



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
TRABAJO FINAL

**Título: “COMPORTAMIENTO SIMBIÓTICO DE SIMBIONTES
NATURALIZADOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr), EN
CONDICIONES DE CAMPO”**

Alumna: Balda, Adriana Paola

Directora: Lic. Balagué, Laura

Co-director: PhD. Balatti, Pedro Alberto

Fecha de entrega: 16/09/2021

ÍNDICE:

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Descripción de la planta de soja.....	6
1.2. Fijación biológica de Nitrógeno.....	7
1.2. a. Selección de cepas naturalizadas para la fabricación de inoculantes comerciales.....	10
2. HIPÓTESIS.....	12
2.1. Objetivo principal.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Cepa control.....	12
3.2. Colección de aislados.....	13
3.3. Cultivo de microorganismos.....	13
3.4. Preparación del Inóculo de microorganismos.....	13
3.5. Ensayo a campo.....	13
3.6. Determinación de la distribución y cuantificación de nódulos y rendimiento.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Condiciones ambientales durante la campaña.....	16
4.2. Nodulación y fijación de N.....	18
4.3. Rendimiento.....	20
5. CONSIDERACIONES FINALES.....	22
6. CONCLUSIÓN.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

Índice de figuras:

Figura 1: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta.

Figura 2: Etapas finales del desarrollo de nódulos de leguminosas indeterminados (izquierda) y determinados (derecha).

Figura 3: Datos meteorológicos de EEJH. Precipitaciones, evapotranspiración y balance hídrico considerando 1 m de profundidad. Los Hornos, campaña 2019/20.

Figura 4: Evolución del almacenaje de agua en el suelo.

Figura 5: Número de nódulos en la raíz principal.

Figura 6: Número de nódulos totales por planta

Figura 7: Rendimiento expresado en kg/ha.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento simbiótico de dos aislados *B. japonicum* 163 y *B. japonicum* 366 que se obtuvieron de un lote manejado con siembra directa (SD), en Runciman, Santa Fe. Estas dos estirpes se estudiaron en sus características fenotípicas y fisiológicas, y en su capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones controladas de laboratorio, en donde se encontró que el aislado 366 desarrolló mayor número y biomasa de nódulos en comparación con la cepa control E109. El aislado 163 se encontró que tiene una marcada actividad de ACC desaminasa que podría estar relacionada con una senescencia demorada de los nódulos. En este marco se realizó un ensayo a campo en el que se evaluó la capacidad de fijación de estos dos aislados en comparación a la cepa comercial de *B. japonicum* E109. La evaluación del comportamiento simbiótico en condiciones de campo, busca poner en evidencia el potencial de estos aislados para la formulación de inoculantes. Si bien las cepas 163 y 366 indujeron la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, es evidente que tuvieron un comportamiento inferior a la cepa control E109. Los resultados arrojados dejan en evidencia que el aislado 366 en condiciones de campo no desarrolló mayor número de nódulos que la cepa control, como se había comprobado en condiciones controladas. No existen diferencias significativas entre los aislados evaluados y la cepa control en lo que refiere a rendimiento de grano, característica de elevada relevancia buscada en producción. La evaluación en condiciones de campo del comportamiento simbiótico, de las cepas *B. japonicum* 163 y *B. japonicum* 366, aislados de suelos con historia agrícola, en comparación con la cepa *B. japonicum* E109, pone en evidencia el potencial de las mismas para la formulación de inoculantes eficientes por su adaptación a nuestros suelos y condiciones climáticas.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento del cultivo de soja *Glycine max (L.) Merr* en Argentina se produjo a partir de la década del '60, la leguminosa se introdujo como planta forrajera para proveer proteínas a la alimentación animal (INTA, 2009). A medida que pasaron los años la importancia del cultivo fue incrementándose, produciéndose un crecimiento explosivo a partir de la liberación de la soja RR. Es un cultivo de particular importancia para la Argentina, ya que es un recurso que genera divisas para la economía de nuestro país, debido a los ingresos por la exportación de granos, como así también el agregado de valor de la industria aceitera (Martínez, 2010). A nivel mundial, USA, Brasil, Argentina y China integran los cuatro primeros productores (FAO, 2019).

En los últimos años, el aumento en la producción de soja, se produce como resultado de un conjunto de prácticas de manejo como la siembra directa, el uso de cultivares transgénicos, plantas con resistencia a enfermedades y/o resistencia a sequía, adopción de grupos de maduración adaptados a las distintas zonas productivas, etc. (Satorre et al., 2003; Bert y Satorre, 2013). Así, el aumento de la superficie sembrada, se dio tanto por la incorporación de nuevas tierras (antes consideradas marginales para el cultivo) como por la sustitución de otros cultivos regionales (Giancola et al., 2009).

En la campaña 2020/2021, se cosecharon 45 millones de toneladas en una superficie sembrada de 16,9 millones de hectáreas (BCR, 2021), siendo el primer exportador de aceite y de harina, con un 47% y 39,9% de participación en el mercado mundial respectivamente (BCR, 2021).

1.1. Descripción de la planta de soja:

La soja es una especie perteneciente a la familia de las Leguminosas (*Fabaceae*), subfamilia Papilionoideae, originaria del continente Asiático, Norte y Centro de China, donde fue domesticada, probablemente en el siglo XI A.C. (Hymowitz, 1970). Es una planta anual, herbácea, de cultivo estival. Sus hojas son alternas trifoliadas, excepto las basales que son simples. Presenta un sistema radicular potente que puede alcanzar hasta un metro de profundidad, aunque lo normal es que no supere los 40 a 50 cm. En cuanto a la inflorescencia, es de tipo racemosa en posición axilar y en número variable. Su fruto es una vaina dehiscente por ambas suturas, presentando entre tres y cuatro semillas (Hymowitz y Newell, 1981).

La fenología del cultivo se describe en dos estados principales: el estado vegetativo que involucra la emergencia del cultivo y la sucesiva aparición de hojas sobre el tallo principal; el segundo estado es el reproductivo, el cual se desarrolla desde la aparición de las primeras flores hasta la madurez de cosecha (Fehr y Caviness, 1977).

El grano de soja posee en su composición, un contenido de aceite de 20% y proteína en un 40% (Satorre et al., 2003). El elevado contenido proteico del grano sugiere que la planta tiene una alta demanda por este elemento que habitualmente es suplido por el N del suelo y la simbiosis que la planta establece con los rizobios presentes en el suelo. Ésta fija el N atmosférico por el proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN). En cultivos de soja sin limitantes ambientales para su desarrollo, entre el 50 y el 80% del nitrógeno requerido, puede provenir de la FBN (Salvagiotti, 2008). La eficiencia de este proceso, depende de muchos factores relacionados con la planta, las bacterias y el ambiente (Salvagiotti et al., 2015).

1.2. Fijación biológica:

La soja establece una relación simbiótica con microorganismos denominados “rizobios”, los cuales abarcan a bacterias que pertenecen a la subdivisión α -Proteobacteria y se pueden describir como bacilos, móviles, Gram (-) (Mulder et al., 2005). Este cultivo puede asociarse con varias especies de rizobios, entre ellas podemos citar a: *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu et al., 1995), *Bradyrhizobium arachidis* (Wang et al., 2013), *Bradyrhizobium betae* (Rivas et al., 2004); *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa et al., 2005), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Liu YH et al., 2018), *Bradyrhizobium cytisi* (Chahboune et al., 2011), *Bradyrhizobium daqingense* (Wang et al., 2013) *Bradyrhizobium denitrificans* (Van Berkum et al., 2006), *Bradyrhizobium huaguaihaiense* (Zhang et al., 2012), *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* (Chen et al., 2002).

El establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio, es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de reconocimiento de los organismos participantes. Las raíces de las plantas exudan flavonoides y estos interactúan con los rizobios, la especificidad de esta interacción, que está definida por la especie de hospedante y los rizobios, pueden conducir en las interacciones compatibles a la expresión de los genes nod (nodulación) (Perret et al., 2000). Estos codifican enzimas para la síntesis de factores de nodulación (lipo-quitina-oligosacáridos) que disparan los procesos metabólicos que conducen a la formación de nódulos. En síntesis, los rizobios ingresan a la corteza de la raíz a través de los hilos de infección (figura 1) en la zona de alargamiento de la raíz en donde todavía se encuentran desarrollando los pelos radicales. Como resultado de esto, el pelo radical se enrula y atrapa a los rizobios, los que liberan enzimas que degradan la pared y así comienza a producirse una invaginación de la membrana desarrollándose un hilo infectivo (Ferguson et al., 2010).



Figura 1: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta. (Extraído de Morón, 2006).

Este proceso conduce a la formación de nódulos determinados, estructuras que albergan a las bacterias simbióticas, las que por medio de la enzima nitrogenasa reducen el nitrógeno atmosférico (N_2) a amoníaco (NH_3) dejándolo disponible para la planta (Mulder et al., 2005).

La morfología de los nódulos determinados de soja es esférica y el meristema no persistente (figura 2), las células que invaden los bradyrizobios se encuentran todas en una misma fase de desarrollo (Ferguson et al., 2010). Estos nódulos permanecen activos algunas semanas y cuando senescen pueden desreprimirse otras infecciones preexistentes y formarse nuevos nódulos en la zona de la raíz en crecimiento. Los nódulos contienen una

proteína, llamada leghemoglobina, que compleja al O₂ del aire, generando tensiones de O₂ tales que evitan la inactivación de la enzima nitrogenasa.

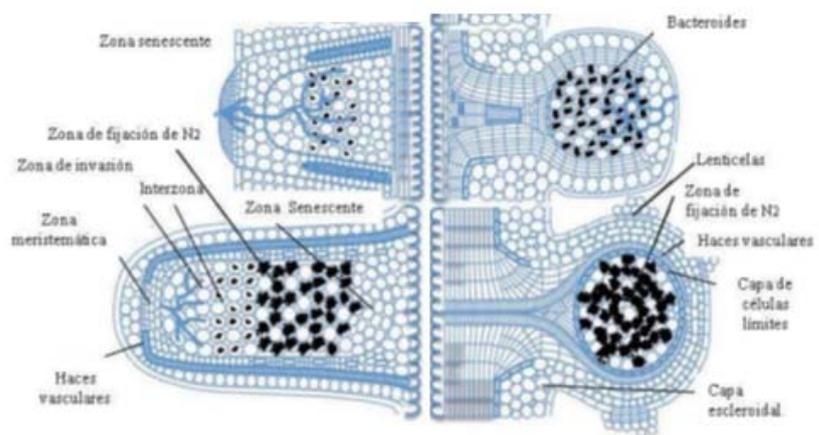


Figura 2: Etapas finales del desarrollo de nódulos de leguminosas indeterminados (izquierda) y determinados (derecha). (Modificado de Pastorino, 2016; Extraído de Ferguson et al., 2010).

Tanto la soja como las bacterias simbiotas son especies originarias del continente asiático, por lo que el manejo del cultivo de la leguminosa demandó introducir también los microorganismos simbióticos por medio de la formulación de inoculantes comerciales que se aplican en el momento de la siembra (Benintende et al., 2010; Peticari, 2005). El ingreso de rizobios a los cultivos por medio de la inoculación hace que los mismos se adapten a las condiciones del suelo, estableciendo de esta manera poblaciones alóctonas de rizobios en los suelos con historia agrícola en los que se ha cultivado la soja. Los rizobios inoculados se han adaptado y sobreviven durante muchos años a las condiciones edafoclimáticas

locales (Narozna, 2015). Las respuestas de los rizobios naturalizados a los factores ambientales abióticos y bióticos influyen en su competencia saprofítica y por la rizósfera, donde finalmente ocuparán los nódulos por genotipos individuales (Vlassak y Vanderleyden, 1997). Estas poblaciones naturalizadas de rizobios constituyen una fuente de competencia para las bacterias que se introducen con los inoculantes comerciales (Pastorino, 2016; Lodeiro, 2015).

Esas poblaciones que se incorporan al suelo se adaptan a las condiciones del mismo, lo que se refleja en que estas poblaciones suelen prevalecer en la ocupación de nódulos sobre las cepas que se adicionan con los inoculantes comerciales (Peticari et al., 2003). Esto probablemente ocurre debido a la abundancia de estas poblaciones y a su distribución en el perfil del suelo (Estrella et al., 2009).

González et al, (1997) evaluaron la capacidad simbiótica de cepas naturalizadas en diferentes suelos y describieron que la mayoría presenta buena capacidad de nodulación, aunque la capacidad de fijación de nitrógeno era media, comparada con las cepas seleccionadas. Estos resultados y lo descrito por Melchiorre et al., (2011), la selección de rizobios competitivos para nodular y fijar N son características claves para seleccionar rizobios cuando se formulan inoculantes comerciales, confirman la importancia de seleccionar cepas y evaluarlas en lo que hace a su desempeño en los suelos.

1.2. a. Selección de cepas naturalizadas para la fabricación de Inoculantes comerciales:

Investigaciones realizadas en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP mostraron que los suelos provenientes de lotes con antecedentes de siembra directa y labranza tradicional de Runciman (Provincia

de Santa Fe) albergan gran diversidad de rizobios noduladores de soja que difieren en sus características simbióticas, fisiológicas, de supervivencia y diversidad genética (López et al., 2013; Pastorino, 2016).

Tan importante como las características de supervivencia y competitividad que estos aislados alóctonos pudieran haber adquirido en la vida saprofítica, es la eficiencia de fijación de nitrógeno. En estas investigaciones, se analizaron 12 aislados alóctonos y estos mostraron una capacidad de fijación de N₂ similar a la cepa de referencia E109 (López et al., 2018).

Entre los doce aislados estudiados, dos aislados de estos, *B. japonicum* 163 y *B. japonicum* 366, presentaron comportamientos eficientes en la fijación de nitrógeno como la cepa altamente competitiva *B. japonicum* E109 recomendada por el INTA para formular inoculantes comerciales (López et al., 2018).

El aislado 366 desarrolló un mayor número y biomasa de nódulos, y probablemente como resultado de esto fijó más nitrógeno. El aislado 163 desarrolló el mismo número y biomasa de nódulos que E109 (López et al., 2018), pero estos conservaron coloración rojiza interna debido a la leghemoglobina durante un período más largo, tuvo un mayor contenido de leghemoglobina, y presentó altos niveles de expresión del gen *acdS*, que codifica para una ACC desaminasa regulando por esta vía la senescencia del nódulo (López et al., 2018).

El estudio del comportamiento en ensayos a campo de los rizobios aislados de suelos de Runciman, permitirá confirmar si se han identificado individuos con una mayor capacidad de fijación de nitrógeno con potencial biotecnológico para su uso en inoculantes.

2. HIPÓTESIS:

Los aislados de *Bradyrhizobium japonicum* 163 y *Bradyrhizobium japonicum* 366, nodulan y fijan más nitrógeno que la estirpe *B. japonicum* E109.

2.1. OBJETIVO GENERAL:

- Disponer de microorganismos fijadores de nitrógeno que se caractericen por una capacidad superior para fijar nitrógeno de manera que al interactuar con la soja contribuyan a la expresión del potencial de los cultivares.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Conocer la nodulación y capacidad de fijación de nitrógeno en cultivos de soja inoculados con cepas seleccionadas por su nodulación y senescencia demorada de los nódulos.
- Conocer el impacto de los aislados en el rendimiento de un cultivar de soja inoculado con los aislados seleccionados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. Cepa control: *Bradyrhizobium japonicum* E109, derivada de la cepa USDA138 de la colección de cepas del USDA, recomendada por INTA para ser utilizada en los inoculantes comerciales para soja (*Glycine max* (L) Merr).

3.2. Colección de aislados: Los aislados nodulantes de soja *B. japonicum* 163 y *B. japonicum* 366 se obtuvieron de un lote manejado con siembra directa (SD) en Runciman, Santa Fe, Argentina (ubicación latitud: - 33.900, longitud: - 61,250) (Pastorino, 2016).

3.3. Cultivo de los microorganismos: Se realizaron en medio de cultivo diferencial YEM (Extracto de levadura-manitol): Componentes en g.L-1: extracto de levadura 0,4; manitol 10; agar 15; MgSO₄.7H₂O 0,2; K₂HPO₄ 0,5 y NaCl 0,1, y solución de rojo Congo para una concentración final de 0,0025 %; pH 6,9 (Vincent 1970). La esterilización del medio se realizó en autoclave, a 121°C durante 20 minutos. Se incubó, incorporando oxígeno al medio por agitación, en un agitador orbital (150 rev. min⁻¹), a 28°C durante 7 días.

3.4. Preparación del Inóculo de microorganismos:

La densidad del cultivo microbiano, desarrollado en un medio de cultivo YEM líquido se estimó midiendo la DO en un espectrofotómetro (Shimadzu). Un valor de absorbancia a 625 nm igual a 1 equivale a una concentración de inóculo de $1,2 \times 10^9$ bacterias/ml. A partir del inóculo original se realizan diluciones para obtener, según recomienda el organismo de control de calidad de inoculantes comerciales (SENASA), un número de 1×10^6 rizobios presentes por semilla en la inoculación (Peticari, 2005).

Para adherir las bacterias a la semilla y evitar la desecación, se adicionó el protector bacteriano Premax (Rizobacter), en una proporción de 1 ml del producto cada 1 kilo de semillas de soja.

3.5 Ensayo a campo:

Durante la campaña 2019/20, se realizó un ensayo de campo en soja de primera, en la Estación Experimental Julio Hirschhörn EEJH (34° 52' LS, 57° 58' LO) Los Hornos,

partido de La Plata (Bs. As.), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Se realizó en un suelo Argiudol típico, serie Centeno, descrito por Lanfranco y Carrizo (1988, sin editar) clasificado taxonómicamente como: Argiudol vértico, Familia arcillosa fina illítica térmica.

Los datos meteorológicos registrados durante el ciclo del cultivo fueron obtenidos de la estación automática meteorológica modelo Davis Advantage Pro2, (ubicada: lat 34°59" LS -long 57°59"LO) de la sección agro meteorológica dependiente de la Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhörn.

El clima del área es templado pampeano húmedo, con una temperatura media diaria anual de 18°C y varía entre 23.6 °C en verano y 10.6°C en invierno. El valor medio anual de precipitaciones es de 900 - 1000 mm y su distribución presenta los menores valores en el periodo junio-agosto, mientras que los máximos se registran en los meses de diciembre, enero y marzo.

El cultivar de soja *Glycine max* (L.) Merr elegido fue Don Mario 42R12 STS, línea precomercial, grupo de madurez IV corto. Para el seguimiento fenológico del cultivar de soja se tomó como referencia la clave de Fher y Caviness (1977).

La superficie de las parcelas fue de 16 m², con una densidad de siembra de 50 semillas m², en hileras espaciadas a 0,42 cm.

El diseño experimental fue compuesto por bloques al azar completos con cuatro repeticiones de cada tratamiento.

Tratamientos:

- 1.-Testigo sin inocular.
- 2.-Testigo sin inocular. Fertilizado con urea.

3.- Inoculado con la cepa de referencia *Bradyrhizobium japonicum* E109.

4.- Inoculado con la cepa *B. japonicum* 163.

5.- Inoculado con la cepa *B. japonicum* 366.

Se fertilizó con 40 kg/ha de urea en el estado R1 (principio de floración).

Durante el ciclo se aplicó glifosato, a razón de 2 l/ha en estado V5, cuando la hoja trifoliada del nudo seis está desarrollada y en el nudo inmediato superior el borde de c/u de los folíolos no se tocan. Durante la etapa reproductiva, se aplicó Engeo (Tiametoxam y lambdacialotrina) para control de chinches, a razón de 150 cm³/ha.

3.6 Determinación de la distribución y cuantificación de nódulos y rendimiento:

A los 45 días de iniciado el cultivo se cuantificó el número de nódulos fijadores de N en la raíz principal (RP) y las raíces secundarias (RS).

Al finalizar el ciclo del cultivo, se evaluó la producción de biomasa y rendimiento.

Determinación de la infectividad y efectividad:

Nodulación: Se descalzaron en cada parcela todas las plantas presentes en 0,5 m lineales y se cuantificó el número de nódulos efectivos mayores a 1,5 mm presentes en la raíz principal (RP) y en las raíces secundarias (RS) de cada planta. Las observaciones fueron realizadas a los 45 días de iniciado el ensayo, en los surcos centrales de cada parcela.

Fijación de N: Al finalizar el ciclo del cultivo, (estado R8- Maduración completa) se evaluó el rendimiento (expresado en kg ha⁻¹). Para la cosecha se descalzaron en cada parcela todas las plantas presentes en 10 m lineales. Las observaciones se realizaron en los surcos centrales de cada parcela. El material se secó en estufa a una temperatura de 60°C con ventilación forzada hasta alcanzar peso constante. Se empleó una balanza analítica con una precisión de 0,01g.

El procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete estadístico InfoStat (InfoStat, 2017) utilizando análisis de la varianza y para la comparación de medias se emplea LDS (diferencia mínima significativa) al 5 % de probabilidad (Di Rienzo et al., 2019).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1. Condiciones ambientales durante la campaña

Las temperaturas medias mensuales registradas en los meses en que se llevó a cabo el ensayo fueron propicias, encontrándose las medias mensuales alrededor de los 22°C durante toda la campaña.

En la figura 3 se representan las precipitaciones ocurridas en el sitio experimental durante el ensayo, las cuales arrojan un valor de 453,2 mm totales. Normalmente la soja de primera requiere entre 500 y 650 mm totales durante el ciclo, sin embargo es una especie que tolera de manera adecuada la sequía. Por lo que podemos decir que para el desarrollo del ensayo fue suficiente.

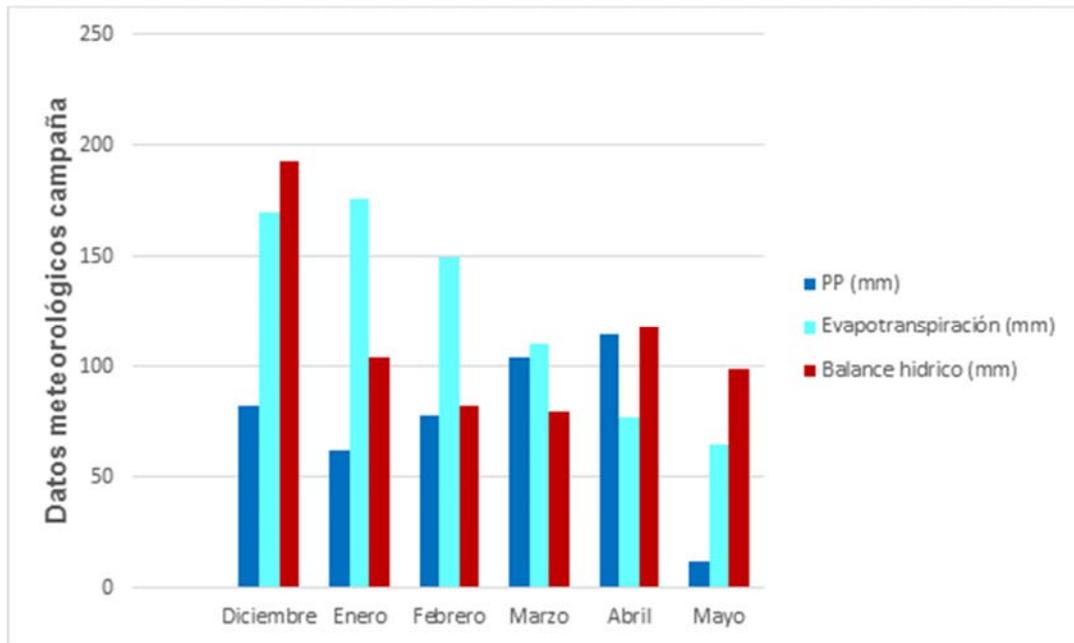


Figura 3: Datos meteorológicos EEJH. Precipitaciones (PP), evapotranspiración y balance hídrico considerando 1 m de profundidad. Los Hornos, campaña 2019/20.

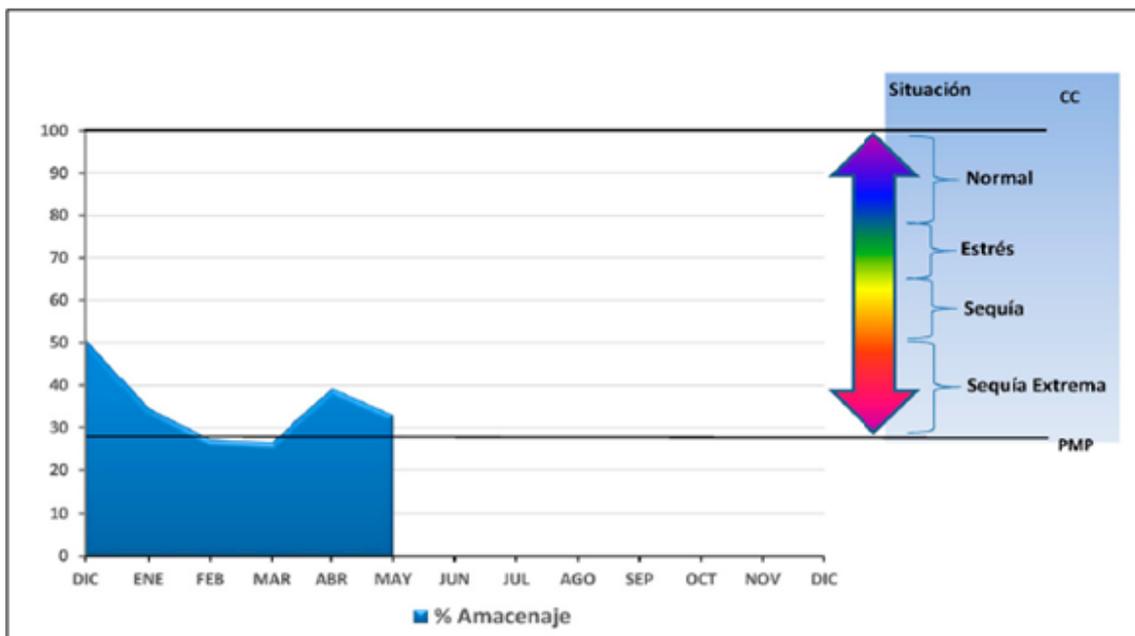


Figura 4: Evolución del almacenaje de agua en el suelo considerando una profundidad de 1 m, un valor máximo de 300 mm de agua en suelo argiudol típico con b2t (2019/20).

4.2. Nodulación y fijación de N:

La importancia de determinar la distribución de los nódulos en la raíz primaria radica en que la ubicación del nódulo está relacionada con la ventana de infección de la raíz que es de 6 horas aproximadamente. Es decir que, la distribución de los nódulos en la raíz refleja la velocidad con que los rizobios inducen al desarrollo de los nódulos (Bhuvanewari et al., 1980). Por este motivo se considera que los nódulos que se encuentran más cerca del cuello de la raíz comenzaron a desarrollarse más tempranamente y esto probablemente proviene de los rizobios que se colocaron sobre la superficie de la semilla en el momento de la siembra.

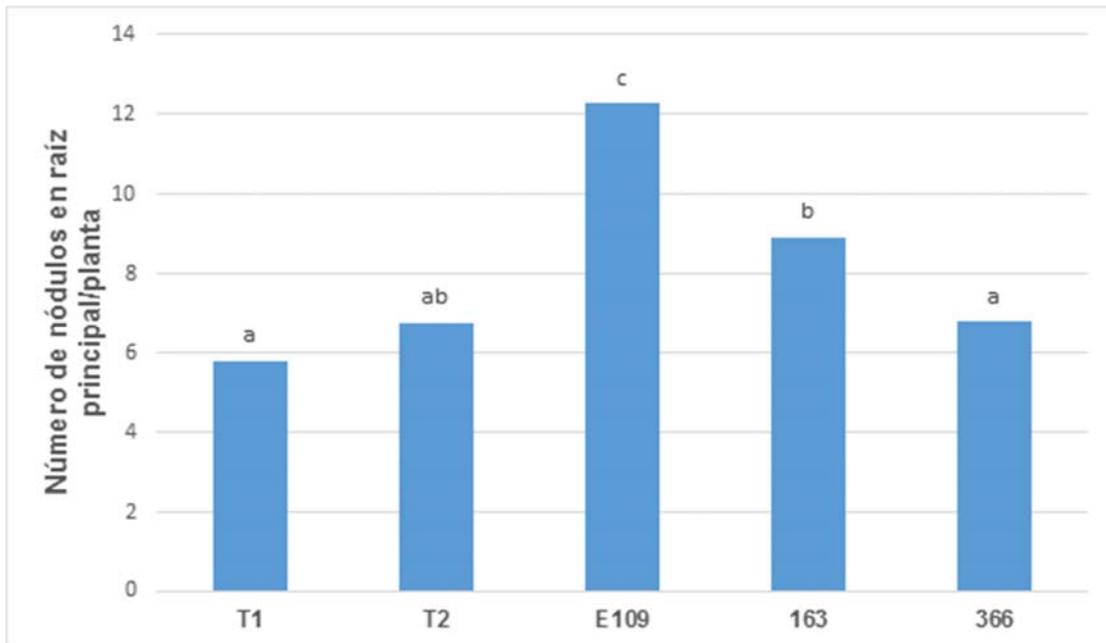


Figura 5: Número de nódulos ubicados en la raíz principal. Las letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas. (Test de LSD, $p < 0,05$).

Como puede observarse en la figura 5, cuando se determinó el número de nódulos presentes en la raíz principal, el tratamiento inoculado la cepa de referencia E109 presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos inoculados con las cepas 163 y 366. Por otra parte, la cepa 366 produjo un menor número de nódulos, valor que no fue estadísticamente distinto de la nodulación de las plantas de la parcela testigo no inoculado. También puede observarse que no existen diferencias significativas entre el testigo fertilizado y las cepas 163 y 366.

La velocidad de desarrollo de nódulos y una mayor biomasa de nódulos son características a considerar en la selección de rizobios (Kiers et al., 2013). Como ya se dijo anteriormente se infiere que las cepas que forman nódulos cerca del cuello de la raíz presentan una ventaja competitiva en relación a los rizobios que los desarrollan más tardíamente, en las raíces laterales.

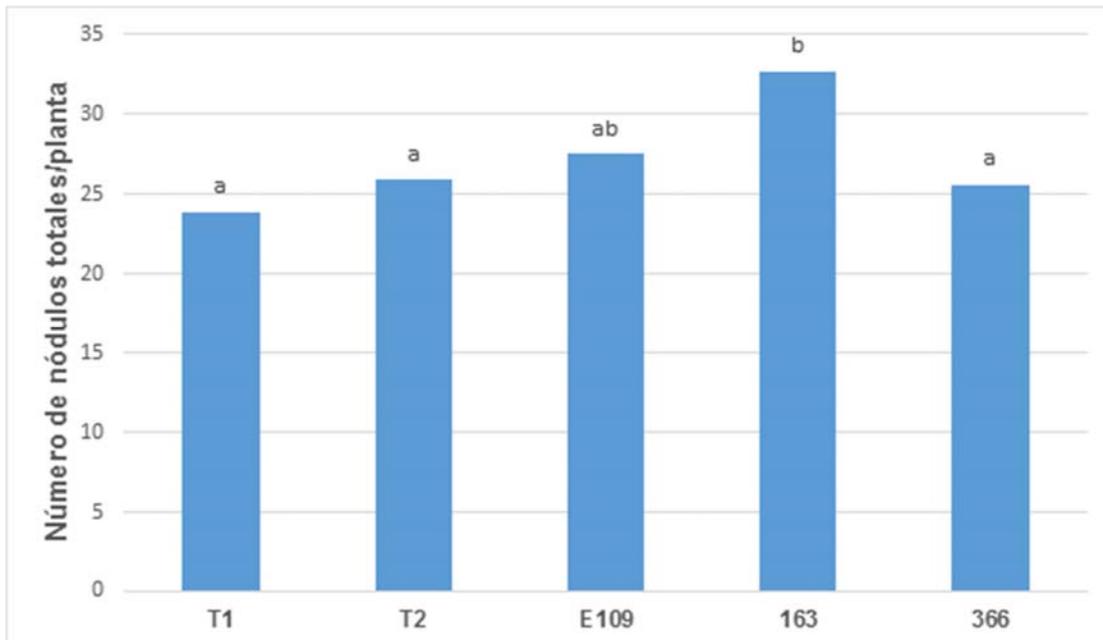


Figura 6: Determinación del número de nódulos totales por planta. Las letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$).

El número total de nódulos por planta (figura 6), fue similar entre los tratamientos inoculados con las cepas E109, 163 y 366 (Test LSD, $p < 0,05$).

La cepa 163 presentó diferencias significativas con respecto a los testigos sin inocular y fertilizado. No se corroboró el desarrollo de un mayor número en condiciones de campo para la cepa 366 que había sido observado por López et al., (2018).

Las plantas testigo no inoculadas y las fertilizadas presentaron nódulos sugiriendo que los suelos donde se implantó el ensayo contenían rizobios naturalizados (figura 5 y figura 6).

4.3. Rendimiento:

Se requieren en promedio aproximadamente 80 kg de N para producir 1 tonelada de grano de soja, dentro de un rango entre 53 y 156 kg de N por tonelada. El requerimiento

de N del cultivo es aproximadamente 4 veces superior al de los cereales, y está dado por la alta concentración de N en el grano (Salvagiotti et al., 2009), el cual es de alrededor del 75 % del nitrógeno adquirido por la planta (González, 2000; Lodeiro, 2015).

La inoculación de soja con rizobios seleccionados proveen de N a la planta por medio de la capacidad de fijación de la simbiosis, lo que suele reflejarse en incrementos de rendimiento (Andrade y Cirilo, 2000; González et al., 1997), que puede llegar a aumentar al menos en un 12% (Díaz Zorita et al., 2004).

En la figura 7 se presentan los valores de rendimientos observados para los tratamientos que presentaron variaciones importantes, pero estos no resultaron significativos (Test de LSD, $p < 0,05$). Sin embargo, es claro que las plantas inoculadas con las estirpes E109, 163 y 366 aumentaron sus rendimientos en 572, 458 y 329 kg/ha respectivamente. El tratamiento fertilizado con urea presentó una diferencia de 514 kg/ha con respecto al testigo no inoculado y fue el que más se acercó al rendimiento de plantas inoculadas con la cepa E109.

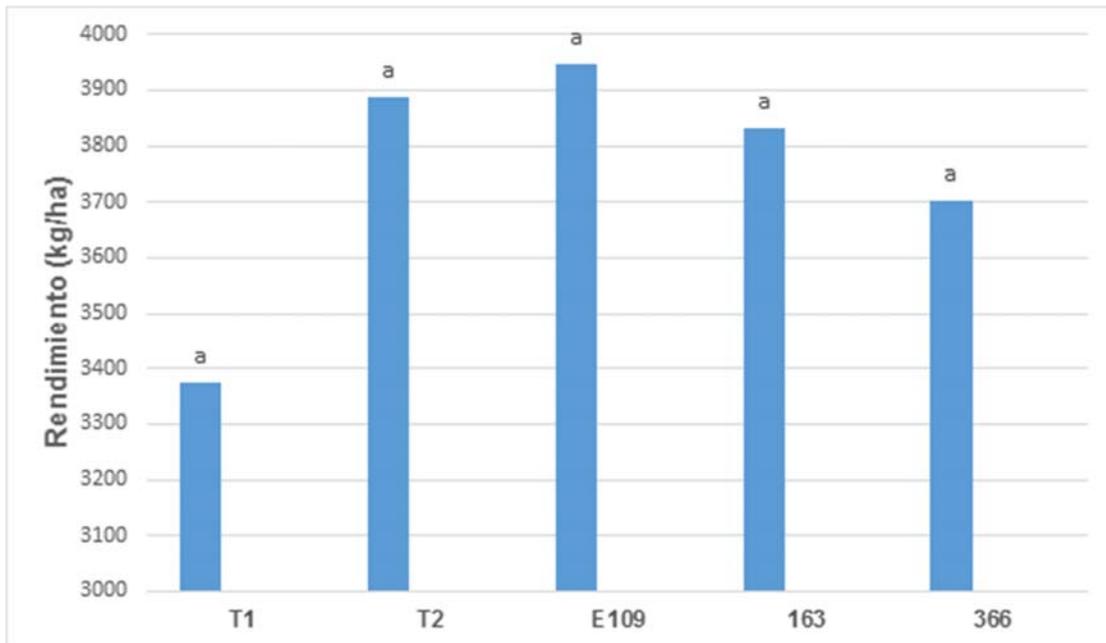


Figura 7: Rendimiento expresado en kg/ha. Las letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas. (Test de LSD, $p < 0,05$).

5. Consideraciones finales:

- Los suelos donde se realizó el ensayo contienen rizobios naturalizados, simbioses de la soja.
- La cepa E109 fue la que generó el mayor aumento de rendimiento.
- Si bien las cepas 163 y 366 indujeron la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, es evidente que tuvieron un comportamiento inferior a la cepa control E109.
- El N fijado por la simbiosis soja-E109 equivale al menos a una fertilización de 40 kg de urea/ha.

- En las condiciones ambientales ensayadas las cepas seleccionadas no demostraron ser superiores a la cepa comercial E109. No obstante, presentaron comportamiento eficiente en la fijación de nitrógeno.
- Finalmente, podemos aceptar la hipótesis quedando demostrado el potencial de los aislados en su comportamiento simbiótico, tanto en infectividad como efectividad que se expresa finalmente en el rendimiento. Sin embargo, se observó que el aislado 366 no desarrolló mayor número de nódulos tal como se había demostrado en condiciones de laboratorio.

6. CONCLUSIÓN:

La evaluación en condiciones de campo del comportamiento simbiótico, de las cepas *B. japonicum* 163 y *B. japonicum* 366, aislados de suelos con historia agrícola, en comparación con la cepa *B. japonicum* E109, pone en evidencia el potencial de las mismas para la formulación de inoculantes eficientes por su adaptación a nuestros suelos y condiciones climáticas. Es relevante el estudio y desarrollo de nuevos productos a partir de cepas naturalizadas en nuestros suelos que sean altamente competitivas y efectivas.

7. Bibliografía:

Andrade, F.; Cirilo, A. 2000. Bases para el manejo del Maíz, el Girasol y la Soja. ANDRADE, F. Y SADRAS V. (Eds). Buenos Aires, Argentina. 295 p.

BCR (Bolsa de Cereales de Rosario) 2021. Estimaciones de producción campaña 2020/2021. <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/gea/estimaciones-nacionales-de-produccion/estimaciones> . Último acceso Septiembre 2021.

Participación de Argentina en comercio internacional <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/la-46>. Ultimo acceso Septiembre 2021

Benintende, S., Uhrich, W., Herrera, M., Gangge, F., Sterren, M., & Benintende, M. 2010. Comparación entre co inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. *agriscientia*, 27(2).

Bert, F.E. y Satorre, E.H. 2013. Factores determinantes de la productividad de soja en la Argentina. Tercera jornada del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales: Aportes de la microbiología a la producción de cultivos.

Bhuvaneshwari, T., Turgeon, B. & Bauer, W. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1027-1031.

Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 2922-2927.

Chen, L., Figueredo, A., Villani, H., Michajluk, J., & Hungria, M. 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 448-457.

Datos meteorológicos EEJH Sección agrometeorología, Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola y Estación Experimental "Ing. Agr. Julio Hirschhorn".

- Díaz Zorita, M.; Baliña, R.; Fernández Canigia, M.** 2004. Inoculación con *Bradhyrizobium japonicum* en cultivos de Soja. En: Campaña 2003-04. Resumen de resultados de investigación y desarrollo aplicado. Nitragin Argentina S.A. Argentina, pp. 7-12.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzales, L., Tablada, M. y Robledo, C.** 2019. Infostat Versión 2019. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Software Estadístico. Versión Libre. Disponible en: <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=46> Último acceso: Enero 2021.
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J.** 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), 1088-1098.
- FAO.** 2019. Base de datos estadística de la Food and Agriculture Organization or the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/> Última consulta: Febrero 2020.
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E.** 1977. Stages of soybean development. Spec. Rep. 80. Iowa Agric. Home Econ. Exp. Stn., Iowa State Univ., Ames.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M.** 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 61-76.
- Giancola, S. I., Salvador, M. L., Covacevich, M., Oliveros, I. E., Iturrioz, G., & Anguil, I. E.** 2009. Análisis de la cadena de soja en la Argentina (No. E21/110). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires (Argentina). Proyecto Específico 2742: Economías de las Cadenas Agroalimentarias y Agroindustriales.
- González, N.** 2000. Inoculación e inoculantes. *Fertilizar*, 21: 18-21.
- González, N. Peticari; B. Stegman de Gurfinkel y E. Rodríguez Cáceres,** 1997. Nutrición nitrogenada. En L. M. Giorda & H. E. J. Baigorri, eds. *El cultivo de la soja en Argentina*. INTA, Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez- EEA., pp. 188–198.
- Hymowitz, T.** 1970. On the domestication of the soybean. *Economic botany*, 24(4), 408-421.
- Hymowitz, T., & Newell, C. A.** 1981. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. *Economic botany*, 35(3), 272-288.

- Jordan, D.C.** 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32, 136-139.
- Kiers, E.T., Ratcliff, W.C., Denison, R.F.** 2013. Single-strain inoculation may create spurious correlations between legume fitness and rhizobial fitness. *New Phytologist* 198: 4-6.
- Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E., & Udell, S. E.** 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 501-505.
- Lanfranco, J. & N. Carrizo** 1988. Cartas de suelo de la Estación Experimental Julio Hirschhorn. Sin editar.
- Liu, Y. H., Wang, E. T., Jiao, Y. S., Tian, C. F., Wang, L., Wang, Z. J. & Chen, W. F.** 2018. Symbiotic characteristics of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 mutants associated with shrubby sophora (*Sophora flavescens*) and soybean (*Glycine max*). *Microbiological research*, 214, 19-27.
- Lodeiro, A.R.** 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Rev Argent Microbiol* 47(3):261– 273.
- López, S. M. Y., Pastorino, G. N., Martínez Alcántara, V., Salvucci, R. D., Balatti, P. A., & Albanesi, A. S.** 2013. Los rizobios que nodulan la soja en sitios con ambientes nativos y cultivados de la Argentina.
- López, S. M., Sánchez, M. D. M., Pastorino, G. N., Franco, M. E., García, N. T., & Balatti, P. A.** 2018. Nodulation and delayed nodule senescence: strategies of two *Bradyrhizobium japonicum* isolates with high capacity to fix nitrogen. *Current microbiology*, 75(8), 997-1005.
- Martínez, F. F.** 2010. Crónica de la soja en la región pampeana argentina. *Para Mejorar la Producción (INTA, EEA Oliveros)*, 45, 141-146.
- Melchiorre, M., De Luca, M. J., Anta, G. G., Suarez, P., Lopez, C., Lascano, R., & Racca, R. W.** 2011. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils*, 47(1), 81-89.

- Morón, B., Dardanelli, M.S., Sousa, C. y Mejías, M.** 2006. Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. *Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones* (pp. 160-171). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.
- Mulder, L.; B. Hogg; A. Bersoult and J. V. Cullimore.** 2005. "Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobiasymbiosis", *PhysiolPlant* 123: 207-218.
- Narożna, D., Pudelko, K., Króliczak, J., Golińska, B., Sugawara, M., Mądrzak, C. J., & Sadowsky, M. J.** 2015. Survival and competitiveness of Bradyrhizobium japonicum strains 20 years after introduction into field locations in Poland. *Applied and environmental microbiology*, 81(16), 5552-5559.
- Pastorino G.N.** 2016. Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos de la Pampa húmeda e identificación de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Perticari, A.** 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Actas del Congreso Mundo Soja, Buenos Aires (Argentina), p.121-126.
- Perticari, A.; N. Arias, H. Baigorri, J. De Battista, L. Lett, M. Montecchia, J. Pacheco Basurco, A. Simonella, S. Toresani, L. Ventimiglia y R. Vicentini.** 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. Capítulo 7. El libro de la soja. Ed. SEMA. pp. 69-76.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., García-Benavides, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velazquez, E.** 2004. Bradyrhizobium betae sp. nov., isolated from roots of Beta vulgaris affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1271-1275.
- Salvagiotti F., G. Cassman, James E. Specht, Daniel T. Walters, Albert Weiss.** 2008. Nitrogen Uptake, Fixation and Response to Fertilizer N in Soybeans: A Review. *Field Crops Research* 108: 1- 13.
- Salvagiotti, F., Capurro, J., & Enrico, J. M.** 2009. El manejo de la nutrición nitrogenada en soja. *Para mejorar la producción*, 42, 45-51.

- Salvagiotti, F Collino, D. J., Peticari, A., Piccinetti, C., Ovando, G., Urquiaga, S., & Racca, R. W.** 2015. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. *Plant and Soil*, 392(1), 239-252.
- Salvagiotti, F., Collino, D. J., Peticari, A., Piccinetti, C., Ovando, G., Urquiaga, S., & Racca, R. W.** 2015. El aporte de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja en Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*, 20, pp.7–11.
- Satorre, E., Benech Arnold, R., Slafer, G., de la Fuente, E., Miralles, D., Otegui, M., Savin, R.** 2003. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Capítulo 9: Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en soja. Páginas 167-201.
- Van Berkum, P., Leibold, J. M., & Eardly, B. D.** 2006. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 207-215.
- Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E.** 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 569-575.
- Vlassak, KM y J. Vanderleyden.** 1997. Factores que influyen en la ocupación de nódulos por rizobios inoculantes. *Crit. Rev. PlantSci.*
- Wang, J. Y., Wang, R., Zhang, Y. M., Liu, H. C., Chen, W. F., Wang, E. T., & Chen, W. X.** 2013. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_2), 616-624.
- Wang, R., Chang, YL., Zheng, WT., Zhang, D., Zhang XX., Sui, XH., Wang, ET., Hu, JQ., Zhang, LY., Chen, WX.** 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Syst. Appl. Microbiol.* 36:101-105.
- Xu LM, Ge C, Cui Z et al.** 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov, isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 45:706–711.

Zhang, Y. M., Li Jr, Y., Chen, W. F., Wang, E. T., Sui, X. H., Li, Q. Q., & Chen, W. X. 2012. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_8), 1951-1957.