



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**

**Universidad Nacional de La Plata**

**Tesis de Grado**

**Carrera Ingeniería Agronómica**

**Los genes de resistencia modifican la capacidad de  
nodulación de los bradyrizobios en los cultivares de  
soja.**

**Alumno:** Juan Pablo Peyran

**Legajo:** 25767/0

**Director:** Ph. D. Pedro A. Balatti

**Codirectora:** Dra. Silvina M. Y. López

**Fecha:** 01/12/2016



## RESUMEN

El sistema de respuestas de la planta a los patógenos, no está bien estudiado en las leguminosas. Esto sugiere que se desconoce cuál es el rol que cumplen los genes de resistencia de la planta en la nodulación. Podría suponerse que el apilamiento de diversa cantidad de genes de resistencia debería tener un impacto diferencial sobre la nodulación de los cultivares. Por otro lado, es de interés el rol de los flavonoides en la interacción rizobio-leguminosa y patógeno-leguminosa. Éstos son compuestos polifenólicos, que participan en promover la relación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios, que conduce a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Trabajos previos afirman que el perfil y el contenido de flavonoides pueden variar según el año, el genotipo del cultivar e incluso ser modificados por efectos del medio ambiente. Probablemente estas diferencias en la cantidad y calidad de los flavonoides podrían tener impacto en la nodulación y fijación de nitrógeno. Por lo tanto, es de particular interés considerar la eficiencia de nodulación que tendrían las cepas de *B. japonicum* en diversos cultivares de soja que difieren en el contenido de genes de resistencia al ataque de patógenos, en los que la composición de los exudados es variable. Los objetivos de este trabajo fueron, por un lado determinar la producción de flavonoides de dos cultivares de soja, Essex y Forrest, que difieren en los genes de resistencia codificados en su genoma. Además, determinar la capacidad de nodulación de los cultivares que son casi isólineas, con una selección de rizobios nodulantes de soja aislados de suelo. Los resultados obtenidos mostraron que las plantas de soja del cultivar Essex (con menos genes de resistencia a enfermedades codificados en su genoma) nodularon más que las del cultivar Forrest. La respuesta de las plantas, es en parte el resultado de la interacción de los flavonoides con los rizobios y por esta razón el contenido diferencial de flavonoides de los cultivares como así también las diferencias en los genes de resistencia a enfermedades codificados en sus genomas podrían afectar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de la soja.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ph. D. Pedro A. Balatti por su predisposición y dedicación para conducir y llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Silvina M. Y. López por brindarme su tiempo y todo el apoyo necesario para el desarrollo práctico de las tareas de laboratorio.

A mi familia y amigos por su incondicional presencia a lo largo de toda la carrera para lograr cumplir con las metas propuestas.

A Dianela Dall' Osso compañera y mejor amiga que la facultad me dio con quien compartí este trabajo final de carrera.

A los profesionales y personal del INFIVE con los cual compartí el proceso de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme las herramientas necesarias para crecer y desarrollarme tanto profesional como personalmente.

A mi mejor amigo, Jorge Barbero, con quien transité toda mi vida universitaria, por su constante apoyo y su pronta recuperación.

## ÍNDICE

### Índice general

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| RESUMEN                          | Pág. 2  |
| AGRADECIMIENTOS                  | Pág. 3  |
| INTRODUCCIÓN                     | Pág. 6  |
| HIPÓTESIS                        | Pág. 18 |
| OBJETIVO                         | Pág. 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS             | Pág. 19 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN           | Pág. 24 |
| CONCLUSIONES                     | Pág. 27 |
| BIBLIOGRAFÍA                     | Pág. 28 |
| ANEXO DE FIGURAS                 | Pág. 34 |
| ANEXO DE TABLAS                  | Pág. 38 |
| ACTIVIDADES OPTATIVAS REALIZADAS | Pág. 39 |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

|   |          |
|---|----------|
| Figura N°1 Posición global de la Argentina como productor de soja   | Pág.31.  |
| Figura N° 2 Interacción rizobios – leguminosa   | Pág.32.  |
| Figura N°3: Concentración de Isoflavonoides en semillas de soja   | Pág. 33. |
| Figura N° 4: Número de nódulos de los cultivares Essex y Forrest en simbiosis con aislados bacterianos    | Pág. 33. |
| Figura N° 5: Peso seco de nódulos de los cultivares Essex y Forrest en simbiosis con aislados bacterianos | Pág. 34. |
| Figura N° 6: Peso seco aéreo de los cultivares Essex y Forrest en simbiosis con aislados bacterianos      | Pág. 34. |

### Tablas

|   |          |
|---|----------|
| Tabla I: Detalle de los tratamientos aplicados en el ensayo de nodulación y fijación de nitrógeno | Pág. 35. |
|---|----------|

## INTRODUCCIÓN

La soja *Glycine max* (L.) Merr. representa el cultivo más importante para la Argentina. Esta planta, que es de la familia de las Leguminosas (Fabaceae), es originaria del continente Asiático, Norte y Centro de China, donde fue domesticada, probablemente en el Siglo XI a.C. (Hymowitz, 1970). En América fue introducida en los Estados Unidos en 1765, sin embargo su gran expansión se inició en 1840. Inicialmente fue utilizada como forraje, y a partir de la década del 30 para producción de grano (Bezus, 2002). El cultivo continuó extendiéndose adquiriendo en los últimos 30 años gran importancia a nivel nacional e internacional (Satorre et al., 2003). Actualmente la producción mundial de soja alcanza a 264 millones de toneladas anuales (promedio 2010/2012), que es aproximadamente el doble del volumen cosechado a mediados de 1990. Esta tendencia de crecimiento que se consolidó a principios de la década del 80, hizo que el cultivo de la soja sea el principal grano oleaginoso a nivel mundial, con una participación promedio del 56 % de la producción total, considerando a las siete principales semillas oleaginosas entre los años 2010/2012 (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2014).

El área implantada con soja en Argentina alcanzó un récord de 19,7 millones de hectáreas en la campaña 2012/2013, con una producción actual estimada en 50 millones de toneladas. En nuestro país, tanto la soja como los derivados de su molienda, tuvieron un valor de exportación cercano a los 20 mil millones de dólares anuales (2010/2012), cifra que compone alrededor del 25 % del valor de las exportaciones totales (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2014).

Según las últimas estadísticas publicadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, los 5 principales productores de soja a nivel mundial son Estados Unidos de América, Brasil, Argentina, India y China (Figura N°1) (FAO, 2014). Es así que, la Argentina ocupa el cuarto puesto de producción

mundial de harina de soja, luego de la República Popular China, Estados Unidos y Brasil. Pero es líder en la exportación con 26,07 millones de toneladas, volumen que representa el 44 % del comercio mundial, siguiendo en importancia Brasil y Estados Unidos. Respecto de la producción mundial de aceite de soja, Argentina ocupa el tercer puesto luego de China y Estados Unidos. Sin embargo, Argentina es líder en exportación con 3,8 millones de toneladas, que representan el 43 % del comercio mundial, seguida por Brasil y Estados Unidos (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2014).

La semilla de soja tiene un alto contenido de proteínas en las semillas, con lo cual seguramente es el cultivo con la mayor demanda de Nitrógeno (N) y la menor producción de biomasa de semilla por foto-asimilado producido (Perticari A., 2006). Por eso, el N es el nutriente más crítico para el cultivo. A menos que exista alguna condición particular con otros limitantes mayores, el rendimiento de soja es función directa de la capacidad de acumular N del cultivo. De la misma manera que otras plantas de la familia de las leguminosas la soja se nutre del N del suelo que es mineralizado por la actividad que realizan los microorganismos del suelo y por medio de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). La soja como la mayoría de las leguminosas, tiene la habilidad de asociarse en forma simbiótica con bacterias fijadoras de  $N_2$ , llamadas rizobios, de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y/o *Ensifer* (*Sinorhizobium*). Así obtiene a través de la FBN, gran parte del N que requiere para su crecimiento. La interacción de plantas de la familia de las leguminosas con bacterias Gram (-) del suelo, los rizobios, resulta en el desarrollo de nódulos, que son estructuras radicales en las que la bacteria fija el  $N_2$  atmosférico convirtiéndolo en  $NH_4$  y entregado a la planta (Angelini et al., 2011).

### **Fijación biológica de nitrógeno**

El nitrógeno (N) es un elemento esencial que forma parte de las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares y es esencial para el crecimiento de



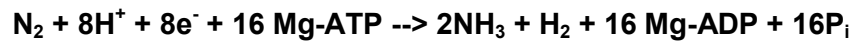
todos los organismos. La fijación de  $N_2$ , gas que constituye el 80 % de la atmósfera, consiste en la reducción del N atmosférico a amonio que se realiza a presión y temperatura ambiental y puede ser llevado a cabo por ciertos organismos del suelo tales como cianobacterias, actinomicetes, bacterias aeróbicas, anaerobias facultativas en forma libre, asociadas a las raíces de las plantas o en simbiosis con determinados grupos de plantas.

Existe una gran cantidad de microorganismos fijadores de  $N_2$  -diazotrofos- tanto en ambientes terrestres como acuáticos con la capacidad de reducir el  $N_2$  atmosférico. Esto es de particular importancia para la biosfera ya que es la responsable principal de la incorporación del N que luego será utilizado como nutriente por todos los organismos vivos. El ejemplo más estudiado de la FBN lo constituyen las plantas de la familia de las leguminosas que interactúan con los rizobios (Angelini et al., 2011). Las etapas previas a la simbiosis han sido bien caracterizadas y consisten en la adhesión de los rizobios a la superficie de las raíces, el reconocimiento que ocurre entre la bacteria y la planta simbiótico, la invasión de la raíz, la organogénesis del nódulo y la diferenciación de las bacterias a bacteroides y fijación de nitrógeno (Figura N°2).

Las leguminosas secretan metabolitos secundarios que atraen a los rizobios que habitan en el suelo. Entre estos compuestos se encuentran los flavonoides, compuestos que en los rizobios inducen la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas involucradas en el proceso de la nodulación. El primer paso en la formación de los nódulos consiste en la adhesión de la bacteria al pelo radicular (Figura N°2). El reconocimiento planta bacteria comienza con los exudados radicales generados por la planta, que contienen principalmente flavonoides, estos activan factores transcripcionales en las bacterias. Los flavonoides interactúan con la proteína NodD que induce la expresión de genes de nodulación, que codifican enzimas involucradas en la síntesis de los quito-lipooligosacáridos conocidos como factores Nod (Peticari A., 2006). Los factores Nod son secretadas por los rizobios y

constituyen una señal que tiene actividad hormonal en la planta, en la que inducen la deformación y el enrulamiento del pelo radical, que dará origen al primordio del nódulo (Martínez et al., 1990). La zona de la raíz que es infectada por los rizobios es la zona de alargamiento de la raíz que se encuentra inmediatamente después del meristema. En esta zona los pelos radicales comienzan su desarrollo, están en activo crecimiento y por lo tanto son susceptibles de ser infectados, durante un lapso de aproximadamente 6 horas, en lo que se da en llamar ventana de infección (Bhuvaneswari et al., 1980). Esta propiedad transitoria está vinculada a los cambios bioquímicos que ocurren en esa zona durante el desarrollo radical. Por lo tanto, la distribución de los nódulos en la raíz refleja la velocidad con que los rizobios indujeron el desarrollo de los nódulos (Bhuvaneswari et al., 1980). Las cepas más eficientes forman nódulos cerca del cuello de la raíz y las menos eficientes, en las zonas más alejadas de la raíz principal o en las raíces secundarias y/o terciarias. A pesar de que los rizobios interactúan con todos los pelos radicales, sólo el 25 % de estos se enrulan y toman forma de gancho (Shepherd's crook) evento que parece ser necesario para lograr la infección (Hirsch, 1992). Las bacterias proliferan y penetran por el pelo radical, en el que se genera una invaginación de la pared, formando un canal de infección por el que se desplazan los rizobios hacia las capas de células internas de la raíz. Las bacterias que se multiplican dentro de este tubo de infección (Vasse & Truchet, 1984; Brewin, 1991), se liberan en células corticales de la raíz en donde luego se diferencian en bacteroides (Spaink, 1995). Los bacteroides y la membrana que los rodea, constituyen el simbiosoma que es la unidad funcional de fijación de  $N_2$  (Long, 1989), donde se reduce el nitrógeno atmosférico a amonio por la acción del complejo enzimático nitrogenasa (Spaink, 1995). El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta los nutrientes hacia y desde él. La formación de una simbiosis efectiva es un proceso altamente específico; sin embargo, el grado de especificidad varía entre los diferentes rizobios.

La enzima nitrogenasa que se encuentra dentro de los nódulos es la enzima clave que cataliza la reacción:



La nitrogenasa es inactivada irreversiblemente (desnaturalizada) por el oxígeno, por lo tanto, la fijación de  $\text{N}_2$  requiere de sistemas de protección de la enzima frente al oxígeno. La planta, le confiere esta protección por medio de una capa de células engrosadas que rodean al nódulo formando una barrera de protección a la difusión del oxígeno de la atmósfera del suelo, que se intensifica aún más en situaciones de estrés hídrico o salino. Además, la planta suministra al nódulo una proteína muy similar a la hemoglobina (Wilson et al., 1990), llamada leghemoglobina, que es capaz de unir y transportar oxígeno con gran afinidad, lo que resulta en concentraciones de oxígeno extremadamente bajas en el nódulo (Paul & Clark, 1986). La leghemoglobina es una nodulina, debido a que el gen que codifica dicha proteína en las plantas sólo se expresa en los nódulos fijadores de  $\text{N}_2$  (Peticari A., 2006). Así, dado que la leghemoglobina es roja, la actividad fijadora de  $\text{N}_2$  en los nódulos es detectable visualmente por una coloración rosada del interior de dichos órganos, a diferencia de la coloración blanca de los nódulos ineficientes o la marrón-verdosa de los nódulos senescentes (Peticari A., 2006).

Para la planta el proceso de FBN tiene un costo energético importante. Se consume más energía para obtener 1 g de N fijado que la que se necesitaría para obtener 1 g de N desde el suelo en la forma de nitratos. Se calcula que se requieren en soja 12 g de C por g de N fijado. Los bacteroides dependen totalmente de la energía que les da la planta para la fijación de nitrógeno. En el caso de soja el amonio generado por los bacteroides es asimilado en forma de alanina y luego exportado vía xilema hacia las hojas como ureídos (Peticari A., 2006).

## Nodulación y FBN

En condiciones ideales la nodulación comienza a visualizarse a los 3-5 días y la actividad de fijación desde los 10-15 días de la emergencia de las plantas. Los valores de N fijado durante el estado vegetativo hasta comienzos de floración de las planta es bajo en promedio. Se han registrado valores promedio 0,5-1 kg de N fijado/ha/día en este período de fijación. De ahí en adelante se registran los mayores valores de actividad que son el resultado de un considerable aumento en la demanda de N. Las tasas máximas de fijación se sitúan entre los estados reproductivos R5-R6 con valores promedio de 3 y máximos de 5 kg de N fijado/ha/día. Luego de esta etapa el proceso cae en forma abrupta. Imsande (1998) trabajando con distintas fuentes de N (nitratos, urea y N de FBN) registró aportes de 600 mg de N/planta por la fijación durante el período de llenado de granos, concluyendo que en presencia de niveles no inhibitorios de N inorgánico, la rápida fijación de  $N_2$  durante el llenado de granos mejora la eficiencia de la fotosíntesis de la soja y por este motivo se espera mayor acumulación de materia seca con esta fuente de N.

La evolución de la FBN está relacionada con la tasa de acumulación de carbono (C), por lo tanto, las limitaciones nutricionales que afecten el crecimiento del cultivo afectarán la tasa de acumulación de N (García 2000). Por otro lado, numerosos nutrientes intervienen directamente en el proceso de fijación, por ejemplo magnesio (Mg), Mo, Fe y Co (Purcell, 1999). En cualquier caso la evolución de la fijación de nitrógeno está reflejada por la acumulación de materia seca dado que el N se constituye en el principal elemento que limita el crecimiento de las plantas.

Si no hay limitaciones ambientales, en numerosas experiencias observamos que estados vegetativos V4-V5 las plantas cuentan con 10-12 nódulos/planta, ubicados en una mayoría en la parte superior de la raíz primaria, con un peso por planta superior a 80 mg y un peso individual de nódulo de 7 a 8 mg. En estado

reproductivo R5-R6 la planta presenta 40-50 nódulos por planta, de los cuáles por lo menos 12 se encuentran en la parte superior de la raíz primaria. Estos nódulos además son de tamaño mediano a grande y alcanzan diámetros de 4-6 mm. El peso seco de nódulos potencialmente ideal para una planta ronda los 800 mg y el peso individual de nódulo los 7-9 mg. En todos los casos la coloración interna de la mayoría de los nódulos es roja o rosada. Cuando el nódulo se deteriora por senescencia natural ó motivada por algún estrés y deja de fijar N, la coloración interna del mismo cambia tornándose en una coloración verde a marrón (Peticari A., 2006).

### **Regulación genética de la nodulación**

Los estudios genéticos y moleculares llevaron a la identificación de los genes bacterianos de nodulación (*nol/nod/noe*) y de fijación de nitrógeno (*fix* y *nif*), (Djordjevic & Weinman, 1991; Györgypal et al., 1991). La mayoría de los genes *nod* no se expresan en forma libre, sino que se inducen en presencia de la planta hospedante. Esta inducción es causada por exudados de la planta (principalmente flavonoides) y requiere la participación de la proteína bacteriana NodD1. El gen *nodD* se ha encontrado en todas las especies de rizobios descritas hasta el momento y es uno de los pocos genes de nodulación que se expresa constitutivamente. La proteína NodD1 presenta dos dominios bien identificados, uno que está involucrado en el reconocimiento de los flavonoides producidos por las plantas (Djordjevic & Weinman, 1991; Györgypal et al., 1991) y el otro dominio interactúa con el ADN coordinando la expresión de genes de nodulación. Es decir que una parte de la proteína detecta la presencia de los flavonoides, que inducen un cambio en otro sector de la proteína que le permite asociarse al ADN e inducir la expresión de genes de nodulación (Djordjevic & Weinman, 1991; Györgypal et al., 1991).

Los rizobios colonizan las raíces, sin embargo, no disparan las reacciones de defensa que afecten a los rizobios (Djordjevic et al., 1988; Vasse et al., 1993). Aun así,

la planta regula la invasión bacteriana, determinando el fracaso de nódulos efectivos, para modular el número de nódulo o las infecciones con rizobios ineficientes resultando en respuesta del tipo patogénica (Parniske et al., 1991). La respuesta de la planta a la interacción con los microorganismos se ha estudiado anteriormente y entre ellas también la vía de traducción de señales que ocurren como resultado de interacciones patogénicas o simbióticas. Una característica importante es que en ambos casos las respuestas son del tipo receptor/ligando: gen de *R/Avr* que además puede disparar la resistencia sistémica adquirida en el caso de la patogénesis y el reconocimiento de factores Nod en la simbiosis que desencadena y controla la nodulación (Baron & Zambryski, 1995; Subramanian et al., 2006).

El rol de los flavonoides en la interacción rizobio-leguminosa y patógeno-leguminosa es de particular interés. Éstos son compuestos polifenólicos, producto del metabolismo secundario de las plantas, que poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados, que cumplen entre otras funciones la de proteger a las plantas del ataque de patógenos (Arranz Martínez, 2010). También participan en promover la relación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios, que conduce a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Actúan como quimio-atrayentes para los rizobios e inductores de la expresión de genes de nodulación, lo que lleva a la producción de factores Nod, compuestos que son claves para el desarrollo de nódulos en las plantas leguminosas (Sreevidya et al., 2006). Las leguminosas sintetizan flavonoides, principalmente isoflavonoides e isoflavonas (Subramanian et al., 2006; Samac & Graham, 2007). Los flavonoides, entre otras funciones, reprimen la expresión de ciertos cistrones de los rizobios y actúan como precursores de los compuestos de defensa, denominados fitoalexinas, que inhiben el crecimiento de diversos microorganismos (Subramanian et al.; 2006).

En las leguminosas la formación de los nódulos, genera una inhibición de infecciones adicionales, limitando así la planta el número de nódulos, proceso que se

conoce como auto-regulación de la nodulación (Pierce & Bauer, 1983; Takats, 1990). Existen evidencias de que esta inhibición ocurre como resultado de la represión de los genes *nod*, que habitualmente son inducidos por los flavonoides en la bacteria. La zona de la raíz susceptible de ser infectada por los rizobios no desarrolla nódulos luego de una infección previa, a lo que se conoce como control feedback de la formación de nódulos (Pierce & Bauer, 1983; Takats, 1990). La nodulación está controlada por un mecanismo señal-respuesta que suprime la emergencia de nuevos nódulos en las partes jóvenes de la raíz, toda vez que se haya desarrollado un umbral crítico de nódulos (Pierce & Bauer, 1983). Por lo tanto los isoflavonoides cumplirían un rol clave en la iniciación de la interacción rizobio leguminosa, es decir la infección y por consecuencia en regular el número de nódulos (Mithöfer, 2002; Catford et al., 2003; Samac & Graham, 2007).

La genisteína y la diadzeína son los flavonoides que se encuentran en los exudados de la soja que se ha demostrado inducen los genes *nod* en *B. japonicum*. En particular, se ha demostrado que la genisteína induce todos los genes asociados al casete regulador de genes de nodulación conocido como *nod box* (Lang et al., 2008).

El sistema de respuestas de la planta a los patógenos, no está bien estudiado en las leguminosas. Esto sugiere que se desconoce cuál es el rol que cumplen los genes de resistencia de la planta en la nodulación. Por ejemplo la inducción de un mecanismo de defensa de la planta como la Resistencia Sistémica Adquirida (RAS) afecta la susceptibilidad de la planta a la infección por rizobios (Stacey et al., 2006; Samac & Graham, 2007). El ácido salicílico es un disparador de la RAS lo que activa los mecanismos de defensa de la planta que probablemente afecta la capacidad de nodulación de las plantas. Si esto fuera así el apilamiento de diversa cantidad de genes de resistencia debería tener un impacto diferencial sobre la nodulación de los cultivares. Es de particular interés por lo tanto considerar la eficiencia de nodulación que tendrían las cepas de *B. japonicum* en diversos cultivares de soja que difieren en

el contenido de genes de resistencia al ataque de patógenos, en los que la composición de los exudados (isoflavonoides entre otros) es variable.

### **Inoculación**

En la década del 70, cuando se produjo la expansión del cultivo de soja dado la inexistencia en nuestros suelos de *Bradyrhizobium japonicum* o *B. elkanii*, se consideró necesaria la incorporación de estas bacterias a las semillas por intermedio de la inoculación (Pacheco Basurco, 1983). Los efectos sobre el rendimiento del cultivo fueron evidentes y esto permitió una alta adopción de los inoculantes y de la tecnología de aplicación en los productores de soja.

Las cepas más eficientes son aquellas que inducen en la planta la formación de una mayor cantidad de nódulos medianos y grandes, con un color rosado a rojo interno que refleja la presencia de leghemoglobina complejando al O<sub>2</sub>, que preferentemente se ubican en la raíz primaria y tienen rápida y prolongada fijación (desde estado V2-V3 hasta R6). En cambio los rizobios menos eficientes tienden a formar nódulos más pequeños, ubicados en raíces secundarias que fijan N en niveles muy bajos o por periodos de tiempo cortos (anteriores a floración) presentando en esos casos nódulos de coloración verde.

Es de particular interés por lo tanto considerar la eficiencia de nodulación que tendrían las cepas de *B. japonicum* en diversos cultivares de soja que difieren en el contenido de genes de resistencia al ataque de patógenos, en los que la composición de los exudados es variable.

El cultivar de soja Forrest surgió a partir de un programa de mejoramiento de USDA y fue el primer cultivar al que se le incorporaron genes de resistencia al nemátodo de los quistes, *Heterodera glycines Ichinohe* y es uno de los dos cultivares modelos para la investigación genómica disponible en los EEUU, habiendo sido además importante para el entendimiento de la genética de resistencia al síndrome de



la muerte súbita (SMS) de la soja. Este cultivar es resistente al nemátodo *Pratylenchus scribneri* (Acosta et al., 1979) y *Rotylenchulus reniformis* (FAO, 1982), pero es susceptible al ataque de *Pratylenchus brachyurus* (Schmitt & Barker, 1981). Forrest es un cultivar desarrollado en USA, es uno de los cultivares considerado parcialmente resistente. En él se han identificado QTLs asociados a la resistencia al SMS causado por *Fusarium virguliforme* (Gibson et al., 1994; Iqbal et al., 2001; Farias Neto et al., 2006; Kazi et al., 2008), pero no hay información de su comportamiento en condiciones de campo en Argentina, donde el 87 % de los aislamientos obtenidos en 6 provincias se identificaron con la especie *Fusarium tucumaniae* (O' Donnell et al., 2010).

La resistencia fue caracterizada como parcial, poligénica y cuantitativa. En los cultivares parcialmente resistentes, se manifiestan los síntomas, pero con menor incidencia y/o severidad que en los más susceptibles. El comportamiento de los genotipos de soja puede variar entre localidades y/o años (Gibson et al., 1994; Njiti et al., 1996).

En una evaluación llevada a cabo en Gral. Roca, Marcos Juárez, Córdoba, en un lote con infestación natural de *Fusarium tucumaniae*, los cultivares de EEUU, en los que se incluía Forrest, no se diferenciaron de los cultivares argentinos con menor nivel de síntomas foliares de SMS, lo que indicaría que los genes asociados con la resistencia a *Fusarium virguliforme*, en las condiciones ambientales en que se realizó la evaluación, fueron efectivos frente a la población de *Fusarium tucumaniae* presente en el lote (Lenzi et al., 2010).

El cultivar Essex, es un cultivar portador de un gen de resistencia a la sequía y con una mayor tolerancia al ozono que el cultivar Forrest, pero no posee resistencia asociada al nemátodo SCN (soybean cyst nematode), *Heterodera glycines* (Chernikova et al., 2000). Este cultivar es afectado por el Oomycete *Pythium ultimum* y

se ha demostrado que es tolerante a los nemátodos *Pratylenchus brachyurus* y *Pratylenchus penetrans* (Schmitt & Barker, 1981).

Estos cultivares no sólo se diferencian en la resistencia o tolerancia a enfermedades y factores abióticos, sino que además se diferencian en el tipo de isoflavonoides que sintetizan.

En síntesis se dispone de dos cultivares de soja con una base genética similar cuya principal diferencia aparece el contenido de genes de resistencia. Por esto aparecen como un sistema ideal para el estudio del impacto de los genes de resistencia en la capacidad de nodulación de la soja. En este marco se planteó la hipótesis de trabajo y los objetivos:

**Hipótesis:**

Los cultivares de soja que se seleccionaron para emplear en este trabajo que difieren en el número de genes de resistencia que se encuentran codificados en su genoma, difieren además en el contenido de flavonoides. Todo eso se manifiesta en diferencias a nivel de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de la soja.

**Objetivo:**

Determinar la producción de flavonoides de dos cultivares de soja que difieren en los genes de resistencia que llevan en su genoma.

Determinar la capacidad de nodulación de los cultivares que son casi isóneas que difieren en la cantidad de genes de resistencia con una selección de rizobios nodulantes de soja aislados de suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivares de soja

Semillas de los cultivares de soja Forrest y Essex fueron gentilmente cedidas por el semillero Don Mario.

### Determinación de Isoflavonoides (IF) Totales – Extracción con solventes.

Se pesaron 2 g de semillas de cada cultivar y se colocaron en frascos con tapa de 150 mL y se utilizó como solvente de extracción una mezcla metanol-agua (8:2). Se procedió a la extracción por agitación constante a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente la muestra se filtró al vacío y el extracto fue transferido a matraz aforado de 25 mL. La cuantificación de IF se realizó por espectroscopia de absorción UV-Visible, para lo cual se realizó una dilución (1:50) a partir del extracto concentrado. Se registró la absorbancia a 258 nm utilizando como blanco la mezcla de metanol-agua utilizada para la extracción. La concentración de IF en la solución se determinó utilizando el coeficiente de absorción molar  $\epsilon^{\circ}_{258\text{nm}} = 26830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y la fórmula de Lambert-Beer  $C = A [M] / \epsilon^{\circ} [M^{-1}\text{cm}^{-1}] d [\text{cm}]$ , donde  $C$  es la concentración molar,  $A$  la absorbancia medida y  $d$  es la distancia en cm que recorre el haz de luz (Barnes et al., 1994).

Las extracciones y determinaciones de concentración se realizaron por triplicado.

### Cepas bacterianas

Se trabajó con las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* identificadas como 163, 366, 2112 y 953. Estas cepas se obtuvieron a partir de nódulos desarrollados por cultivares de soja inoculados con suspensiones de suelos provenientes de la provincia de Santa Fe. Como cepas controles se utilizaron *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, ambas se utilizan en formulaciones comerciales de

inoculantes. Los aislados bacterianos se mantuvieron en medio de cultivo YEM (Extracto de levadura – Manitol – Agar) en tubos pico de flauta en heladera a 4 °C (Vincent, 1970).

#### **Medio de cultivo YEM (sólido)**

| <b>Componentes</b>                   | <b>Cantidad g/L</b> |
|--------------------------------------|---------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,5                 |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,2                 |
| NaCl                                 | 0,1                 |
| Manitol                              | 5                   |
| Extracto de levadura                 | 0,4 – 2             |
| Agar                                 | 18                  |
| Rojo Congo                           | 10 mL.              |
| pH 6,9                               |                     |

El medio de cultivo, las cajas de Petri y los tubos para realizar picos de flauta se esterilizaron en autoclave tipo Chamberlain a 1 atm de presión y 120 °C durante 20 minutos. Los aislados se sembraron en las cajas de Petri en estrías por agotamiento.

Las placas sembradas se incubaron en estufa a 28 °C durante 5 días, momento en el que se hizo visible el desarrollo de las colonias aisladas. Las colonias se repicaron a tubos picos de flauta que se incubaron en las mismas condiciones antes descriptas. Estos cultivos fueron los stocks que se conservaron en heladera a 4 °C.

#### **Fijación de nitrógeno y nodulación (in vitro)**

Para determinar la nodulación y fijación de nitrógeno, semillas de soja de los cultivares Essex y Forrest fueron esterilizadas superficialmente antes de la siembra.

Dicha esterilización consistió en el lavado de las semillas con una solución de etanol al 50 % durante 3 minutos, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 50 % durante 3 minutos y sucesivos enjuagues con agua. Las semillas se colocaron en vasos de plástico de 200 ml con vermiculita esterilizada como soporte.

Las plantas se inocularon con una suspensión de cada una de las cepas. Para esto se cultivaron los aislados de suelo y las cepas control en medio YEM líquido, en agitación a  $150 \text{ Rev. min}^{-1}$  durante 5 días. Transcurrido este tiempo se determinó la densidad óptica (DO) a 625 nm y se ajustó la concentración del inóculo mediante diluciones del cultivo, a  $4 \cdot 10^7$  ufc/ml. (ufc – unidades formadoras de colonias). Se sembraron dos semillas por maceta, que fueron inoculadas con 250  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana por semilla ( $1 \cdot 10^7$  ufc/semilla). Las macetas se regaron con solución nutritiva Jensen estéril 1X (libre de N). Las plantas se cultivaron en cámara con condiciones controladas de luz, temperatura y aireación.

El diseño experimental fue completamente al azar, y consistió de 7 tratamientos con 6 repeticiones, incluyendo el tratamiento testigo sin inocular. Los tratamientos fueron aplicados en cada uno de los cultivares de soja, Essex y Forrest. Las semillas de cada cultivar fueron inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* 163, 366, 2112 y 953 (aislados de suelo), así como también con los controles, *B. japonicum* E109 y *B. elkanii* SEMIA 587 y un tratamiento testigo sin inocular como se describe en la Tabla I (Anexo de tablas).

**Solución nutritiva Jensen 50 X**

| COMPUESTOS                           | g/ L  |
|--------------------------------------|-------|
| CaHPO <sub>4</sub>                   | 1     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,2   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,2   |
| NaCl                                 | 0,2   |
| FeCl <sub>3</sub>                    | 0,1   |
| Solución de elementos trazas*        | 1 mL. |

**\*Solución elementos trazas:** B, 0,05%, Mn, 0,05%; Zn, 0,005% Mo, 0,005%; Cu, 0,002%. La solución se preparó en agua destilada y se aciduló con gotas de HCl concentrado, para facilitar la disolución de los elementos. Se esterilizó por autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Con el fin de evitar la contaminación cruzada las macetas de cada tratamiento se colocaron en bandejas de plástico, las que se regaron periódicamente con agua destilada.

Luego de la emergencia de las plántulas se realizó un raleo dejando una planta por maceta. A los 45 días de cultivo se cosecharon las plantas, descalzaron las raíces y se determinó el número y peso seco de los nódulos y el peso seco de la parte aérea.

El recuento de nódulos se realizó estandarizando el procedimiento, contando sólo los nódulos de raíces primarias y secundarias que se ubicaron en un cilindro imaginario de 2,5 cm de largo comenzando en la base del tallo y 2,5 cm de diámetro.

Los nódulos se separaron de la raíz y se dispusieron en sobres rotulados, al igual que las partes aéreas de las plantas para realizar el peso seco. Este material se colocó en estufa a 80 °C hasta peso constante, y una vez transcurrido este tiempo se pesaron en balanza analítica.

### **Análisis Estadístico**

El análisis de los datos de cada ensayo se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA), como un diseño completamente aleatorizado (DCA). Para establecer entre que medias existen diferencias significativas se utilizó el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Producción de Isoflavonoides de los cultivares Essex y Forrest

Los resultados mostraron que las semillas del cultivar Essex contienen una mayor concentración de isoflavonoides que las del cultivar Forrest (Figura N° 3). El cultivar Essex contiene un 35 % más isoflavonoides que el cultivar Forrest. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Meksem et al. (2001) que afirman que el perfil y el contenido de isoflavonas pueden variar según el año, el genotipo del cultivar e incluso ser modificados por efectos del medio ambiente. Probablemente estas diferencias en la cantidad y calidad de los flavonoides podrían tener impacto en la nodulación y fijación de nitrógeno, por estar vinculados con la eficiencia en el establecimiento de la interacción simbiótica. La raíz produce exudados que constituyen una importante fuente de carbohidratos y otras moléculas, así como moléculas bioactivas que de alguna manera determinan el éxito o el fracaso de las poblaciones microbianas en la rizósfera (Kennedy, 2005). Colonizar este nicho, rico en fuentes de carbono es clave cuando el objetivo es garantizar que en el momento la iniciación de la nodulación, la bacteria adherida a la superficie de la raíz en el sitio correcto sea la seleccionada para la infección y formación del nódulo (Sorroche et al., 2012). Una de las características más relevantes de la simbiosis es la especificidad de los rizobios, esto es que algunas plantas son noduladas solo por determinada especie bacteriana. La especificidad está determinada por factores de las bacterias y de las plantas. Entre los factores bacterianos se pueden mencionar a los factores Nod, los polisacáridos de superficie (exopolisacáridos) y las proteínas secretadas (extracelulares) (Broughton & Perret, 1999). Las plantas por su parte, secretan compuestos de la familia de los flavonoides (Cooper, 2004; Samac & Graham, 2007), siendo estos compuestos los que atraen a las bacterias hacia los pelos radiculares, estimulan su crecimiento e inducen la expresión de los genes *nod* (Subramanian et al., 2006; Samac & Graham,

2007). Adicionalmente las plantas también difieren en los receptores que codifica su genoma que perciben la presencia de los factores Nod liberados por las bacterias (Subramanian et al., 2006). Así es que las distintas composiciones de los exudados de los diferentes cultivares podrían influir en el establecimiento de una simbiosis efectiva.

### **Capacidad de los cultivares Essex y Forrest para nodular y fijar N en simbiosis con aislados de *B. japonicum***

Los resultados mostraron que las plantas de soja del cultivar Essex nodularon más que las del cultivar Forrest, lo que se observó tanto a nivel del número como del peso seco de los nódulos (Figura N° 4 y Figura N° 5). Se encontró que si bien en todos los casos las plantas del cultivar Essex nodularon más que las del cultivar Forrest, sólo algunas interacciones rizobio-soja mostraron diferencias significativas. En este sentido se destaca que el número y peso de nódulos fue significativamente mayor cuando las plantas del cultivar Essex fueron inoculadas con las estirpes E109, 163, 2112 y 953 (Figura N° 4 y Figura N° 5). El peso seco de la parte aérea, que es una medida indirecta de fijación de N, fue mayor en las plantas del cv Essex que en las del cv Forrest. (Figura N° 6). Esto sugiere que existen determinantes genéticos en el cultivar Essex que hacen que éste interactúe con mayor eficiencia con los rizobios, lo que se observó en el número y peso seco de nódulos y peso seco de la parte aérea.

Considerando que los cultivares de estudio son casi isólinas, que difieren en los genes de resistencia, los determinantes genéticos de resistencia a enfermedades podrían ser responsables de las respuestas diferenciales obtenidas en la eficiencia simbiótica de ambos cultivares de hecho en un trabajo de Yang et al. (2010) han encontrado que un gen de resistencia de la soja es responsable de la respuesta de incompatibilidad de un cultivar con ciertas cepas de rizobios. Por otro lado, las diferencias encontradas en la concentración de los exudados liberados por las semillas

podrían ser responsables al menos en parte de una menor eficiencia en la interacción de los rizobios con las semillas del cultivar Forrest.

## CONCLUSIONES

Los cultivares de soja Essex y Forrest tienen una respuesta diferencial a la inoculación con rizobios.

El patrón de nodulación de los cultivares no fue alterado por la estirpe de rizobio inoculada lo que sugiere que el genoma de la planta es determinante de la respuesta.

La concentración de isoflavonoides fue diferente en ambos cultivares.

El cultivar Essex que contiene en su genoma menos genes de resistencia tuvo un patrón de nodulación superior en número y masa de nódulos que el cultivar Forrest, por lo que se acepta la hipótesis:

*“Los cultivares de soja que difieren en el número de genes de resistencia que se encuentran en su genoma, difieren además en el contenido de flavonoides. Todo eso se manifiesta en diferencias a nivel de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de la soja”.*

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta N., R. Malek, and D. Edwards, 1979. Susceptibility of soybean cultivars to *Pratylenchus scribneri*. J. Agric Univ. Puerto Rico 63: 103-110.
- Angelini J., et al., 2011. A Study on the Prevalence of Bacteria that Occupy Nodules within Single Peanut Plants. Curr Microbiol 62:1752–1759.
- Arranz Martínez, S., -2010. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española. Metodología para su determinación e identificación. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid 2010 - ISBN: 978-84-693-7843-4
- Barnes S.,M. Kirk, and L. Coward. 1994. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(11): 2466-2474.
- Baron C., and P. C. Zambryski, 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme. Annu. Rev. Genetics 29: 107-129.
- Bezus, 2002. Material didáctico N° 4, Oleaginosas de verano. Soja, introducción, Origen y Ubicación Sistemática. Curso Oleaginosas, 2002. p 1.
- Bhuvaneshwari T.V., Lesniak A.P. & W.D. Bauer, 1980. Efficiency of nodule initiation in Cowpea and Soybean. Plant Physiol. 86, 1210-1215.
- Bhuvaneshwari, T.V., Turgeon, B.G. & W.D. Bauer, 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. Plant Physiol. 66, 1027-1033.
- Broughton, W. & Perret, X. (1999). Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. Current opinion in plant biology, 2(4), 305-311.

- Catford J.G., C. Staehelin, G. Larose, Y. Piche, and H. Vierheilig, 2003. Suppression of arbuscular micorrizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *J. Exp. Bot* 54: 1481-1487.
- Chernikova T., J. Robinson, E. Lee, and C. Mulchi, 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynth Res.* 64: 15-26.
- Cooper, J. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*, 41, 1-62.
- Djordjevic S. P., et al., 1988. Induction of pathogenic-like response in the legume *Macroptilium atropurpureum* by a transposon-induced mutant of the fast-growing, broad-host-range *Rhizobium* strain NGR234. *J. Bacteriol* 170: 1848-1857.
- Djordjevic, M. A. & J. J. Weinman, 1991. Factors determining host recognition in the Clover-*Rhizobium* symbiosis. *Aust. J. Plant Physiol.* 18, 543-557.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación), 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/161730/>
- FAO. 1982. Soybean production in the tropics. FAO Plant Production and Protection Paper 4, Rev/1. Roma, FAO.
- García.2000.Especial Inoculación. Disponible en : <http://www.lanacion.com.ar/832441-especial-inoculacion>. Último acceso: Octubre 2016.
- Gibson P. T., M. Shenaut, R. Suttner, V. Njiti, J. Myers, 1994. Soybean varietal response to sudden death syndrome. In: Wikinson D (ed) Proc 24ht Soybean seed Res Conf, Chicago, Illinois, 6-7 Dec, Am Seed Trade Assoc, Washington, D.C.:20 – 40.

- Hirsch, A. M., 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122, 211-237.
- Hymowitz, T., 1970. On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* 24: 408-421.
- Imsande. 1998. Especial Inoculación. Disponible en : <http://www.lanacion.com.ar/832441-especial-inoculacion>. Último acceso: Octubre 2016.
- Iqbal, M. J., Meksem, K., Njiti, V. N., Kassem, M. & Lightfoot, 2001. Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). In Essex X Forrest RILs. *Theor. Appl. Genet* 102: 187 - 192.
- Kazi S., J. L. Shultz, R. Bashir, et al., 2008. Identification of loci underlying seed yield and resistance to soybean cyst nematode race 2 in 'Hartwig'. *Theoretical and Applied Genetics*. In press.
- Kennedy, A. (2005) Rhizosphere. Principles and Applications of Soil Microbiology (2nd Ed) (Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, Eds), pp. 242-262. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Lang K., Lindemann A., Hauser F. & M. Göttfert, 2008. The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 279, p. 203-211.
- Lenzi L., L. Salines, S. Distéfano, C. Ferreira, M. Supertino, 2010. Evaluación de cultivares de soja argentinos y exóticos frente al síndrome de la muerte súbita (*fusarium tucumaniae*) en condiciones de campo. Informe de Actualización Técnica N° 21- INTE EEA Marcos Juárez.
- Long, S. R., 1989. The *Rhizobium*-legume symbiosis: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.

- Martínez, E., Romero, D. & R. Palacios, 1990. The Rhizobium Genome. *Plant Sciences*, 9, 59-93.
- Meksem, K., Njiti, V., Banz, W., Iqbal, M., Kassem, M., Hyten, D., Yuang, J., Winters, T. & Lightfoot, D. (2001). Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. *BioMed Research International*, 1(1), 38-44.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2014. Disponible en: [http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/newsletters/nro79/nl\\_harina-aceite.pdf](http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/newsletters/nro79/nl_harina-aceite.pdf)
- Mithöfer A., 2002. Suppression of plant defense in rhizobia-legume symbiosis. *Trends in Plant Science* 7: 440-444.
- O'Donnell, K., Sink, S., Scandiani, M., Luque, A., Colletto, A., Biasoli, M., Lenzi, L., Salas, G., Gonzalez, V., Ploper, L. D., Formento, N., Pioli, R., Aoki, T., Yang, X. B. & A. J. Brice, 2010. Soybean Sudden Death Syndrome Species Diversity within North and South America Revealed by Multilocus Genotyping. *Phytopathology* 100: 58 - 71.
- Parniske M., B. Ahlborn, and D. Werner, 1991. Isoflavonoid-Inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J. Bacteriology* 173: 3432-3439.
- Parniske M., C Zimmermann, P. B. Cregan and D. Werner, 1990. Hypersensitive reaction of nodule cell in the *Glycine* sp./*Bradyrhizobium japonicum*-symbiosis occurs at the genotype-specific level. *Bot. Acta* 103: 143-148.
- Paul & Clark, 1986. Utilización del nitrógeno como fuente de crecimiento. Boletín de divulgación INTA, 2001.
- Perticari, A., Arias, N., De Battista, J. J., Lett, L., Montechia, M., Pacheco Basurco, J. C., Simonella, A., Toresani, S., Ventimiglia, L. & R. Vicentini, 2003. Inoculación y



fijación biológica del nitrógeno en el cultivo de soja, en: “El libro de la soja”, Argentina, edición 2003, pp. 69-78.

Perticari, A., Puente, M., Echegaray, R. & C. Piccinetti, 2007. Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica de nitrógeno. De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, A.M., Cassan, F. D., & Olmedo, C. A., eds), pp. 277–291. Río Cuarto

Pierce, M. & W. D. Bauer, 1983. A Rapid regulatory Response Governing Nodulation in Soybean. *Plant Physiol.*, 73, 286-290.

Purcell.1999. Especial Inoculación. Disponible en : <http://www.lanacion.com.ar/832441-especial-inoculacion>. Último acceso: Octubre 2016.

Samac D., and M. A. Graham, 2007. Recent advances in legume-microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. *Plant Physiology* 144: 582-587.

Satorre, E. et al., 2003. El libro de la soja. Servicios y Marketing Agropecuarios.

Schmitt D. and K. Barker, 1981. Damage and reproductive potentials of *Pratylenchus brachyurus* and *P. penetrans* on soybean. *J. Nematol* 13: 327-332.

Sorroche, F., Spesia, M., Zorreguieta, Á. & Giordano, W. (2012). A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4092-4101.

Spaink, H. P., 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of sympathogenesis. *Annu. Rev. Phytothol.* 33: 345 – 368.

Sreevidya, V. S., Srinivasa Rao, C., Sullia, S. B., Jagdish, K., Ladha & M. R. Pallavolu, 2006. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *Jornal of Experimental Botaby*, Vol. 57, No 9, pp. 1957 – 1969, 2006.

Stacey G., C. B. McAlvin, S-Y. Kim, J. Olivares, and M. J. Soto, 2006. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 141: 1473-1481.

Subramanian S., G. Stacey, and O. Yu, 2006. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal* 48: 261-273.

Vasse J. et al., 1993. Absortion of infection during *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by hypersensitive reaction. *Plant J.* 4: 555-566.

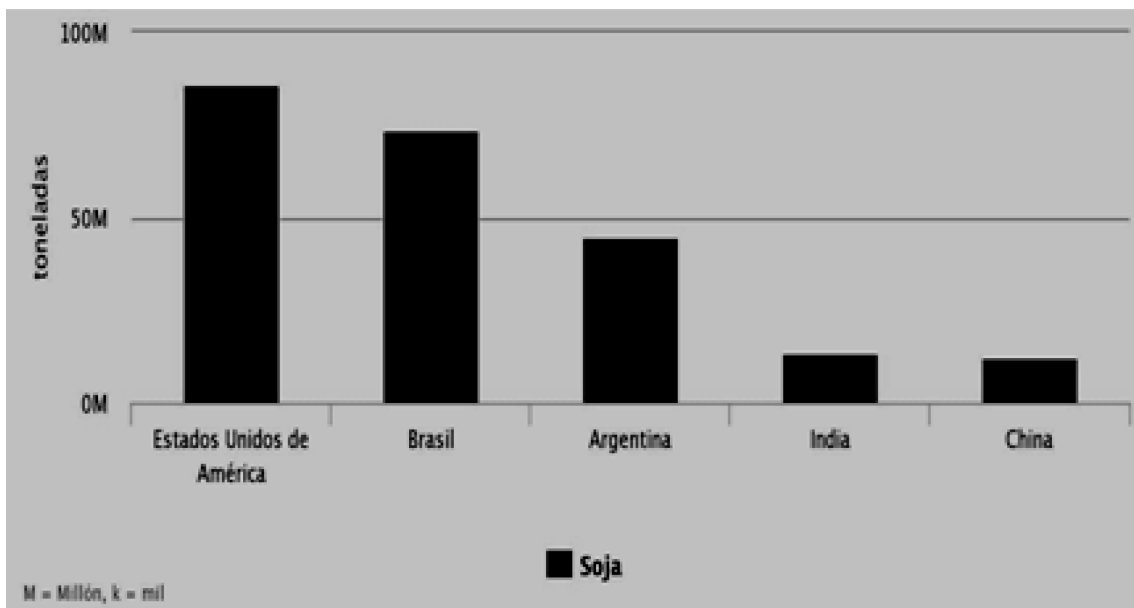
Vasse, J. & G. Truchet, 1994. The Rhizobium – Legume symbiosis: observation of root infection by bright – field microscopy after staining with methylene blue. *Planta* 161: 487 - 489.

Vincent JM. 1970. IBP Handbook 15. A manual for the study of root nodule bacteria. London: Blackwell Scientific Publications.

Wilson D. O. & H. M., 1990. Reisenauer. Determination of leghemoglobin in legume nodules. *Analycal Biochemistry*, 6: 27- 30.

## ANEXO DE FIGURAS

**Figura N° 1:** Principales 5 países en la producción de soja. Posición global de la Argentina como productor de soja (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO, 2014).



**Figura N°2:** Interacción rizobios – leguminosa (Madigan, M., Martinko, J. & J. Parker, 1998. “Brock: Biología de los Microorganismos”). 1: Rizobios en el suelo; 2: Rizobios en la rizósfera en el momento de la emergencia de los pelos radicales.; 3: Adhesión de los rizobios a los pelos radicales; 4: Gancho de infección; 5: Hilos infectivos infectando células sub-epidérmicas. 6: Penetración en las células de la epidermis; 7: Haces vasculares.; 8: Nódulo conectado a la raíz y en funcionamiento; 9: Bacteroides.; 10: Nódulo visible en la raíz.

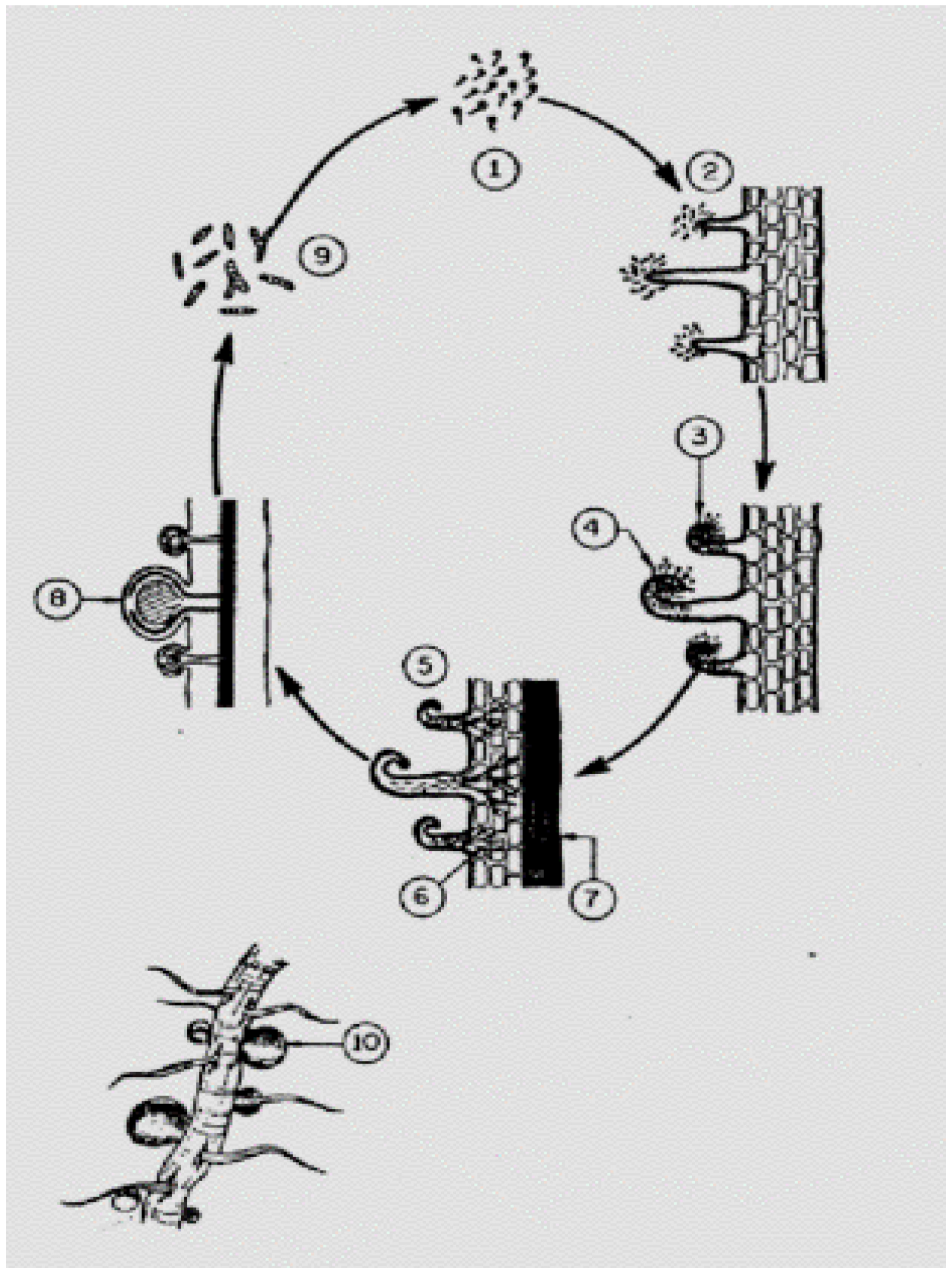


Figura N° 3: Concentración de Isoflavonoides de los cultivares Essex y Forrest.

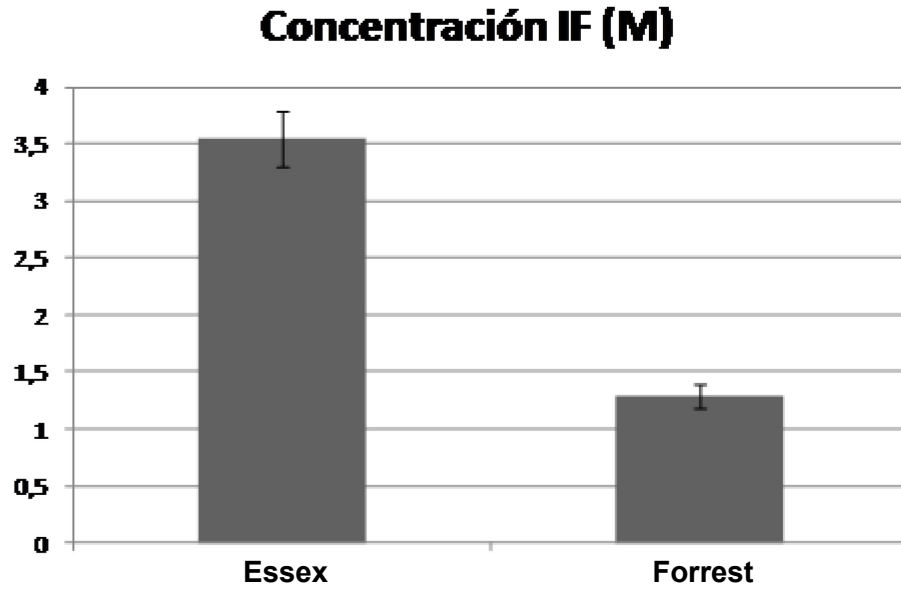
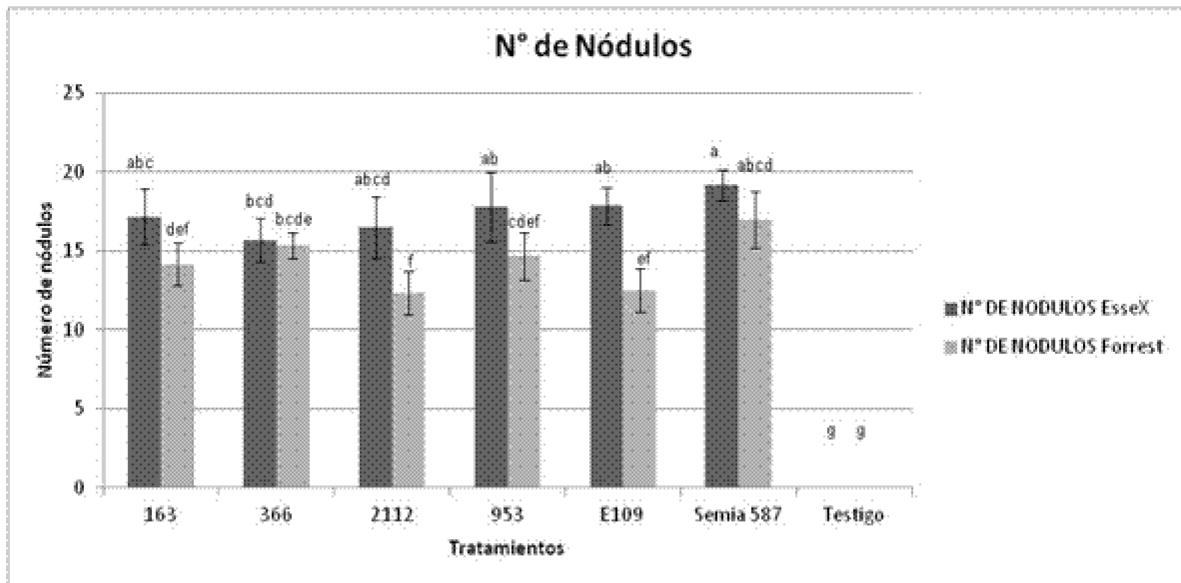
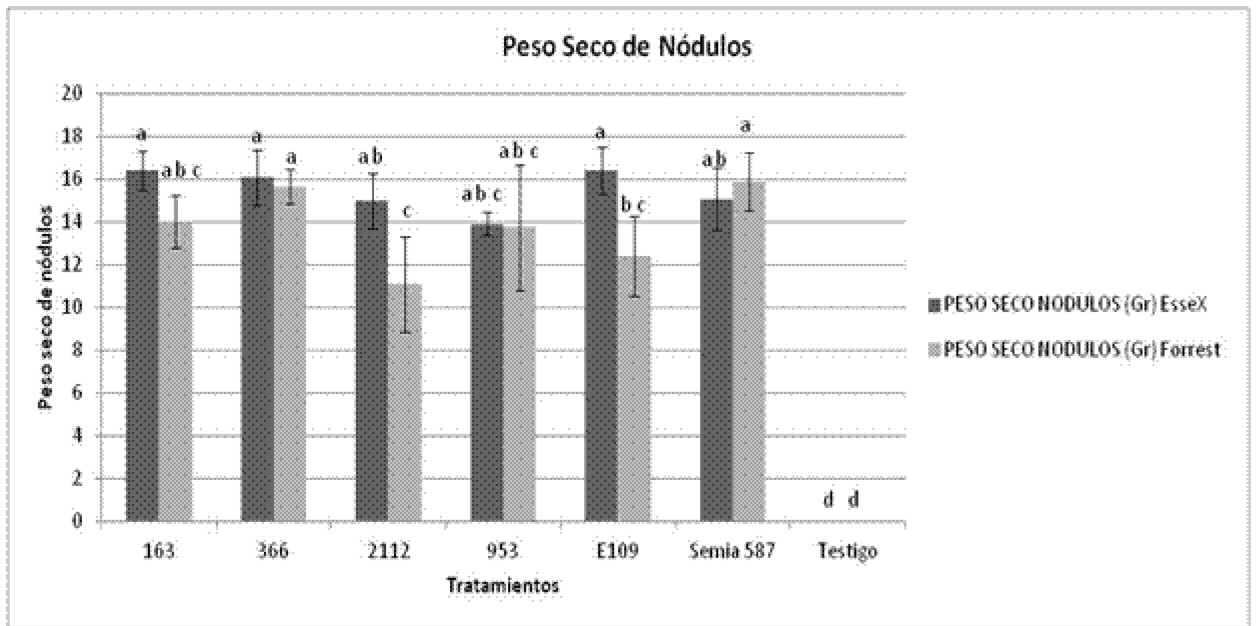


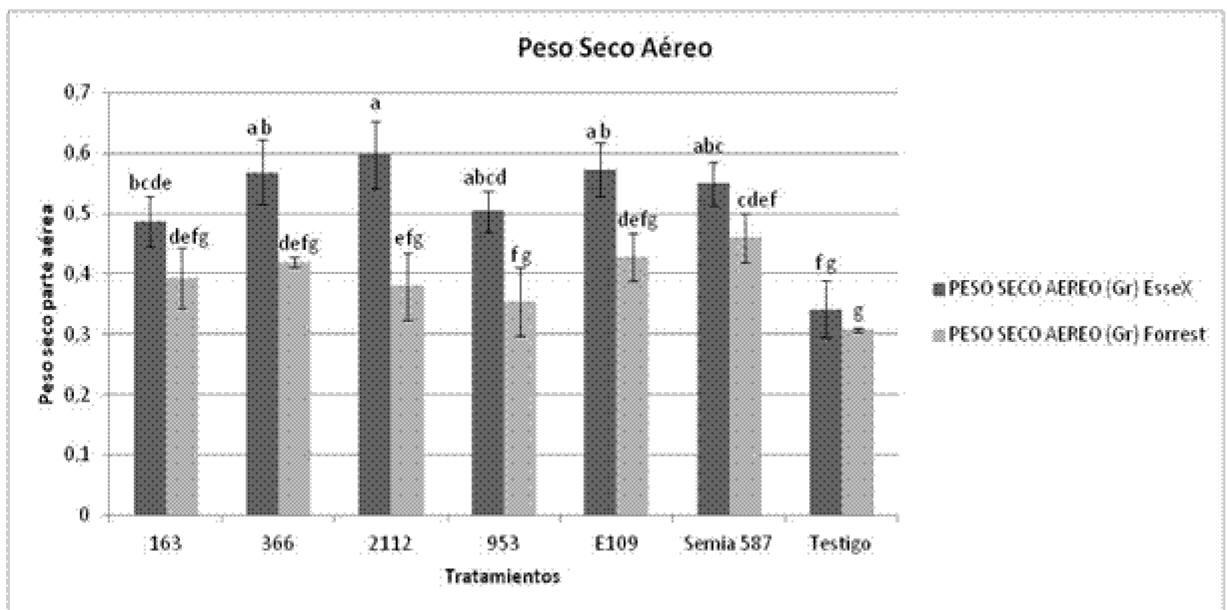
Figura N° 4: Número de nódulos de los cultivares Essex y Forrest en simbiosis con aislamientos bacterianos.



**Figura N° 5:** Peso seco de nódulos de los cultivares Essex y Forrest en simbiosis con aislamientos bacterianos.



**Figura N° 6:** Peso seco aéreo de los cultivares Essex y Forrest en simbiosis con aislamientos bacterianos



## ANEXO DE TABLAS

**Tabla I:** Detalles de los tratamientos aplicados en el ensayo de nodulación y fijación de nitrógeno.

| <b>Tratamiento (6 repeticiones)</b> | <b>Cultivar</b> | <b>Inóculo</b> |
|-------------------------------------|-----------------|----------------|
| 1                                   | Essex           | E109           |
| 2                                   | Essex           | SEMIA 587      |
| 3                                   | Essex           | 163            |
| 4                                   | Essex           | 366            |
| 5                                   | Essex           | 2112           |
| 6                                   | Essex           | 953            |
| 7                                   | Essex           | Sin inocular   |
| 8                                   | Forrest         | E109           |
| 9                                   | Forrest         | SEMIA 587      |
| 10                                  | Forrest         | 163            |
| 11                                  | Forrest         | 366            |
| 12                                  | Forrest         | 2112           |
| 13                                  | Forrest         | 953            |
| 14                                  | Forrest         | Sin inocular   |



**ACTIVIDADES OPTATIVAS REALIZADAS**

| <b>Materia</b>  | <b>Fecha</b> | <b>Nota</b> | <b>Forma de Aprobación.</b> | <b>Acta/ Resol</b> | <b>Plan</b> | <b>Puntaje</b> |
|---|--------------|-------------|-----------------------------|--------------------|-------------|----------------|
| (M10A1)Producción porcina   | 25-03-2010   | 8           | Promoción                   | 2205               | 2005        | 6              |
| (M1081)Inglés Técnico   | 02-07-2010   | 8           | Promoción                   | 1048               | 2005        | 6              |
| (M1184)Transmisiones y elementos de unión utilizados en máquinas agrícolas y forestales. Expte. 200-2025/11                                 | 26-06-2012   | 9           | Promoción                   | 2294               | 2005        | 4              |
| (PATE6)Pasantía: Utilización de marcadores moleculares en la caracterización de Cepas Bradyrhizobium simbiotes de soja. Expte. 200-03445/12 | 20-03-2013   |             | Promoción                   | 2672               | 2005        | 6              |
| (SEMI1)Seminario: Actualidad Agropecuaria y el rol de la juventud. Expte. 200-004203/13   | 22-10-2013   |             | Promoción                   | 3169               | 2005        | 1              |
| (M1121)Procesos Evolutivos de Residuos Orgánicos para la Producción Lombricompuesto.  | 19-12-2013   | 8           | Promoción                   | 3227               | 2005        | 6              |
| (M1CC3)Fundamentos del manejo integrado de plagas. Expte. 200-4634/13   | 01-09-2014   | 8           | Promoción                   | 3773               | 2005        | 3              |