra (López-García *et al.*, 2009) infectaban una mayor cantidad de nódulos cuando se enfrentaban a la población autóctona y aumentaban el rendimiento; se obtuvieron las variantes más móviles CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>. Estas cepas conservaron la capacidad de nodular soja y el fenotipo de mayor movilidad resultó estable aún después de la interacción simbiótica. Esto indica que se trata de un rasgo fenotípicamente estable, y dado que no ha sido sometida a la manipulación por ingeniería genética, puede ser utilizada para la formulación de inoculantes y ser aplicadas en el campo de forma segura. Por tal motivo, proponemos que las cepas *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup> serán las que formen parte del inoculante granulado.

Sin embargo, no se pudo evaluar su eficiencia en la inoculación a campo porque la campaña en la que se hizo el experimento fue de las peores para el sector agroproductivo. La campaña 2017/2018 tuvo la desventaja que, en los meses de enero y febrero, donde los cultivos deben recibir grandes cantidades de agua para crecer, hubo una de las más grandes sequías en el país, la cual afectó a la gran mayoría de los cultivos. El INTA reportó que se perdieron aproximadamente 21 millones de toneladas de soja. Fue una de las campañas más difíciles de los últimos años ya que el estrés hídrico y el calor afectaron los rendimientos y el contenido de proteína del grano. Además, el exceso de humedad antes de la cosecha desencadenó la apertura de vainas, el desgrane, el brotado y el desarrollo de enfermedades (<http://intainforma.inta.gov.ar/?p=43206>). Durante la temporada actual, campaña 2019/2020 se están haciendo nuevos ensayos a campo en 3 localidades de la llanura pampeana.



# CAPÍTULO V



*Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum*:  
coexistencia de ambos microorganismos y  
coinoculación de plantas de soja





La seguridad alimentaria exige una provisión de alimentos sostenibles para una población que aumenta cada año, mientras que la expansión de las tierras cultivables es limitada. Esta situación lleva a que se requiera una mayor productividad por hectárea, sin que esto afecte la fertilidad y la estabilidad del suelo (Lodeiro, 2015).

Los factores que limitan la productividad de los cultivos están relacionados, entre otros, con el manejo del suelo y del cultivo, las condiciones de ambientes desfavorables y con factores bióticos, como las malezas, plagas y enfermedades. A nivel mundial, se calcula que las pérdidas de rendimiento ocasionadas por las enfermedades que afectan a los cultivos oscilan entre el 10% y el 15%. En Argentina, los daños causados anualmente por las enfermedades de soja alcanzan desde el 8% hasta el 10% del total de la producción (Ivancovich, 2013).

Las enfermedades de los cultivos se controlan mediante la aplicación de productos químicos. Sin embargo, su uso a gran escala ha generado diversos problemas, entre los que se incluyen la contaminación ambiental, la disminución de la biodiversidad y la resistencia de los patógenos (Zhang *et al.*, 2016). Por lo tanto, es prudente desarrollar una estrategia efectiva y ecológica para reemplazar los productos fitosanitarios para controlar las enfermedades de las plantas. Esta situación ha dado lugar a un interés creciente en el control biológico como una prometedora alternativa o una forma complementaria en la reducción del uso de agroquímicos. El control biológico, o biocontrol, implica el uso de microorganismos benéficos para la protección de las

plantas. Ofrece el atractivo de proteger a los cultivos de las enfermedades pero no provoca los efectos adversos que causan los productos de síntesis química (Pal *et al.*, 2006).

Existen reportes de la utilización de diversos microorganismos para control biológico y estos involucran a diversos grupos de hongos y bacterias (Usman Ghazanfar *et al.*, 2018). Por ejemplo, distintas cepas de *Bacillus* spp. se han probado como agentes de biocontrol. Entre ellas, *B. pumilus* SQR-N43 controla el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* que produce el tizón de plántulas (*damping-off*) en pepino (Zhang *et al.*, 2012). Se ha empleado la surfactina A purificada de *Bacillus* NH-100 y NH-217 porque tiene un efecto positivo sobre la enfermedad Bakanae en el cultivo de arroz que es producida por *Gibberella fujikuroi* (Sarwar *et al.*, 2018). Otro ejemplo, es la utilización de *Microbacterium maritypicum* Sneb159 contra *Heterodera glycines*, que es un nematodo que afecta las plantas de soja (Zhao *et al.*, 2019).

*Trichoderma* spp. se informó, ya desde la década del '30, como agente de biocontrol (Weindling, 1934). Las especies del género *Trichoderma* son hongos cosmopolitas y de vida libre en los suelos y en materia vegetal- en descomposición (Harman *et al.*, 2004). Son antagonistas exitosos que tienen capacidades de biocontrol contra patógenos que generan enfermedades en cultivos de importancia económica (Shahid, 2014). Como agente de biocontrol ha desempeñado un papel importante en el manejo de microorganismos que ocasionan enfermedades en las plantas (Alwathnani *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Por ejemplo, en plantas de garbanzo diversas cepas de *Trichoderma* protegen a los cultivos del hongo *Fusarium oxysporum* (Dubey *et al.*, 2007). También, cepas identificadas como *T. harzianum* controlan el crecimiento de *Pythium ultimum* uno de los agentes causales del *damping off* en cultivos como la papa y el trigo (Naseby *et al.*, 2000).

Las especies del género *Trichoderma* utilizan diferentes mecanismos para el control de los patógenos de las plantas. Algunas especies de *Trichoderma* actúan sobre los patógenos directamente generando micoparasitismo (Druzhinina *et al.*, 2011), produciendo enzimas líticas de la pared celular o compuestos antimicrobianos (Kamala, 2012). También actúan mediante efectos indirectos sobre los patógenos de las plantas, compitiendo por los nutrientes y el espacio, modificando las condiciones ambientales, promoviendo el crecimiento de las plantas, generando una respuesta de defensa sistémica indirecta al patógeno de planta (Benítez *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2015). Mediante todos estos mecanismos de acción, las especies de *Trichoderma* pueden controlar y antagonizar una amplia gama de fitopatógenos y patógenos de post cosecha económicamente importantes, así como también controlar bacterias y virus (Harman *et al.*, 2004). Por lo general, se considera un competidor agresivo que coloniza rápidamente a los patógenos, especialmente aquellos que habitan el suelo como *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., entre otros (Usman Ghazanfar *et al.*, 2018).

Otra ventaja que presenta la utilización de especies de *Trichoderma* es que están descritas como hongos que promueven el crecimiento vegetal (*Plant Growth*

*Promoting Fungi*, PGPF). Su aplicación ha dado como resultado la estimulación en el crecimiento de diversas plantas; observándose un incremento en la emergencia, el vigor, la biomasa y el desarrollo en los sistemas radiculares. Generando, en consecuencia, un incremento en la producción y el rendimiento (Hossain *et al.*, 2017; Masunaka *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2016).

En Argentina, el desarrollo de las enfermedades en los cultivares de soja se ve favorecido por las condiciones ambientales, el incremento en la superficie sembrada, la práctica del monocultivo, así como con el uso de germoplasma de escasa variabilidad. Así, el panorama sanitario de la soja en Argentina ha cambiado. Ha pasado de ser un cultivo prácticamente libre de enfermedades, en la década del '80, a la situación actual, donde se consideran a las enfermedades como responsables de severas reducciones tanto en la calidad como en el rendimiento; con el consecuente impacto negativo en la producción y rentabilidad del cultivo (Ivancovich, 2013). Una ventaja importante que brinda la presentación del inoculante granulado es que permite incorporar, además de los rizobios, otro microorganismo en el mismo soporte como podría ser el caso de *Trichoderma* spp.

**En este capítulo, se describirá la interacción entre las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y el hongo *Trichoderma harzianum*, con el objetivo de evaluar el efecto que produce la coinoculación de ambos microorganismos sobre las plantas de soja. Además, se analizará a *T. harzianum* como agente de biocontrol sobre diversos patógenos de soja y la capacidad para mejorar la distribución de los rizobios en el suelo.**

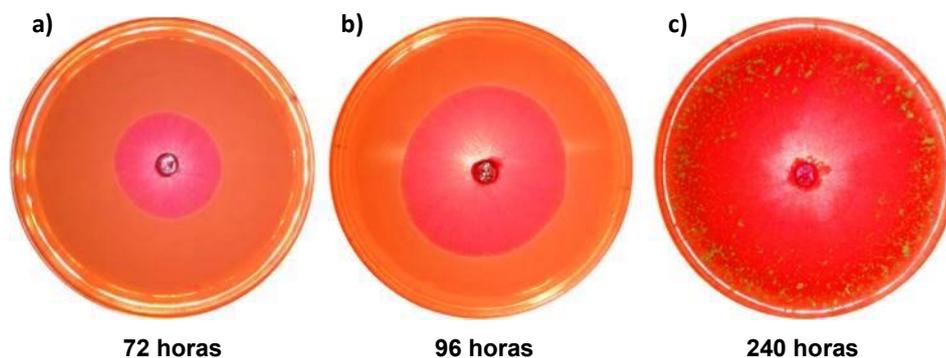
## **V.1 Efecto de *Trichoderma harzianum* en la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum***

### **V.1.1 Antagonismo entre *Trichoderma harzianum* Th5cc y *Bradyrhizobium japonicum***

Con el objetivo de incorporar al inoculante granulado una cepa de *Trichoderma* spp. evaluamos la posibilidad de antagonizar con *Bradyrhizobium* spp., utilizadas habitualmente como microorganismos benéficos en los cultivos de soja. Si ambos microorganismos pueden coexistir, pueden incorporarse en un mismo soporte.

Se evaluó la existencia de antagonismo, cuando se las cultivan en una misma caja de Petri, *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc. La cepa Th5cc fue aislada de filoplano de trigo y es biocontroladora de *Zymoseptoria tritici*, agente causal de la mancha de la hoja del trigo (Cordo *et al.*, 2007). Como los cultivos de rizobios en placas de Petri se hacen de rutina en el laboratorio en el medio agarizado, extracto de levadura-manitol (*yeast extract mannitol*, YEM), decidimos registrar el crecimiento del hongo en este medio. Para ello, de una placa de cultivo de *T. harzianum* Th5cc cultivada en medio APG se cortó una circunferencia y se la colocó en el centro de otra placa de Petri con medio

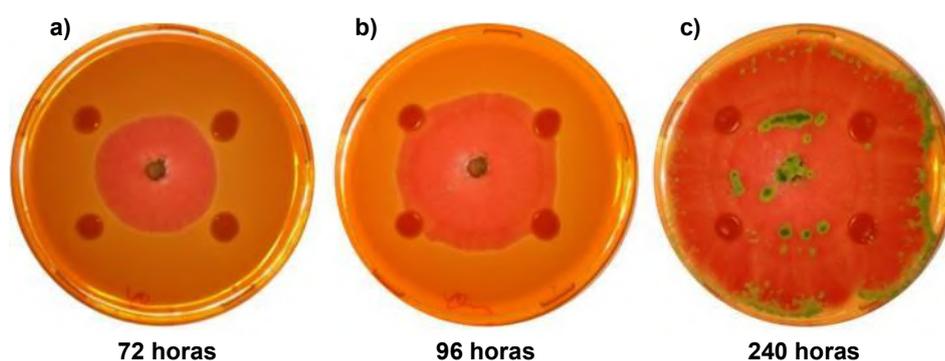
YEM fresco. Se registró el crecimiento de *T. harzianum* Th5cc a lo largo del tiempo (Figura V.1).



**Figura V.1: Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Th5cc en medio YEM.** Registro del crecimiento del hongo *T. harzianum* Th5cc en el medio YEM a las 72 horas (a), a las 96 horas (b) y a las 240 horas (c). Después de 10 días se puede apreciar la formación de conidios del hongo en el medio.

La cepa *T. harzianum* Th5cc fue capaz de crecer en el medio YEM agarizado y generar conidios. Esta capacidad es una de las características del género *Trichoderma*, que puede crecer y generar conidios en una gran cantidad de medios de cultivo sintéticos (Martínez *et al.* 2013; Usman Ghazanfar *et al.*, 2018).

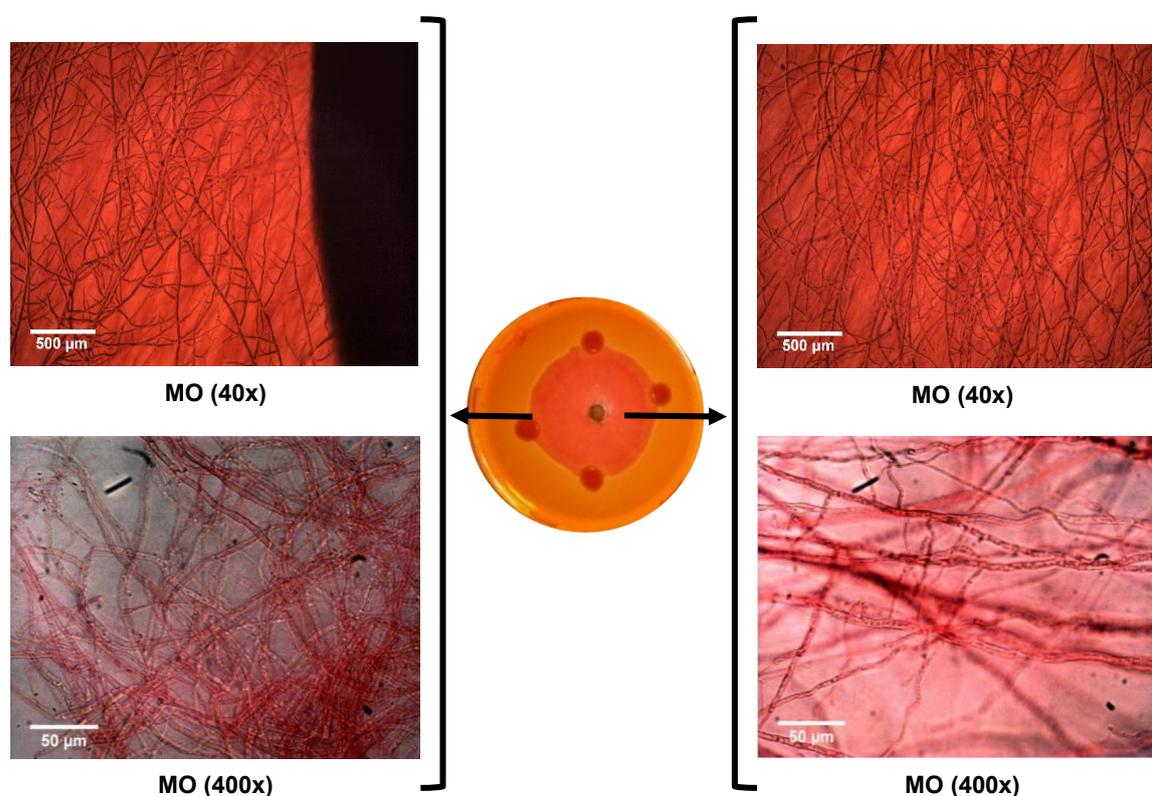
Una vez establecido que *T. harzianum* Th5cc se podía cultivar adecuadamente en el medio YEM, realizamos cultivos duales en este medio de *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc para evaluar si eran antagonistas. Como en este medio de cultivo los microorganismos tienen diferentes cinéticas de crecimiento, primero se sembró la cepa de *Bradyrhizobium* en cuatro puntos de la placa de YEM y se cultivó durante cinco días. En ese momento, se colocó en el centro de la placa, equidistante a las macrocolonias de *B. japonicum* E109, un taco de *T. harzianum* Th5cc. A lo largo del tiempo de incubación, se registró el avance de los halos de crecimiento (Figura V.2).



**Figura V.2 Cultivo dual entre *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Trichoderma harzianum* Th5cc.** Los cultivos se realizaron en medio de cultivo YEM. (a) Luego de 72 horas de cocultivo, se aprecia que los dos microorganismos aún no entraron en contacto (b) A las 96 horas, *T. harzianum* Th5cc hizo contacto con las macrocolonias *B. japonicum* y se observa halo de inhibición entre ellas. (c) Después de 10 días, el hongo colonizó toda la placa, no se aprecia halo de inhibición entre ambas cepas y el proceso de formación de conidios no se ve inhibido por la presencia del rizobio.

A los tres días post colocación e incubación del taco con el micelio del hongo, el crecimiento de este aún no alcanzaba la zona donde se encontraban las bacterias creciendo en macrocolonias. A las 96 horas de incubación, el hongo entró en contacto con los rizobios y no se observó halo de inhibición. Se apreció, a los diez días de crecimiento, que *T. harzianum* Th5cc ocupó toda la placa y que fue capaz formar conidios, por lo que el hongo no se vio afectado ni por el ambiente ni por el otro microorganismo (Infante *et al.*, 2009).

La observación microscópica de la zona de contacto entre la macrocolonia de *B. japonicum* E109 y el micelio de *T. harzianum* Th5cc, luego de 96 horas de cocultivo, muestra ausencia de inhibición entre ambos microorganismos y de daño en las hifas del hongo (**Figura V.3**).



**Figura V.3:** Zona de contacto entre el micelio de *Trichoderma harzianum* Th5cc y *Bradyrhizobium japonicum* E109. A la izquierda se muestra la zona de interacción entre *T. harzianum* Th5cc y la macrocolonia del rizobio *B. japonicum* E109. A la derecha, se muestra el micelio de *T. harzianum* Th5cc lejos de la zona de contacto. Las muestras se observaron en un microscopio óptico. Para las muestras superiores, se observó directamente la placa de Petri. En las inferiores, se aisló una porción de micelio en ambas zonas de interés.

Para comprobar el estado fisiológico del hongo se cortó un disco de *T. harzianum* Th5cc después de 10 días de contacto con *B. japonicum* E109 y, se lo colocó en una placa fresca de YEM. Luego de 72 horas de cultivo se registró crecimiento del hongo, en comparación con una muestra sin contacto con *B. japonicum* E109, mostrando que el contacto previo con el rizobio no había afectado su habitual cinética de crecimiento.

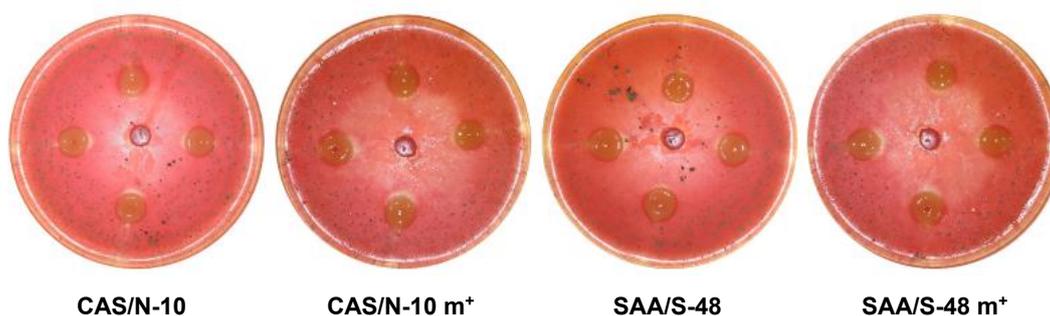
A su vez, también se evaluó el estado fisiológico de las rizobacterias luego de diez días de cocultivo. Una de las macrocolonias de *B. japonicum* E109 que estuvo en

contacto con el hongo se resuspendió en solución fisiológica estéril y se sembró en una placa con medio fresco YEM, suplementada con el fungicida cicloheximida (*Ch*). Como es habitual en este medio, luego de 7 días de incubación se apreció el crecimiento del rizobio. Demostrándose así que el contacto de *T. harzianum* Th5cc con *B. japonicum* E109 no afectó su normal desarrollo.

Como resumen, se observó que *T. harzianum* Th5cc y *B. japonicum* E109 no son antagonistas cuando crecen en el medio YEM. El crecimiento de *T. harzianum* Th5cc no se ve afectado por la presencia de *B. japonicum* E109 y es capaz de generar conidios. Además, que *B. japonicum* E109 conserva su cinética habitual de crecimiento luego de estar en contacto con el hongo.

### V.1.2 Antagonismo con las cepas de rizobios seleccionadas: CAS/N-10, CAS/N-10 m<sup>+</sup>, SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup>

Seguidamente, realizamos un ensayo dual con la cepa *T. harzianum* Th5cc y las cepas seleccionadas en los capítulos previos, *B. japonicum* CAS/N-10, SAA/S-48 y sus respectivas cepas más móviles, *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>. Utilizamos el mismo esquema experimental que para *B. japonicum* E109 y luego de 10 días se registró la etapa final del ensayo (**Figura V.4**).



**Figura V.4: Cultivo dual entre las cepas seleccionadas y *Trichoderma harzianum* Th5cc.** Las macrocolonias de *B. japonicum* CAS/N-10, CAS/N-10 m<sup>+</sup>, SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup> se crecieron en placas de YEM y luego se colocó un taco de 0.5 cm de *T. harzianum* Th5cc crecido en medio APG. Se muestra el estadio final para cada enfrentamiento dual luego de 10 días de incubación.

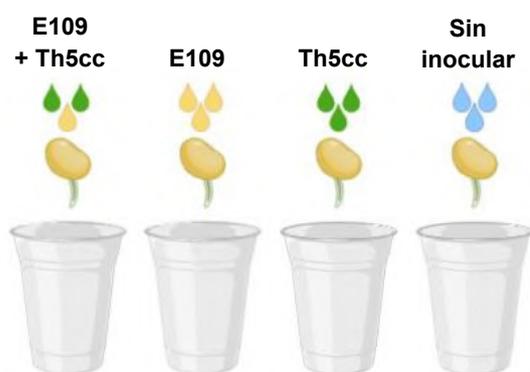
Al igual que con la cepa *B. japonicum* E109, no hubo halo de inhibición entre las cepas *B. japonicum* CAS/N-10, CAS/N-10 m<sup>+</sup>, SAA/S-48 y SAA/S-48 m<sup>+</sup> y la cepa *T. harzianum* Th5cc.

Que no sean microorganismos antagonistas es condición necesaria para que ambas especies formen parte del inoculante granulado.

### V.1.3 Coinoculación de plantas de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum*

Finalmente nos proponemos el desarrollo de inoculantes combinados para cultivos de soja que, además de los rizobios, incluyan otro microorganismo que pudieran tener un efecto benéfico sobre la planta como *T. harzianum*. Con lo cual, ensayamos

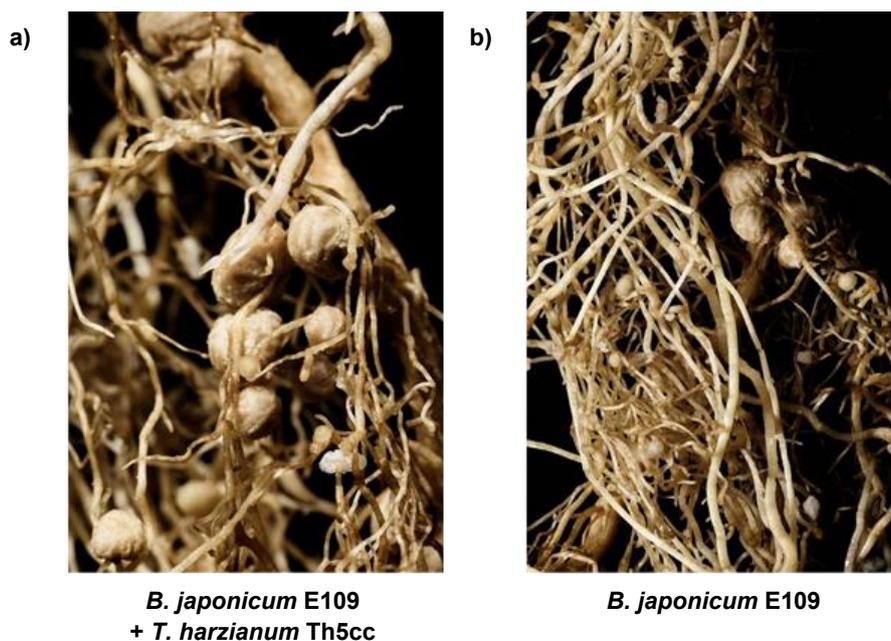
sobre plantas de soja el efecto de la coinoculación con estos microorganismos. Evaluando la nodulación y el peso seco de la parte aérea y de las raíces como parámetros que nos permiten estimar la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Para ello, en el diseño del experimento, además de las plantas inoculadas con ambas cepas, se incluyeron controles de las plantas inoculadas sólo con *B. japonicum*, sólo con el hongo y plantas sin inocular a las que se les agregó el mismo volumen que las condiciones inoculadas, pero con solución mineral estéril (**Figura V.5**).



**Figura V.5: Esquema del experimento de coinoculación de plantas de soja.** Sobre semillas germinadas de soja, las condiciones ensayadas fueron: coinoculación con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc, inoculado sólo con *B. japonicum* E109, sólo con *T. harzianum* Th5cc y, control negativo, sin inocular. El soporte en el que se realizó fue perlita/arena y se regaron con solución mineral de Fähræus modificada.

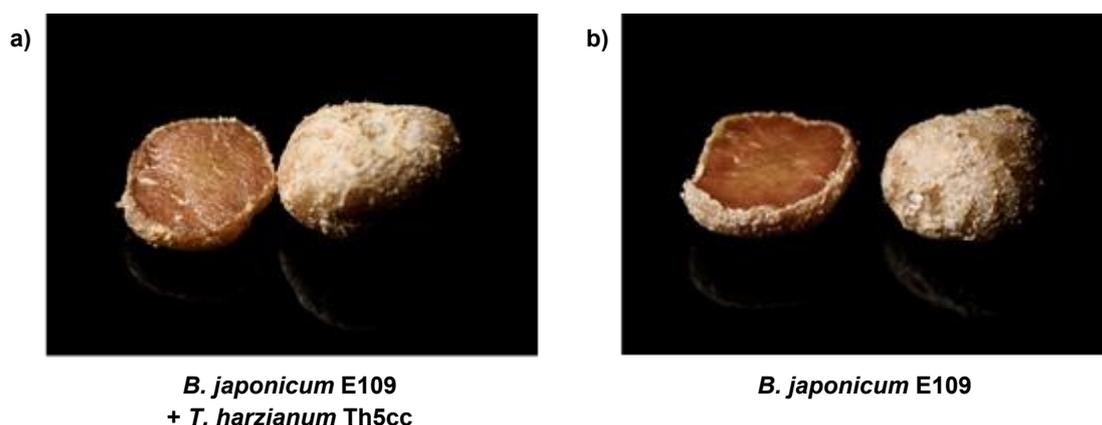
El inóculo para las plantas de la condición coinoculada se obtuvo a partir de cultivos independientes de *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc que se mezclaron en partes iguales previo al contacto con la raíz. La concentración de *B. japonicum* fue de  $10^6$  UFC/mL y, para *T. harzianum*, de  $10^7$  conidios/mL. Para la coinoculación, la concentración de los microorganismos fue la misma que la utilizada con los microorganismos en solitario.

Las plantas fueron cosechadas luego de 21 días post inoculación. El control sin inocular no presentó nódulos ni en la raíz primaria, ni en las secundarias. Al igual que las plantas inoculadas solamente con el hongo. Mientras que sí desarrollaron nódulos, las plantas inoculadas con *B. japonicum* E109 y aquellas coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc. En la **Figura V.6** se muestran fotografías de los nódulos en ambas condiciones.



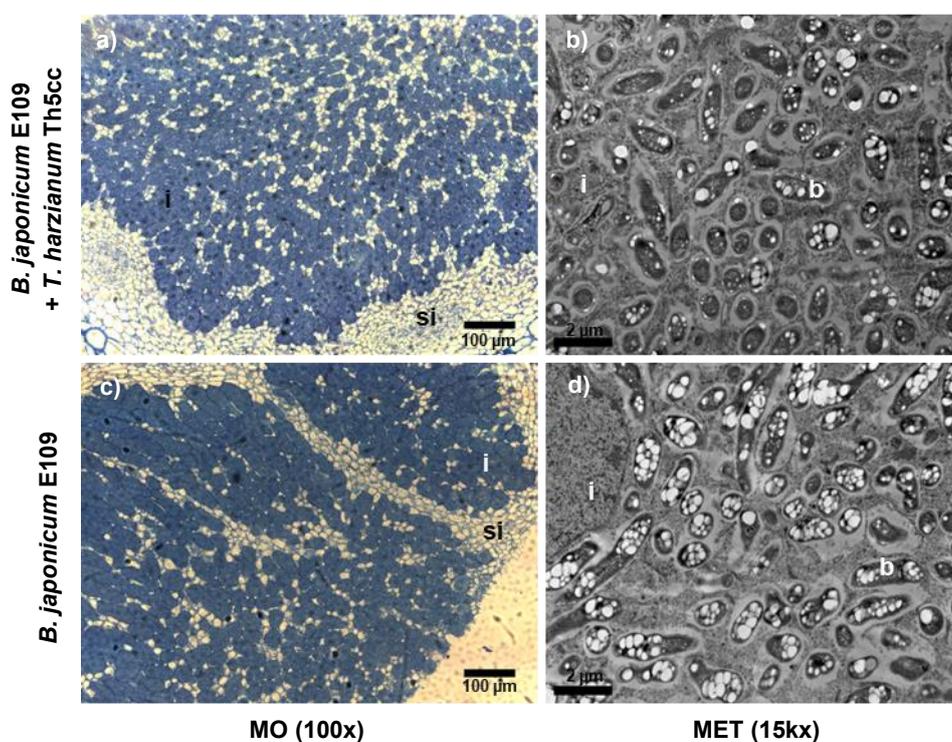
**Figura V.6:** Nódulos en raíces de soja coinoculadas con *B. japonicum* y *T. harzianum*. En a) se observan los nódulos sobre las raíces de las plantas cuando fueron coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc. En b) se muestran los nódulos producto de la inoculación con *B. japonicum* E109 como control positivo de nodulación.

Los nódulos producto de la coinoculación del rizobios con el hongo o los provenientes de la inoculación sólo con la bacteria no presentaron diferencias ni en el número, ni en su morfología. A su vez, en ambos casos cuando se cortó este órgano radical se observó el interior rojizo característico de la leghemoglobina, hemoproteína presente en los nódulos con actividad fijadora de nitrógeno (Patriarca *et al.*, 2004) (Figura V.7).



**Figura V.7:** Nódulos producto de la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum*. Los nódulos fueron cortados a la mitad con una hoja de bisturí para observar la coloración interna. Dentro de una misma imagen, a la izquierda se observa un nódulo cortado y a la derecha, un nódulo sin cortar. En a) se muestran los nódulos cuando las plantas fueron coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc y, en b) cuando fueron inoculadas sólo con *B. japonicum* E109.

Con el objetivo de estudiar si estos nódulos con actividad fijadora de N, presentaban alguna diferencia en la estructura microscópica, se realizaron cortes finos que se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico (MO) (**Figura V.8.a** y **Figura V.8.c**). Así, apreciamos que las células vegetales se encontraban mayoritariamente infectadas con rizobios, tanto en los cortes de los nódulos de las raíces coinoculadas o inoculadas sólo con las bacterias (identificadas con la letra “i” en la **Figura V.8.a** y **Figura V.8.c**, zona azulada). Lo que muestra que no habría diferencias en la estructura microscópica. Al analizar la ultraestructura de los nódulos, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), se aprecia que en ambas condiciones las células vegetales están ocupadas por simbiosomas que adentro muestran los bacteroides (“b” en **Figura V.8.b** y **Figura V.8.d**). La ultraestructura del nódulo producto de la coinoculación (**Figura V.8.b**) no muestra diferencias con la de un nódulo funcional donde se produce la FBN (**Figura V.8.d**).



**Figura V.8: Estructura y ultraestructura del interior de los nódulos producto de la coinoculación.** Microscopías de la estructura (**a**) y ultraestructura (**b**) de los nódulos cuando se coinoculan las plantas de soja con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en comparación con la estructura (**c**) y ultraestructura (**d**) de los nódulos inoculados sólo con rizobios. Las letras corresponden a célula vegetal infectada (i) con bacteroides (b) y célula sin infectar (si).

Los nódulos de las plantas de soja coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc y aquellas que sólo fueron inoculadas con el rizobio, no mostraron diferencias morfológicas ni en su estructura macro (MO) ni ultraestructura (MET), aun cuando reflejan que son funcionales, fijadores de N. Asimismo, cuando se comparó el peso seco de estas plantas, no se encontraron diferencias significativas. Esto podría

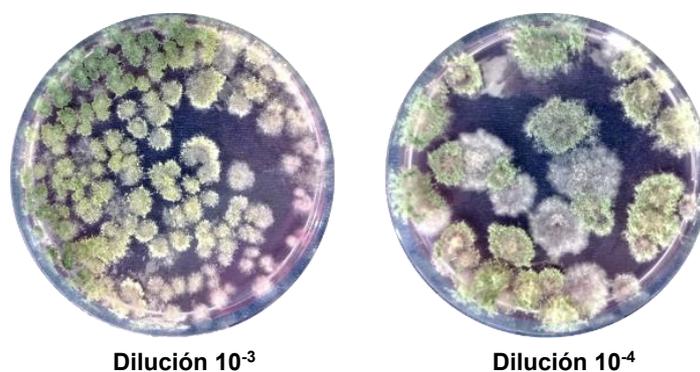
deberse a que la coinoculación con *T. harzianum* Th5cc no tiene efecto sobre los parámetros evaluados. O, que el tiempo del desarrollo de las plantas no fue suficiente como para que la FBN impacte sobre los mismos.

#### V.1.4 Supervivencia de *Trichoderma harzianum* Th5cc en las raíces de plantas de soja

Los ensayos de coinoculación se realizaron, como suele hacerse para evaluar la capacidad simbiótica de los rizobios, sobre un sustrato inerte estéril y se regó con una solución mineral mínima para plantas libre de N. Si bien *Trichoderma* spp. es un hongo ubicuo que se encuentra en los suelos y es capaz de crecer en medios de cultivo con diversas fuentes de carbono (Papavizas *et al.*, 1982), desconocíamos su capacidad de sobrevivir en las macetas con perlita/arena luego de 21 días post inoculación.

Para esclarecer esta situación de la permanencia de *T. harzianum* Th5cc en la rizosfera de soja se utilizó la técnica de suelo diluido. Se cosecharon las raíces de todos los tratamientos, se sumergieron y agitaron en agua destilada estéril durante 20 minutos y diluciones seriadas se sembraron en placas con medio selectivo para *Trichoderma* (*Trichoderma selective medium*, TSM) y pentacloronitrobenceno (PCNB) como fungiestático (modera el crecimiento del hongo) (Elad *et al.*, 1983).

Placas como las que se muestran en la **Figura V.9**, se contaron luego de siete días de incubación en la estufa.



**Figura V.9: Recuento de *T. harzianum* en la rizosfera de soja.** Crecimiento de *T. harzianum* Th5cc en el medio TSM con PCNB. Se muestran dos diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

Los recuentos de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de *T. harzianum* Th5cc correspondientes a las raíces de cada condición de inoculación se muestran en la **Tabla V.1**. Sólo se encontraron colonias de *T. harzianum* en las condiciones en las cuales había sido inoculada; no encontrándose colonias fúngicas en las condiciones sin inocular e inoculada sólo con la bacteria. Además, los recuentos no mostraron diferencias significativas entre las condiciones inoculadas con *T. harzianum* Th5cc y la coinoculación.

Tabla V.1: Recuento de *T. harzianum* Th5cc

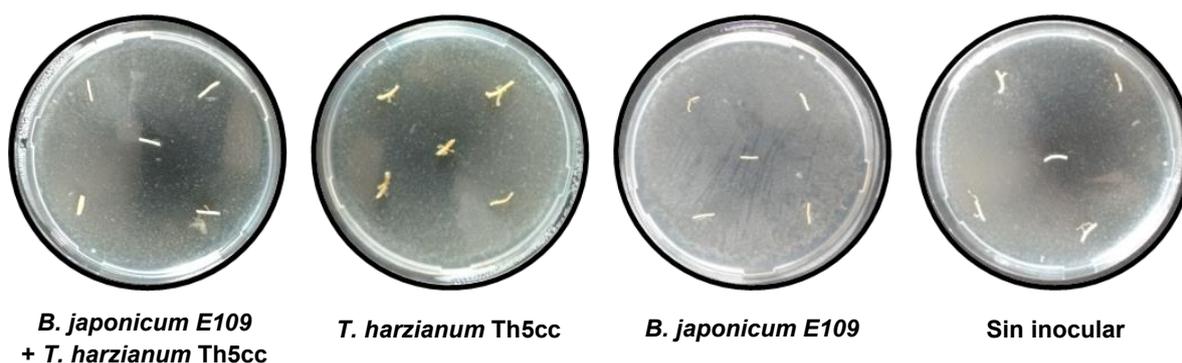
Condición	Recuento (UFC/g fresco de raíz)
<i>B. japonicum</i> E109	0 <sup>a</sup>
<i>T. harzianum</i> Th5cc	(0.97 ± 0.24)x10 <sup>5</sup> b
<i>B. japonicum</i> E109 + <i>T. harzianum</i> Th5cc	(1.24 ± 0.62)x10 <sup>5</sup> b
Sin inocular	0 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$ .

Los resultados indicaron que *T. harzianum* Th5cc fue capaz de colonizar la superficie de las raíces de soja y que *B. japonicum* E109 no interfirió. El experimento, además, permitió confirmar que no hubo contaminación cruzada entre los distintos tratamientos.

### V.1.5 *Trichoderma harzianum* Th5cc no es endófito de raíces de soja

Está descrito que el género *Trichoderma* es capaz de ser endófito de distintos tipos de especies vegetales (Katoch *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2018; Rinu *et al.*, 2014). Para comprobar si en el caso de plantas de soja era endófito, se desarrolló un protocolo para encontrar hongos endófitos en raíces de esta plantas (Russo *et al.*, 2018). Raíces de 21 días, se cortaron trozos de raíz de los ensayos que habían sido inoculados con *T. harzianum* Th5cc, se desinfectaron superficialmente con etanol 96° durante 10 minutos e hipoclorito de sodio (10% v/v) durante 10 minutos, se realizaron 10 lavados con agua destilada y se colocaron los trozos de raíz sobre una placa con medio APG. Se realizó el mismo procedimiento para las raíces de plantas que fueron inoculadas sólo con *B. japonicum* E109 y plantas sin inocular. Luego de una semana de incubación a 24°C se analizaron placas como las que se muestran en la **Figura V.10**.



**Figura V.10: *Trichoderma harzianum* Th5cc no es endófito en raíces de soja.** Cortes de raíces esterilizadas que habían sido inoculadas con *T. harzianum* Th5cc, coinoculadas con *B. japonicum* E109. También se agregaron, como control negativo, plantas inoculadas con *B. japonicum* E109 y plantas sin inocular.

En ninguna de las placas, provenientes de cada una de las condiciones de inoculación, se observa crecimiento de micelio alrededor de las raíces de soja. Ni en

aquellas raíces que no estuvieron en contacto con el hongo, ni tampoco en las provenientes de las condiciones inoculadas con *T. harzianum* Th5cc o coinoculadas.

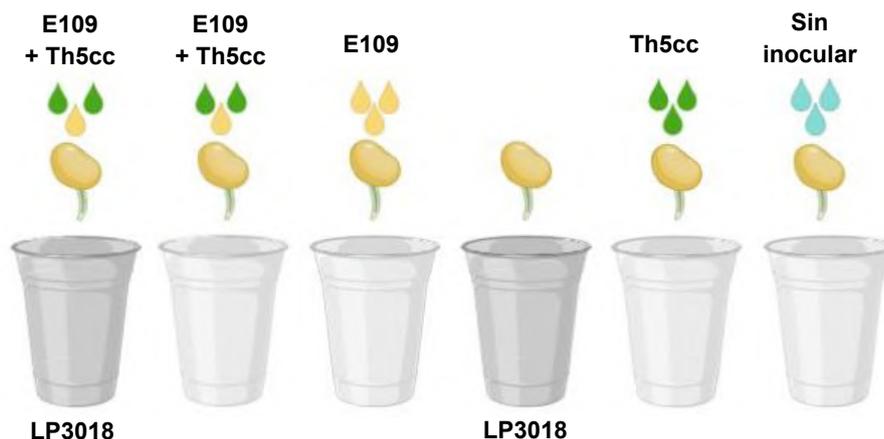
Para profundizar en el tema, las porciones de raíz se aclararon y se tiñeron con lactofenol con azul de algodón y se miraron al microscopio óptico. Con estos experimentos tampoco se pudo observar la presencia de micelio en las capas de la epidermis de la raíz.

Los experimentos indicaron que *T. harzianum* Th5cc no es endófito de soja en las condiciones ensayadas.

#### **V.1.6 Competición para la nodulación cuando se adiciona *Trichoderma harzianum* Th5cc**

Los resultados obtenidos muestran que el agregado de *T. harzianum* Th5cc no interfiere en el proceso de nodulación de *B. japonicum* E109 y que, por lo tanto, el hongo podría añadirse al formulado del inoculante granulado. Con esta nueva presentación de inoculante una de las variables que buscamos mejorar es la competición para la nodulación. Para conocer si la adición de *T. harzianum* Th5cc le confiere una ventaja al rizobio inoculado para competir con una población establecida en el soporte, se realizó un ensayo de competición en macetas (Pérez-Giménez *et al.*, 2011).

En el experimento se usaron dos cepas de rizobios que poseen la misma capacidad de ocupar nódulos y sólo difieren en su resistencia a antibióticos. La cepa *B. japonicum* LP3018, derivada de la cepa *B. japonicum* E109 con resistencia a los antibióticos espectinomina (*Sm*) y estreptomina (*Sp*) (López-García *et al.*, 2009). Se inocularon 200 mL de LP3018 ( $10^6$  UFC/mL) que se establecieron en el soporte, mientras que *B. japonicum* E109 ( $10^6$  UFC/mL), con o sin Th5cc ( $10^7$  conidios/mL) fueron aplicados de modo líquido sobre las semillas. De esta manera, se podría evidenciar que cepa había originado los nódulos en las raíces de las plantas. Además, se agregaron como controles semillas inoculadas sólo con *B. japonicum* E109, sólo con *T. harzianum* Th5cc, y, coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc. Se añadió el control de *B. japonicum* LP3018 inoculado en la maceta y un control sin inocular. El esquema del experimento se muestra en la **Figura V.11**. Se realizaron dos réplicas biológicas del experimento, con 10 réplicas técnicas por condición cada uno.



**Figura V.11: Esquema del experimento de competición para la nodulación con *Trichoderma harzianum*.** Condiciones ensayadas en el experimento de la competición entre *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc contra la población establecida en la maceta de *B. japonicum* LP3018. Los controles del ensayo fueron: *B. japonicum* E109, *T. harzianum* Th5cc, y la coinoculación sobre semillas; la cepa *B. japonicum* LP3018 establecida en la maceta y, finalmente, una condición sin inocular donde las semillas se embibieron con Fähræus.

Después de 21 días, los nódulos se retiraron de las raíces. Se contaron y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio 10% (v/v). Se maceraron con palillos con punta romo estériles y se realizaron estrías en placas con antibióticos para seleccionar el crecimiento de las distintas cepas. En la **Tabla V.2** se muestran los porcentajes de nódulos que ocupaban cada una de las cepas.

**Tabla V.2: Competición para la nodulación**

Competición Inoculación sobre semilla	Población en maceta	Relación inóculo/ LP3018	Sm resistentes (%)	Sm sensibles (%)	Diferencia significativa
E109 + Th5cc	LP3018	(1-1) : 1	57	43	ns
E109 + Th5cc	-	1 : 0	0	100	-
E109	-	1 : 0	0	100	-
-	LP3018	0 : 1	100	0	-
E109	LP3018	1 : 1	45	55	-
Th5cc	-	1 : 0	0	0	-
Sin inocular	-	0 : 0	0	0	-

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. (ns) representa que no hay diferencias significativas. Se consideró un porcentaje de doble ocupación del 20%.

Podemos observar que el agregado de *T. harzianum* Th5cc no tuvo efecto sobre la competitividad intrínseca de las cepas de rizobios.

## V.2 *Trichoderma harzianum* Th5cc como biocontrol de distintos patógenos de soja

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos ya que no son patógenos de plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982). Los productos comerciales de *Trichoderma* spp. se han utilizado en horticultura y en cultivos extensivos de invierno (Stocco *et al.*, 2016). Se ha demostrado el efecto de biocontrol de la cepa *T. harzianum* T-aloe contra el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* que afecta al cultivo de soja (Zhang *et al.* 2016).

Con el fin de evaluar la capacidad biocontroladora de *T. harzianum* Th5cc sobre hongos patógenos de soja, se evaluó su antagonismo contra algunos de estos microorganismos. Las especies de hongos fitopatógenos a ensayar se seleccionaron por su relevancia de alta a moderada en el cultivo de soja (ver **Anexo III**).

El antagonismo entre *T. harzianum* Th5cc y los distintos patógenos de soja, se evaluó mediante ensayos duales (Zhang *et al.*, 2016). Los mismos se realizaron en una placa de medio APG, en el que se colocaron dos discos de cultivo de hongos; en un extremo de la placa se colocó un disco con la cepa *T. harzianum* Th5cc y, enfrentado en el otro extremo, el disco con el patógeno. Las cepas de fitopatógenos de soja ensayadas fueron:

- *Alternaria* spp. D18
- *Cercospora kikuchii* D33
- *Phomopsis longicolla* DP38
- *Phomopsis longicolla* DP41
- *Rhizotonia* spp. RM
- *Rhizotonia* spp. R24
- *Sclerotinia sclerotiorum* L50

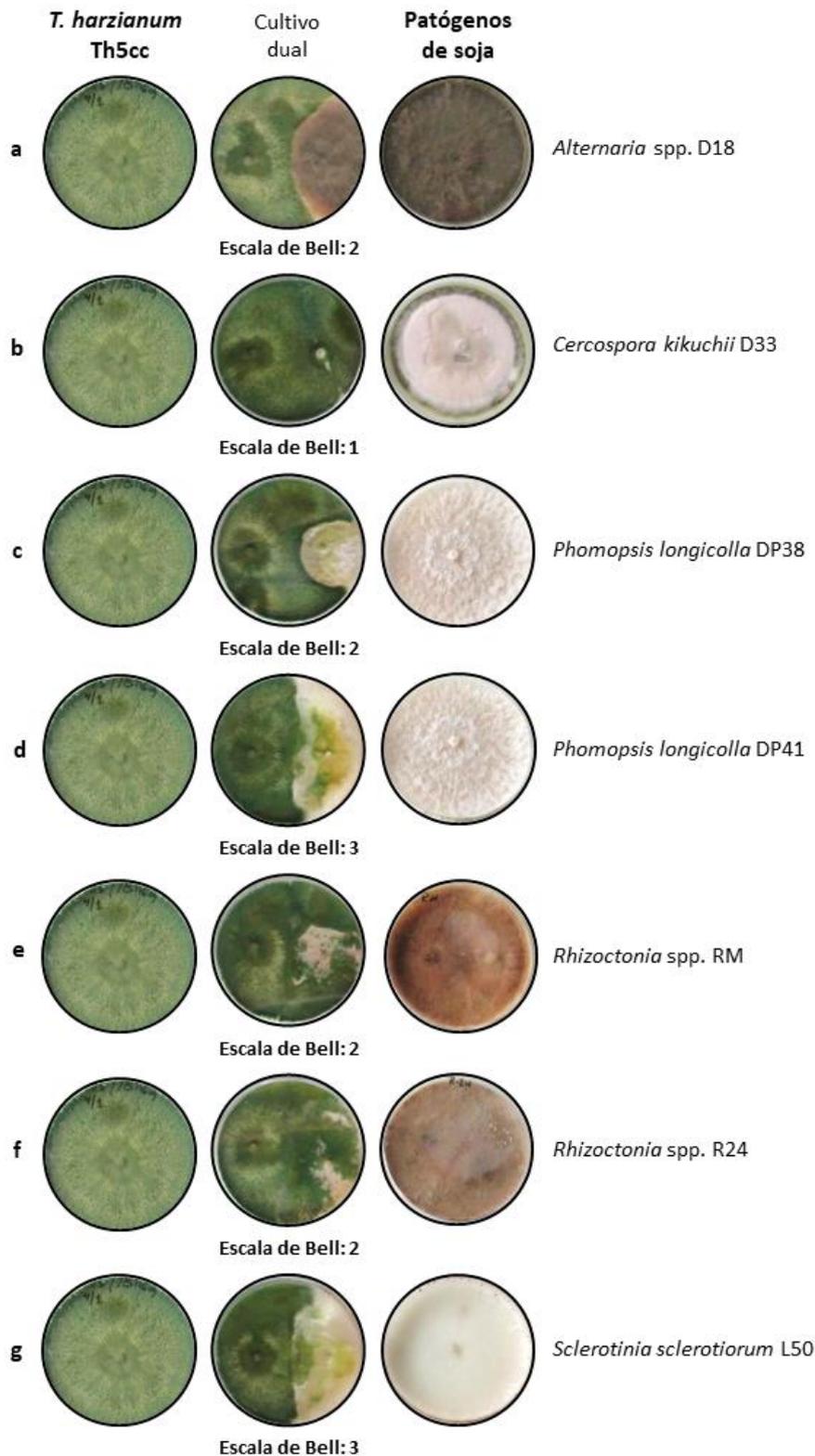
Para evaluar el antagonismo en los ensayos duales, se utilizó la escala de Bell (Bell *et al.*, 1980). Esta escala cualitativa fue desarrollada para el género *Trichoderma* y asigna valores entre 1 y 5 dependiendo del nivel de antagonismo que se produzca con el hongo ensayado. En el esquema que se muestra en la **Figura V.12** se ejemplifican todas las situaciones posibles y los valores que tomaría la escala de Bell en cada caso. El valor 1 en la escala de Bell corresponde al crecimiento del hongo *Trichoderma* spp. sobre el hongo patógeno; el puntaje 2, indica el crecimiento del hongo *Trichoderma* spp. en al menos dos tercios de la superficie del medio; el puntaje 3 indica que *Trichoderma* spp. y el hongo patógeno colonizan en partes iguales la mitad de la placa de Petri. En este caso, ninguno de los organismos domina al otro. El puntaje 4 indica que el patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio, y el puntaje 5 corresponde al crecimiento del hongo patógeno sobre el hongo *Trichoderma* spp.

**Figura V.12: Escala de Bell.** Representación de los valores que asigna la escala de Bell



para evaluar el antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y un patógeno.

En la **Figura V.13**, se muestran los resultados de los ensayos de cultivos duales *in vitro* de *T. harzianum* Th5cc contra los patógenos.



**Figura V.13: Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Th5cc frente a distintos hongos patógenos de soja.** A la izquierda, se muestra el crecimiento de *T. harzianum* Th5cc en APG y a la derecha, el crecimiento del patógeno en APG. Al centro, el cultivo dual. Los fitopatógenos ensayados fueron: *Alternaria* spp. D18 (a), *Cercospora kikuchii* D33 (b), *Phomopsis longicolla* DP38 (c) y DP41 (d), *Rhizotonia* spp. RM (e) y R24 (f) y *Sclerotinia sclerotiorum* L50 (g). Los números debajo del enfrentamiento dual corresponden a los valores asignados según la escala de Bell. Los aislamientos de patógenos que se utilizaron pertenecen a la colección de la empresa Rizobacter S.A.

Siguiendo las consideraciones establecidas en la escala de Bell (Bell *et al.*, 1980), se aprecia que *T. harzianum* Th5cc inhibe el crecimiento de *Cercospora kikuchii* D33 (valor en la escala de Bell=1). Además, controla el crecimiento de las cepas patógenas *Alternaria* sp. D18, *Phomopsis longicolla* DP38 y las cepas *Rhizoctonia* sp. RM y R24 (valor en la escala de Bell=2). Por el contrario, no hay control en el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* L50 y *P. longicolla* DP41 (valor en la escala de Bell=3). Cabe destacar, que los últimos patógenos tampoco controlan el crecimiento de *T. harzianum* Th5cc.

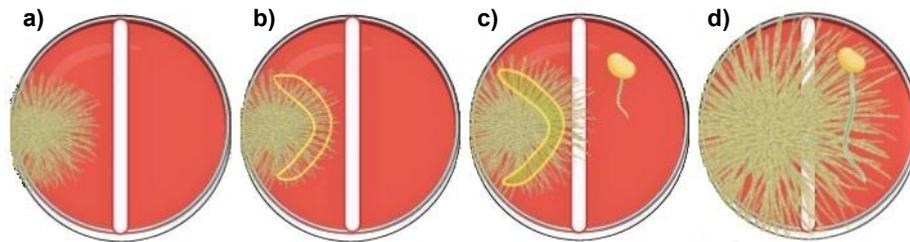
Teniendo en cuenta que *T. harzianum* Th5cc controla *in vitro* el crecimiento de cinco de los siete hongos patógenos que se han probado, podría ser beneficioso su uso en los cultivos de soja.

### **V.3 Dispersión de los rizobios mediante las hifas del hongo *Trichoderma harzianum***

Como se ha descrito, las bacterias son capaces de moverse mediante *swimming*, *swarming*, *twitching*, *sliding* y *gliding* sin pili (Sun *et al.*, 2011). Aunque, a excepción del último, estos tipos de movimiento son sólo eficientes en presencia de películas de líquido (Harshey, 2003). Entonces, en los suelos que no están saturados de agua, es decir, a condición de campo, el movimiento de las bacterias está fuertemente limitado (Or *et al.*, 2007). En experimentos *in vitro* con medios no saturados en agua se ha demostrado que los micelios de los hongos pueden ser utilizados como vías o caminos para la dispersión activa de bacterias. Las bacterias se mueven en la película que se forma alrededor de las hifas que actúan como autopistas fúngicas (o *fungus highway*) (Kohlmeier *et al.*, 2005). Algunos cálculos muestran que, por metro cúbico (m<sup>3</sup>) de suelo puede haber 20.000 km de hifas (Moore *et al.*, 2011). Hay que tener en cuenta que las hifas de los hongos pueden colonizar huecos tanto saturados de agua como llenos de aire que se forman entre las partículas de suelo (Wösten, 2001). Así, el transporte impulsado por micelios podría desempeñar un papel importante en la regulación de la dispersión de las bacterias en suelos a capacidad de campo.

Para demostrar si *T. harzianum* Th5cc podría dispersar los rizobios mediante el mecanismo de *fungus highway*, se diseñó un experimento en el cual, a una placa de Petri con medio YEM agarizado se le extrajo un rectángulo de 0,5 cm de lado y el largo de la zona central de la placa, quedando la placa de Petri separada mediante un surco dejando ambas porciones de medio sin contacto (**Figura V.14.a**). De un lado del surco, primero se cultivó el hongo *T. harzianum* Th5cc y antes que las hifas alcanzaran el surco, se agregó del mismo lado que Th5cc, un cultivo en fase exponencial del rizobio (10<sup>9</sup> UFC/mL) (**Figura V.14.a** y **Figura V.14.b**). La placa se incubó a 28°C durante 48 horas para que ambos microorganismos se desarrollen y cuando se visualizó que las hifas atravesaron el surco central, se colocó una semilla pregerminada, durante 2 días, en el lado opuesto del surco (**Figura V.14.c**). Cuando las hifas colonizaron el lado opuesto, la semilla se sembró en una maceta conteniendo soporte inerte (perlita/arena) y se la incubó en condiciones adecuadas para favorecer su crecimiento (**Figura V.14.d**).

Luego de 21 días, si los rizobios hubieran atravesado el surco, mediante las hifas del hongo, y alcanzado las raíces de soja, sería posible observar nódulos.



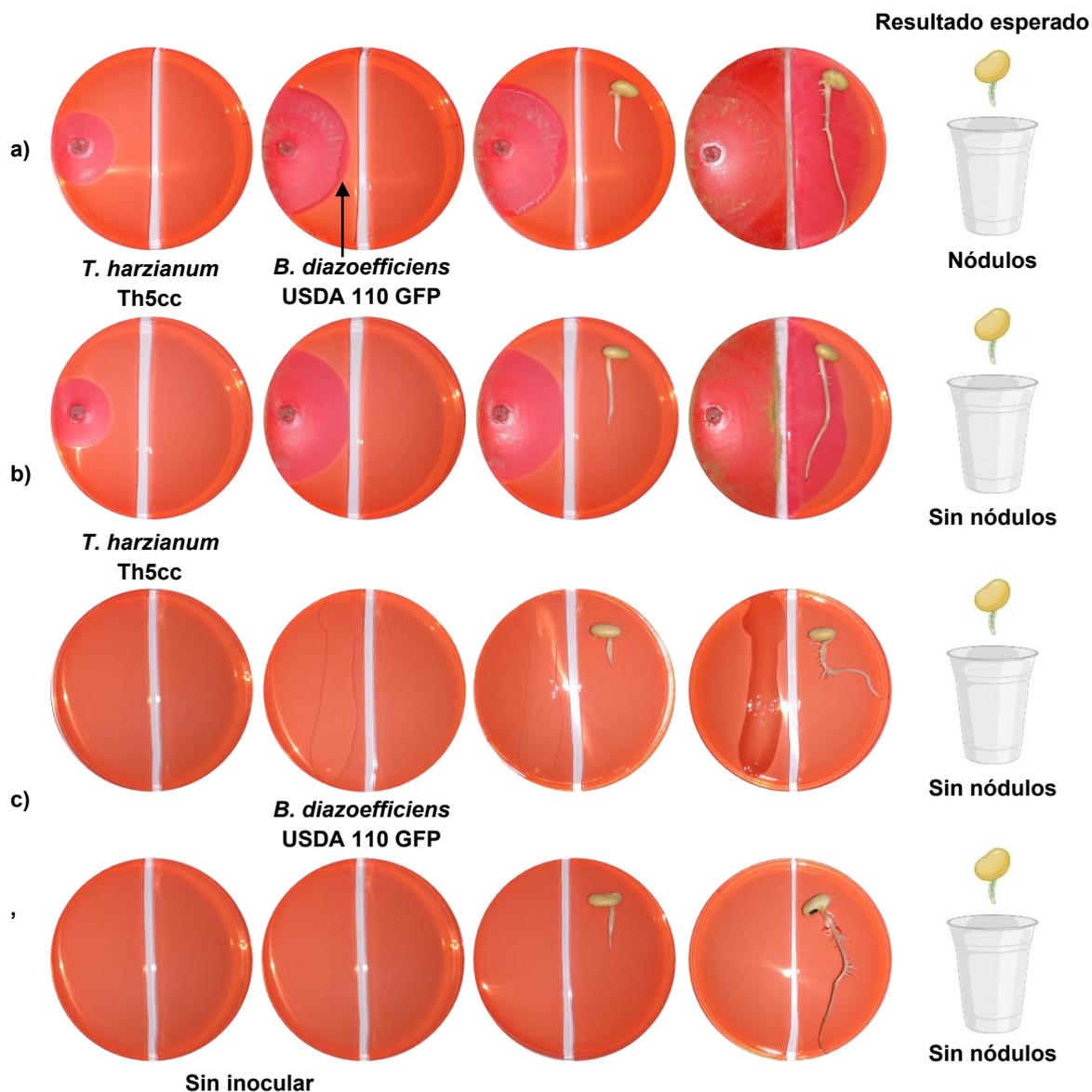
**Figura V.14: Esquema del experimento de *fungal highway*.** (a) El primer paso consiste en generar un surco central en la placa de Petri y la colocar un taco de cultivo de *T. harzianum* Th5cc. (b) Se coloca 500 ml de un cultivo en fase exponencial del rizobio. (c) Una semilla germinada de soja se coloca en la otra división de la placa de Petri. (d) luego que las hifas del hongo colonicen el lado contrario y lleguen a la semilla, se coloca la semilla en una maceta.

En este experimento la visualización y la ocupación de los nódulos por parte del rizobio pondría de manifiesto que las bacterias se desplazaron a través del surco central mediante las hifas. Con el fin de manejar otra alternativa para observar nódulos se utilizó *B. diazoefficiens* USDA 110 que expresa la proteína de fluorescencia GFP mediante la incorporación en su genoma del plásmido pRJPaph-bjGFP (Ledermann *et al.*, 2015), *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP. Esta herramienta nos permitiría observar fluorescencia GFP al exponerlos en la luz UV si los nódulos que se producen están infectados. La especie *B. diazoefficiens* también es capaz de nodular soja.

El registro de las condiciones a lo largo de las diferentes etapas del experimento se muestra en la **Figura V.15**. En la sección **Figura V.15.a** se muestra el esquema con la inoculación en el lado izquierdo de la placa de Petri con *T. harzianum* Th5cc y posteriormente *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP. Si hubiera presencia de nódulos es porque los rizobios pasaron el surco movilizándose por las hifas de *T. harzianum* Th5cc.

El experimento se complementó con los siguientes controles: en el mismo esquema, se inoculó un tratamiento sólo con *T. harzianum* Th5cc, por lo que no se esperaba nodulación cuando las hifas llegaran a la semilla pregerminada (**Figura V.15.b**); se inoculó en uno de los lados sólo con *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP, se espera ausencia de nódulos debido a la incapacidad de alcanzar la raíz de la semilla sin usar a Th5cc como vehículo (**Figura V.15.c**); y en otra condición no se inocularon ni *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP ni *T. harzianum* Th5cc como control negativo (**Figura V.15.d**).

Consideramos necesarios otros controles cuando se colocaron las semillas pregerminadas en macetas: semillas inoculadas con cultivos líquidos de *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP y coinoculación de *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP con *T. harzianum* Th5cc, como controles positivos de nodulación. También, plantas inoculadas sólo con *T. harzianum* Th5cc y sin inocular, como controles negativos de nodulación.



**Figura V.15** Ensayo de *fungal highway*. Realización del esquema planteado anteriormente. En a) se realizó la coinoculación de *T. harzianum* Th5cc y de *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP para comprobar el *fungal highway*. La flecha indica la zona donde se incubó el rizobio. Se realizaron los controles en los que se agregó sólo *T. harzianum* Th5cc (b), sólo *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP (c) y sin inocular (d).

Sólo hubo nodulación en aquellos tratamientos inoculados con *T. harzianum* Th5cc y con *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP (Figura V.16). No hubo nodulación en ninguna de las condiciones control en las que se colocaron sólo *T. harzianum* Th5cc, sólo *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP y sin inocular.

Los controles positivos de nodulación, es decir, las plantas que fueron inoculadas con cultivos líquidos de *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP y coinoculadas con *T. harzianum* Th5cc + *B. diazoefficiens* USDA 100 GFP, presentaban nódulos en ambas condiciones (Figura V.16).

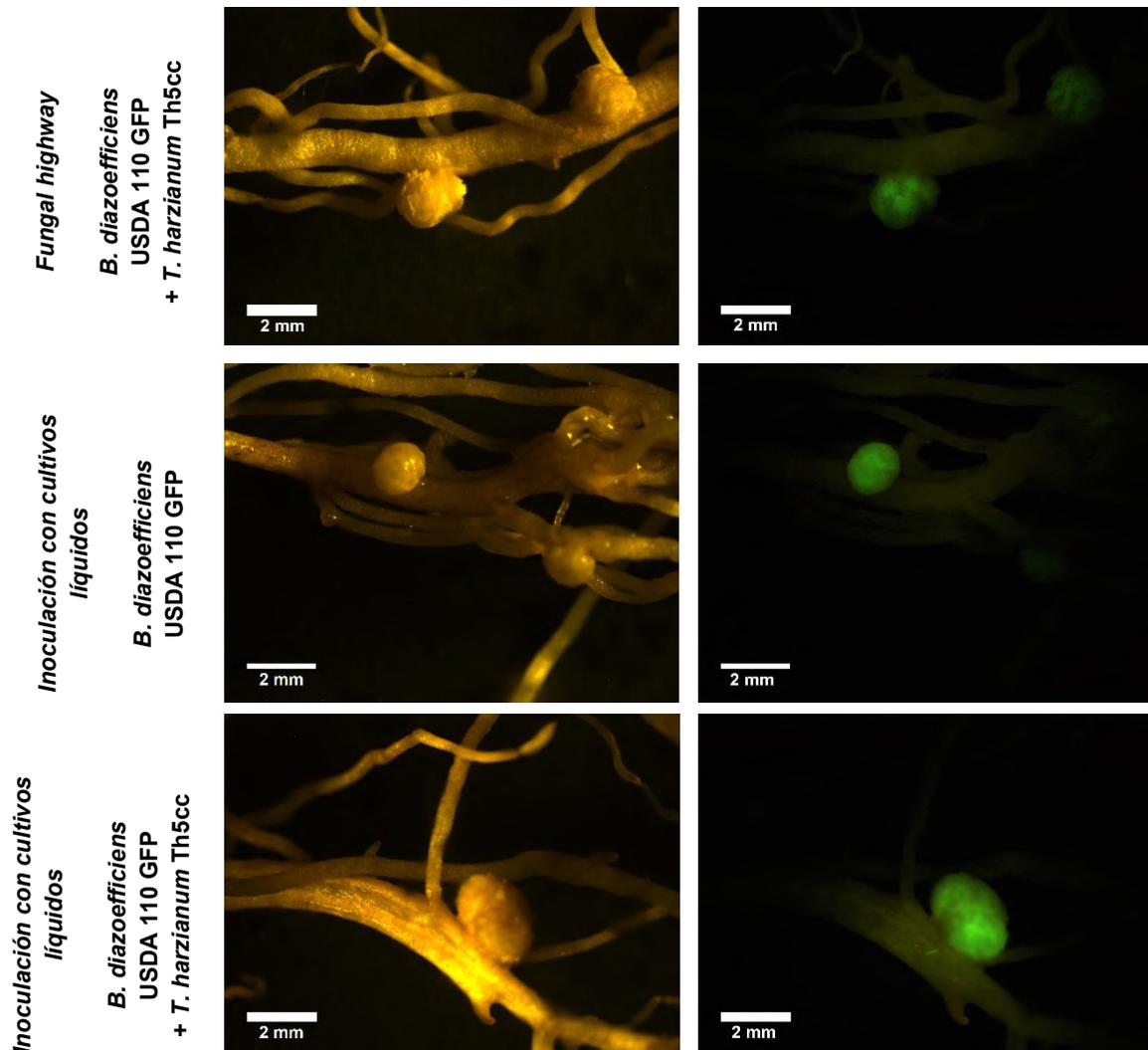
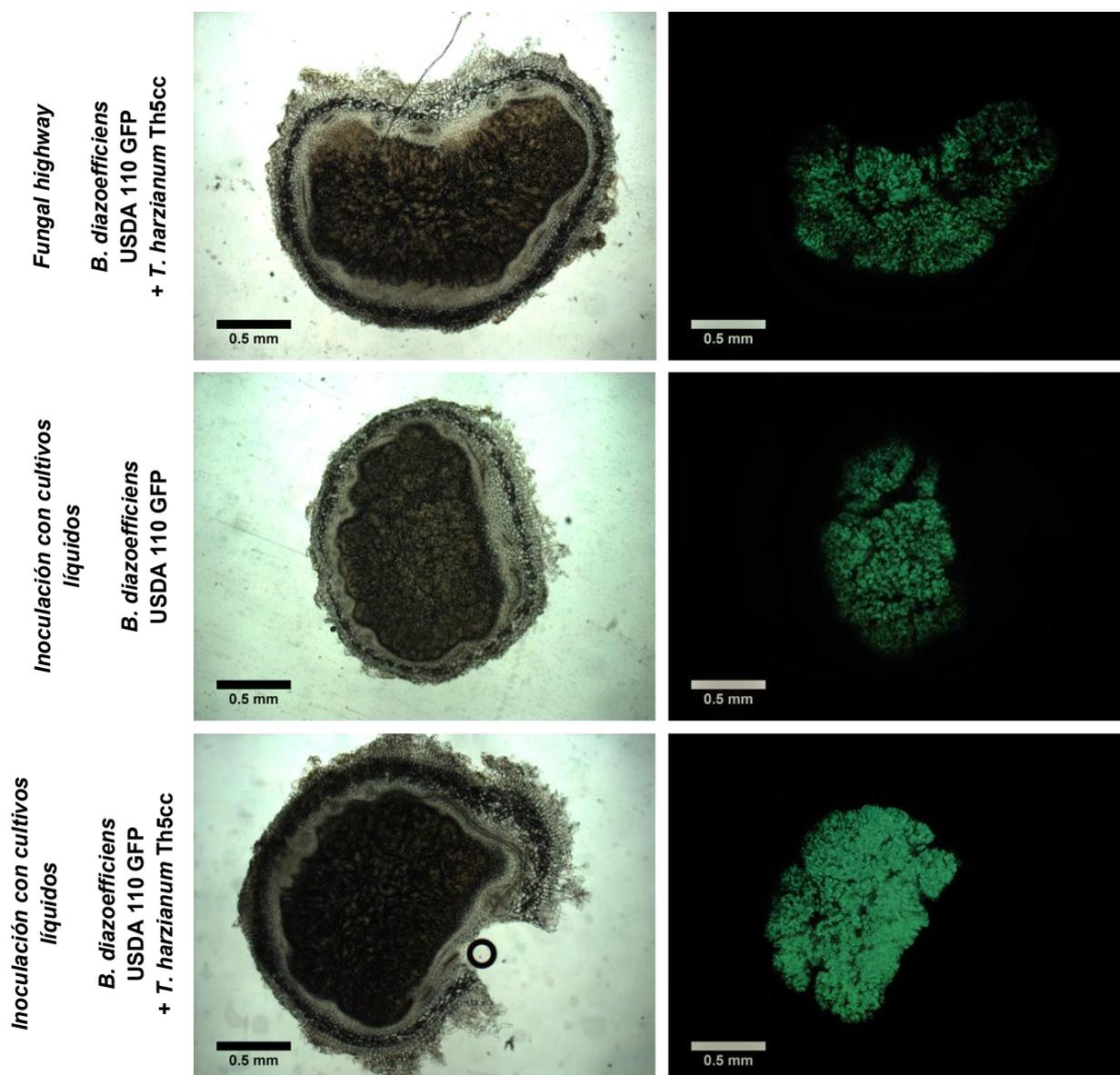


Figura V.16: Nódulos de soja infectados con *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 GFP. Los nódulos fluorescentes bajo UV que provienen del traslado de los rizobios mediante las hifas, *fungal highway*, o los controles positivos de inocularlos con cultivos líquidos.

Todos los nódulos presentaban coloración verde al ser expuestos bajo la luz UV.

Para corroborar que la fluorescencia provenía de los rizobios que habían infectado los nódulos, se cortaron estos órganos radicales con un micrótopo con un espesor de 70 µm y los cortes se observaron en el microscopio óptico (**Figura V.17**).



**Figura V.17:** Corte de los nódulos de soja infectados con *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 GFP. Los nódulos fluorescentes bajo UV que provienen del traslado de los rizobios mediante las hifas, *fungal highway*, o los controles positivos de inocularlos con cultivos líquidos.

Las fotos muestran cortes de nódulos de soja completamente infectados con rizobios (**Figura V.16 a, c y e**). Estos rizobios presentan fluorescencia cuando se los expone a la luz UV (**Figura V.16 b, d y f**) lo que implica que están ocupados efectivamente por *B. diazoefficiens* USDA 110 GFP. La morfología y estructura de los nódulos generados mediante las bacterias que alcanzaron las raíces en las placas o los que provienen de la inoculación sobre semilla, no presentan diferencias apreciables.

En el experimento que diseñamos para poner en evidencia el movimiento de las bacterias a través de las hifas, los rizobios que lograron infectar la raíz de soja, se movilaron desde un sector de la placa hacia el otro. Si bien no contamos con evidencias directas, las bacterias deberían haberse movido mediante las hifas del hongo.

#### V.4 Resumen

Como hemos mencionado, buscamos desarrollar inoculantes combinados que además de contener a las cepas de *B. japonicum* seleccionadas, incluyan bioprotectores. Evaluamos así, *in vitro*, en placas de Petri con medio YEM, la interacción de la cepa de *T. harzianum* Th5cc con las cepas *B. japonicum* E109, CAS/N-10, SAA/S-48 y sus derivadas más móviles, CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>. Al demostrar que podían coexistir, se analizó el efecto que produce la coinoculación de ambos microorganismos sobre las plantas de soja. La nodulación no se afectó por la presencia del hongo, pero no se observó el efecto PGPF que descripto para *T. harzianum*.

El agregado de *T. harzianum* Th5cc en la formulación del inoculante granulado podría influenciar en el mejoramiento ya que tiene la capacidad de controlar *in vitro* el crecimiento de los patógenos de soja *Alternaria* spp. D18, *Cercospora kikuchii* D33, *Phomopsis longicolla* DP38, *Rhizoctonia* spp. RM y R24. Todos ellos agentes producen enfermedades importantes de nuestro país que afectan el rendimiento de los cultivos de soja (ver Capítulo I).

El agregado de *T. harzianum* Th5cc permitiría que los rizobios puedan distribuirse mejor en el suelo mediante sus hifas. Esto podría permitir que los rizobios puedan colonizar otros nichos y así se beneficiaría la competencia para la nodulación. Estudios recientes sobre el mecanismo de *fungus highway* han destacado los beneficios ecológicos de este mecanismo de dispersión. Por ejemplo, se ha mejorado la biodegradación de los contaminantes del suelo en experimentos de microcosmos del suelo (Kohlmeier *et al.*, 2005; Wick *et al.*, 2007; Banitz *et al.*, 2013). La dispersión bacteriana impulsada por el micelio también se ha sugerido como un mecanismo que contribuye a la explicación del mantenimiento de los flagelos en el suelo (Kohlmeier *et al.*, 2005).

*T. harzianum* Th5cc podría agregarse en la presentación del inoculante granulado para cultivos de soja ya que podría conferir ventajas respecto al control de hongos fitopatógenos y a la distribución de los rizobios en el suelo.

# CAPÍTULO VI



**Coinoculación de plantas de soja con  
*Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum*:  
alivio de la inhibición de la nodulación por nitratos**



Como se esperaría de los saprófitos que viven en los suelo, *Trichoderma harzianum* puede crecer en una gran diversidad de fuentes de carbono y nitrógeno (Danielson y Davey, 1973). Como se observó en el capítulo anterior, *Trichoderma harzianum* Th5cc pudo permanecer en el soporte junto a las raíces de la planta de soja cuando estas fueron regadas con una solución libre de fuente de carbono y de nitrógeno como lo es Fåhræus modificado (Lodeiro *et al.*, 2000). Sin embargo, más allá de la permanencia del hongo, no se pudo cuantificar el efecto promotor del crecimiento vegetal (PGPF por sus siglas en inglés *Plant Growth-Promoting Fungi*) en las plantas de soja.

Esto quizás se deba a que la condición en la que se realizaron los ensayos con plantas, en ausencia de nitrógeno combinado disponible, sea muy exigente y pueda enmascarar algún posible efecto del hongo *T. harzianum* Th5cc en el crecimiento de las plantas de soja. Cabe mencionar que este género no tiene la capacidad de ciertas bacterias y arqueas de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio (Halbleib *et al.*, 2000; Leigh, 2000).

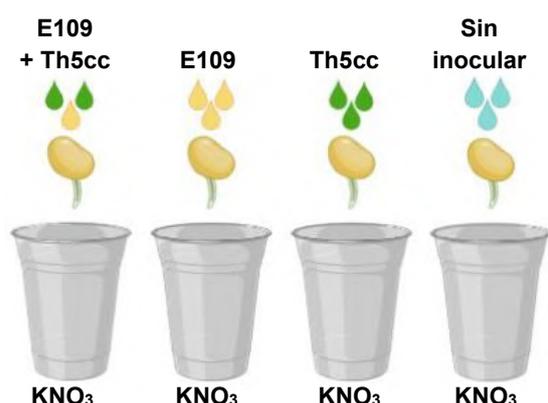
Una alternativa, con el fin de observar algún efecto PGPF de *T. harzianum* Th5cc sobre las plantas de soja, es suplementar el soporte con distintas concentraciones de N. Sin embargo, adicionar formas asimilables de nitrógeno, tiene consecuencias en la nodulación de los rizobios. La nodulación de la soja se ve obstaculizada si fuentes combinadas de nitrógeno, y especialmente nitrato, se encuentran disponibles

(Nishida y Suzaki, 2018). Los nitratos inhiben la liberación de las auxinas dentro del pelo radical, lo que evita que se produzca el enrulamiento (*curling*) del mismo, paso de suma importancia para la formación del nódulo (Patriarca *et al.*, 2004).

En este capítulo, se evaluará el efecto que produce la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* E109 y el hongo *Trichoderma harzianum* Th5cc sobre plantas de soja ante la presencia de diferentes concentraciones de nitratos.

### VI.1 Coinoculación sobre plantas de soja de *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum* en presencia de distintas concentraciones de nitratos

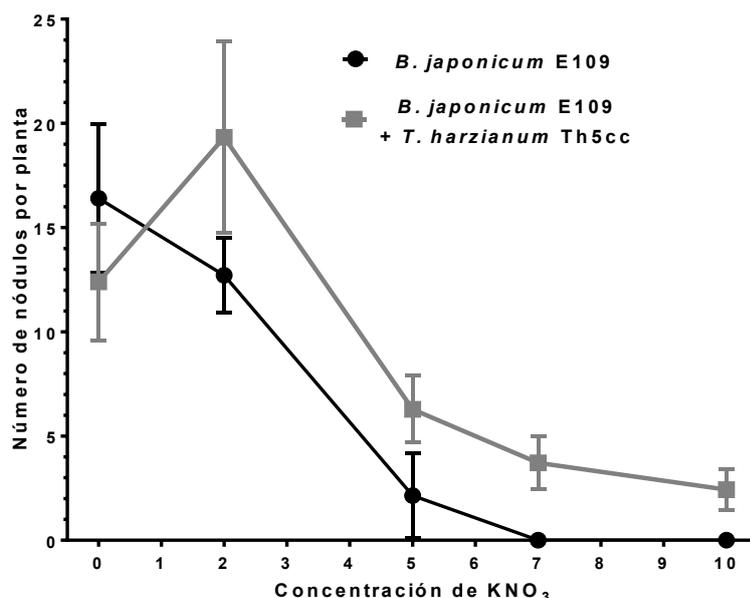
En nuevos experimentos evaluamos la respuesta de plantas de soja inoculadas con o sin combinaciones de *B. japonicum* y *T. harzianum*, regadas con soluciones que contienen concentraciones crecientes de  $\text{KNO}_3$  (Figura VI.1). Las concentraciones que se utilizaron fueron 0, 2, 5, 7 y 10 mM de  $\text{KNO}_3$ .



**Figura VI.1:** Esquema experimental de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum* en presencia de nitratos.

La condición principal del ensayo es la coinoculación sobre semillas de soja de *B. japonicum* E109 con *T. harzianum* Th5cc. Las plantas fueron regadas a lo largo del experimento con solución Fårhæus suplementada con 0, 2, 5, 7 o 10 mM de  $\text{KNO}_3$ . Los controles del experimento fueron las raíces inoculadas sólo con *B. japonicum* E109, sólo con *T. harzianum* Th5cc y sin inocular. Por cada concentración de  $\text{KNO}_3$  se ensayaron 4 condiciones experimentales con 10 plantas cada una.

Después de 21 días post inoculación, las plantas se retiraron de las macetas y se contaron los nódulos que se encontraban sobre las raíces. Como era de esperar, las plantas sin inocular no presentaban nódulos, como tampoco aquellas que sólo fueron inoculadas con *T. harzianum* Th5cc. La cantidad de nódulos en función de la condición ensayada y de la concentración de  $\text{KNO}_3$  utilizada se encuentra graficada en la Figura VI.2.



**Figura VI.2: Nodulación de *B. japonicum* E109 cuando es inoculada o coinoculada con *Trichoderma harzianum* Th5cc en presencia de distintas concentraciones de nitratos.**

En los ejes del gráfico se indica el número de nódulos producto de la inoculación sólo con *B. japonicum* E109 (círculos negros) y de la coinoculación de *B. japonicum* E109 con *T. harzianum* Th5cc (cuadrados grises) en relación con la concentración crecientes (0, 2, 5, 7 y 10 mM) de KNO<sub>3</sub>. Los puntos son valores promedio  $\pm$  desviación estándar (barras de error).

Analizando las curvas, vemos que a medida que se incrementa la concentración de KNO<sub>3</sub> en las macetas inoculadas sólo con *B. japonicum* E109 hay una clara disminución en la cantidad de nódulos hasta llegar a la concentración de 5 mM donde sólo la mitad de las plantas tenían nódulos. Por otro lado, utilizando concentraciones superiores a 5 mM de KNO<sub>3</sub>, como 7 y 10 mM de KNO<sub>3</sub>, no hubo presencia de nódulos en las raíces. Debido a que el proceso de nodulación se inhibe cuando aumenta la concentración de nitratos disponibles para la raíz (Reid *et al.*, 2011), era esperable que a medida que se incrementará la concentración de KNO<sub>3</sub>, en aquellas plantas que fueron inoculadas sólo con el rizobio, fuera menor el número de nódulos desarrollados.

Las plantas coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc mostraron un efecto positivo del hongo sobre la nodulación en todas las concentraciones de KNO<sub>3</sub> ensayadas. Es interesante observar, que cuando la cantidad de nitrógeno combinado en el soporte fue menor o igual a 5 mM, el agregado de *T. harzianum* Th5cc provocó un incremento en el número de nódulos en comparación con las plantas inoculadas sólo con el rizobio. Mientras que cuando las concentraciones de KNO<sub>3</sub> fueron mayores, 7 mM y 10 mM, el rizobio sólo es capaz de nodular cuando se lo coinocula con el hongo.

## **VI.2 Efecto de *Trichoderma harzianum* sobre la nodulación de soja en presencia de concentraciones de nitratos similares a las del suelo**

Las concentraciones de nitrógeno en el suelo, suelen rondar entre 1 mM y 2 mM de nitratos y nitritos (Ferraris *et al.*, 2012). Previamente, observamos que, cuando se

coinoculaban *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc había un incremento en la producción de nódulos con respecto a la inoculación sólo con *B. japonicum* E109 cuando en el soporte aumentaba la concentración de 0 a 2 mM de KNO<sub>3</sub>.

Con el objetivo de profundizar sobre el efecto benéfico en la nodulación cuando se coinoculan ambos microorganismos, se efectuó el mismo esquema experimental, pero cambiando las condiciones de riego con Fåhræus modificado suplementado con 0, 1 y 2 mM de KNO<sub>3</sub>. Nuevamente las plantas fueron cosechadas 21 días después de la inoculación. En la **Tabla VI.1** se detallan la cantidad de nódulos encontrados en cada caso.

**Tabla VI.1: Número de nódulos al coinocular con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en concentraciones de nitratos similares a las del suelo**

Condición	Número de nódulos por planta		
	0 mM KNO <sub>3</sub>	1 mM KNO <sub>3</sub>	2 mM KNO <sub>3</sub>
<i>B. japonicum</i> E109 + <i>T. harzianum</i> Th5cc	13 ± 2 <sup>b</sup>	16 ± 2 <sup>c</sup>	18 ± 3 <sup>c</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	14 ± 1 <sup>b</sup>	11 ± 2 <sup>b</sup>	13 ± 2 <sup>b</sup>
<i>T. harzianum</i> Th5cc	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Sin inocular	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey entre tratamientos dentro de una misma condición de riego de KNO<sub>3</sub>. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un p<0,0001.

Cuando las concentraciones de KNO<sub>3</sub> en el soporte son similares a las del suelo, aproximadamente 1 y 2 mM de KNO<sub>3</sub>, el agregado de *T. harzianum* Th5cc permitió observar un aumento en el número de nódulos en las raíces de las plantas. A los nódulos que se encontraron en esta condición, se les analizó la ultraestructura y corresponde a la de nódulos fijadores de nitrógeno (**Anexo V**).

Está reportado que la aplicación de nitratos no sólo afecta el desarrollo de los nódulos, sino que también puede afectar su crecimiento y la actividad fijadora de nitrógeno (Nishida y Suzaki, 2018). Entonces para evaluar el tamaño de los nódulos, estos se pesaron y se compararon los pesos entre las condiciones de coinoculación e inoculación sólo con *B. japonicum* E109 (**Tabla VI.2**).

**Tabla VI.2: Peso seco promedio por nódulo al coinocular con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en concentraciones similares a las del suelo**

Condición	Peso por nódulo (g)		
	0 mM KNO <sub>3</sub>	1 mM KNO <sub>3</sub>	2 mM KNO <sub>3</sub>
<i>B. japonicum</i> E109 + <i>T. harzianum</i> Th5cc	0.0011 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.0008 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.0007 ± 0.0004 <sup>a</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	0.0012 ± 0.0002 <sup>a</sup>	0.0008 ± 0.0004 <sup>a</sup>	0.0007 ± 0.0002 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey entre tratamientos dentro de una misma condición de riego. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un p<0,0001.

Al comparar el peso promedio por nódulo entre las condiciones coinoculado con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc y sólo inoculado con *B. japonicum* E109, se aprecia que no hubo diferencias significativas en la variable. Tampoco se vieron diferencias en el peso seco de la parte aérea entre las mismas condiciones (**Tabla VI.3**).

**Tabla VI.3: Peso seco promedio de la parte aérea al coinocular con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en concentraciones similares a las del suelo**

Condición	Peso seco de la parte aérea (g)		
	0 mM KNO <sub>3</sub>	1 mM KNO <sub>3</sub>	2 mM KNO <sub>3</sub>
<i>B. japonicum</i> E109 + <i>T. harzianum</i> Th5cc	0.221 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.336 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.408 ± 0.058 <sup>a</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	0.175 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.310 ± 0.042 <sup>a</sup>	0.411 ± 0.064 <sup>a</sup>
<i>T. harzianum</i> Th5cc	0.216 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.318 ± 0.105 <sup>a</sup>	0.328 ± 0.057 <sup>a</sup>
Sin inocular	0.163 ± 0.048 <sup>a</sup>	0.306 ± 0.091 <sup>a</sup>	0.356 ± 0.063 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey entre tratamientos dentro de una misma condición de riego de KNO<sub>3</sub>. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas con un p>0.0001.

De esta manera, al coinocular con *T. harzianum* Th5cc en presencia de concentraciones de nitratos similares a las del suelo, se produce una mayor cantidad de nódulos en comparación con la inoculación sólo con rizobios y estos tienen un tamaño similar. Sin embargo, este desarrollo nodular no impacta en la FBN en plantas de 21 días post inoculación.

### VI.3 Plantas de soja coinoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma harzianum* nodulan en 10 mM de KNO<sub>3</sub>

Sorprendentemente, aquellas plantas que fueron coinoculadas con ambas cepas en presencia de 10mM de KNO<sub>3</sub> presentaban nódulos en todas las réplicas del experimento. La morfología de los nódulos era de pseudonódulos; estos eran más pequeños y no presentaban crestas, como los que se desarrollan en ausencia de KNO<sub>3</sub> en el sustrato. En la **Figura VI.3** se aprecia un nódulo sobre las raíces hallado en esta condición.



**Figura VI.3: Nódulo en planta de soja coinoculada en presencia de 10 mM de KNO<sub>3</sub>.** Foto de un nódulo en raíces de plantas coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc, regadas con Fähræus modificado suplementadas con 10 mM de KNO<sub>3</sub>.

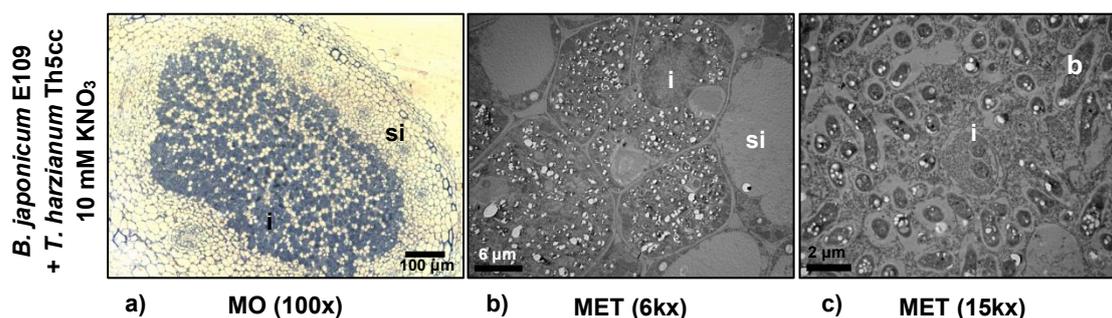
La morfología de los nódulos no era la característica del órgano radical infectado por rizobios con actividad fijadora de N. Sin embargo, al realizar un corte transversal, en su interior había zonas con coloración rojiza; color característico de la presencia de leghemoglobina dentro del nódulo (Patriarca *et al.*, 2004) (**Figura VI.4**). Fue así, que se planteó la hipótesis de que los nódulos estaban ocupados por rizobios expresando la actividad nitrogenasa y por lo tanto, poseían actividad fijadora de N.



**Figura VI.4: Nódulos de la coinoculación en alta concentración de nitratos.** A la izquierda, se cortó un nódulo a la mitad y a la derecha está el nódulo entero como se encontraba en la raíz. En el centro del nódulo cortado hay coloración rojiza propia de la leghemoglobina.

Con el objetivo de chequear esta hipótesis, los nódulos se esterilizaron superficialmente, se cubrieron con agua estéril y se machacaron con palillos. El agua embebida con restos del nódulo triturado se colocó sobre una placa con medio YEM agarizado. Luego de cinco días de incubación en estufa de 28°C se observó crecimiento sobre la placa, demostrando que los nódulos encontrados en esta condición estaban ocupados por rizobios.

A su vez, la estructura y ultraestructura de los nódulos se observó mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), respectivamente (**Figura VI.5**).



**Figura VI.5: Estructura y ultraestructura de los nódulos producto de la coinoculación en presencia de 10 mM de KNO<sub>3</sub>.** Cortes de los nódulos obtenidos a partir de la coinoculación con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en 10 mM de KNO<sub>3</sub>. En **a**) se observa un corte semifino del nódulo al microscopio óptico (MO) y se aprecian células vegetales que están infectadas con rizobios (i) y células sin infectar (si). Para visualizar la ultraestructura de los nódulos se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM). En **b**) se observa en detalle que las células infectadas (i) contienen bacteroides, mientras que las sin infectar (si), no. En **c**) se amplifica una célula infectada (i) donde se aprecian los bacteroides (b) en los simbiosomas.

Analizando la estructura de los nódulos, se aprecia que tienen una región central infectada con rizobios ya que se observan las células vegetales ocupadas (**Figura VI.5.a**). Esta infección no es uniforme ya que hay zonas con células vegetales sin infectar (si) contiguas a zonas infectadas (i) (**Figura VI.5.b**). En cuanto a la ultraestructura de las células infectadas, se aprecian los bacteroides (b) dentro de los simbiosomas (**Figura VI.5.c**). Las observaciones realizadas indican que los nódulos encontrados cuando se realiza la coinoculación en plantas de soja con *B. japonicum* E109 con *T. harzianum* Th5cc siendo regadas con 10 mM de KNO<sub>3</sub>, tienen una ultraestructura de nódulo fijador.

Seguidamente, evaluamos la FBN mediante la determinación del peso seco de la parte aérea y los ureidos en las hojas de las plantas; los valores se encuentran plasmados en la **Tabla VI.4**.

**Tabla VI.4: Mediciones de parámetros de la FBN al coinocular *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en 10 mM de KNO<sub>3</sub>**

Condición (con 10 mM de KNO <sub>3</sub> )	Peso seco de la parte aérea (g)	Ureídos (μmol/g)
<i>B. japonicum</i> E109 + <i>T. harzianum</i> Th5cc	0.581 ± 0.090 <sup>a</sup>	0.581 ± 0.088 <sup>a</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	0.600 ± 0.093 <sup>a</sup>	0.599 ± 0.073 <sup>a</sup>
<i>T. harzianum</i> Th5cc	0.538 ± 0.087 <sup>a</sup>	0.538 ± 0.087 <sup>a</sup>
Sin inocular	0.498 ± 0.072 <sup>a</sup>	0.498 ± 0.091 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey entre tratamientos dentro de una misma condición de riego. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas con un  $p > 0.0001$ .

Las plantas coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc, que desarrollaron nódulos, no mostraron diferencias en el peso seco de la parte aérea o en la medida de la concentración de ureidos, en comparación al resto de los tratamientos incluido el sin inocular. Al regar las plantas con una concentración alta de nitrógeno durante todo el experimento, éstas no estuvieron limitadas en el crecimiento.

#### **VI.4 Posible inducción de nodulación por Ácido Indol-3-Acético (AIA) en presencia de KNO<sub>3</sub>**

Observamos que, si las plantas de soja son coinoculadas con E109 y Th5cc, nodulan aún en presencia de concentraciones de KNO<sub>3</sub> en las cuales la sola presencia de *B. japonicum* E109 no induce nódulos. A su vez, el transporte y la acumulación de auxina pueden estar relacionados con la respuesta de la nodulación al nitrógeno combinado (Caba *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2015).

Distintas especies de *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios y luego secretarlos al medio de cultivo en el que está creciendo (Patil *et al.*, 2016). Uno de los metabolitos que es capaz de producir es Ácido 3-Indol Acético (AIA). Naturalmente, las plantas sintetizan AIA y actúa como una hormona de crecimiento vegetal. En las leguminosas, el AIA que producen las plantas está involucrado en el proceso de enrulamiento de los pelos radicales y tienen un rol determinante en la nodulación (Patriarca *et al.*, 2004).

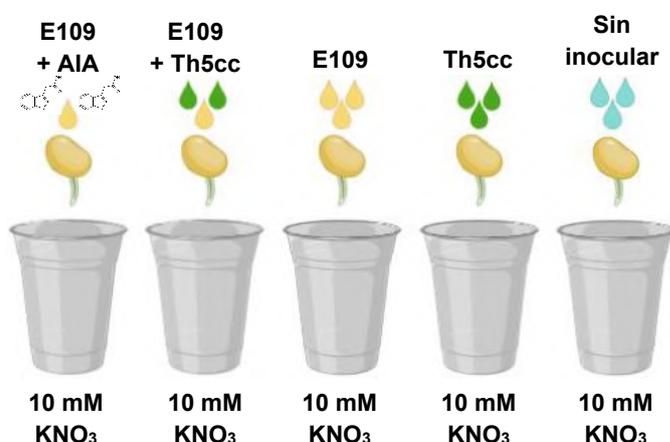
A tres réplicas biológicas de cultivos de *T. harzianum* Th5cc en medio YEM, se les cuantificó la producción de AIA mediante el método colorimétrico de Gordon y Weber utilizando el reactivo de Salkowski (Gravel *et al.*, 2007) (**Tabla VI.5**).

**Tabla VI.5: Producción de AIA de *T. harzianum* Th5cc**

Cepa	Medio	AIA (µg/mL)
<i>T. harzianum</i> Th5cc	YEM	2.01 ± 0.20

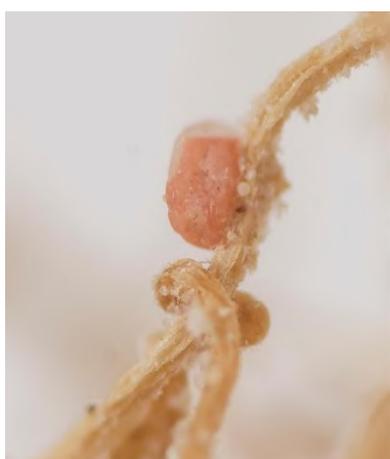
La cepa *T. harzianum* Th5cc es capaz de producir un valor de 2.01 ± 0.20 µg/mL de AIA.

Para dilucidar si la producción de AIA por parte de *T. harzianum* Th5cc interviene en la nodulación en presencia de 10 mM de KNO<sub>3</sub>, se inocularon semillas pregerminadas de soja siguiendo el esquema experimental de la **Figura VI.6**. Como evaluamos que el hongo es capaz de producir 2 µg/mL de AIA, consideramos reemplazar la coinoculación con *T. harzianum* TH5cc por AIA exógeno en esa concentración. Además, se ensayó la condición coinoculada con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc como control positivo del experimento.

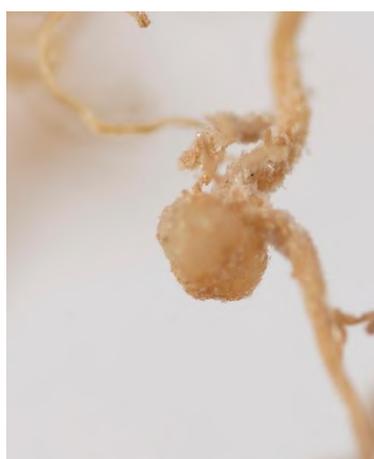


**Figura VI.6: Esquema de coinoculación con agregado de Ácido 3-Indol Acético exógeno.** Se evaluó la nodulación de plantas de soja en presencia de 10 mM de KNO<sub>3</sub>. Se añadió, al inóculo de *B. japonicum* E109, AIA a una concentración final de 2 µg/mL. Como controles se agregó la coinoculación de *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc, sólo con *B. japonicum* E109, sólo con *T. harzianum* Th5cc y sin inocular.

En la **Figura VI.7** se muestran fotografías de los nódulos que se encontraron 21 días después de la inoculación.



***B. japonicum* E109  
+ AIA 2 µg/mL  
10 mM KNO<sub>3</sub>**



***B. japonicum* E109  
+ *T. harzianum* Th5cc  
10 mM KNO<sub>3</sub>**

**Figura VI.7: Efecto del Ácido 3-Indol Acético sobre la nodulación de soja en presencia de altas concentraciones de nitratos.** En el panel de la izquierda se observa un nódulo sobre las raíces producto de la inoculación de *B. japonicum* E109 con la adición de 2 µg/mL de AIA exógeno cuando las plantas son regadas con 10 mM de KNO<sub>3</sub>. A la derecha, un nódulo cuando se coinocula *B. japonicum* E109 con *T. harzianum* Th5cc en 10 mM de KNO<sub>3</sub>.

Todas las plantas que fueron inoculadas con *B. japonicum* E109 y 2 µg/mL de AIA exógeno presentaron nódulos en sus raíces al igual que aquellas coinoculadas con

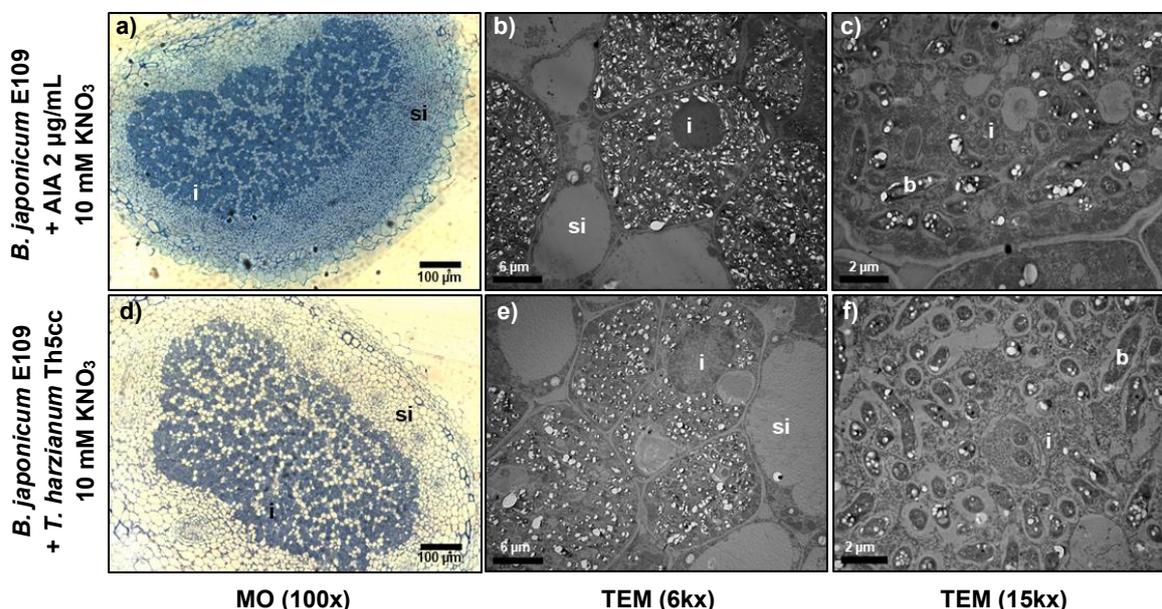
*B. japonicum* E109 + *T. harzianum* Th5cc. El número de nódulos desarrollados en los distintos tratamientos del experimento se muestran en la **Tabla VI.6**.

**Tabla VI.6: Nodulación con *B. japonicum* E109 y AIA en presencia de 10 mM de KNO<sub>3</sub>**

Condición (con 10 mM de KNO <sub>3</sub> )	Nódulos por planta
<i>B. japonicum</i> E109 + 2 µg/mL de AIA	4 ± 2 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> E109 + <i>T. harzianum</i> Th5cc	6 ± 2 <sup>b</sup>
<i>B. japonicum</i> E109	0 <sup>a</sup>
<i>T. harzianum</i> Th5cc	0 <sup>a</sup>
Sin inocular	0 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$ .

La ocupación de los rizobios dentro del nódulo se analizó mediante el análisis de la estructura y ultraestructura por microscopías (**Figura VI.8**).



**Figura VI.8: Estructura y ultraestructura de los nódulos encontrados cuando se adiciona Ácido 3-Indol Acético exógeno al inóculo de *B. japonicum* E109 en 10 mM de KNO<sub>3</sub>.** Microscopías de los cortes de los nódulos obtenidos a partir de la inoculación *B. japonicum* E109 con 2 µg/mL de AIA en 10 mM de KNO<sub>3</sub> (**a, b y c**) en comparación con nódulos producto de la coinoculación de *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc (**d, e y f**). Los preparados se observaron en el microscopio óptico (MO) (**a y d**), donde se vieron células vegetales que están infectadas con rizobios (i) y células sin infectar (si). Ultraestructura de los nódulos mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) (**b, c, e y f**). En la ultraestructura se observan las células infectadas (i) que están ocupadas por bacteroides (b) en los simbiosomas y células sin infectar (si).

En presencia de 10 mM de KNO<sub>3</sub>, los nódulos de las plantas inoculadas con *B. japonicum* E109 suplementado con AIA exógeno, son indistinguibles histológica y ultraestructuralmente de los obtenidos de las plantas coinoculadas en paralelo con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc.

## VI.5 Resumen

El agregado de *T. harzianum* Th5cc en la coinoculación junto con *B. japonicum* E109 en concentraciones similares a las del suelo, 1 o 2 mM de KNO<sub>3</sub>, produce un aumento en la cantidad de nódulos si se compara con aquellas plantas que fueron inoculadas sólo con el rizobio. Además, si existen concentraciones superiores (10 mM de KNO<sub>3</sub>), las plantas de soja sólo son capaces de nodular cuando son coinoculadas con *T. harzianum* Th5cc.

Hace muchos años, se observó que las pelos de las raíces de alfalfa se deformaban cuando se inoculaban con *Ensifer meliloti* (anteriormente, *Sinorhizobium meliloti*), sin embargo, estas deformaciones desaparecían en presencia de NaNO<sub>3</sub> (Thornton, 1936). A su vez, la presencia de nitratos parece tener una influencia en la acción del AIA en el inicio y desarrollo de la simbiosis entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* (Valera *et al.*, 1965). Se sugiere que el AIA es el responsable de provocar el enrulado (*curling*) de los pelos de la raíz. Este paso es de suma importancia en la invasión bacteriana de la raíz de la leguminosa que desencadena la formación del nódulo (Stahl *et al.*, 2012). Estudios más recientes han demostrado que el nitrato interfiere con la acumulación de auxinas en los pelos radicales de las plantas de soja luego de la inoculación con rizobios (Caba *et al.*, 2000).

La relación observada entre la producción de auxina por parte de *T. harzianum* Th5cc, la nodulación cuando se coinocula *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en presencia de KNO<sub>3</sub>, o la nodulación por parte del rizobio cuando se aplica AIA exógenamente, sugiere que hay una posible liberación de auxinas por parte de *T. harzianum* Th5cc en la rizosfera de la soja, y que es esto lo que podría inducir la nodulación de *B. japonicum* E109 en presencia de altas concentraciones de KNO<sub>3</sub>.

En contraste, la supuesta producción de auxinas de *T. harzianum* Th5cc en la rizosfera de soja no tuvo un efecto en la producción de biomasa de brotes. Sin embargo, la producción de nódulos funcionales en presencia de nitrato podría ser beneficiosas para preservar la fertilidad del suelo porque esas plantas podrían obtener parte de su nitrógeno nutritivo de la atmósfera incluso en suelos relativamente ricos en compuestos asimilables de nitrógeno.

# CAPÍTULO VII



**Desarrollo del inoculante granulado  
para cultivos de soja**



os inoculantes comerciales que se utilizan en su mayoría son líquidos y se aplican sobre las semillas previo a la siembra. Sin embargo, se ha demostrado que esta forma de administración es ineficiente para promover la ocupación de los nódulos por parte de las bacterias inoculadas en competencia con la población de rizobios del suelo. Esto se debe a que las bacterias inoculadas se adhieren fuertemente a las superficies seminales y no se dispersan en el suelo, lo que provoca una pobre distribución de los rizobios inoculados en la zona de infección de las raíces. Una solución a estos inconvenientes la brinda la inoculación directa en el surco de siembra. Esto mejora la distribución de los rizobios y con ello, la competitividad del inoculante para la ocupación de los nódulos (López-García *et al.*, 2009). Pese a los mejores resultados obtenidos con esta técnica tanto en porcentajes de ocupación de nódulos como en aumento de rendimiento en grano, los productores argentinos se muestran reticentes a su empleo. Esto se debe, a que los inoculantes para surco de siembra existentes en el mercado son de formulación líquida, y su aplicación requiere el transporte de grandes volúmenes de agua, con la consecuente complicación logística (Lodeiro, 2015). Por ello, una opción interesante para el desarrollo de un inoculante amigable para la inoculación en el surco de siembra en cultivos extensivos es la obtención de un inoculante granulado. Esta opción brinda, además, la oportunidad de combinar en el mismo inoculante diversas cepas de rizobios noduladores de soja con microorganismos promotores del crecimiento vegetal y sustancias promotoras del crecimiento bacteriano, separando al mismo

tiempo a los rizobios de compuestos con potenciales efectos perjudiciales, como curasemillas o metales pesados.

La legislación argentina define como fertilizantes biológicos a los productos que contienen uno o varios microorganismos como principal componente sobre determinado soporte; líquido, sólido u oleoso. Desde la Red de Control de Calidad de Inoculantes (REDCAI), y en conjunto con expertos e investigadores acuerdan llamar inoculantes a “los productos formulados por microorganismos viables benéficos, seleccionados para favorecer la nutrición y/o promover el crecimiento de las plantas” (REDCAI 2006).

La calidad de un inoculante está determinada, en primer término, por la eficiencia simbiótica de la cepa presente en el producto. En segundo lugar, dependerá de la formulación del inoculante, que deberá garantizar el número mínimo de células viables desde su elaboración y hasta el período de vencimiento en condiciones de almacenamiento determinados y durante el período de vida útil o tiempo de vigencia establecido por los entes de fiscalización (Bedmar *et al.*, 2006).

Durante el transcurso de la tesis doctoral, se pusieron a punto las condiciones y parámetros para el armado del inoculante granulado que se basó en una patente europea que no tiene vigencia en Argentina (Day *et al.*, 1988). Además, seleccionamos los rizobios que lo formarán y evaluamos la cepa *Trichoderma harzianum* Th5cc para que acompañe en el soporte a estas bacterias noduladoras de soja.

**En este capítulo se presentan los resultados que se obtuvieron durante la generación del inoculante granulado, incluyendo la puesta a punto de la concentración de rizobios que exige la REDCAI para dichas formulaciones, como también el control de la calidad de los mismos. Finalmente, logramos un inoculante granulado utilizando las cepas seleccionadas a lo largo de esta tesis doctoral.**

## VII.1 Los rizobios en el inoculante granulado

Los parámetros que se tienen en cuenta para la selección de las cepas de rizobios que luego serán empleadas en la producción de inoculantes comerciales son: la infectividad (que es la capacidad que tienen las cepas para formar nódulos), la efectividad en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), la supervivencia en las semillas y en el suelo, la adaptación o tolerancia a las diversas situaciones de estrés, la estabilidad genética y la capacidad de crecimiento en las condiciones de producción de los inoculantes. La cepa *Bradyrhizobium japonicum* E109 ha mostrado buenos resultados en la evaluación de todos estos parámetros en cultivos de soja a lo largo de todo el país, y es por esto, que el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) la recomienda para su empleo en la formulación de los inoculantes para esta leguminosa (Piccinetti *et al.*, 2013).

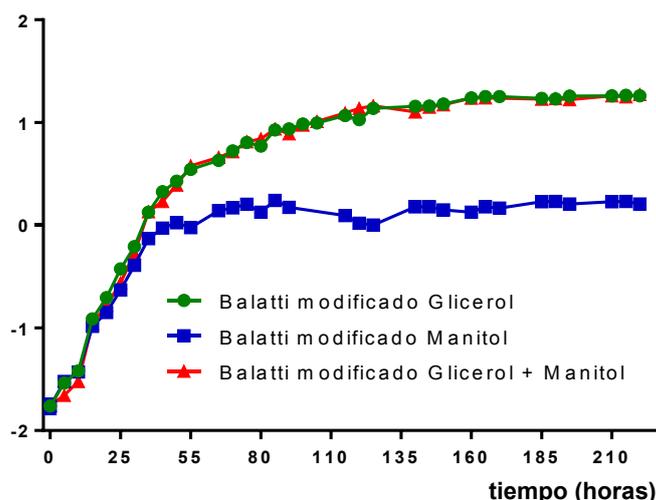
En los capítulos anteriores se han seleccionado y caracterizado cepas de *B. japonicum* con buenas características simbióticas para que formen parte de esta nueva presentación de inoculantes (*B. japonicum* CAS/N-10, *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup>, *B. japonicum* SAA/S-48 o *B. japonicum* SAA/S-48 m<sup>+</sup>). Sin embargo, los experimentos de diseño, armado y control de calidad del inoculante granulado los hicimos con una cepa derivada de *B. japonicum* E109, *B. japonicum* LP3018 cepa resistente espontáneamente al antibiótico estreptomina (*Sm*) (López-García *et al.*, 2009). Esta cualidad permite identificar a esta cepa cuando infecta las raíces de soja. Esta ventaja será utilizada luego en los ensayos con plantas para poder corroborar que la cepa que logró infectar las plantas sea la que proviene del inoculante granulado, ya que la mayoría de las cepas de *Bradyrhizobium* spp. son resistentes al antibiótico cloranfenicol (*Cm*) (Gault *et al.*, 1993).

Los detalles en referencia a la composición y al armado del granulado se omitirán en este manuscrito ya que el desarrollo de esta nueva presentación es susceptible de ser patentado.

### VII.1.1 Selección del medio de cultivo para los rizobios

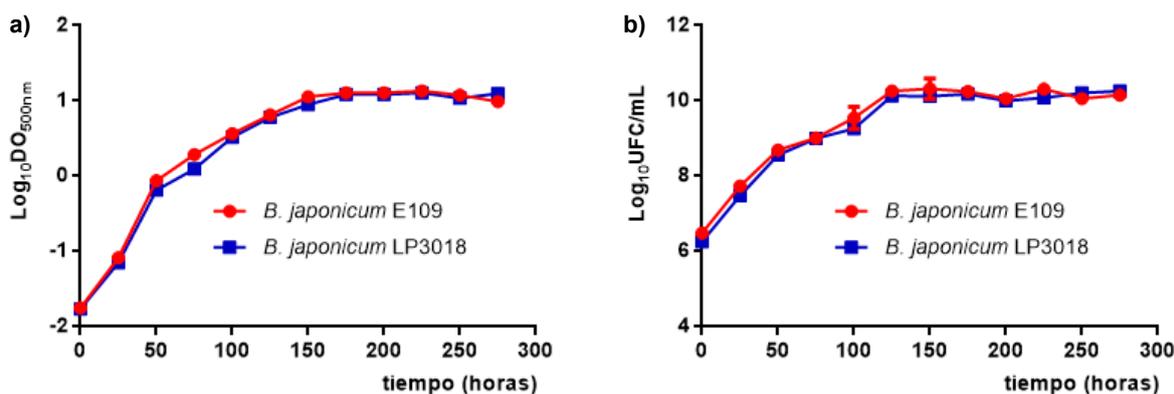
Una de las premisas fundamentales en la elaboración de inoculantes comerciales es la obtención de una alta concentración de microorganismos (Ronchi *et al.*, 1996). De los distintos medios de cultivo en los que los rizobios son capaces de reproducirse hasta obtener una alta concentración de unidades formadoras de colonia (UFC/mL), en este trabajo elegimos Balatti modificado (Mariani *et al.*, 2004). Utilizando este medio como base, realizamos cinéticas de crecimiento de *B. japonicum* E109, sustituyendo la sacarosa, su fuente de carbono original, por alternativas. Se propuso que estas fuentes de C alternativas permitan el desarrollo de la biomasa de los cultivos y que además impacten en el metabolismo bacteriano induciendo la producción de algún compuesto que, por ejemplo, contribuyera al armado del gránulo (**Figura VII.1**).

Por un lado, se evaluó glicerol como fuente de carbono, porque es utilizado en la industria por su económico precio. A este medio lo denominamos Balatti modificado Glicerol. Se ensayó además manitol como fuente de carbono, que se denominó Balatti modificado Manitol. El manitol se utiliza habitualmente como fuente de C en los cultivos de *Bradyrhizobium* spp quienes además lo metabolizan para generar polisacáridos extracelulares (Quelas *et al.*, 2006). A otro medio, se le añadió ambas fuentes de carbono, denominando a este último Balatti modificado Glicerol + Manitol (**Figura VII.1**).



**Figura VII.1: Cinéticas de crecimiento de *B. japonicum* E109 en medio Balatti con distintas fuentes de C.** *B. japonicum* E109 se cultivó en los medios Balatti modificado Glicerol, Balatti modificado Manitol, y en combinación de ambas fuentes de carbono, Balatti modificado Glicerol + Manitol. Cada punto representa el promedio de la Densidad Óptica a 500 nm (DO<sub>500nm</sub>) con su desvío estándar. Se realizaron 3 réplicas biológicas para este ensayo.

En estos experimentos observamos que, luego de una semana, cuando *B. japonicum* E109 se cultivó en Balatti modificado Glicerol, la densidad óptica a 500 nm (DO<sub>500nm</sub>) se registraba por encima de 10. Como al utilizar el medio Balatti modificado Manitol no se obtenía la concentración de rizobios deseada, descartamos este medio en el desarrollo del inoculante granulado. A su vez, cuando cultivamos *B. japonicum* E109 con Balatti modificado Glicerol + Manitol, no se registró en el crecimiento mediante DO<sub>500nm</sub> diferencias respecto a usar sólo glicerol como fuente de C. En base a estos resultados, consideramos al medio Balatti modificado Glicerol como el más adecuado para cultivar a los rizobios que se incorporaran al inoculante granulado. Entonces, analizamos en este medio la cinética de crecimiento de la cepa *B. japonicum* LP3018, en comparación con la cepa parental *B. japonicum* E109 (Figura VII.2).



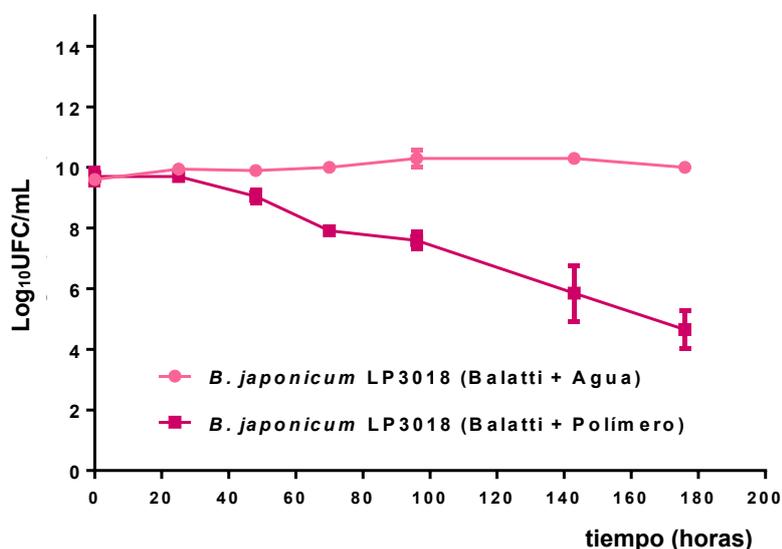
**Figura VII.2 Cinética de crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *B. japonicum* LP3018 en medio Balatti modificado Glicerol.** a) Biomasa estimada por la densidad óptica a 500 nm (DO<sub>500nm</sub>) de las cepas *B. japonicum* E109 (círculo colorado) y LP3018 (cuadrado azul). b) Estimación del número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/mL). Ambos experimentos fueron realizados en medio Balatti modificado Glicerol. Para cada cepa se realizaron dos réplicas biológicas y se graficó el promedio y el desvío estándar para cada punto.

La cepa *B. japonicum* LP3018 tiene el mismo comportamiento en el medio de cultivo Balatti modificado Glicerol que la cepa *B. japonicum* E109, tanto en  $DO_{500nm}$  como en las UFC/mL.

### VII.1.2 Selección del aglutinante

Al generar el inoculante granulado se tienen que respetar los estándares de calidad que la REDCAI, en concordancia con los del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), exigen para su registro. El inoculante granulado deberá garantizar el número mínimo de células viables desde su elaboración hasta el período de vencimiento en condiciones determinadas de almacenamiento y durante el período de vida útil o tiempo de vigencia establecido por los entes de fiscalización (Albanesi *et al.*, 2013).

En un principio, a la mezcla que indica la patente europea que se toma como referencia (Day *et al.*, 1988), se le incorporó un polímero industrial como aglutinante. Este permitió obtener gránulos con el tamaño, forma y consistencia adecuados, similares a los de los gránulos de fertilizante. En la industria de los inoculantes, se utilizan polímeros, por ejemplo, en el peletizado de semillas. Sin embargo, antes de utilizar el polímero para generar el inoculante granulado, analizamos si este afectaba la viabilidad de los rizobios. Así, se evaluó la supervivencia de la cepa *B. japonicum* LP3018 en presencia o ausencia del polímero (Figura VII.3).



**Figura VII.3 Supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum* LP3018 en presencia o ausencia de polímero industrial.** A un cultivo en fase exponencial tardía de *B. japonicum* LP3018, en el medio Balatti modificado Glicerol, se le agregó agua destilada como control (círculo rosado) y al otro polímero diluido a la mitad en agua destilada (cuadrado fucsia). Se graficó la estimación del número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/mL), cada 24 horas durante 4 días, y los dos últimos puntos a los 6 y 8 días del inicio del experimento. Se realizaron 2 réplicas biológicas para cada condición y los datos se grafican como el promedio y el desvío estándar.

En la condición en la que se agregó el polímero, el recuento de rizobios se redujo en comparación con el control, luego de 48 horas de incubación. Este descenso alcanzó una diferencia de cuatro órdenes de magnitud a los seis días post incubación de los rizobios con el polímero. Además, observamos que luego de una semana de incubación, al momento de la evaluación de la  $DO_{500nm}$  de las diluciones correspondientes, el medio YEM había virado del colorado a una tonalidad violácea. Entonces, medimos el pH de los cultivos líquidos mediante tiras reactivas de pH y, aquellos en contacto con el polímero tenían un pH aproximado de 5, mientras que aquellos a los que se agregó agua destilada, tenían un pH cercano a 8. El pH del polímero comercial era de aproximadamente 4. Cabe destacar que el medio Balatti modificado Glicerol tiene un pH inicial de 7. Así, el descenso en el número de UFC de los rizobios cuando se pusieron en contacto con el polímero se podría deber a la disminución del pH que se detectó en el medio de cultivo con el agregado del mencionado producto comercial.

Evidentemente, debíamos evaluar otro aglutinante para conseguir los gránulos con rizobios con el tamaño y la consistencia que nos propusimos para el inoculante granulado. Entonces, probamos directamente como aglutinante el cultivo de *B. japonicum* LP3018 en el medio Balatti modificado Glicerol. El inoculante granulado que se obtuvo cumplía con los requisitos de tamaño y consistencia deseados, resultando las células y componentes extracelulares del propio cultivo, suficientes para generar el efecto aglutinante.

## VII.2 Determinación de la temperatura de almacenamiento

Una vez que obtuvimos los gránulos con rizobios, procedimos a determinar la temperatura adecuada de almacenamiento. Según las recomendaciones de las empresas productoras de bioinsumos, los inoculantes líquidos deben mantenerse en la oscuridad y en un lugar fresco; en cuanto a los sólidos, recomiendan almacenarlos a 25°C (Albareda *et al.*, 2008). Basándose en estas recomendaciones, decidimos analizar tres temperaturas de almacenamiento: temperatura ambiente, 28°C y 37°C. Esta última temperatura, se da fácilmente en el campo en la época de cultivo de la soja.

En una primera instancia, se prepararon bajo condiciones de esterilidad tres inoculantes granulados (G1, G2, G3) (**Figura VII.4**). Cada inoculante se fraccionó en tres cajas de Petri con papel secante para ser almacenado a tres temperaturas diferentes en oscuridad.



**Figura VII.4: Inoculante granulado.** Aspecto del inoculante granulado G1 almacenado en una placa de Petri con papel secante.

Cuando se habla de calidad, la REDCAI se refiere “a la totalidad de parámetros que debe reunir un producto o un servicio para cumplir con el fin para el que fue fabricado o desarrollado”. Este organismo recomienda una concentración de rizobios en los inoculantes sólidos por encima de  $10^9$  UFC/g. En cuanto a contaminantes, sugiere que se encuentren por debajo de  $10^5$  UFC/g y el pH por encima de 5,5, ya que por debajo de este valor puede indicar contaminación. En cuanto a medios de cultivo recomienda la utilización de Tripteína Soja Agar (TSA) para recuento de bacterias, el empleo de Agar Sabouraud (SABA) para el recuento de hongos y el medio de cultivo YEM para recuento de los rizobios (Albanesi *et al.*, 2013).

Siguiendo la recomendación de la REDCAI, se tomaron muestras para el control de calidad de los inoculantes granulados desarrollados. Luego se estimó el número de células viables mediante el recuento en placa de las UFC, ya sea por extensión de superficie en el caso del recuento de contaminantes (en los medios TSA y SABA) o por el método de la gota en el caso del recuento de rizobios (medio YEM) (Hoben *et al.*, 1982). Las muestras se tomaron inmediatamente después de realizados los inoculantes granulados, a la semana, al mes y a los seis meses de su preparación. Además, se realizaron cambios del papel secante luego de cada muestreo siempre en condiciones de esterilidad.

En la **Tabla VII.1** se muestran los resultados representativos de los tres inoculantes granulados realizados. En la tabla se expresan los rangos de recuentos de rizobios en UFC normalizado por gramo de inoculante granulado. En cuanto a los contaminantes, los mismos se indican como “P” (presencia) si existe una concentración mayor a  $10^5$  UFC/g y “A” (ausencia) a concentraciones menores a  $10^5$  UFC/g.

**Tabla VII.1: Resultados del análisis de control de calidad de los inoculantes granulados.**

Tiempo (semanas)	Temperatura Ambiente			28°C			37°C		
	Rizobios (UFC/g)	Contaminantes		Rizobios (UFC/g)	Contaminantes		Rizobios (UFC/g)	Contaminantes	
		TSA	SABA		TSA	SABA		TSA	SABA
0	$10^9$ - $10^{10}$	A	A	$10^9$ - $10^{10}$	A	A	$10^9$ - $10^{10}$	A	A
1	$10^{10}$	P	P	$10^{10}$	P	P	$10^8$	P	A
4	$10^{10}$	P	P	$10^9$ - $10^{10}$	P	P			
24	$10^8$	P	P	-	-	-			

“P” (presencia) representa los casos en que los contaminantes superan  $10^5$  UFC/g, y “A” (ausencia) aquellos casos en los que los valores se encuentran por debajo de  $10^5$  UFC/g a las 48 horas. Los datos faltantes se deben a que esas condiciones fueron descartadas a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento porque no cumplían los estándares de calidad de la REDCAI.

En la tabla se muestra que los rizobios aumentaron su población a la semana de almacenamiento en el inoculante granulado, en dos de las temperaturas de almacenamiento estudiadas, a 28°C y temperatura ambiente. Cuando se lo incubó a 37°C, durante el mismo período de tiempo, disminuyó en un orden de magnitud el recuento de rizobios alcanzando un valor menor al recomendado para un inoculante por la REDCAI. Por tal motivo, esta temperatura de almacenamiento fue descartada y su análisis fue abandonado. A las cuatro semanas de almacenamiento, tanto a 28°C como a temperatura ambiente, los rizobios se encuentran por encima del límite recomendado. Sin embargo, al muestrear a las 24 semanas, la población de rizobios del inoculante

granulado almacenado a temperatura ambiente, disminuye dos órdenes de magnitud, y queda por debajo de lo aconsejado por la REDCAI.

En cuanto al rango de pH, el mismo se mantiene en todas las temperaturas entre pH=6 y pH=7 en todos los tiempos evaluados. Estos valores se encuentran dentro del rango recomendado por la REDCAI.

Con respecto al recuento de los contaminantes, no hay presencia inmediatamente después del armado de los inoculantes granulados. Sin embargo, transcurrida una semana de almacenamiento los mismos se pueden cuantificar. En el caso de los contaminantes bacterianos, el comportamiento se mantiene en las tres temperaturas analizadas, ya que todos están por encima del límite aceptado. El recuento de los contaminantes bacterianos cuando se almacena el inoculante granulado a temperatura ambiente es menor que cuando se lo almacena a 28°C. Esto sumado al hecho de que a temperatura ambiente se mantiene el recuento de rizobios dentro de los valores recomendados para los inoculantes comerciales, se decidió como temperatura de almacenamiento adecuada la del ambiente.

Sin embargo, la REDCAI recomienda que los contaminantes se encuentren por debajo de  $10^5$  bacterias por gramo de producto y estos inoculantes granulados se encuentran dos órdenes de magnitud por encima de ese valor por lo que todavía este producto no se encuentra dentro de los límites microbiológicos deseados.

### VII.3 Capacidad simbiótica del inoculante granulado

#### VII.3.1 Obtención del inoculante granulado para ensayo con plantas

Armamos un nuevo inoculante granulado, que denominamos G4, con el fin de inocular plantas de soja para evaluar su capacidad de nodulación y FBN. Se evaluaron a distintos tiempos de almacenamiento a temperatura promedio de 21°C, las mismas determinaciones que a los inoculantes granulados anteriores: supervivencia de rizobios, contaminantes en medio TSA y SABA (**Tabla VII.2**).

**Tabla VII.2: Control de calidad del inoculante granulado G4**

Tiempo almacenamiento (semanas)	Rizobios (UFC/g)	Contaminantes	
		TSA	SABA
0	$10^9$	A	A
1	$10^{10}$	A	A
4	$10^9$	P	P
10	$10^9$	P	P

"P" (presencia) representa los casos en que los contaminantes superan  $10^5$  UFC/g, y "A" (ausencia) aquellos casos en los que los valores se encuentran por debajo de  $10^5$ UFC/g a las 48 horas.

En este inoculante granulado, la población de rizobios aumentó un orden de magnitud cuando se almacenó una semana a temperatura ambiente. Esto coincidió con los recuentos que se obtuvieron para los inoculantes granulados G1, G2 y G3 (**Tabla VII.1**). Luego, a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, los recuentos de

rizobios disminuyeron con respecto a la primera semana. Sin embargo, se mantuvieron del orden de los valores recomendados por la REDCAI, incluso después de 10 semanas de almacenamiento. Estos resultados reflejan la supervivencia de los microorganismos en el soporte sólido y respaldan los experimentos mostrados en la sección anterior. En cuanto a los contaminantes, la cuantificación supera el valor que recomienda la REDCAI a partir de la cuarta semana de almacenamiento.

El control de calidad del inoculante granulado G4 respaldó los resultados que se obtuvieron para los inoculantes granulados G1, G2 y G3. Se corroboró que la temperatura ambiente resulta adecuada para el almacenamiento del inoculante ya que había supervivencia de los rizobios en los rangos de concentración deseados aún después de 10 semanas de su elaboración. Sin embargo, los contaminantes estuvieron por encima de lo que recomienda la REDCAI (Albanesi *et al.*, 2013). Sin embargo, el rango de pH, que es un parámetro que también refleja la presencia de contaminaciones, se mantuvo durante todo el tiempo de almacenamiento en los valores recomendados por la REDCAI (pH mayor a 5). Estos resultados indicaban que había que trabajar en la disminución del número de contaminantes (Albanesi *et al.*, 2013).

### VII.3.2 Disminución de los contaminantes en el inoculante granulado

Con el objetivo de disminuir los contaminantes para que la preparación del inoculante granulado cumpliera con los valores aceptados por la REDCAI a tiempos de almacenamiento mayores a una semana, se realizó un nuevo inoculante, G5.

El inoculante granulado G5 fue fraccionado inmediatamente después de la preparación, la mitad de la producción del inoculante granulado G5 se expuso al secado durante 20 minutos en un flujo laminar (21°C) (G5 Seco); mientras que la otra mitad, se reservó para ser utilizado como control (G5 Húmedo). Las mismas determinaciones que se describieron anteriormente fueron realizadas y los resultados se resumen en la **Tabla VII.3**.

**Tabla VII.3: Control de calidad del inoculante granulado G5**

Tiempo almacenamiento (semanas)	G5 Sin Secado			G5 Secado		
	Rizobios (UFC/g)	Contaminantes		Rizobios (UFC/g)	Contaminantes	
		TSA	SABA		TSA	SABA
0	10 <sup>9</sup>	A	A	10 <sup>9</sup>	A	A
1	10 <sup>8</sup>	A	A	0	A	A

“P” (presencia) representa los casos en que los contaminantes superan 10<sup>5</sup> UFC/g, y “A” (ausencia) aquellos casos en los que los valores se encuentran por debajo de 10<sup>5</sup>UFC/g a las 48 horas.

Los datos de la **Tabla VII.3** muestran que el inoculante granulado G5 Secado bajo flujo no posee rizobios a la semana de almacenamiento. Y aunque el que no estuvo expuesto al secado, G5 Sin Secado, tiene rizobios, la población disminuyó respecto al tiempo inicial. En cuanto a los contaminantes, ambos casos se encuentran por debajo de 10<sup>5</sup> UFC/g, cumpliendo con uno de los requisitos de la REDCAI.

En este experimento el pH disminuyó en el muestreo semanal. Se mantuvo dentro de los valores aceptados por las exigencias del control de calidad, pero fue más cercano a 6.

En el caso del inoculante granulado G5 planteamos una alternativa de secado bajo flujo laminar al momento de armar los gránulos con el objetivo de disminuir los contaminantes. Esto se logró tanto en el inoculante granulado Secado como en el Sin Secado, pero con un efecto negativo sobre la población de rizobios que se vio afectada en ambas condiciones.

Los resultados que se obtuvieron con el inoculante granulado G5 también podrían estar afectados por la disminución del pH. Esto podría estar relacionado con el uso de un lote diferente del soporte en el armado de este inoculante granulado.

### VII.3.3 Evaluación de parámetros simbióticos

Con el objetivo de evaluar la capacidad de nodulación y FBN de los inoculantes granulados, se procedió a realizar un ensayo con plantas de soja utilizando los siguientes productos:

- **G4:** Granulado almacenado a 28°C durante 10 semanas.
- **G5:** Granulado con 4 días de elaboración, en sus dos versiones G5 Sin Secado y G5 Secado, que al tiempo de implementarlo cumplía con los requerimientos mínimos de la REDCAI.

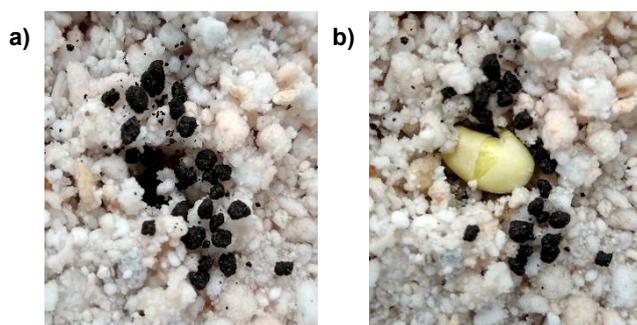
Se adicionaron como controles positivos al experimento un inoculante comercial líquido y el cultivo líquido de la cepa *B. japonicum* LP3018. Por un lado, para comparar la funcionalidad del inoculante granulado con respecto a la eficiencia de lo que se encuentra en el mercado, y, por otro, la capacidad de nodular de la cepa *B. japonicum* LP3018. El esquema del ensayo de plantas se muestra en la **Figura VII.5**. Para cada condición hubo 10 plantas como réplicas.



**Figura VII.5: Esquema del ensayo con plantas.** Las semillas pregerminadas fueron inoculadas con: solución mineral de Fåhræus modificado (sin inocular), inoculante comercial líquido, un cultivo líquido de la cepa *B. japonicum* LP3018 crecida en Balatti modificado Glicerol, el inoculante granulado G4, el inoculante granulado G5 Sin Secado y el inoculante granulado G5 Secado en flujo laminar.

Para determinar la cantidad de inoculante granulado agregado se tomó como referencia una dosis baja de fertilizante sólido, el que se agrega en la siembra junto con la semilla, y se extrapolaron los cálculos a la superficie de la maceta que se usó para el experimento (ver cálculos en el Capítulo II). A su vez, en este experimento con plantas,

se colocaron los gránulos del inoculante de manera que queden distribuidos homogéneamente alrededor de la semilla (**Figura VII.6**)



**Figura VII.6: Aplicación del inoculante granulado.** Primero se colocó el inoculante granulado sobre el soporte previamente humedecido (a) y luego se adicionó la semilla germinada (b).

De estas consideraciones, surgió una determinada cantidad en gramos de inoculante granulado a agregar previo a la siembra de la semilla. El cálculo de la carga de microorganismos que se inoculó en los tratamientos control se realizó a partir de la masa y el recuento correspondientes al granulado G4 a las 10 semanas de almacenamiento (ver **Tabla VII.2**). Las plantas fueron inoculadas con concentraciones similares de rizobios, del orden de  $10^8$  UFC por semilla (valores se muestran en el **Anexo IV**). Los controles positivos del ensayo, plantas inoculadas con un cultivo líquido de *B. japonicum* LP3018 y con un inoculante comercial líquido, tuvieron inóculos semejantes entre ellos, pero un orden de magnitud mayor al de los inoculantes granulados.

Las plantas se cosecharon 21 días post inoculación y en la **Tabla VII.4** se muestra el número de nódulos en las raíces de soja tratadas con los inoculantes granulados.

**Tabla VII.4: Parámetros simbióticos del inoculante granulado**

Condiciones	Nódulos totales por planta	Peso seco parte aérea (g)
<b>G4</b>	$8 \pm 6^b$	$0.276 \pm 0.054^b$
<b>G5 Húmedo</b>	$11 \pm 5^b$	$0.292 \pm 0.071^b$
<b>G5 Seco</b>	$9 \pm 2^b$	$0.384 \pm 0.082^b$
<b>LP3018</b>	$10 \pm 1^b$	$0.325 \pm 0.061^b$
<b>Inoculante comercial</b>	$6 \pm 3^b$	$0.295 \pm 0.070^b$
<b>Sin inocular</b>	$0^a$	$0.186 \pm 0.055^a$

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$ .

Los resultados muestran que todas las plantas inoculadas poseían nódulos y no se detectaron nódulos en las plantas sin inocular. Los controles positivos (inoculante comercial y *B. japonicum* LP3018) tuvieron un número de nódulos estadísticamente superior al control sin inocular, pero no hubo diferencias al ser comparados con las condiciones inoculadas con los inoculantes granulados. Los rizobios presentes en los inoculantes granulados, conservaron la capacidad de nodular.

Nódulos extraídos, tanto de raíz primaria como de raíces secundarias se desinfectaron superficialmente, se maceraron y se picaron para determinar su

contenido. Posteriormente, se colocaron en placas de medio YEM suplementadas con *Sm*, para comprobar la ocupación de los nódulos por la cepa *B. japonicum* LP3018. El análisis de los resultados indica que los nódulos pertenecientes a las plantas tratadas con el inoculante comercial líquido estuvieron ocupados por una cepa sin resistencia a *Sm* en todos los casos. Mientras que las plantas inoculadas con el cultivo de *B. japonicum* LP3018 líquido estaban infectadas en su totalidad con esta cepa porque crecieron en placas YEM suplementadas con el antibiótico *Sm*. Por último, en las plantas inoculadas con los inoculantes granulados, todos los nódulos estaban ocupados por la cepa *B. japonicum* LP3018. Los resultados se muestran detallados en el **Anexo IV**.

Finalmente, se analizó la FBN mediante la evaluación de los pesos secos de la parte aérea y de la raíz de cada plántula, como cuantificación de la biomasa total producida. En estos experimentos las plantas fueron cultivadas con una solución balanceada de nutrientes, con lo cual todos los nutrientes, excepto el nitrógeno, fueron suplementados de manera tal de no ser limitantes. Los datos se muestran en la **Tabla VII.4**.

Al analizar el peso seco de la parte aérea, en el caso de los controles positivos, inoculante comercial y cultivo líquido de la cepa *B. japonicum* LP3018 no presentan diferencias significativas con los inoculantes granulados. Todas las condiciones inoculadas presentan diferencias significativas con los testigos sin inocular.

#### VII.4 Permanencia de los rizobios del inoculante granulado en el soporte

Para observar la permanencia de los rizobios en la zona de contacto de las raíces con el soporte inerte, se resuspendió en solución fisiológica el sustrato débilmente adherido a las raíces de las plantas y diluciones se cultivaron en placas con medio YEM suplementadas con *Ch* para contar las UFC/g. El valor se relativizó a las UFC que se inocular al empezar el ensayo (**Tabla VII.5**).

**Tabla VII.5: Permanencia en la zona de interacción de las raíces con el sustrato**

Condiciones	Rizobios inoculados (UFC/mL o g)	Rizobios en el soporte (UFC/g)	Relación Rizobios en el soporte/Rizobios inoculados
<b>G4</b>	1.28x10 <sup>8</sup>	1.42x10 <sup>7</sup>	0.111 ± 0.042 <sup>d</sup>
<b>G5 Húmedo</b>	8x10 <sup>7</sup>	1.19x10 <sup>7</sup>	0.149 ± 0.055 <sup>d</sup>
<b>G5 Seco</b>	2x10 <sup>8</sup>	1.17x10 <sup>7</sup>	0.058 ± 0.022 <sup>c</sup>
<b>LP3018</b>	1.57x10 <sup>9</sup>	1.79x10 <sup>7</sup>	0.011 ± 0.019 <sup>b</sup>
<b>Inoculante comercial</b>	8.13x10 <sup>9</sup>	1.07x10 <sup>8</sup>	0.013 ± 0.030 <sup>b</sup>
<b>Sin inocular</b>	0	0	0 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$ .

Al contar las UFC de rizobios en el soporte y relativizarlas con las UFC inoculadas, se observa que los rizobios provenientes de los inoculantes granulados tienen una mayor permanencia que aquellos que provienen de inoculantes líquidos. La ubicación en la que se aplican los inoculantes granulados podría favorecer la distribución de los rizobios y de esta manera, la permanencia en la maceta.

### VII.5 Desarrollo del inoculante granulado con las cepas seleccionadas

Los inoculantes granulados que obtuvimos contuvieron un buen título de rizobios luego de varias semanas almacenados a temperatura ambiente y, más allá de que la cantidad de contaminantes superaba lo recomendado por la REDCAI, las plantas de soja inoculadas con estos gránulos desarrollaron nódulos. En base a esta experiencia, desarrollamos un inoculante granulado que contuvo las cepas seleccionadas *B. japonicum* CAS/N-10, aislada de campo, y su derivada más móvil, *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup>. Además, se probó formar inoculantes granulados con estas cepas y el agregado de *T. harzianum* Th5cc.

Es importante destacar, que pudimos agregar los rizobios y el hongo *T. harzianum* en el mismo soporte, logrando un gránulo del tamaño y la consistencia deseadas. También, logramos inoculantes granulados que cumplieron nuestros estándares conteniendo sólo el hongo. El título de *T. harzianum* Th5cc que se utilizó para la formulación fue igual que el que se utilizó en los ensayos de coinoculación con rizobios en plantas de soja.

Los inoculantes granulados se utilizaron inmediatamente después de haberlos armado en el experimento con plantas. Con el fin de comparar el desempeño simbiótico del inoculante granulado con el del mismo inoculante líquido, se prepararon las dos presentaciones a partir del mismo cultivo. Es decir, para el inoculante granulado desarrollado con *B. japonicum* CAS/N-10 y *T. harzianum* Th5cc se fabricó un inoculante líquido con la misma concentración de microorganismos de *B. japonicum* CAS/N-10 y *T. harzianum* Th5cc. Además, se incorporó al ensayo un inoculante granulado sólo con *T. harzianum* Th5cc y una condición de control positivo con un inoculante comercial.

Después de 21 días post inoculación, las plantas se cosecharon y se contaron los nódulos que había en sus raíces (**Tabla VII.6**).

Tabla VII.6: Parámetros simbióticos del inoculante granulado versus inoculante líquido

Condiciones	Número de nódulos		Peso seco de la parte aérea (g)	
	Inoculante granulado	Inoculante líquido	Inoculante granulado	Inoculante líquido
LP3018	18 ± 5 <sup>bc</sup>	17 ± 4 <sup>bc</sup>	0.178 ± 0.015 <sup>bc</sup>	0.204 ± 0.020 <sup>bc</sup>
LP3018 + Th5cc	17 ± 2 <sup>bc</sup>	16 ± 5 <sup>bc</sup>	0.199 ± 0.020 <sup>bc</sup>	0.206 ± 0.024 <sup>bc</sup>
CAS/N-10	19 ± 4 <sup>bc</sup>	18 ± 3 <sup>bc</sup>	0.188 ± 0.028 <sup>bc</sup>	0.191 ± 0.018 <sup>bc</sup>
CAS/N-10 + Th5cc	16 ± 5 <sup>bc</sup>	17 ± 4 <sup>bc</sup>	0.181 ± 0.016 <sup>bc</sup>	0.188 ± 0.018 <sup>bc</sup>
CAS/N-10 m <sup>+</sup>	18 ± 3 <sup>bc</sup>	15 ± 4 <sup>bc</sup>	0.184 ± 0.014 <sup>bc</sup>	0.175 ± 0.036 <sup>bc</sup>
CAS/N-10 m <sup>+</sup> + Th5cc	16 ± 4 <sup>bc</sup>	19 ± 3 <sup>bc</sup>	0.193 ± 0.021 <sup>bc</sup>	0.190 ± 0.051 <sup>bc</sup>
Th5cc	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.163 ± 0.022 <sup>bc</sup>	0.156 ± 0.015 <sup>bc</sup>
Inoculante comercial	-	19 ± 2 <sup>b</sup>	-	0.185 ± 0.032 <sup>bc</sup>
Sin inocular	-	0 <sup>a</sup>	-	0.118 ± 0.023 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio y a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ONE-WAY ANOVA con test de Tukey. Los valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas con un  $p < 0,0001$  dentro de la misma columna. La letra c representa que no hay diferencias significativas al comparar entre inoculante líquido e inoculante granulado.

Se encontraron nódulos en todas las plantas inoculadas con los inoculantes granulados, salvo cuando este contenía sólo el hongo *T. harzianum* Th5cc. Entonces, las cepas seleccionadas, *B. japonicum* CAS/N-10 y *B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup>, son capaces de nodular cuando se incorporan en el soporte del inoculante granulado. No hubo diferencias significativas en el número de nódulos producidos por el inoculante granulado formado sólo con rizobios o con rizobios y el hongo. Es importante aclarar que, en las condiciones del experimento, la cantidad de nódulos no varió entre la inoculación mediante el uso de inoculantes líquidos o granulados.

Respecto al peso seco de la parte aérea, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas de soja inoculadas con inoculantes líquidos o granulados. Sólo hubo diferencias significativas con los controles sin inocular (**Tabla VII.6**).

## VII.6 Resumen

La implementación del inoculante granulado es importante para inocular microorganismos en el surco de siembra y no tiene la complicación logística de trasladar al campo grandes cantidades de agua.

Basándonos en los estándares de control de calidad de la REDCAI, se determinó a la temperatura ambiente como la más adecuada para el almacenamiento del producto granulado. Este hecho podría ser beneficioso pensando en la industrialización del producto y en su almacenamiento a campo.

En cuanto a los contaminantes, ya sean hongos o bacterias, inmediatamente después de realizados los inoculantes granulados están ausentes. Pero a tiempos más largos de almacenamiento, al menos una semana, los recuentos de estos microorganismos son mayores a los recomendados por la REDCAI. Si bien, se implementó una estrategia para disminuirlos, esta no resultó eficiente y factible porque disminuyó también el recuento de rizobios. La disminución de la población del microorganismo nodulante se puede deber al marcado descenso en el pH del producto. Por lo que se debería tener en cuenta la calidad de los insumos que se utilizan en la elaboración del inoculante granulado.

Los experimentos con plantas reflejan la eficiencia del producto. Las plantas inoculadas con los inoculantes granulados no presentaron diferencias significativas, ni en el número de nódulos ni en el peso seco de la parte aérea, con respecto al uso de inoculantes líquidos o comerciales.

La incorporación de varios microorganismos en un mismo soporte, en nuestro caso *B. japonicum* y el hongo *T. harzianum*, es un beneficio del inoculante granulado que permite su administración conjunta en el surco de siembra.



# CAPÍTULO VIII



**Discusión y perspectivas**



a Organización de las Naciones Unidas (ONU) lidera el esfuerzo internacional para poner fin al hambre. Dentro de las cinco actividades que proponen para lograr la seguridad alimentaria, y al mismo tiempo, garantizar el acceso regular a los alimentos, se encuentra hacer que la agricultura sea más productiva y sustentable (<http://www.fao.org/>).

La soja es la oleaginosa más importante de Argentina por extensión y por producción. La superficie sembrada con este cultivo desde el año 2011 alcanza aproximadamente el 44% de la superficie cultivable de nuestro país, promediando los 18 millones de hectáreas (ha) sembradas con esta leguminosa (Tejeda Rodríguez et al., 2019; <https://datos.bancomundial.org/>). Esto indica que su frontera agrícola ya ha sido alcanzada, y todo incremento ulterior en la producción de soja requerirá aumentar la productividad por ha, lo cual presionará sobre la sanidad vegetal y la productividad del suelo. Para aumentar la productividad se recurre al uso de pesticidas y variedades con alto índice de cosecha, pero estas prácticas amenazan la sustentabilidad ambiental. Los pesticidas son de por sí contaminantes, y las variedades de alto índice de cosecha poseen altas tasas de extracción de nutrientes del suelo, que deben ser repuestos dado que casi la totalidad del grano cosechado se exporta. Claramente esta situación, atenta contra la sustentabilidad del cultivo, desbalanceando vertiginosamente el equilibrio del triángulo de relación entre planta, microorganismo y geoquímica del suelo (Montgomery, 2012). Para mitigar los efectos de estas prácticas

juegan un papel preponderante los productos biotecnológicos basados en microorganismos promotores del crecimiento vegetal, entre los que se destacan los rizobios fijadores de N<sub>2</sub> y los biocontroladores de fitopatógenos.

En el cultivo de soja se observa que hay un uso generalizado de inoculantes con bacterias fijadoras de nitrógeno. Datos del Proyecto Inocular del INTA revelan que el 94% de los productores agropecuarios utilizan inoculantes comerciales (Piccinetti *et al.*, 2013). Sin embargo, también es cierto que la respuesta a la inoculación, en términos de rendimiento del cultivo, dista de ser óptima, y si se siguen utilizando inoculantes, ello obedece principalmente a su bajo costo y a la simplicidad de su aplicación sobre semillas o comprándolas preinoculadas, más que a un resultado concreto y reproducible (Lodeiro, 2015).

Parte del éxito de la práctica de inoculación depende de las cepas de rizobios que componen el producto. A lo largo de esta tesis, hemos observado que dentro de las poblaciones alóctonas de rizobios noduladores de soja provenientes de diversos suelos argentinos existen cepas con buena capacidad fijadora de N<sub>2</sub> en comparación con la cepa recomendada por el INTA para la producción de inoculantes, *Bradyrhizobium japonicum* E109 (**Tabla III.4**). Adicionalmente, dichas cepas, que están adaptadas para nodular en las condiciones edafoclimáticas locales, demostraron tener una competición intrínseca similar a la de *B. japonicum* E109.

En el microbioma del nódulo, se han encontrado una gran cantidad de bacterias distintas a los rizobios. Sorprendentemente, algunos de estos aislamientos también tienen genes *nif* y *nod* lo que les permite nodular y fijar nitrógeno en las leguminosas (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2017). En nuestra muestra, que es pequeña en comparación con la diversidad que hay en el suelo, encontramos dos aislamientos identificados como *Rhizobium radiobacter* (**Figura III. 4**) que tienen copias de los genes *nifH* o *nodC* (**Figura III.5**). Además, se encontró una cepa de *Paenibacillus* (**Figura III.4**) que sólo es capaz de ingresar al nódulo en presencia de otra bacteria nodulante. Comprender el rol biológico de estas otras especies que se asocian a los rizobios en los nódulos podría ayudar a proteger los cultivos de manera sustentable.

Experimentos a campo demostraron que plantas de soja inoculadas con cepas de rizobios más móviles generaban un mayor rendimiento en grano (Althabegoiti *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2009). Entonces, se podría aumentar el rendimiento de los inoculantes mediante la incorporación de cepas con un fenotipo estable de mayor movilidad, originadas a partir de las cepas de la población alóctona con buena eficiencia en la FBN (**Tabla III.4**), como las que generamos en este trabajo de tesis (**Figura IV.3** y **Figura IV.8**).

Para la soja, una vía menos costosa energéticamente que la FBN, es la adquisición de compuestos nitrogenados mediante la absorción de N del suelo. Así, las plantas suelen inhibir total o parcialmente la simbiosis cuando tienen disponibilidad de N combinado (Nishida *et al.*, 2018). Aún, cuando la fijación de N<sub>2</sub> es capaz de proveer todo el N que la planta necesita, en la realidad se observa que un 35-40 % del N asimilado por

el cultivo de soja proviene del suelo (Piccinetti *et al.*, 2013). Esto implica que con un rendimiento modesto de 2500 kg/ha se estarían retirando del suelo entre 52 y 60 kg/ha de N en cada campaña. Entonces, por cada punto porcentual de incremento en la proporción de N del grano que se logre con una mejor fijación simbiótica de N<sub>2</sub> se ahorrarían 1,5 kg/ha de N del suelo con ese rendimiento modesto, o bien 3,6 kg/ha de N si se considera un rendimiento potencial de 6000 kg/ha (Salvagiotti *et al.*, 2016). En esta tesis observamos que la coinoculación de *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en plantas de soja evitó la inhibición de la nodulación por el N combinado (**Figura VI.2**). Esto podría conducir a que las plantas de soja coinoculadas con *Bradyrhizobium* spp. y *T. harzianum* puedan obtener una mayor proporción de su N a partir de la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico aún en presencia de N combinado en el suelo, y así mitigar la extracción de N del suelo. En este sentido vimos que, plantas coinoculadas con *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc, en presencia de concentraciones de nitratos similares a las del suelo, tienen una mayor cantidad de nódulos (**Tabla VI.1**) y de tamaño similar (**Tabla VI.2**) que aquellas inoculadas sólo con el rizobio. Nuestros resultados sugieren que este estímulo en la nodulación en presencia de *T. harzianum* estaría mediado por la producción de auxinas (ácido-Indol-3-acético) por parte del hongo (**Figura VI.7**, **Figura VI.8** y **Tabla VI.5**).

A su vez, *Trichoderma* spp. se utiliza en la actualidad como un agente de biocontrol para cultivos intensivos y extensivos. El proceso de biocontrol es un proceso indirecto y complejo en la interacción planta-*Trichoderma*. En este, tiene lugar un diálogo molecular, y tanto la planta como *Trichoderma* producen moléculas para mediar la interacción (Pozo *et al.*, 2005). Esta señalización incluye enzimas, proteínas y metabolitos secundarios que son secretados por *Trichoderma* spp (Patil *et al.*, 2016). Además, estos efectores pueden activar la expresión de genes involucrados en la resistencia sistémica de las plantas (Pieterse *et al.*, 2014). En este trabajo mostramos que *T. harzianum* se comportó como antagonista de varios hongos fitopatógenos de soja (**Figura V.13**) que producen enfermedades de importancia económica, con lo cual también, podría mitigar el uso de fungicidas. Dado que ambos microorganismos fueron capaces de convivir tanto en el medio de cultivo (**Figura V.2**, **Figura V.3** y **Figura V.4**) como en la rizósfera (**Tabla V.1** y **Figura V.9**), y que la nodulación no se vio afectada por la presencia de *T. harzianum* (**Figura V.6**, **Figura V.7** y **Figura V.8**), el desarrollo de un inoculante combinando con estas dos especies parece posible.

La mayor parte de la biomasa microbiana del suelo está formada por los micelios fúngicos que se ha demostrado crecen ampliamente atravesando sus poros y forman una red micelar que se conoce como *fungus highway* (Kohlmeier *et al.*, 2005). Estos micelios también se conocen como un canal ideal para la dispersión bacteriana en ecosistemas de suelo estructural y químicamente heterogéneos (Kohlmeier *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2015). La colonización en simultáneo de las leguminosas por hongos y rizobios probablemente es común en la naturaleza porque habitan en el mismo nicho (van Overbeek *et al.*, 2016; Deveau *et al.*, 2018). En este trabajo mostramos que los

rizobios pueden alcanzar las raíces de soja y nodularlas, al ser dispersados por las hifas de *T. harzianum* Th5cc (**Figura V.16** y **Figura V.17**). Estudios recientes, indican que estas redes micelares transfieren rizobios desde el suelo a la rizosfera y, por lo tanto, participan del inicio de la interacción rizobio-leguminosa (Zhang *et al.*, 2020). De este modo, el uso de *T. harzianum* Th5cc en la inoculación combinada con rizobios promovería la distribución de las bacterias en el suelo mejorando quizás la competición para la nodulación.

Ensayos a campo llevados a cabo por nuestro laboratorio han demostrado (Althabegoiti *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2009) que la inoculación en el surco de siembra es superior a la inoculación en semillas ya que posiciona mejor a los rizobios inoculados para la infección temprana. Pese a ello, y a los inconvenientes de la inoculación en semillas y sobre todo en semillas preinoculadas (**Figura VII.3**) (Lodeiro, 2015), la inoculación en semillas sigue siendo la práctica habitual, ya que la inoculación en el surco de siembra con inoculantes líquidos requiere del traslado de grandes volúmenes de agua por el campo con el fin de diluir el inoculante, lo cual provoca dificultades logísticas y encarece los costos del uso de maquinarias y combustible. Por lo tanto, hemos encarado el desarrollo de inoculantes granulados, que poseen varias ventajas con respecto de los inoculantes líquidos. Estos gránulos pueden llevarse y aplicarse en conjunto con las semillas, pueden separar a los rizobios de sustancias potencialmente nocivas, pueden ser vehículos no solo de los rizobios sino de otros microorganismos benéficos o biocontroladores y pueden mejorar la supervivencia de los rizobios entre el momento de la aplicación y el momento de la germinación. En una primera etapa de desarrollo ajustamos la composición básica de los gránulos con el fin de optimizar el tamaño, forma y consistencia de los mismos para que tengan un tamaño similar a los gránulos de fertilizantes (**Figura VII.4**), que sean suficientemente estables para no deshacerse en la sembradora, y que sean lo suficientemente permeables para liberar su contenido rápidamente en el suelo húmedo. Además, hemos observado en estos gránulos un contenido de alrededor de  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) de rizobios activos por gramo de gránulos, cuya viabilidad se mantuvo durante, al menos, 10 semanas (**Tabla VII.2**). Estos gránulos, en ensayos con plantas en el laboratorio, fueron igual de eficientes para nodular soja que inoculantes líquidos y comerciales (**Tabla VII.4** y **Tabla VII.6**). A su vez, hubo una mayor permanencia en el soporte donde crecimos las plantas, de los rizobios provenientes de la inoculación con los gránulos (**Tabla VII.5**); sugiriendo que este método de aplicación podría favorecer la distribución de los rizobios en el suelo.

La formulación granulada también brinda la posibilidad de incluir otros microorganismos como *T. harzianum* Th5cc a la presentación (**Tabla VII.6**). Que además de tener un efecto biocontrolador (**Figura V.13**), podría dispersar a los rizobios en el suelo (**Figura V.16** y **Figura V.17**). Esto traería como efecto la estimulación de la colonización rizosférica por parte de los rizobios del inoculante, como para situar un número alto de los rizobios seleccionados en las inmediaciones de los sitios de infección.

Esto favorecería la nodulación por parte de las bacterias inoculadas aún en presencia de rizobios noduladores de soja provenientes de la población del suelo, con lo cual se podría aumentar significativamente el porcentaje de ocupación de los nódulos por parte de la cepa inoculada (Lodeiro, 2015). Así, se podría incrementar la proporción de N obtenido por fijación del N<sub>2</sub> atmosférico de una manera sustentable.

Bajo el prisma de nuestra responsabilidad social como científicos, resulta necesario que aportemos nuestros conocimientos, experticia y vocación para tener una sociedad que se desarrolle sustentablemente, ayudando y capacitando a los más necesitados.

En ese sentido, resulta válido destacar el aporte que realiza el Papa Francisco en su carta encíclica *Laudato sí'* al abordar la problemática del cambio climático y las consecuencias que produce en el medio ambiente y en la pobreza. Allí afirma que “son ellos, los pobres y los marginados de nuestra sociedad los más vulnerables al cambio climático y, los más afectados”.

En definitiva, como científicos debemos dirigir hacia allí nuestras acciones. De esta forma, aportaremos nuestro granito de arena para Cuidar la Tierra, nuestra Casa Común.

## Perspectivas

En este trabajo de tesis hemos avanzado en generar conocimientos básicos y tecnológicos para incrementar la eficiencia de inoculantes para soja y su confirmación será foco de estudios futuros.

En las condiciones ensayadas en el laboratorio, no pudimos observar el efecto promotor del crecimiento vegetal que está descrito para cepas identificadas como *T. harzianum*. Sería de gran utilidad evaluar el resultado de la coinoculación en ensayos a campo. Esto permitiría analizar no sólo el efecto sobre la FBN y el rendimiento en grano, sino también, como la planta responde bajo este tratamiento a los diferentes estreses a los cuales se ve sometida hasta el momento de la cosecha.

En esta misma línea, se plantean realizar ensayos a campo con las dos cepas seleccionadas de la población alóctona por su buena eficiencia en FBN (*B. japonicum* CAS/N-10 y SAA/S-48) y sus cepas derivadas que tienen un fenotipo más móvil (*B. japonicum* CAS/N-10 m<sup>+</sup> y SAA/S-48 m<sup>+</sup>). También se evaluaría la condición de coinoculación de todas estas cepas de rizobios con *T. harzianum* Th5cc.

Los enfrentamientos duales *in vitro* entre *T. harzianum* Th5cc y diversos patógenos de soja mostraron un claro efecto biocontrolador de nuestra cepa de interés. Sin embargo, sería interesante evaluar este efecto en ensayos *in vivo*.

Si los resultados de los ensayos a campo son alentadores, optimizar la formulación de los inoculantes granulados conteniendo las cepas alóctonas seleccionadas y sus derivadas más móviles, sería un objetivo a corto plazo. A su vez, disminuir la concentración de contaminantes en los gránulos, permitiría prolongar el tiempo de almacenado. Una vez establecida esta condición, quedaría perfeccionar la incorporación de los conidios de *T. harzianum* Th5cc en el producto.

Finalmente, para que este avance en el conocimiento se transfiera a la sociedad, nos proponemos establecer una interacción con una empresa productora de inoculantes para proyectar la factibilidad del desarrollo del producto a escala industrial.



Anexos



**Anexo 1: Tabla para calcular el número más probable (NMP)****Tabla AI.1: Tabla para estimar la concentración de rizobios en el suelo**

Dilución			Factor NMP	Porcentaje de Probabilidad	Intervalo de confianza	
D1	D2	D3			Mínimo	Máximo
0	0	1	0,300	0,332	0,073	1,675
0	0	2	0,601	0,001	0,186	2,176
0	0	3	0,904	0,000	0,329	2,645
0	1	0	0,305	3,365	0,074	1,698
0	1	1	0,611	0,045	0,189	2,208
0	1	2	0,917	0,000	0,334	2,684
0	1	3	1,224	0,000	0,498	3,140
0	2	0	0,620	0,156	0,192	2,239
0	2	1	0,930	0,004	0,338	2,722
0	2	2	1,242	0,000	0,505	3,185
0	2	3	1,555	0,000	0,686	3,636
0	3	0	0,944	0,004	0,343	2,762
0	3	1	1,261	0,000	0,512	3,233
0	3	2	1,579	0,000	0,695	3,693
0	3	3	1,898	0,000	0,890	4,141
1	0	0	0,357	39,203	0,087	2,058
1	0	1	0,723	0,624	0,225	2,711
1	0	2	1,098	0,006	0,399	3,336
1	0	3	1,482	0,000	0,601	3,948
1	1	0	0,736	6,445	0,228	2,762
1	1	1	1,118	0,179	0,407	3,401
1	1	2	1,510	0,002	0,612	4,026
1	1	3	1,911	0,000	0,838	4,644
1	2	0	1,138	0,627	0,414	3,468
1	2	1	1,538	0,025	0,623	4,108
1	2	2	1,950	0,000	0,854	7,740
1	2	3	2,370	0,000	1,104	5,356
1	3	0	1,568	0,030	0,635	4,194
1	3	1	1,988	0,002	0,871	4,842
1	3	2	2,418	0,000	1,126	5,486
1	3	3	2,860	0,000	1,397	6,126
2	0	0	0,917	31,927	0,288	3,773
2	0	1	1,432	1,120	0,522	4,791
2	0	2	1,990	0,019	0,802	5,832
2	0	3	2,600	0,000	1,123	6,887
2	1	0	1,469	11,963	0,535	4,951
2	1	1	2,046	0,632	0,823	6,037
2	1	2	2,680	0,015	1,156	7,143
2	1	3	3,359	0,000	1,529	8,261
2	2	0	2,106	2,318	0,847	6,261
2	2	1	2,763	1,700	1,191	7,420

**Tabla A1.1 (continuación): Tabla para estimar la concentración de rizobios en el suelo**

Dilución			Factor NMP	Porcentaje de Probabilidad	Intervalo de confianza	
D1	D2	D3			Mínimo	Máximo
2	2	2	3,478	0,005	1,579	8,598
2	2	3	4,240	0,000	2,009	9,782
2	3	0	2,855	0,216	1,229	7,726
2	3	1	3,602	0,021	1,632	8,966
2	3	2	4,408	0,001	2,082	10,217
2	3	3	5,254	0,000	2,574	11,478
3	0	0	2,312	34,098	0,871	12,822
3	0	1	3,850	3,099	1,511	17,662
3	0	2	6,348	0,158	2,434	22,749
3	0	3	9,538	0,004	3,706	27,927
3	1	0	4,272	37,433	1,664	21,327
3	1	1	7,488	6,579	2,777	28,088
3	1	2	11,520	0,649	4,380	35,159
3	1	3	15,878	0,032	6,485	42,502
3	2	0	9,624	32,817	3,331	38,555
3	2	1	14,938	12,507	5,569	50,581
3	2	2	21,470	2,470	8,652	64,067
3	2	3	29,170	0,235	12,543	79,220
3	3	0	23,970	36,594	9,128	139,550
3	3	1	46,208	42,767	17,836	240,763
3	3	2	109,849	44,442	38,227	478,767

## Anexo II: Número de acceso de las secuencias de genes

Tabla A.II.1: Número de acceso para los genes secuenciados

<b>16S rRNA</b>	
<b>Aislamiento</b>	<b>Número de acceso</b>
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NUJ/N-43	MK228877
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/S-02	MK228874
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/N-10	MK228875
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAV/S-15	MK22879
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CUR/N-28	MK228876
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SAA/S-48	MK228878
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CAV/S-14-1	MK228883
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CUR/S-25-2	MK228880
<i>Rhizobium radiobacter</i> NUJ/N-44-1	MK228881
<i>Rhizobium radiobacter</i> NUJ/N-44-2	MK228882
<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> CUR/S-25-1	MK243450
<b>recA</b>	
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NUJ/N-43	MK246834
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/S-02	MK246831
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/N-10	MK246832
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAV/S-15	MK246836
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CUR/N-28	MK246833
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SAA/S-48	MK246835
<b>atpD</b>	
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NUJ/N-43	MK246822
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/S-02	MK246819
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/N-10	MK246820
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAV/S-15	MK246824
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CUR/N-28	MK246821
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SAA/S-48	MK246823
<b>glnII</b>	
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NUJ/N-43	MK246828
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/S-02	MK246825
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAS/N-10	MK246826
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CAV/S-15	MK246830
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CUR/N-28	MK246827
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SAA/S-48	MK246829



### Anexo III: Patógenos de soja

Tabla A.III.1: Características de los hongos patógenos de soja enfrentados a *Trichoderma harzianum* Th5cc

Patógeno	Enfermedad	Síntoma	Importancia relativa
<b><i>Alternaria</i> spp.</b>	Mancha foliar en soja por <i>Alternaria</i>	Causan manchas foliares circulares, grandes, de hasta 25 mm de diámetro, de color oscuro, casi negro, tienen anillos concéntricos con un margen bien definido. Es generalmente un invasor secundario, oportunista, ya que ataca tejidos dañados por efecto mecánico, o por insectos u otras enfermedades.	Moderada
<b><i>Cercospora kikuchii</i></b>	Tizón morado de la hoja y macha púrpura de la semilla	Puede presentar en semillas, tallos, hojas y vainas. Hojas: lesiones de forma variable, angulares e irregulares, localizadas a generalizadas, el rasgo típico es de color morado, bronceado a púrpura. Las hojas superiores manifiestan esta característica con mayor intensidad debido a un pigmento tóxico fotoactivo producido por el hongo (cercosporina). Vainas: manchado generalizado de color morado. Las infecciones severas pueden causar defoliación o senescencia prematura. Semillas: presencia de manchas de color púrpura, y muchas veces, el agrietamiento del tegumento.	Alta. Es la enfermedad foliar de mayor crecimiento en los últimos años en Argentina
<b><i>Phomopsis</i> spp.</b>	Tizón de vaina y el tallo y podredumbre de la semilla	El signo característico es la presencia de picnidios (se observan como puntuaciones negras), en hileras en tallos y dispersos en vainas, los cuales bajo condiciones de alta humedad incrementan su número. La semilla infectada puede presentarse arrugada y muchas veces, cubierta por micelio blanco. Sin embargo, puede tener aspecto normal y estar infectada.	Alta. De gran prevalencia en todas las zonas. Disminuye la calidad de la semilla, generando alta mortandad de plántulas y disminuyendo el poder germinativo.
<b><i>Rhizoctonia</i> spp.</b>	Pudrición de raíz y tallo	El síntoma típico son canchales castaño-rojizos en el cuello de la planta. En ocasiones pueden observarse filamentos amarillentos en el interior y por fuera del tallo. La pudrición basal avanza hacia las raíces y hacia la parte superior de la planta. Los tallos tienden a romperse fácilmente. En plántulas causa <i>damping off</i> de pre y post emergencia. En plantas adultas se observa marchitamiento y muerte en grandes parches de los lotes. Su presencia predomina desde la emergencia hasta V2 y luego en planta adulta después de la floración.	Alta. Produce la muerte de la plántula. Las condiciones climáticas favorables se dan en las fechas de siembra temprana.

La información es un resumen del Herbario Virtual de la cátedra de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Buenos Aires (<http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/>)

**Tabla A.III.1 (continuación): Características de los hongos patógenos de soja enfrentados a *Trichoderma harzianum* Th5cc**

Patógeno	Enfermedad	Síntoma	Importancia relativa
<b><i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b>	Podredumbre húmeda del tallo	Causa podredumbre húmeda de todos los órganos que ataca. Es común observar tallos muertos que se vuelven blanquecinos y quebradizos, con las hojas marchitas y adheridas al tallo. Las lesiones generalmente se observan en la parte media y superior de los tallos. En condiciones de alta humedad, se produce desarrollo miceliar (blanco, de aspecto algodonoso) con formación de esclerocios (cuerpo de resistencia, oscuros y duros) en el interior y exterior. Las vainas pueden quedar vanas o presentar granos pequeños y deformes. La enfermedad puede provocar la muerte de plantas a partir de floración. Los daños están relacionados con el menor número y peso de los granos y la contaminación de los mismo con esclerocios.	Moderada. Causa mayores daños en variedades más ramificadas, con altas densidades de siembra, y ciclos largos.

La información es un resumen del Herbario Virtual de la cátedra de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Buenos Aires (<http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/>)

**Anexo IV: Estructura y ultraestructura de los nódulos al ser coinoculados con *Trichoderma harzianum* Th5cc en concentraciones de  $\text{KNO}_3$**

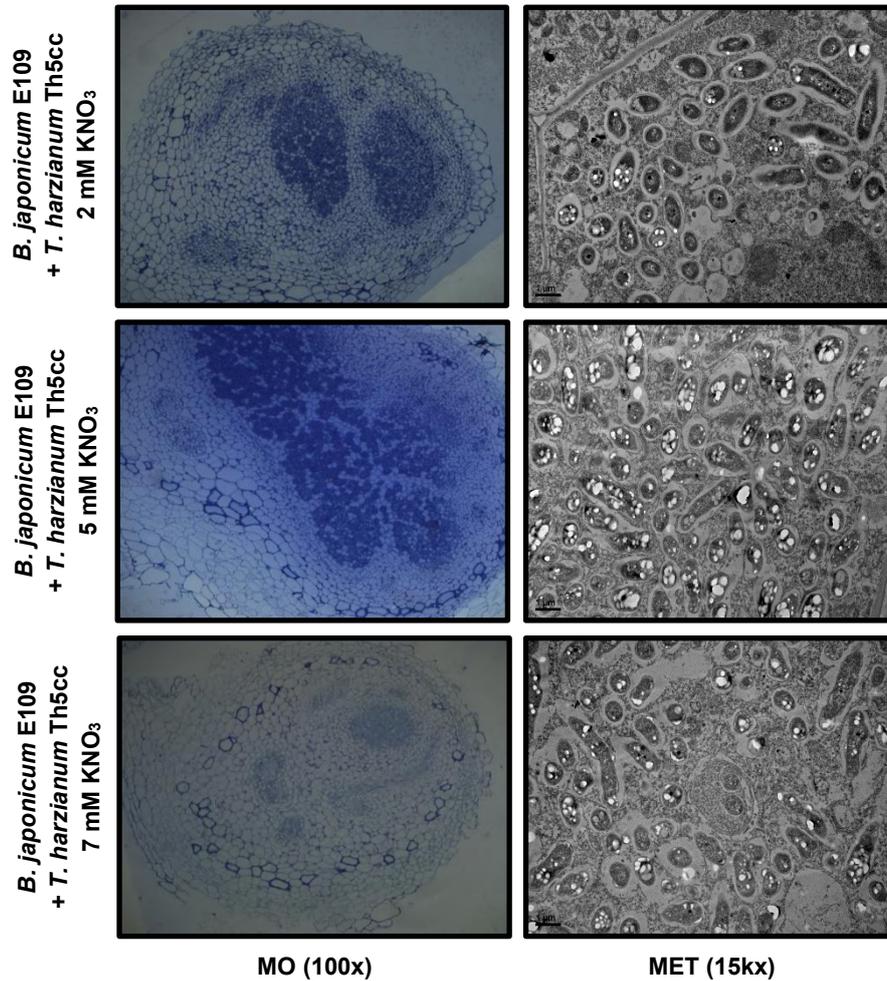


Figura A.IV.1: Estructura y ultraestructura de nódulos coinoculados con *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Trichoderma harzianum* Th5cc con concentraciones crecientes de  $\text{KNO}_3$ . Microscopías ópticas y TEM de los nódulos de soja encontrados en la coinoculación de *B. japonicum* E109 y *T. harzianum* Th5cc en 2, 5 y 7 mM de  $\text{KNO}_3$ .



## Anexo V: Parámetros para ensayos simbióticos con el inoculante granulado

**Tabla VII.4: Recuento de rizobios inoculados en cada tratamiento**

Condición	Rizobios inoculados por maceta
<b>G4</b>	1.28x10 <sup>8</sup> UFC en 0.128 g de inoculante granulado
<b>G5 Sin Secar</b>	8x10 <sup>7</sup> UFC en 0.128 g de inoculante granulado
<b>G5 Secado</b>	2x10 <sup>8</sup> UFC en 0.128 g de inoculante granulado
<b>LP3018</b>	8.46x10 <sup>9</sup> UFC en 1 mL de inoculante líquido
<b>Inoculante comercial</b>	1.57x10 <sup>9</sup> UFC en 1 mL de inoculante líquido

**Tabla VII.8: Número de rizobios de los inoculantes granulados y líquidos**

Condiciones	Rizobios	
	Inoculante granulado (UFC/g)	Inoculante líquido (UFC/mL)
<b>LP3018</b>	10 <sup>9</sup>	1.40x10 <sup>9</sup>
<b>LP3018 + Th5cc</b>	10 <sup>9</sup>	1.63x10 <sup>9</sup>
<b>CAS/N-10</b>	10 <sup>9</sup>	1.85x10 <sup>9</sup>
<b>CAS/N-10 + Th5cc</b>	10 <sup>9</sup>	1.94x10 <sup>9</sup>
<b>CAS/N-10 m<sup>+</sup></b>	10 <sup>9</sup>	2.05x10 <sup>9</sup>
<b>CAS/N-10 m<sup>+</sup> + Th5cc</b>	10 <sup>9</sup>	1.92x10 <sup>9</sup>
<b>Inoculante comercial</b>	-	3.15x10 <sup>9</sup>





**Referencias bibliográficas**



**Referencias bibliográficas**

Acea, M. J., Moore, C. R. and Alexander, M. (1988) 'Survival and growth of bacteria introduced into soil', *Soil Biology and Biochemistry*. Pergamon, 20(4), pp. 509–515. doi: 10.1016/0038-0717(88)90066-1.

Albanesi, A. *et al.* (2013) 'Inoculantes para leguminosas formulados con rizobios', in *Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes*. Buenos Aires, pp. 15–24.

Albareda, M. *et al.* (2008) 'Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations', *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), pp. 2771–2779. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.07.021.

Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N. and Temprano, F. J. (2009) 'Use of *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* for soybean inoculants in South Spain', *European Journal of Agronomy*. Elsevier, 30(3), pp. 205–211. doi: 10.1016/J.EJA.2008.10.002.

Althabegoiti, M. *et al.* (2011) 'Analysis of the role of the two flagella of *Bradyrhizobium japonicum* in competition for nodulation of soybean', *FEMS Microbiology Letters*. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02280.x.

Althabegoiti, M. J. *et al.* (2008) 'Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean', *FEMS Microbiology Letters*, 282(1), pp. 115–123. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01114.x.

Alwathnani, H. A. (2012) 'Biological control of fusarium wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria', *African journal of biotechnology*. Academic Journals, 11(5). doi: 10.5897/ajb11.3361.

Ampomah, O. Y. and Huss-Danell, K. (2011) 'Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden', *Systematic and Applied Microbiology*, 34(4), pp. 267–275. doi: 10.1016/j.syapm.2011.01.006.

Andrews, M. *et al.* (2018) 'Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: Occurrence and importance', *Genes*. MDPI AG. doi: 10.3390/genes9070321.

Angelini, J. *et al.* (2011) 'A study on the prevalence of bacteria that occupy nodules within single peanut plants', *Current Microbiology*, 62(6), pp. 1752–1759. doi: 10.1007/s00284-011-9924-2.

Aserse, A. A. *et al.* (2013) 'Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia', *Applied microbiology and biotechnology*. 2013/10/03. Germany, 97(23), pp. 10117–10134. doi: 10.1007/s00253-013-5248-4.

Bais, H. P. *et al.* (2004) 'How plants communicate using the underground information superhighway', *Trends in plant science*. England, 9(1), pp. 26–32. doi: 10.1016/j.tplants.2003.11.008.

- Barbagelata, P. A. (2011) *Evaluación de fertilizantes fosfatados en soja*.
- Barcellos, F. G. *et al.* (2007) 'Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), pp. 2635–2643. doi: 10.1128/AEM.01823-06.
- Bashan, Y. *et al.* (2014) 'Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013)', *Plant and Soil*, 378(1), pp. 1–33. doi: 10.1007/s11104-013-1956-x.
- Batista, J. S. S. *et al.* (2007) 'Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil', *Microbial Ecology*, 53(2), pp. 270–284. doi: 10.1007/s00248-006-9149-2.
- Bedmar, E. J., Gonzalez, J. and Rodelas, B. (2006) 'Inoculantes de *Rhizobium*: tipos, soportes sólidos e inoculación de semillas.', *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones*.
- Bell, D. K., Wells, H. D. and Markham, C. R. (1980) 'In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens', *Phytopathology*, 72(4), pp. 379–383.
- Benítez, T. *et al.* (2004) 'Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains', *International Microbiology*, (7), pp. 249–260. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/8065870>.
- Berg, G. and Smalla, K. (2009) 'Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere', *FEMS microbiology ecology*. 2009/02/25. England, 68(1), pp. 1–13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- Van Berkum, P. *et al.* (2003) 'Discordant phylogenies within the *rrn* loci of *Rhizobia*', *Journal of Bacteriology*, 185(10), pp. 2988–2998. doi: 10.1128/JB.185.10.2988-2998.2003.
- Bhuvaneswari, T. V, Turgeon, B. G. and Bauer, W. D. (1980) *Early Events in the Infection of Soybean (Glycine max L. Merr) by Rhizobium japonicum I. Localization of infectible root cells*, *Plant Physiol.*
- Blagodatskaya, E. and Kuzyakov, Y. (2013) 'Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches', *Soil Biology and Biochemistry*. Pergamon, 67, pp. 192–211. doi: 10.1016/J.SOILBIO.2013.08.024.
- Bontemps, C. *et al.* (2010) '*Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes', *Molecular ecology*. 2009/12/10. England, 19(1), pp. 44–52. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x.
- Brechenmacher, L. *et al.* (2008) 'Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*', *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*. United States, 21(5), pp. 631–645. doi: 10.1094/MPMI-21-5-0631.

Broughton, W. J., Jabbouri, S. and Perret, X. (2000) 'Keys to symbiotic harmony', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 182(20), pp. 5641–5652. doi: 10.1128/jb.182.20.5641-5652.2000.

Caba, J. M. *et al.* (2000) 'Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type', *Planta*, (211), pp. 98–104.

Carroll, B. J. and Gresshoff, P. M. (1983) 'Nitrate Inhibition of Nodulation and Nitrogen Fixation in White Clover', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 110(1), pp. 77–88. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(83\)80218-9](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(83)80218-9).

Castro-Sowinski, S. *et al.* (2007) 'Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms', *FEMS Microbiology Letters*, pp. 1–11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00878.x.

Cederlund, H. *et al.* (2014) 'Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla', *Applied Soil Ecology*, 84, pp. 62–68. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.06.003.

Chen, L. S. *et al.* (2002) 'Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay', *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), pp. 448–457. doi: 10.1007/s00374-002-0493-1.

Chibeba, A. M. *et al.* (2017) 'Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique', *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Elsevier B.V., 246, pp. 291–305. doi: 10.1016/j.agee.2017.06.017.

Coba de la Peña, T. *et al.* (2018) 'The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle?', *Frontiers in plant science*. Frontiers Media S.A., 8, p. 2229. doi: 10.3389/fpls.2017.02229.

Cook, R. J. and Baker, K. F. (1983) *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.

Cooper, J. E. (2007) 'Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 103(5), pp. 1355–1365. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x.

Cooper, J. E. and Feil, E. J. (2004) 'Multilocus sequence typing - What is resolved?', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 12(8), pp. 373–377. doi: 10.1016/j.tim.2004.06.003.

Cordo, C. A. *et al.* (2007) 'Trichoderma spp. as elicitors of wheat plant defense responses against Septoria tritici', *Biocontrol Science and Technology*, 17(7), pp. 687–698. doi: 10.1080/09583150701527094.

Coronado, C. *et al.* (1995) 'Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated', *Plant Physiology*, 108(2), p. 533. doi: 10.1104/pp.108.2.533.

Covelli, J. M. *et al.* (2013) 'Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*', *Research in Microbiology*, 164(2), pp. 136–144. doi: 10.1016/j.resmic.2012.10.014.

Covelli, J. M. (2015) Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación. Universidad Nacional de La Plata. doi: <https://doi.org/10.35537/10915/27577>.

Danielson, R. M. and Davey, C. B. (1973) Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*, *Soil Bid. Biochem.* Pergamon Press.

Day, J. M. and Williams, P. M. (1988) 'European Patent Application 0286351A2'.

Delamuta, J. R. M. *et al.* (2012) 'Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: Revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria', *Brazilian Journal of Microbiology*, pp. 698–710. Available at: <http://www.bmrc.lncc.br>.

Deveau, A. *et al.* (2018) 'Bacterial-fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges', *FEMS microbiology reviews*. England, 42(3), pp. 335–352. doi: 10.1093/femsre/fuy008.

Druzhinina, I. S. *et al.* (2011) 'Trichoderma: The genomics of opportunistic success', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 749–759. doi: 10.1038/nrmicro2637.

Dubey, S. C., Suresh, M. and Singh, B. (2007) 'Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt', *Biological Control*, 40(1), pp. 118–127. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.06.006.

Elad Y and Chet, I. (1983) 'Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp.', *Phytoparasitica*, 11(1), pp. 55–58.

Estrella, M. J. *et al.* (2009) 'Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina)', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), pp. 1088–1098. doi: 10.1128/AEM.02405-08.

Ferguson, B. J. *et al.* (2010) 'Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation', *Journal of Integrative Plant Biology*, pp. 61–76. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x.

Ferguson, B. J. *et al.* (2019) 'Legume nodulation: The host controls the party', *Plant, Cell & Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, 42(1), pp. 41–51. doi: 10.1111/pce.13348.

Ferraris, G. N. *et al.* (2012) Introducción Efectos de diferentes estrategias de fertilización sobre los rendimientos y el balance de nutrientes.

Ferreira, L. *et al.* (2011) 'MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *rhizobiaceae*', *PLoS ONE*, 6(5). doi: 10.1371/journal.pone.0020223.

Fierer, N. *et al.* (2009) 'Global patterns in belowground communities', *Ecology letters*. 2009/08/11. England, 12(11), pp. 1238–1249. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01360.x.

Fierer, N. (2017) 'Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 579–590. doi: 10.1038/nrmicro.2017.87.

Fischer, H. M. (1994) 'Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia', *Microbiological reviews*, 58(3), pp. 352–386. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7968919>.

Fischer, S. G. and Lerman, L. S. (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory (screening for mutation/gel electrophoresis/helix-coil transition/A phage/restriction fragment), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.

Fujikake, H. *et al.* (2002) 'Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N<sub>2</sub> fixation activity in soybean (glycine max (l.) merr.)', *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(2), pp. 211–217. doi: 10.1080/00380768.2002.10409193.

Garrido-Sanz, D. *et al.* (2019) 'Phylogenomic analyses of *Bradyrhizobium* reveal uneven distribution of the lateral and subpolar flagellar systems, which extends to rhizobiales', *Microorganisms*. MDPI AG, 7(2). doi: 10.3390/microorganisms7020050.

Gault, R. R. and Schwinghamer, E. A. (1993) 'Direct isolation of *Bradyrhizobium japonicum* from soil', *Soil Biology and Biochemistry*. Pergamon, 25(9), pp. 1161–1166. doi: 10.1016/0038-0717(93)90210-3.

Godoy, D. *et al.* (2003) 'Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), pp. 2068–2079. doi: 10.1128/JCM.41.5.2068-2079.2003.

Gomes Germano, M. *et al.* (2006) 'RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobial* strains from 33 legume species', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), pp. 217–229. doi: 10.1099/ijs.0.02917-0.

Gordon, S. A. and Weber, R. P. (1951) *Colorimetric estimation of indoleacetic acid*.

Götz, R. *et al.* (1982) 'Motility and Chemotaxis in Two Strains of *Rhizobium* with Complex Flagella', *Journal of General Microbiology*, 128, pp. 789–798.

Grange, L. and Hungria, M. (2004) 'Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems', *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), pp. 1389–1398. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.03.005.

Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R. J. (2007) 'Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA)', *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), pp. 1968–1977. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.02.015.

Gyaneshwar, P. *et al.* (2011) 'Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects', *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*. United States, 24(11), pp. 1276–1288. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0172.

Halbleib, C. M. and Ludden, P. W. (2000) 'Regulation of biological nitrogen fixation', *The Journal of nutrition*. United States, 130(5), pp. 1081–1084. doi: 10.1093/jn/130.5.1081.

Harman, G. E. (2000) 'Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22', *Plant Disease*. American Phytopathological Society, pp. 377–393. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.4.377.

Harman, G. E. *et al.* (2004a) '*Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 43–56. doi: 10.1038/nrmicro797.

Harshey, R. M. (2003) 'Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal', *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews, 57(1), pp. 249–273. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.

Haukka, K., Lindström, K. and Young, J. P. (1998) 'Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 64(2), pp. 419–426. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9464375>.

van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D. and van Straalen, N. M. (2008) 'The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems', *Ecology letters*. 2007/11/29. England, 11(3), pp. 296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.

Hermosa, R. *et al.* (2012) 'Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes', *Microbiology*. doi: 10.1099/mic.0.052274-0.

Hirsch, A. M. *et al.* (1989) 'Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(4), pp. 1244–1248. doi: 10.1073/pnas.86.4.1244.

Hitchcock, A. S. and Green, M. L. . (1947) 'Species lectotypicae generum Linnaei.', *Brittonia*, 6, p. 114–118.

Hoben, H. J. and Somasegaran, P. (1982) 'Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat', *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), pp. 1246–1247.

Horiuchi, J. *et al.* (2005) 'Horiuchi J, Prithiviraj B, Bais HP, Kimball BA, Vivanco JM.. Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and *Rhizobium* bacteria. *Planta* 222: 848-857', *Planta*, 222, pp. 848–857. doi: 10.1007/s00425-005-0025-y.

Hossain, M. M., Sultana, F. and Islam, S. (2017) 'Plant growth-promoting fungi (PGPF): Phytostimulation and induced systemic resistance', in *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer Singapore, pp. 135–191. doi: 10.1007/978-981-10-6593-4\_6.

Howieson, J. G., Dilworth, M. J. and Australian Centre for International Agricultural Research (2006) *Working with rhizobia*.

Hu, T. . (1963) 'Discourse on the character shu (soybeans).', in *Essays on Chinese literature and history*. Shangha, pp. 11–115.

Hymowitz, T. (1970) 'On the domestication of the soybean', *Economic Botany*, 24(4), pp. 408–421. doi: 10.1007/BF02860745.

Ivancovich, A. (2013) *Enfermedades de soja: Diagnóstico y Manejo*. INTA Pergamino: Instituto de Tecnología Agropecuaria. Available at: <http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/fitopatologia/wp-content/uploads/sites/30/2018/03/Enfermedades-de-soja.-Diagnostico-y-manejo..pdf>.

Jaccard, P. (1912) 'The distribution of the flora in the alpine zone', *The new phytologist*, XI(2), pp. 37–50. doi: 10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x.

Jaklitsch, W. M. (2009) 'European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species', *Studies in mycology*. CBS Fungal Biodiversity Centre, 63, pp. 1–91. doi: 10.3114/sim.2009.63.01.

Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985) 'Individual-specific "fingerprints" of human DNA', *Nature*. England, 316(6023), pp. 76–79. doi: 10.1038/316076a0.

Jin, J., Watt, M. and Mathesius, U. (2012) 'The Autoregulation Gene SUNN Mediates Changes in Root Organ Formation in Response to Nitrogen through Alteration of Shoot-to-Root Auxin Transport', *PLANT PHYSIOLOGY*. doi: 10.1104/pp.112.194993.

Kamala, T. (2012) 'Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*', *African Journal of Biotechnology*. Academic Journals, 11(34). doi: 10.5897/ajb11.1938.

Kanbe, M. *et al.* (2007) 'Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*', *Journal of Bacteriology*, 189(3), pp. 1083–1089. doi: 10.1128/JB.01405-06.

Kapat, A., Rakshit, S. K. and Panda, T. (1996) 'Optimization of carbon and nitrogen sources in the medium and environmental factors for enhanced production of chitinase by *Trichoderma harzianum*', *Bioprocess Engineering*. Springer Verlag, 15(1), pp. 13–20. doi: 10.1007/BF00435522.

Katoch, M. *et al.* (2019) '*Trichoderma lixii* (IIIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols', *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd., 19(1). doi: 10.1186/s12866-019-1477-8.

Koeth, T., Versalovic, J. and Lupski, J. R. (1995) 'Differential Subsequence Conservation of Interspersed Repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX Elements in Diverse Bacteria', *Genome Reserch*.

Kohlen, W. *et al.* (2017) 'Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: Indeterminate and determinate nodules', *Journal of experimental botany*, 69. doi: 10.1093/jxb/erx308.

Kohlmeier, S., Smits, T. H. M., *et al.* (2005) 'Taking the fungal highway: Mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi', *Environmental Science and Technology*, 39(12), pp. 4640–4646. doi: 10.1021/es047979z.

Kong, Z. *et al.* (2018) 'Trichoderma diones A and B from the solid culture of *Trichoderma atroviride* S361, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei*', *Fitoterapia*. 2018/04/04. Netherlands, 127, pp. 362–366. doi: 10.1016/j.fitote.2018.04.004.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular biology and evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Kuzma, M. M., Topunov, A. F. and Layzell, D. B. (1995) 'Effects of Temperature on Infected Cell O<sub>2</sub> Concentration and Adenylate Levels in Attached Soybean Nodules', *Plant physiology*, 107(4), pp. 1209–1216. doi: 10.1104/pp.107.4.1209.

Kuzyakov, Y. and Blagodatskaya, E. (2015) 'Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review', *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd, pp. 184–199. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.025.

Laemmli UK. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature*, 227(227), pp. 680–685. doi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

Laguerre, G. *et al.* (1994) Rapid Identification of *Rhizobia* by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes, *Applied and environmental microbiology*.

Leach, J. E. *et al.* (2017) 'Communication in the Phytobiome', *Cell*. United States, 169(4), pp. 587–596. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.025.

Leigh, J. A. (2000) 'Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective', *Current issues in molecular biology*. England, 2(4), pp. 125–131. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11471757>.

Libault, M. (2018) 'Transcriptional Reprogramming of Legume Genomes: Perspective and Challenges Associated With Single-Cell and Single Cell-Type Approaches During Nodule Development', *Frontiers in plant science*. Frontiers Media S.A., 9, p. 1600. doi: 10.3389/fpls.2018.01600.

Lison, L., Lema, A. A. and Magaldi, R. (1976) Estadística aplicada a la biología experimental: Planificación de experiencias y análisis de resultados. Buenos Aires.: EUDEBA.

Liu, H. *et al.* (2018) 'Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis', *Journal of Integrative Plant Biology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 632–648. doi: 10.1111/jipb.12653.

Lodeiro, A. R. *et al.* (2000) 'Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin', *FEMS Microbiology Letters*. doi: 10.1016/S0378-1097(00)00232-9.

Lodeiro, A. R. (2015) 'Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp.', *Rev Argent Microbiol*, 47(3), pp. 261–273. doi: 10.1016/j.ram.2015.06.006.

López-García, S. L. *et al.* (2002) 'Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean', *Environmental Microbiology*, 4(4), pp. 216–224. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00287.x.

López-García, S. L. *et al.* (2009) 'In-furrow inoculation and selection for higher motility enhances the efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* nodulation', *Agronomy Journal*. doi: 10.2134/agronj2008.0155x.

Loureiro, M. D. F. *et al.* (2007) 'Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements', *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), pp. 665–674. doi: 10.1007/s00374-006-0146-x.

Lucy, M., Reed, E. and Glick, B. R. (2004) 'Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria', *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), pp. 1–25. doi: 10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e.

Maiden, M. C. J. *et al.* (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms . Available at: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).

Mariani, D. D. *et al.* (2004) Optimización del proceso de obtención de inoculantes líquidos para alfalfa, Rizobacter Argentina S.A.-*Ruta*.

Martínez-Hidalgo, P. and Hirsch, A. M. (2017) 'The Nodule Microbiome: N<sub>2</sub>-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone', *Phytobiomes Journal*. Scientific Societies, 1(2), pp. 70–82. doi: 10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW.

Martínez Alvarez, D. (2012) Historia de la soja en la Argentina: Introducción y adopción del cultivo.

Masunaka, A., Hyakumachi, M. and Takenaka, S. (2011) 'Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization n/in the roots of *Lotus japonicus*', *Microbes and Environments*, 26(2), pp. 128–134. doi: 10.1264/jsme2.ME10176.

Matamoros, M. A. *et al.* (1999) 'Stress-Induced Legume Root Nodule Senescence. Physiological, Biochemical, and Structural Alterations', *Plant Physiology*, 121(1), p. 97. doi: 10.1104/pp.121.1.97.

Mathesius, U. *et al.* (1998) 'Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides', *The Plant journal : for cell and molecular biology*. England, 14(1), pp. 23–34. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00090.x.

McCasland, M. *et al.* (1985) 'Nitrate: Health effects in drinking water.' Ithaca, NY: Cornell Cooperative Extension.

Melchiorre, M. *et al.* (2011) 'Evaluation of *Bradyrhizobia* strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants', *Biology and Fertility of Soils*. doi: 10.1007/s00374-010-0503-7.

Mengucci, F. *et al.* (2019) 'Characterization of FliL proteins in *Bradyrhizobium diazoefficiens* : lateral FliL supports swimming motility, and subpolar FliL modulates the lateral flagella system', *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/JB.00708-19.

Menna, P. *et al.* (2006) 'Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants', *Systematic and Applied Microbiology*. Elsevier GmbH, 29(4), pp. 315–332. doi: 10.1016/j.syapm.2005.12.002.

Menna, P., Barcellos, F. G. and Hungria, M. (2009) 'Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of **Bradyrhizobium** strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(12), pp. 2934–2950. doi: 10.1099/ijs.0.009779-0.

Mergaert, P., Van Montagu, M. and Holsters, M. (1997) 'Molecular mechanisms of Nod factor diversity', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 25(5), pp. 811–817. doi: 10.1111/j.1365-2958.1997.mmi526.x.

Minamisawa, K. *et al.* (2002) Horizontal Transfer of Nodulation Genes in Soils and Microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. elkanii*. Available at: <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsme2/>.

Monte, E. (2001) 'Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology.', *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, pp. 1–4. doi: 10.1007/s101230100001.

Montgomery, D. (2012) *Dirt The Erosion of Civilizations*.

Moore, D. (David), Robson, G. D. (Geoffrey D. . and Trinci, A. P. J. (2011) 21st century guidebook to fungi. Cambridge University Press.

Moulin, L. *et al.* (2004) 'Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus', *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Academic Press Inc., 30(3), pp. 720–732. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00255-0.

Muresu, R. *et al.* (2008) 'Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes', *FEMS microbiology ecology*. 2008/01/09. England, 63(3), pp. 383–400. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x.

Naseby, D. C., Pascual, J. A. and Lynch, J. M. (2000) Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities, *Journal of Applied Microbiology*.

Nelson, L. (2004) 'Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants', *Crop Management*, 3. doi: 10.1094/CM-2004-0301-05-RV.

Ng, J. L. P. *et al.* (2015) 'Flavonoids and Auxin Transport Inhibitors Rescue Symbiotic Nodulation in the *Medicago truncatula* Cytokinin Perception Mutant *cre1*', *The Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.15.00231.

Nishida, H. and Suzaki, T. (2018) 'Two Negative Regulatory Systems of Root Nodule Symbiosis: How Are Symbiotic Benefits and Costs Balanced?', *Plant and Cell Physiology*. Oxford University Press, pp. 1733–1738. doi: 10.1093/pcp/pcy102.

van Noorden, G. E. *et al.* (2007) 'Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*', *Plant physiology*. 2007/04/27. American Society of Plant Biologists, 144(2), pp. 1115–1131. doi: 10.1104/pp.107.099978.

Oliverio, A. M., Bradford, M. A. and Fierer, N. (2017) 'Identifying the microbial taxa that consistently respond to soil warming across time and space', *Global change biology*. 2016/11/28. England, 23(5), pp. 2117–2129. doi: 10.1111/gcb.13557.

Or, D. *et al.* (2007) 'Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media - a review', *Advances in Water Resources*, 30(6–7), pp. 1505–1527. doi: 10.1016/j.advwatres.2006.05.025.

Ott, T. *et al.* (2005) 'Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development', *Current biology : CB*. England, 15(6), pp. 531–535. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.042.

van Overbeek, L. S. and Saikonen, K. (2016) 'Impact of Bacterial-Fungal Interactions on the Colonization of the Endosphere', *Trends in plant science*. 2016/01/25. England, 21(3), pp. 230–242. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.003.

Pal, K. K. and McSpadden Gardener, B. (2006) 'Biological Control of Plant Pathogens', *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Papavizas, G. (1982) 'Evaluation of New Biotypes of *Trichoderma harzianum* for Tolerance to Benomyl and Enhanced Biocontrol Capabilities', *Phytopathology*, 72, p. 126. doi: 10.1094/Phyto-77-126.

Parker, M. A. (2004) *rRNA* and *dnaK* relationships of *Bradyrhizobium sp.* Nodule Bacteria from four *Papilionoid* legume trees in Costa Rica, *System. Appl. Microbiol.* Available at: <http://www.elsevier.de/syapm>.

Patil, A. S., Patil, S. R. and Paikrao, H. M. (2016) 'Trichoderma Secondary Metabolites: Their Biochemistry and Possible Role in Disease Management', in Choudhary, D. K. and Varma, A. (eds) *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. Singapore: Springer Singapore, pp. 69–102. doi: 10.1007/978-981-10-0388-2\_6.

Patriarca, E. J. *et al.* (2004) 'Organogenesis of Legume Root Nodules', *International Review of Cytology*. doi: 10.1016/S0074-7696(04)34005-2.

Pérez-Giménez, J., Quelas, J. I. and Lodeiro, A. R. (2011) 'Competition for Nodulation', in Prof. Hany El-Shemy (ed.) *Soybean Physiology and Biochemistry*. InTech, p. 488. Available at: <http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase>.

Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J. (2000) 'Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 64(1), pp. 180–201. doi: 10.1128/mmbr.64.1.180-201.2000.

Pett-Ridge, J. and Firestone, M. K. (2005) 'Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), pp. 6998–7007. doi: 10.1128/AEM.71.11.6998-7007.2005.

Philippot, L. *et al.* (2013) 'Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere', *Nature reviews. Microbiology*. 2013/09/23. England, 11(11), pp. 789–799. doi: 10.1038/nrmicro3109.

Piccinetti, C. F. *et al.* (2013) Positive effects of inoculation of soybean on nodulation, bnf and the parameters of crop production. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/283591773>.

Pieterse, C. M. J. *et al.* (2014) 'Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes', *Annual Review of Phytopathology*. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.

Qin Li, Q. *et al.* (2011) 'Diversity and Biogeography of Rhizobia Isolated from Root Nodules of Glycine max Grown', *Ecology*, 61(4), pp. 917–931. doi: 10.1007/S00248-01.

Quelas, J. I. *et al.* (2006) 'Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots', *Archives of microbiology*. 2006/06/21. Germany, 186(2), pp. 119–128. doi: 10.1007/s00203-006-0127-3.

Quelas, J. I. *et al.* (2016) 'Swimming performance of *Bradyrhizobium diazoefficiens* is an emergent property of its two flagellar systems', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep23841.

Quiza, L., St-Arnaud, M. and Yergeau, E. (2015) 'Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering', *Frontiers in Plant Science*, 6, p. 507. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00507>.

Rademaker, J. L. W. *et al.* (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Rajendran, G., Patel, M. H. and Joshi, S. J. (2012) 'Isolation and Characterization of Nodule-Associated *Exiguobacterium* sp. from the Root Nodules of *Fenugreek* (*Trigonella foenum-graecum*) and Their Possible Role in Plant Growth Promotion', *International Journal of Microbiology*. Edited by D. Daffonchio. Hindawi Publishing Corporation, 2012, p. 693982. doi: 10.1155/2012/693982.

REDCAI (2006) 'Documento de procedimientos N° 1', pp. 1–14.

Reid, D. E., Ferguson, B. J. and Gresshoff, P. M. (2011) 'Inoculation-and Nitrate-Induced CLE Peptides of Soybean Control NARK-Dependent Nodule Formation', *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 606(5), pp. 606–618. doi: 10.1094.

Ribeiro, R. A. *et al.* (2009) 'Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity', *Research in Microbiology*, 160(4), pp. 297–306. doi: 10.1016/j.resmic.2009.03.009.

Rinu, K., Sati, P. and Pandey, A. (2014) '*Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): a newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain', *Journal of basic microbiology*. 2013/04/08. Germany, 54(5), pp. 408–417. doi: 10.1002/jobm.201200579.

Ronchi, A. L., Grassano, A. and Balatti, A. P. (1996) 'Obtención de biomasa de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*: Influencia de la concentración de nutrientes y de la aeración Biomass production of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains: effect of media nutrient concentration and aeration', *Rev. Fac. Agronomía*, 9(6300)., 9(6300).

Rosenthal, L. M. *et al.* (2017) 'Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal', *Mycologia*. 2017/01/19. England, 109(1), pp. 115–127. doi: 10.1080/00275514.2017.1281677.

Russo, M. L. *et al.* (2018) 'Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield', *Journal of King Saud University - Science*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jksus.2018.04.008.

Sadowsky, M. J. *et al.* (1987) 'Genetic Diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Serogroup 123 and Its Relation to Genotype-Specific Nodulation of Soybean', *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 53(11), pp. 2624–2630.

Saito, A. *et al.* (2014) 'Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) merr.)', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 15(3), pp. 4464–4480. doi: 10.3390/ijms15034464.

Salcedo, S. and Guzmán. Lya (2014) *Agricultura Familiar en América Latina y el Caribe: Recomendaciones de Política*. Santiago, Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura . Available at: [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications).

Salvagiotti, F. *et al.* (2016) 'Para mejorar la producción 54-inta eea Oliveros 2016', in *Para mejorar la producción*. INTA - EEA Oliveros, pp. 129–136.

Sarwar, A. *et al.* (2018) 'Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease', *Microbiological research*. 2018/02/15. Germany, 209, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.006.

Scheublin, T. R. *et al.* (2004) 'Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 70(10), pp. 6240–6246. doi: 10.1128/AEM.70.10.6240-6246.2004.

Schlaman, H. R. *et al.* (1997) 'Chitin oligosaccharides can induce cortical cell division in roots of *Vicia sativa* when delivered by ballistic microtargeting', *Development (Cambridge, England)*. England, 124(23), pp. 4887–4895. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9428425>.

Schwartz, A. *et al.* (2013) 'Bacillus simplex—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*', *Agronomy*. MDPI AG, 3(4), pp. 595–620. doi: 10.3390/agronomy3040595.

Serna-Chavez, H. M., Fierer, N. and van Bodegom, P. M. (2013) 'Global drivers and patterns of microbial abundance in soil', *Global Ecology and Biogeography*. John Wiley & Sons, Ltd, 22(10), pp. 1162–1172. doi: 10.1111/geb.12070.

Shahid, D. M. (2014) 'In vitro Growth Performance of *Trichoderma* species and Antagonistic activity against Soil Borne Pathogens', *International Journal of Science and Research*. 3(7): 672-675., 3, p. 672–675.

Shukla, N. *et al.* (2012) 'Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress', *Plant physiology and biochemistry: PPB*. 2012/02/08. France, 54, pp. 78–88. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.001.

Shurtleff, W. and Aoyagi, A. (2014) *Early history of soybeans and soyfoods worldwide: extensively annotated bibliography and sourcebook*. Lafayette.

Simon, A. *et al.* (2015) 'Exploiting the fungal highway: Development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium', *FEMS Microbiology Ecology*. doi: 10.1093/femsec/fiv116.

Sneath, P. H. and Sokal, R. (1975) *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco.

Somasegaran, P. and Hoben, H. J. (1985) *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. University of Hawaii NifTAL Project.

Stahl, Y. and Simon, R. (2012) 'Peptides and receptors controlling root development', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, pp. 1453–1460. doi: 10.1098/rstb.2011.0235.

Stępkowski, T. *et al.* (2005) 'European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa', *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.71.11.7041-7052.2005.

Stocco, M. (2014) *Control biológico de *Mycosphaerella graminicola**. Universidad Nacional de La Plata. doi: <https://doi.org/10.35537/10915/42904>.

Stocco, M. C. *et al.* (2016) 'Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of Septoria leaf blotch of wheat', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s11274-015-1989-9.

Streeter, J. G. (1985) Nitrate Inhibition of Legume Nodule Growth and Activity' II. Short term studies with high nitrate supply, *Plant Physiol.*

Sturz, A. V, Christie, B. R. and Nowak, J. (2000) 'Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production', *Critical Reviews in Plant Sciences*. Taylor & Francis, 19(1), pp. 1–30. doi: 10.1080/07352680091139169.

Sul, W. J. *et al.* (2013) 'Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon', *Soil Biology and Biochemistry*, 65, pp. 33–38. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.007.

Sun, M. *et al.* (2011) 'Motor-driven intracellular transport powers bacterial gliding motility', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), pp. 7559–7564. doi: 10.1073/pnas.1101101108.

Suominen, L. *et al.* (2001) 'Identification and Structure of the *Rhizobium galegae* Common Nodulation Genes: Evidence for Horizontal Gene Transfer', *Mol. Biol. Evol.*, 18(6), pp. 907–916. Available at: <https://academic.oup.com/mbe/article-abstract/18/6/907/1046903>.

Suzaki, T. *et al.* (2012) 'Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response', *Development*, 139(21), p. 3997. doi: 10.1242/dev.084079.

Takanashi, K., Sugiyama, A. and Yazaki, K. (2011) 'Involvement of auxin distribution in root nodule development of *Lotus japonicus*', *Planta*, 234, pp. 73–81. doi: 10.1007/s00425-011-1385-0.

Tejeda Rodríguez, A., Copati, E. J. and Brihet, J. (2019) 'Informe de Pre-Campaña N° 30: Soja 2019/20'. Buenos Aires: Bolsa de Cereales, pp. 1–9. Available at: <http://www.bolsadecereales.com/descargar-documento1-104/informes-descargar>.

Tesfaye, M. and Holl, F. B. (1998) Group-specific differentiation of *Rhizobium* from clover species by PCR amplification of 23S rDNA sequences.

Thomas-Oates, J. *et al.* (2003) A Catalogue of Molecular, Physiological and Symbiotic Properties of Soybean-Nodulating Rhizobial Strains from Different Soybean Cropping Areas of China, *System. Appl. Microbiol.* Available at: <http://www.urbanfischer.de/journals/sam>.

Thornton, H. G. (1936) 'The action of sodium nitrate upon the infection of *Lucerne* root-hairs by nodule bacteria', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*. The Royal Society, 119(815), pp. 474–492. doi: 10.1098/rspb.1936.0017.

Udvardi, M. and Poole, P. S. (2013) 'Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses', *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews, 64(1), pp. 781–805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.

Usman Ghazanfar, M. *et al.* (2018) '*Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review', *Plant Protection*, p. 109. Available at: <http://esciencepress.net/journals/PP>.

Valera, C. L. and Alexander, M. (1965) 'Reversal of Nitrate Inhibition of Nodulation by Indolyl-3-acetic Acid', *Nature*, 206(4981), p. 326. doi: 10.1038/206326a0.

Vance, C. (2008) 'Carbon and Nitrogen Metabolism in Legume Nodules', in *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, pp. 293–320. doi: 10.1007/978-1-4020-3548-7\_10.

Velázquez, E., Martínez-Hidalgo, P., Carro, L., Alonso, P., Peix, A., Trujillo, M. E., and Martínez-Molina, E. (2013) 'Nodular endophytes: An untapped diversity.', in *Beneficial Plant Microbial Interactions: Ecology and Applications*. . Florida. CRC Press, Boca Raton, pp. 215–236. doi: <https://doi.org/10.1201/b15251-11>.

Versalovic, J., De Bruijn, F. J. and Lupski, J. R. (1994) Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes. *Bacterial Genomes*. doi: 10.1007/978-1-4615-6369-3\_34.

Via, V. D., Zanetti, M. E. and Blanco, F. (2016) 'How legumes recognize rhizobia', *Plant signaling & behavior*. Taylor & Francis, 11(2), pp. e1120396–e1120396. doi: 10.1080/15592324.2015.1120396.

Vicario, J. C., Dardanelli, M. S. and Giordano, W. (2015) 'Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia', *FEMS Microbiology Letters*, 362, pp. 1–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnu038>.

Vincent, J. (1970) 'A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria (IBP Handbuch No. 15 des International Biology Program, London). XI u. 164 S., 10 Abb., 17 Tab., 7 Taf. Oxford-Edinburgh 1970: Blackwell Scientific Publ., 45 s', in *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, pp. 440–440. doi: 10.1002/jobm.19720120524.

Vinuesa, P. *et al.* (1998) Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing, *Applied and environmental microbiology*. Available at: <http://aem.asm.org/>.

Vos, C. M. F. *et al.* (2015) 'The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease', *Molecular Plant Pathology*. Blackwell Publishing Ltd, 16(4), pp. 400–412. doi: 10.1111/mpp.12189.

Walker, T. S. *et al.* (2003) 'Root Exudation and Rhizosphere Biology', *Plant Physiology*, 132(1), p. 44. doi: 10.1104/pp.102.019661.

Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. (1991) 'Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material', *BioTechniques*. doi: 10.2144/000114018.

Weindling, R. (1934) 'Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi.(Studii sul principio tossico che agisce nel parassitismo del *Trichoderma lignorum* sopra le *Rhizoctonia solani* ed altri funghi del terreno).', *Phytopathology*, 24: 1153-1179, (24), pp. 1153–1179.

Weisburg, W. G. *et al.* (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *Journal of bacteriology*.

Willems, A. *et al.* (2001) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Williams, J. G. K. *et al.* (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*.

Wilson, C. L. *et al.* (1991) 'Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides', *Crop Protection*. Elsevier, 10(3), pp. 172–177. doi: 10.1016/0261-2194(91)90039-T.

Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution, *Microbiological reviews*.

Wösten, H. A. (2001) 'Hydrophobins: multipurpose proteins', *Annual review of microbiology*. United States, 55, pp. 625–646. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.625.

Wu, L. J. *et al.* (2011) 'Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (**Glycine soja** Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China', *FEMS Microbiology Ecology*. Blackwell Publishing Ltd, 76(3), pp. 439–450. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01064.x.

Young, I. M. and Crawford, J. W. (2004) 'Interactions and self-organization in the soil-microbe complex', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 304(5677), pp. 1634–1637. doi: 10.1126/science.1097394.

Zahran, H. H. (1999) 'Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology, 63(4), pp. 968–989. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10585971>.

Zhang, F. *et al.* (2016) 'Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 100, pp. 64–74. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.12.017.

Zhang, N. *et al.* (2012) 'Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43', *Microbiological Research*. doi: 10.1016/j.micres.2011.06.002.

Zhang, S., Gan, Y. and Xu, B. (2016) 'Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation, 7(September). doi: 10.3389/fpls.2016.01405.

Zhang, W. *et al.* (2020) 'Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation', *ISME Journal*. Springer Nature. doi: 10.1038/s41396-020-0587-5.

Zhao, J. *et al.* (2019) 'Biocontrol potential of *Microbacterium maritopicum* Sneb159 against *Heterodera glycines*', *Pest management science*. 2019/08/21. England, 75(12), pp. 3381–3391. doi: 10.1002/ps.5546.





Florencia Mengucci, Esteban Tomás Iturralde, Carolina Dardis, Valeria Hegel y Florencia Lamenza (2015)





Julieta Pérez Giménez y Esteban Tomás Iturralde (2018)





