



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: “Capacidad infectiva de aislados simbiotes de soja (*Glycine max* (L) Merr) provenientes de suelos con distinta labranza”

Alumna: Perrone Ayelen

Director: Lic. Balagué Laura

Co-director: Prof. PhD Balatti Pedro

Fecha de entrega: 03/05/2017

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
RESUMEN	5
1- INTRODUCCIÓN	6
1.1.a. Importancia del cultivo de soja en Argentina	6
1.1.b. Características generales del cultivo	7
1.2. Rizobios	8
1.3. a. Relación simbiótica entre rizobios y leguminosas. Fijación biológica de N ₂	8
1.3. b. Pasos de la infección	9
Figura 1: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta. (Extraído de Morón, et al, 2006).....	11
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).....	12
1.4. a. Competencia entre rizobios naturalizados e inoculados	13
1.4. b. Competencia entre rizobios y su relación con la ubicación en el nódulo	14
1.5. La labranza como uno de los factores de influencia en el comportamiento de rizobios en el suelo	15
1.6. Importancia de la selección de cepas naturalizadas como estrategia en la fabricación de inoculantes	16
2- HIPÓTESIS:.....	18
2.1. Objetivo general:.....	18
2.2. Objetivos específicos:.....	18
3- MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Cepas control empleadas como inoculantes comerciales:	19
3.2. Colección de aislados: Aislados nodulantes de soja provenientes de suelos de Runciman (Pcia. De Santa Fe) con distintos tipos de labranza.	19
3.3. Medios de cultivo:.....	19
3.4. Ensayos para evaluar la infectividad y efectividad de los aislados:	20
3.4. a- Método de determinación del Porcentaje de Plantas Noduladas (PPN) (SENASA Resolución 264/2011. Método Burton modificado, Capítulo 12).....	20
Figura 3: Representación gráfica del cilindro imaginario definido para la cuantificación de nódulos con el método PPN.	21

3.4. b. Peso seco de las plantas.....	22
3.4. c. Altura	22
3.5 Análisis de los datos	22
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1. Evaluación de la infectividad.....	23
Tabla 1: Porcentaje de plantas noduladas.	24
4.2. Determinación del Número de Nódulos totales en los primeros 2,5 cm de la raíz principal y de las raíces secundarias.....	25
4.2. a- Número de nódulos totales en raíz principal y raíz secundaria. Segmento inicial (2,5 cm).....	26
Figura 4: Determinación del Número de Nódulos por Planta en el sector inicial de la raíz principal y de las raíces secundarias (2,5 cm). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$).	26
4.2. b- Nódulos en raíz principal. Segmento inicial 2,5 cm.	27
Figura 5: Número de nódulos en los primeros 2,5 cm de la raíz principal. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas. (Test de LSD, $p < 0,05$).	27
4.3. Distribución de nódulos sobre la raíz principal.....	28
Tabla 2: Distribución de nódulos (%) en segmentos de 0,5 cm sobre la raíz principal.	29
4.4. Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal.	30
Figura 6: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal. Cepas de referencia <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109, SEMIA587, SEMIA5019 y <i>B. elkanii</i> SEMIA5079 y SEMIA5080. Se representa el desvío estándar (DE).	31
Figura 7: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal. Cepas evaluadas <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 163, 455, 665 y 2614. Se representa el desvío estándar (DE). ..	32
Figura 8: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal.	33
Cepas evaluadas 457 y 458. Se representa el desvío estándar (DE).	33
Figura 9: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal.	34
Cepas evaluadas 115, 366, 953 y 9110. Se representa el desvío estándar (DE).	34
4.5. Determinación de la biomasa aérea de las plantas	35
Figura 10: Peso seco de la biomasa aérea promedio en gramos por planta. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$).	35
4.6. Determinación de la altura por planta.....	37

Figura 11: Altura de la parte aérea. Promedio por planta en cm. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$)..... 37

4.7. Consideraciones finales..... 38

5- CONCLUSIÓN..... 39

6- BIBLIOGRAFÍA..... 40

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el comportamiento simbiótico de doce cepas de rizobios aisladas de suelos con distinta historia agrícola, nueve de ellas provenían de un suelo trabajado durante ocho años bajo siembra directa y tres de ellas de un suelo trabajado durante ocho años con labranza convencional. El objetivo fue evaluar la capacidad de las cepas para formar nódulos y fijar nitrógeno. El comportamiento de las cepas aisladas se comparó con las cepas comerciales que se utilizaron de referencia, entre ellas, la E109 recomendada por el INTA. Todas las cepas evaluadas presentaron un porcentaje de plantas noduladas igual o superior al 80%. Las cepas 455 y 665 son potencialmente viables para la fabricación de nuevos inoculantes por tener la misma capacidad para formar nódulos y fijar nitrógeno que las cepas comerciales actualmente utilizadas. Por último, no se encontró relación directa entre la procedencia de los aislados y su capacidad para formar nódulos y fijar N_2 .

1- INTRODUCCIÓN

1.1.a. Importancia del cultivo de soja en Argentina

La soja, *Glicine Max* (L.) Merr, pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosas), Subfamilia Papilionoideas, pero a diferencia de otros integrantes de dicha familia, posee características que le son propias, y se destaca entre otras cosas por el alto porcentaje de proteína del grano y la calidad nutritiva del mismo. El cultivo de la soja es considerado uno de los más antiguos, siendo el origen del mismo el norte y centro de China (Hymowitz, 1970).

La introducción de la soja en Argentina se produjo en los años sesenta, con el objetivo de proveer proteínas a la alimentación animal (INTA, 2009), pasando en el transcurso de 30 años, a transformarse en el principal cultivo a nivel nacional (Martínez, 2010).

En los últimos años, el aumento significativo de la producción de soja en el país, fue acompañado por un importante aporte de la tecnología: siembra directa, surgimiento de variedades transgénicas, mejoramiento genético en busca de resistencia a enfermedades, adopción de grupos de maduración de mejor comportamiento y el desarrollo de materiales adaptados a las distintas zonas productivas (Satorre et al, 2003). 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.

Actualmente, Argentina junto con Brasil, China y Estados Unidos son los países que concentran más del 95% de la producción. A nivel mundial, la producción en 2015 fue de 320,5 millones de toneladas, siendo los principales productores Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e India. En el país la producción fue de 58,5 millones de toneladas. (Ybran y Lacelli, 2015).

En este último período el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estima que la Producción Mundial de Soja 2016/2017 será de 345.96 millones de toneladas, de las cuales 56 millones corresponden a Argentina.

1.1.b. Características generales del cultivo

La soja es una planta anual, herbácea, de cultivo estival. Se trata de una especie de crecimiento indeterminado cuya morfología presenta importantes variaciones en cuanto a altura, ramificaciones, estructura de canopeo y forma de las hojas, que son debidas tanto a factores genéticos como ambientales y también al efecto de las prácticas culturales.

La planta de soja posee una raíz primaria pivotante y numerosas raíces secundarias, siendo estas las principales responsables de la exploración del suelo.

La parte aérea de la planta consta de tallo principal, ramas y hojas; todas las partes anatómicas mencionadas presentan abundante pubescencia. El tallo erecto y más o menos ramificado normalmente alcanza una altura que oscila entre los 0,40 y 1,20 m, presenta en general, entre 14 y 26 nudos. Esto depende de la variedad (hábito de crecimiento), época y densidad de siembra, la latitud y la duración del ciclo (Apunte interno, Curso Oleaginosas y Cultivos Regionales, 2011).

Si bien la soja es una especie de crecimiento indeterminado, debido a la existencia de diferentes grados de superposición entre el crecimiento vegetativo y el reproductivo, se clasifica en dos tipos de cultivares: de crecimiento indeterminado y determinado. Estos hábitos de crecimiento determinan estructuras de canopeo muy diferentes, confiriéndole al cultivo respuestas diferenciales ante los distintos factores que lo afectan (Apunte interno, Curso Oleaginosas y Cultivos Regionales, 2011).

En cuanto a la composición química del grano, esta se encuentra definida por el contenido de aceite y la concentración de proteína presentes, aproximadamente un 20% del peso de la semilla es aceite y un 40% proteína (Satorre et al, 2003).

1.2. Rizobios

Los rizobios (del griego rizo= raíz y bios= vida) son bacterias Gram (-) móviles que habitan el suelo y tienen forma de bacilo. Este término incluye un grupo heterogéneo de microorganismos que poseen en común la enzima nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico (N_2) y lo convierte en amonio (Jordan1984; Graham 2008).

Hasta la fecha, se han descrito más de 48 especies en 9 géneros de bacterias que forman nódulos con leguminosas. Se ha reportado que los rizobios tienen tres estados de vida diferentes: uno dentro de los nódulos de las leguminosas, otro en el suelo y otro dentro de plantas no leguminosas como endófitos. Todos los rizobios pueden vivir muy bien como saprófitos en los suelos o en medios de cultivo. Cuando están activos fijando nitrógeno, las células tienen formas irregulares: curvas, en forma de X o de Y, denominadas bacteroides (Berrada, 2014).

1.3. a. Relación simbiótica entre rizobios y leguminosas. Fijación biológica de N_2 .

Las leguminosas se caracterizan por poseer dos vías por medio de las cuales captan y asimilan nutrientes nitrogenados. Una de ellas parte de compuestos nitrogenados solubles que se encuentran disponibles en la solución del suelo y la otra requiere de la asociación con rizobios fijadores de nitrógeno (Lodeiro, 2015). Así se establece una simbiosis rizobio-leguminosa, en la cual, la bacteria le brinda a la planta

nitrógeno, obteniendo a cambio, compuestos carbonados y un ambiente favorable para fijar nitrógeno (Wang et al, 2002).

Los rizobios dentro de los nódulos encuentran un ambiente con baja presión parcial de O_2 , que es clave para la actividad del complejo nitrogenasa, que es el que cataliza la reducción de N_2 atmosférico a NH_4^+ , el cual queda disponible para la planta.

El rendimiento de la soja depende fuertemente de la disponibilidad de nitrógeno, el que puede provenir de la mineralización de la materia orgánica del suelo o de la simbiosis con los rizobios del suelo. La fuente más económica y ecológica de N es la FBN, cuya eficiencia depende de muchos factores relacionados con la planta, las bacterias, la simbiosis y el medio ambiente (González, 2006). Cuando alguno de los factores mencionado impacta sobre la simbiosis esta no es efectiva, la nodulación es pobre. Sin embargo esto suele no estar relacionado a un bajo rendimiento, debido a que las plantas compensan esta caída en la provisión de N, extrayéndolo del suelo, lo que conduce al empobrecimiento del mismo. Esta forma de explotación de la reserva de N del suelo no es sostenible a lo largo del tiempo (Pastorino, 2016).

Es por eso que es de gran importancia asegurar las condiciones óptimas para que se produzca una fijación biológica de nitrógeno de manera eficiente.

El proceso de nodulación es complejo, y consiste en una serie de etapas en las que se produce la expresión coordinada tanto de un conjunto de genes de la planta como de la bacteria, esta comunicación molecular que se establece entre los simbioses es altamente específica (Morón et al, 2006).

1.3. b. Pasos de la infección

El proceso de nodulación se inicia con el intercambio de señales, ya que como respuesta a los compuestos excretados por las plantas (flavonoides, ac. aldónicos y

betaínas) que interactúan con la proteína NodD sintetizada por las bacterias, se induce en ellas la síntesis de una molécula lipoquitooligosacáridica, conocida como “factor Nod” o factor de nodulación. Esta, desencadena una serie de cambios en la raíz de la planta que finalizará con la formación del nódulo (Lodeiro, 2003). Luego de la adherencia del rizobio a la planta, a través de proteínas específicas, como la ricadesina, los pelos radicales se enroscan, debido a la acción de tipo hormonal de los factores Nod secretados por la bacteria (Wang et al, 2002)

A continuación como resultado de la invaginación de la membrana celular se forma en el pelo radical el hilo infectivo (Figura 1), que contiene a los rizobios. Este hilo infectivo es una vía por la que los rizobios se mueven hacia la corteza de la raíz en donde se induce la división celular que se extiende hacia capas más internas, formándose así el meristema del nódulo, que es infectado por los rizobios que llegan a través del hilo infectivo. Las raíces de ciertas especies de leguminosas son infectadas por los rizobios a través de roturas que se producen en la epidermis de la superficie radical. En el interior de los nódulos las bacterias adoptan forma de bacteroides, que son las formas diferenciadas que fijan N_2 . El nódulo provee un ambiente, de baja tensión de oxígeno y allí es donde el nitrógeno es reducido a NH_4^+ , por la enzima nitrogenasa. Es decir que la bacteria fija el nitrógeno del aire y se lo entrega a la planta como amonio y la planta, aporta sustratos carbonados a la bacteria (Morón et al, 2006).

Los nódulos contienen una proteína, llamada leghemoglobina, que compleja al O_2 del aire y lo libera gradualmente en el interior del nódulo, generando dentro del mismo, tensiones de O_2 tales que evitan la inactivación de la enzima nitrogenasa, sin embargo en estas condiciones se produce la respiración aeróbica en el interior del nódulo que es la principal fuente de ATP para el proceso. La presencia de la proteína leghemoglobina se puede visualizar por el color rojizo de los nódulos, lo que de manera indirecta indica actividad de fijación de nitrógeno (Morón et al, 2006).

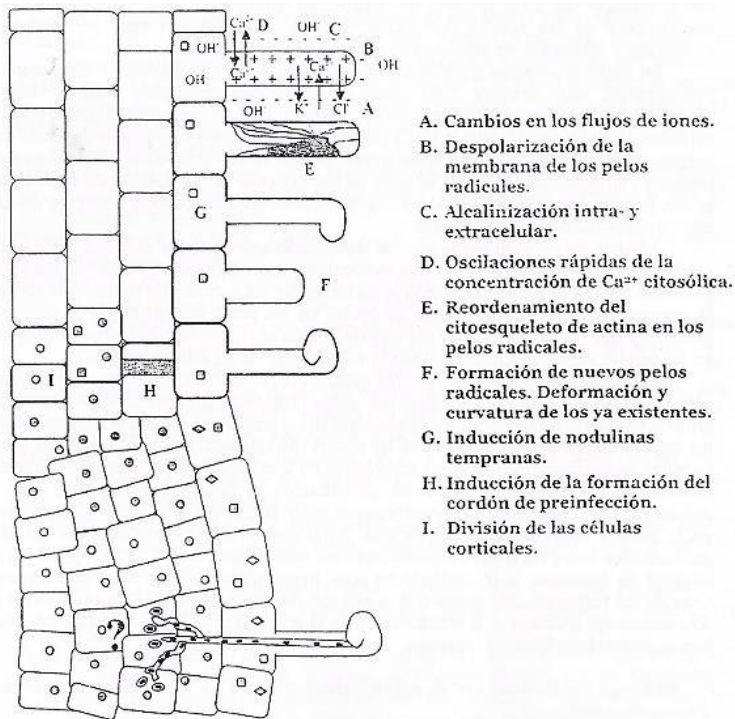


Figura 1: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta. (Extraído de Morón et al, 2006).

Existen dos tipos morfológicos de nódulos en las leguminosas: determinado e indeterminado (Figura 2). Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son el sitio de las primeras divisiones celulares internas, el mantenimiento de una región meristemática, y la forma de los nódulos maduros (Ferguson et al, 2010). Los nódulos indeterminados tienen un meristema persistente, que se ubica en el ápice del nódulo, que cuando crece se alarga y toma forma de un tubo, lo que resulta en nódulos de forma cilíndrica como los nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium repens*) y arveja (*Pisum sativum*). Las células que se generan en el meristema apical se infectan con bacterias. Así en la madurez, los nódulos indeterminados contienen una zona meristemática de división celular, una zona en donde se infectan las células, una zona de activa fijación y una zona

de senescencia en la que las células contienen acumulación de almidón. Es decir que en un nódulo indeterminado coexisten estados de desarrollo del nódulo. En cambio en los nódulos determinados, que suelen ser esféricos y el meristema está presente y activo en etapas tempranas del desarrollo del nódulo, que luego crece por aumento del tamaño de las células. En la madurez, los nódulos determinados contienen un solo estado de desarrollo y es decir el nódulo está fijando activamente o esta senescente, debido a que la diferenciación de las células infectadas se produce en forma sincronizada, seguida de la senescencia. Estos nódulos tienen una vida útil de unas pocas semanas. Cuando los nódulos senescen, se forman nuevos nódulos que desarrollan a partir de infecciones preexistentes en la raíz. Las leguminosas que forman nódulos determinados son predominantemente de especies tropicales y subtropicales, incluyendo la soja (Ferguson et al, 2010).

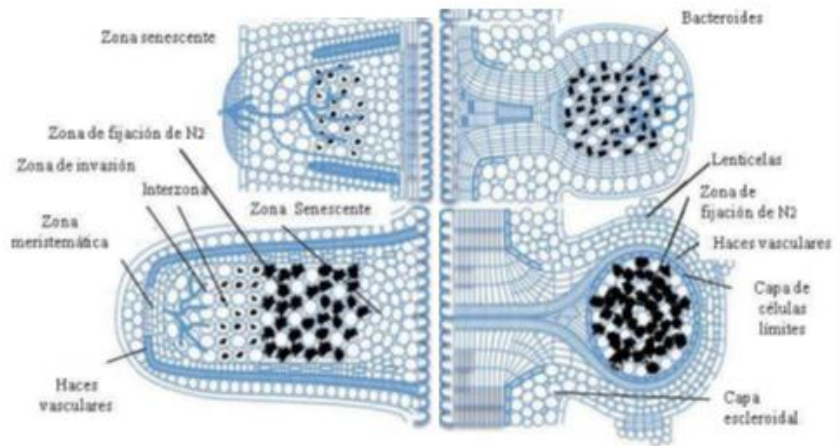


Figura 2: Etapas finales del desarrollo de nódulos de leguminosas indeterminados (izquierda) y determinados (derecha). (Modificado de Pastorino, 2016; Extraído de Ferguson et al, 2010).

1.4. a. Competencia entre rizobios naturalizados e inoculados

Cuando los investigadores descubren que los bacteroides intranodulares se pueden aislar y que existe una relación entre la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno demuestran la gran ventaja de adicionar cultivos puros de rizobios a la semilla en el momento de la siembra de semillas de leguminosas. Es así como nace asociado al cultivo de leguminosas, el concepto de inoculantes y el origen industrial de estas formulaciones comerciales (Peticari et al, 2005).

En Argentina, la práctica de la inoculación se fue generalizando rápidamente y el uso masivo de los inoculantes creció íntimamente asociado al desarrollo del cultivo de la soja (Pena et al, 2013).

La reiterada inoculación de los cultivos de soja a lo largo de varios años llevó al establecimiento de poblaciones autóctonas de rizobios en los suelos de la Argentina. Estos rizobios de la población autóctona del suelo están adaptados a las condiciones edafoclimáticas locales y por ello suelen ser lo que preferentemente ocupan los nódulos de la soja, aun cuando el cultivo se haya inoculado con un inoculante de buena calidad (Peticari et al, 2007).

La fijación de N_2 de una planta depende tanto de la eficacia de cada nódulo como del número total de nódulos. Si la mayor parte de los nódulos está ocupada por rizobios provenientes de la población autóctona del suelo la tasa de fijación, en general es inferior (y a veces muy inferior) a la de la cepa seleccionada que se usó para inocular (Lodeiro, 2015). Por otro lado esto está indicando una ineficiencia importante del proceso de la inoculación.

Sin embargo, en otras ocasiones puede resultar que la cepa naturalizada no sólo genere más cantidad de nódulos sino que tenga una tasa de fijación mayor que el inoculante. Por este motivo se estudia el comportamiento de las cepas naturalizadas y en

el caso de la obtención de buenos resultados, una estrategia de los fabricantes es utilizar la cepa naturalizada en la generación de nuevos inoculantes de mejor comportamiento (Uribe, 1994).

Tal como lo expresa Pastorino (2016), es importante estudiar las poblaciones naturalizadas de cada región, con el fin de identificar cepas adaptadas a las condiciones naturales y que fijan N_2 más eficientemente. En otros países de la región como en Brasil se han llevado a cabo programas de selección de cepas, los cuales han generado progresos importantes (Santos et al, 1999).

1.4. b. Competencia entre rizobios y su relación con la ubicación en el nódulo

Según la Resolución 264/2011 del SENASA (Apéndice A), los inoculantes deben contener por lo menos una concentración de 10^8 rizobios vivos por ml o g a la fecha de vencimiento. Sin embargo, una semilla bien inoculada puede contener entre 10^5 y 10^6 bacterias y se estima que aproximadamente el 80% de ellas mueren en un tiempo de aproximadamente dos horas que transcurre después de la inoculación (Streeter, 2007).

Si consideramos todos los eventos desde la inoculación hasta que se inicia el desarrollo de la radícula en la germinación, las bacterias del inoculante quedarían en desventaja competitiva frente a los rizobios autóctonos. Esto se debe a que en el perfil del suelo que va a ser ocupado por la rizósfera, ya estarán distribuidos los rizobios autóctonos en una concentración aproximada de 10^5 a 10^7 rizobios por gramo de suelo. Esta exigencia en la competición, para los rizobios del inoculante, se hará tanto más intensa a medida que las raíces crezcan, llevando las zonas de los pelos emergentes cada vez más lejos del cuello de la raíz (Covelli, 2013). Este problema de competencia por la nodulación, se observó en todo el mundo, y también en otros cultivos de leguminosas (Althabegoiti et al, 2008).

Por lo tanto es importante considerar las poblaciones de rizobios alóctonas, que si bien por un lado son una fuente para la selección de nuevas cepas adaptadas a ambientes locales, por otro presentan problemas como son los altos niveles de capacidad competitiva de las poblaciones de rizobios naturalizadas (Zengeni et al, 2006).

1.5. La labranza como uno de los factores de influencia en el comportamiento de rizobios en el suelo

El suelo es un ambiente vivo y dinámico, razón por la cual es muy complejo y cambiante en tiempo y espacio. Por lo tanto, el manejo de los lotes de producción agrícola altera las propiedades físicas y químicas del suelo, lo que afecta directamente a la microbiota (Dorr de Quadros et al, 2012).

Estudios realizados sobre distintos grupos biológicos detectan que la diversidad fue modificada en función de las labores producidas en el suelo. La siembra directa en función de la cobertura de rastrojo y mayor humedad permite la proliferación de organismos que afectan los cultivos como moluscos (babosas y caracoles) y crustáceos (bicho bolita), y otras plagas como orugas cortadoras (Aragón, 2017).

Los sistemas de labranza alteran los suelos y esto impacta directamente sobre la dinámica de las poblaciones que lo habitan, entre ellas las poblaciones de rizobios. La cantidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo también es una función de la historia de cultivo del lote. Esa población naturalizada de rizobios es diversa a nivel de características fenotípicas, bioquímicas y genéticas (Pastorino, 2016).

El estado del suelo, que puede ser modificado por el sistema de labranza, el aporte diferencial de la cantidad y calidad de rastrojos de los cultivos, la inoculación y la fertilización, actúa como condicionante del patrón de nodulación (conjunto de variables seleccionadas para caracterizar el sistema nodular: número, peso, ubicación y actividad de nódulos) (Pietrarelli et al, 2008).

Según los ensayos realizados por Díaz Zorita et al (1999), la nodulación de las plantas de soja mostró diferencias significativas en tres sistemas de labranza probados (labranza convencional con arado de rejas, labranza vertical con arado de cinceles y siembra directa). El número, peso seco total y peso seco individual de los nódulos en la porción superior de la raíz principal fue significativamente mayor en siembra directa en comparación con los otros dos sistemas de labranza, entre los cuales no hubo diferencias significativas. El peso total de los nódulos fue mayor en siembra directa que en los otros sistemas de labranza en dos fechas de muestreo.

Estudios realizados en suelos de Brasil, demostraron que las poblaciones de *Bradyrhizobium* sp. fueron modificadas cuantitativa y cualitativamente, por el sistema de labranza y los cultivos empleados en la rotación (Ferreira et al, 2000).

1.6. Importancia de la selección de cepas naturalizadas como estrategia en la fabricación de inoculantes

La diversidad microbiana que surge de la adaptación a las condiciones del ambiente, es una fuente de microorganismos para seleccionar cepas de bradyrhizobios que nodulen con mayor eficiencia bajo condiciones de estrés (Santos et al, 1999; Ferreira et al, 2000; Loureiro et al, 2007).

El interés agronómico en la caracterización de los rizobios simbiotes de soja se centra fundamentalmente en identificar individuos con capacidades de nodulación y fijación de nitrógeno distintos de manera de lograr un aumento en el rendimiento y calidad de las leguminosas, sin que esto implique una pérdida de nutrientes para el suelo (Melchiorre et al, 2011).

La variabilidad entre las cepas de rizobios podría ser un factor importante a considerar en la selección y preservación de los cultivos para la producción de inoculantes (Kober y Giongio, 2004).

Los programas de selección de cepas de rizobios para la producción de inoculantes tienen varias fases. El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de los nódulos de plantas cultivadas a campo, o inoculadas con muestras del suelo; la selección en base a su velocidad de infección, capacidad para desarrollo de nódulos y eficiencia de fijación de N_2 , si bien inicialmente éstas características se evalúan en condiciones controladas, luego se realizan ensayos a campo en condiciones similares a los sitios en que se utilizarán los inoculantes (Zengeni et al, 2006).

En trabajos previos realizados en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP (Pastorino, 2016; Lopez, 2016) se ha obtenido una colección de cepas de rizobios aisladas de suelos de distintos lotes de Runciman (Provincia de Santa Fe). Uno de los suelos había sido trabajado por ocho años bajo siembra directa y el otro suelo bajo labranza convencional en el mismo período de tiempo. Por ello se decidió utilizar a las poblaciones de rizobios de estas colecciones de rizobios aisladas de estos dos ambientes para llevar adelante los estudios de este trabajo final de carrera.

2- HIPÓTESIS:

Aislados de rizobium provenientes de suelos con labranza tradicional y siembra directa difieren en la infectividad y efectividad para nodular plantas de cultivares de soja.

2.1. Objetivo general:

Identificar cepas de rizobios que se destaquen por su capacidad para formar nódulos y fijar N_2 , dos características que hacen a la capacidad competitiva de los rizobios en el suelo.

2.2. Objetivos específicos:

Evaluar la capacidad infectiva de los rizobios determinando el número de nódulos y su disposición en la raíz de la planta.

Evaluar la capacidad de fijación de N_2 de las estirpes indirectamente determinando el peso seco de las plantas.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas control empleadas como inoculantes comerciales:

Bradyrhizobium japonicum E109, *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, *B.elkanii* SEMIA 5019, *B. japonicum* SEMIA 5079, *B. japonicum* SEMIA 5080, estos aislados son los que se utilizan para formular inoculantes de soja en Brasil, Uruguay y la Argentina.

3.2. Colección de aislados: En este trabajo se utilizaron Bradyrhizobios aislados de soja provenientes de suelos de Runciman (Pcia. de Santa Fe) con distintos tipos de labranza.

B. japonicum CEPA 665, CEPA 9110, CEPA 953, se seleccionaron del lote manejado durante los últimos 8 años con labranza convencional (LC). Los aislados *B. japonicum* CEPA 163, CEPA 366, CEPA 457, CEPA 2112, CEPA 2614, CEPA 2615, CEPA 115, CEPA 458, CEPA 455 se obtuvieron de un lote manejado durante los últimos 8 años con siembra directa (SD):

3.3. Medios de cultivo:

YEM modificado (Yeast Extract Mannitol), componentes en g.l⁻¹,

pH =6.9.

Manitol 5

SO₄Mg0,2

PO₄HK2 0,5

CINa 0,1

Extracto de levadura 0,4

Agar 18

Agua bidestilada 1000 ml

Rojo Congo 1:400 10 ml

Solución nutritiva para plantas

Cl₃Fe 1 g
SO₄Mg . 7H₂O 2 g
CINa 2 g
PO₄HCa 10 g
PO₄HK₂ 2 g
Agua 1000ml

Los cultivos de los microorganismos se realizaron en caldo YEM, incorporando oxígeno al medio agitando los cultivos en un agitador orbital (150 rev. min⁻¹), durante 7 días (Vincent, 1970).

3.4. Ensayos para evaluar la infectividad y efectividad de los aislados:

3.4. a- Método de determinación del Porcentaje de Plantas Noduladas (PPN)

(SENASA Resolución 264/2011. Método Burton modificado, Capítulo 12).

Para la cuantificación de nódulos: Se toman como positivas aquellas plantas (tipo soja) que posean tres (3) o más nódulos, ubicados dentro de un cilindro imaginario con eje central en la raíz principal, un diámetro de dos coma cinco centímetros (2,5 cm) y una longitud de dos coma cinco centímetros (2,5 cm). Se identificará el número de nódulos presentes en raíz principal y en secundaria.



Figura 3: Representación gráfica del cilindro imaginario definido para la cuantificación de nódulos con el método PPN.

Los resultados se expresan como porcentaje de plantas noduladas satisfactoriamente. Se considera como satisfactorio aquel ensayo que cuente con un mínimo de OCHENTA PORCIENTO (80%) de plantas positivas (noduladas).

Materiales: - Recipientes de plástico (vasos) nuevos de siete centímetros (7 cm) de diámetro por once centímetros (11 cm) de profundidad - bandejas de material plástico, con una altura de 4 centímetros (cm);

- Vermiculita dorada de granulometría media

Procedimiento: Inoculación:

- Testigo negativo: semilla sin inocular.

- Se prepararon veinte (20) vasos con cincuenta y dos gramos (52 gr) de vermiculita o dolomita estéril. Se agregaron dos coma cinco mililitros (2,5 ml) de solución buffer por gramo de vermiculita seca [aproximadamente ciento treinta mililitros (130 ml) para llegar a saturación];
- Se colocó una semilla tratada por recipiente, efectuando previamente un orificio a una profundidad no mayor a dos (2) veces el tamaño de la semilla. Luego se cubrió con vermiculita y se compactó ligeramente;
- En bandejas separadas, se colocaron veinte (20) vasos con testigos positivos y veinte (20) con negativos;
- Se llevó a cámara de germinación.

Momento de evaluación: Veinticinco (25) días a partir de la germinación para soja.

3.4. b. Peso seco de las plantas.

Las plantas se secaron en estufa hasta peso constante y luego se determinó el peso seco pesando las plantas en una balanza analítica con una precisión de 0.01 g. En todos los casos las plantas fueron cosechadas cortando la parte aérea a la altura del nudo cotiledonar. Esta determinación se realizó a los 25 días después de la siembra.

3.4. c. Altura

Se midió la longitud de la parte aérea (cm). desde el nudo cotiledonar hasta el extremo terminal.

3.5 Análisis estadísticos de los datos

Los datos se analizaron por medio de ANOVA y la comparación de medias se realizó a través del test de Diferencia Mínima Significativa (LSD) ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la infectividad

Porcentaje de plantas noduladas (PPN)

Los inoculantes formulados con rizobios deben demostrar, no solo que cuentan con la cantidad de rizobios exigible por la legislación y su pureza, sino también, si tienen aptitud para establecer una asociación simbiótica con especies de leguminosas. El método del Porcentaje de Plantas Noduladas (PPN) o método de Burton modificado resulta una solución simple y rápida para evaluar la eficiencia del producto para establecer el sistema de nodulación en la planta, previo al uso del producto en el campo (Albanesi et al, 2006).

La legislación de Argentina (Resolución 0264/2011 del SENASA) establece que una de las formas de evaluación de la calidad de los productos biológicos formulados en base a *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* consiste en la determinación del porcentaje de plantas noduladas.

Se eligió este método para la evaluación, ya que sus resultados tienen validez nacional y, a su vez, permite hacer comparaciones con otros ensayos realizados con la misma metodología.

Tabla 1: Porcentaje de plantas noduladas.

CEPA	PORCENTAJE DE PLANTAS NODULADAS (%)
E 109	100
587	95
5019	100
5079	100
5080	100
115	100
163	100
366	88,89
455	100
457	95
458	100
665	100
953	95
2112	87,5
2614	95,45
2615	95,65
9110	100

En la Tabla 1 se observa que todas las cepas presentaron un porcentaje de nodulación superior al 80%, por lo tanto los resultados obtenidos en este ensayo indican que todos los aislados provenientes de suelos con labranza convencional y siembra directa de suelos de Runciman, Santa Fe nodulan con eficiencia. Aun así considerando el porcentaje de plantas noduladas se destacaron los aislados 115, 163, 455, 458, 665 y 9110 que indujeron la formación de nódulos en el 100% de las plantas inoculadas, comportamiento similar al que se observó en la cepa de referencia E109.

Por otro lado se observó que las cepas 366 y 2112 fueron las que nodularon los menores porcentajes de plantas 88,89 % y 87,5 % respectivamente. Esto sugiere que las mismas son menos eficientes que el resto de los aislados.

La capacidad de formar nódulos por microorganismos en condiciones controladas de laboratorio no se puede extrapolar directamente a condiciones de campo. Sin embargo estudios de este tipo son un requisito e indicio de calidad mínima que debe tener un inoculante. En estas condiciones de estudio la falta o escasa nodulación en el laboratorio es un indicador de la potencial capacidad de nodulación del aislado en las condiciones de campo (Thompson, 1980).

4.2. Determinación del Número de Nódulos totales en los primeros 2,5 cm de la raíz principal y de las raíces secundarias

Para realizar el recuento de nódulos presentes en la raíz principal y en las raíces secundarias se consideró un cilindro imaginario de 2,5 cm de diámetro por 2,5 cm de longitud como indica la metodología propuesta.

La presencia de nódulos en los primeros centímetros indicaría que las cepas presentan un proceso rápido de nodulación marcando una ventaja competitiva en relación a otras (Handelsman et al, 1984).

4.2. a- Número de nódulos totales en raíz principal y raíz secundaria. Segmento inicial (2,5 cm)

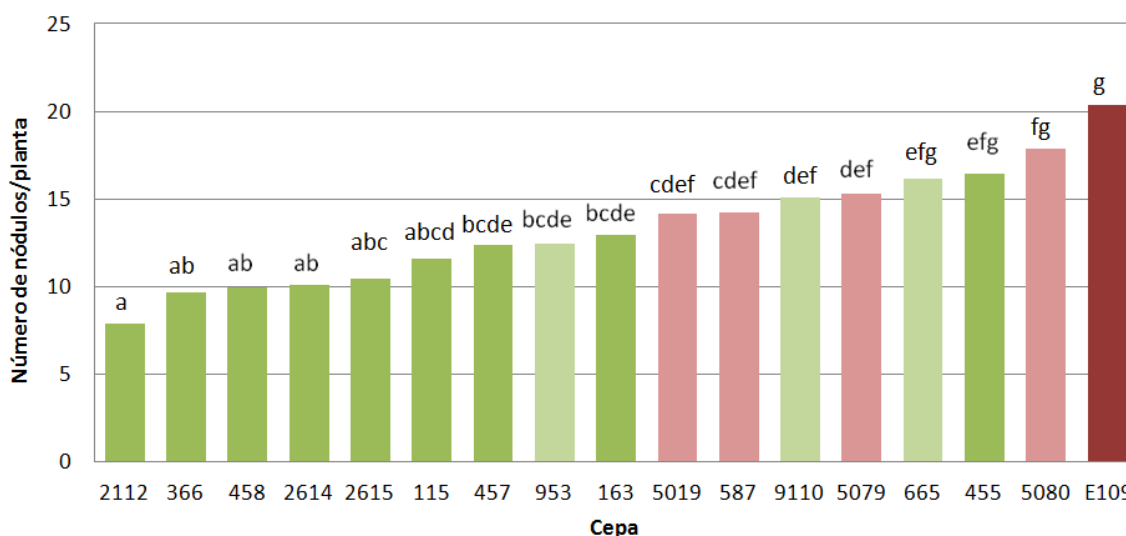


Figura 4: Determinación del Número de Nódulos por Planta en el sector inicial de la raíz principal y de las raíces secundarias (2,5 cm). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$).

Cuando se determinó el número total de nódulos presente en el segmento de 2,5 cm de la raíz principal y la raíz secundaria se observó que la cepa control E109 no presentó diferencias significativas con el tratamiento inoculado con la cepa SEMIA 5080, ni con los tratamientos inoculados con los aislados 455 y 665.

Por otro lado los aislados 2112, 366, 458 y 2614 presentan diferencias significativas con el resto de los controles inoculados con cepas comerciales, presentando un menor número de nódulos por planta según el análisis estadístico de los resultados mediante el test LSD, $p < 0,05$.

Los aislados 953, 665 y 9110 provienen de suelos trabajados con labranza convencional, no presentan diferencias significativas entre sí y presentan un

comportamiento similar a un grupo de aislados provenientes de suelos trabajos con siembra directa.

4.2. b- Nódulos en raíz principal. Segmento inicial 2,5 cm.

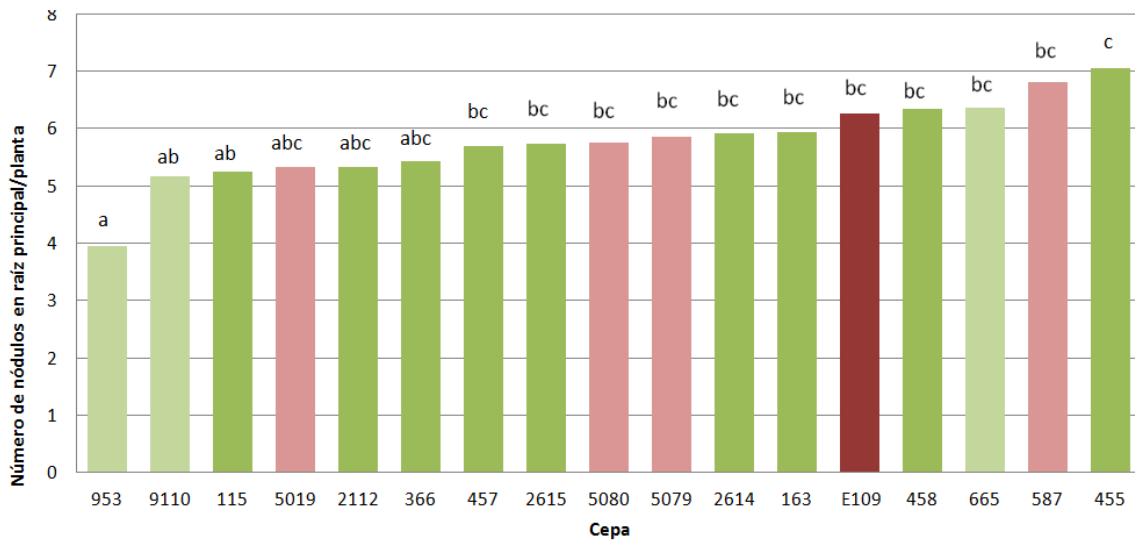


Figura 5: Número de nódulos en los primeros 2,5 cm de la raíz principal. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas. (Test de LSD, $p < 0,05$).

En este caso (Figura 4) se destaca la cepa 455 porque fue la que indujo el desarrollo de la mayor cantidad de nódulos en los primeros 2,5 cm de la raíz principal, si bien su comportamiento no fue significativamente distinto del resto de los controles y aislados según el análisis estadístico de los resultados mediante el test LSD, $p < 0.05$.

En cuanto a los aislados procedentes de suelos con labranza convencional se observó, por un lado que 953 y 9110 son las dos cepas que indujeron la menor cantidad de nódulos en la raíz principal; por el otro que el aislado 665 mostró un comportamiento similar al de las estirpes que se destacaron por inducir una mayor cantidad de nódulos en la raíz principal, si bien no se observaron diferencias significativas.

Por todo lo expuesto es claro que no es posible establecer una relación directa entre la procedencia y el patrón de comportamiento de los aislados. Sin embargo, vale la pena mencionar que es claro que los aislados presentan diversidad en cuanto a su capacidad de interactuar con la soja y que esto seguramente es el resultado de cambios genéticos que ocurrieron durante el proceso de adaptación de los rizobios al ambiente del suelo.

4.3. Distribución de nódulos sobre la raíz principal

La distribución de nódulos sobre la raíz principal se determinó a lo largo de toda la raíz determinándose la cantidad de nódulos en cada sector de 0,5 cm.

Se calculó el número total de nódulos de cada tratamiento considerando 100% al número de nódulos totales, luego se expresaron los resultados como porcentaje de nódulos de cada sector (0,5 cm).

Tabla 2: Distribución de nódulos (%) en segmentos de 0,5 cm sobre la raíz principal.

CEPA	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
E 109	19,63	20,57	23,37	20,57	10,29	1,87	0,00	0,00	3,70	0,00
587	15,45	24,26	33,09	22,05	5,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5019	14,29	38,09	18,09	20,01	7,62	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00
5079	25,62	29,05	14,85	20,47	7,53	2,48	0,00	0,00	0,00	0,00
5080	19,14	25,22	18,27	24,34	11,30	1,73	0,00	0,00	0,00	0,00
115	5,95	26,29	24,59	19,51	16,96	5,01	1,69	0,00	0,00	0,00
163	26,79	29,18	17,28	15,49	4,18	4,17	2,91	0,00	0,00	0,00
366	13,08	12,23	23,36	22,43	8,41	4,67	0,93	1,87	0	0
455	25,98	29,14	21,26	15,75	5,51	1,57	0,79	0,00	0,00	0,00
457	26,21	20,38	12,62	8,73	10,37	6,79	9,70	0,00	3,88	0,97
458	17,92	24,63	20,15	16,51	20,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
665	16,95	39,84	20,34	13,55	9,32	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00
953	19,76	40,75	16,05	11,11	9,87	2,46	0,00	0,00	0,00	0,00
2112	30,33	36,07	18,86	4,09	4,09	3,28	1,64	1,64	0,00	0,00
2614	22,91	39,69	22,13	8,39	4,59	2,29	0,00	0,00	0,00	0,00
2615	27,97	27,97	19,58	11,18	5,59	6,29	1,39	0,00	0	0
9110	9,83	19,65	25,01	17,85	15,17	9,82	2,67	0,00	0,00	0,00

Referencias: *Segmento con mayor número de nódulos de cada tratamiento inoculado en gris más oscuro y **segundo segmento con mayor número de nódulos de cada tratamiento inoculado en gris más claro.

Como puede observarse en la Tabla 2, la mayoría de las plantas inoculadas con los aislados de suelo y las cepas control desarrollaron el mayor porcentaje de nódulos entre los 0,5 cm y 1 cm de la raíz principal (señalado con gris oscuro). Se observó

además que a partir de los 3 cm, el número de nódulos desarrollados disminuyó marcadamente representando porcentajes inferiores al 10%. Este comportamiento fue similar para las cepas de referencia y los aislados, por lo cual no representa más que un patrón de comportamiento de los rizobios cuando interactúan con la soja.

Los resultados obtenidos demuestran que los aislados que presentan mayor porcentaje de nódulos hasta los primeros 2,00 cm de raíz, son la estirpe 2614, seguidos por los aislados 455 y 665.

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 (Bhuvanewari et al., 1980), pero que refleja que los nódulos que se encuentran más cerca del cuello de la raíz comenzaron a desarrollar más tempranamente. Esto último estaría indicando que las estirpes que desarrollan nódulos cerca del cuello de la raíz estarían interactuando más tempranamente con la planta lo cual significa una ventaja competitiva respecto del resto de los rizobios. Es decir la velocidad de desarrollo de nódulos es un carácter a considerar en la selección de rizobios.

4.4. Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal.

Se representó el perfil de nodulación en cada tratamiento determinando el número de nódulos por planta en cada segmento de 0,5 cm (Figuras 6, 7, 8 y 9).

Un perfil de distribución conveniente presenta la mayor cantidad de nódulos en los primeros segmentos de la raíz principal, las cepas que forman nódulos en estos espacios serían más competentes en la fase infectiva.

En el perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal de todas las cepas de referencia y de los aislados evaluados se observó que el mayor número de nódulos se

concentró en los primeros 2,5 cm de la raíz principal, más allá de los 3,5 cm la presencia de nódulos se hace nula.

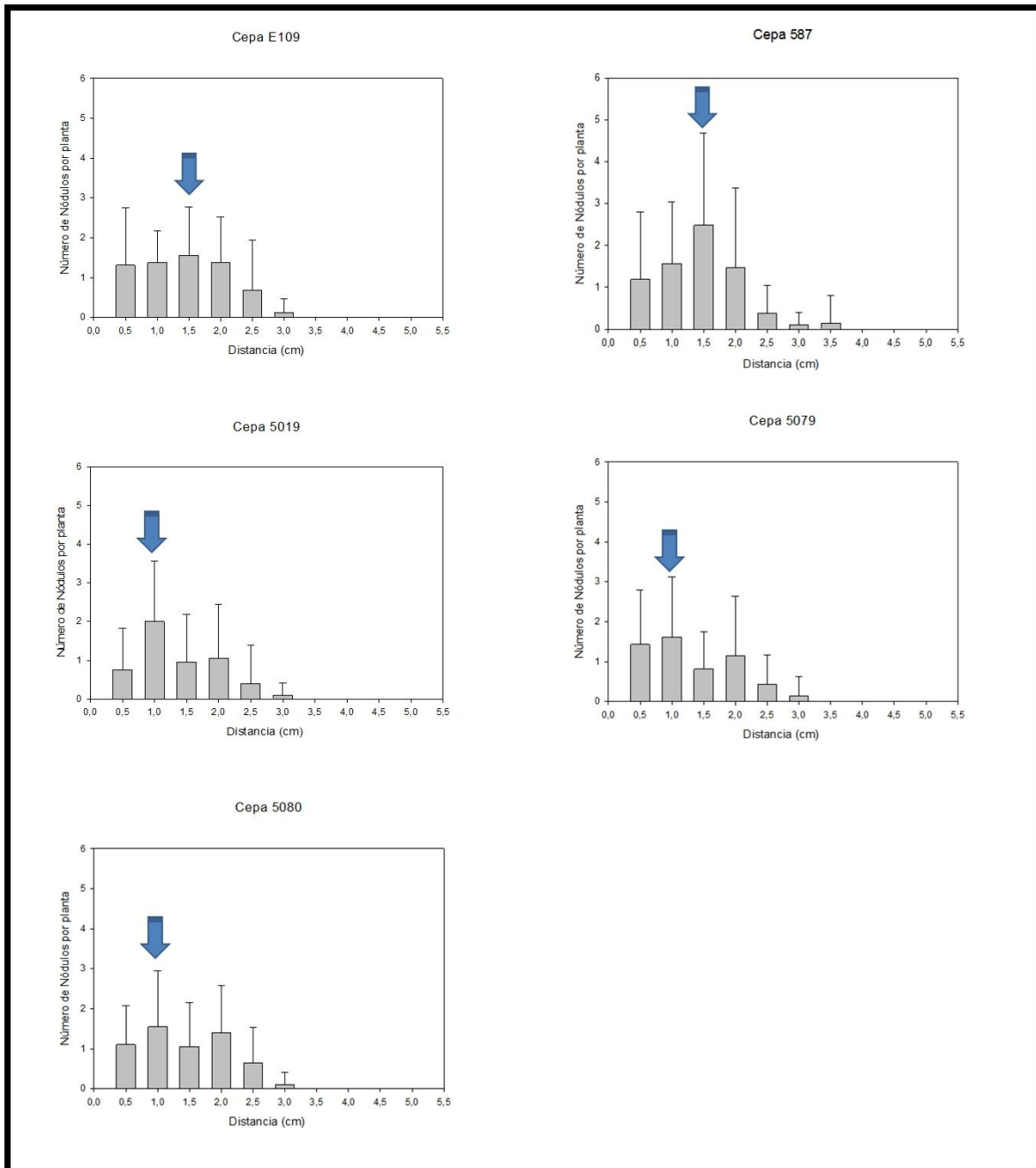


Figura 6: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal. Cepas de referencia *Bradyrhizobium japonicum* E109, SEMIA587, SEMIA5019 y *B. elkanii* SEMIA5079 y SEMIA5080. Se representa el desvío estándar (DE).

Considerando el análisis planteado las estirpes E109, SEMIA 587 y SEMIA 5019 presentaron el mayor número de nódulos de la raíz concentrados en estratos superiores de la raíz. Las cepas SEMIA 5079 y SEMIA 5080 presentaron comparativamente un menor número de nódulos en el fragmento superior de la raíz próximo al cuello comparado con el resto de las cepas empleadas como control.

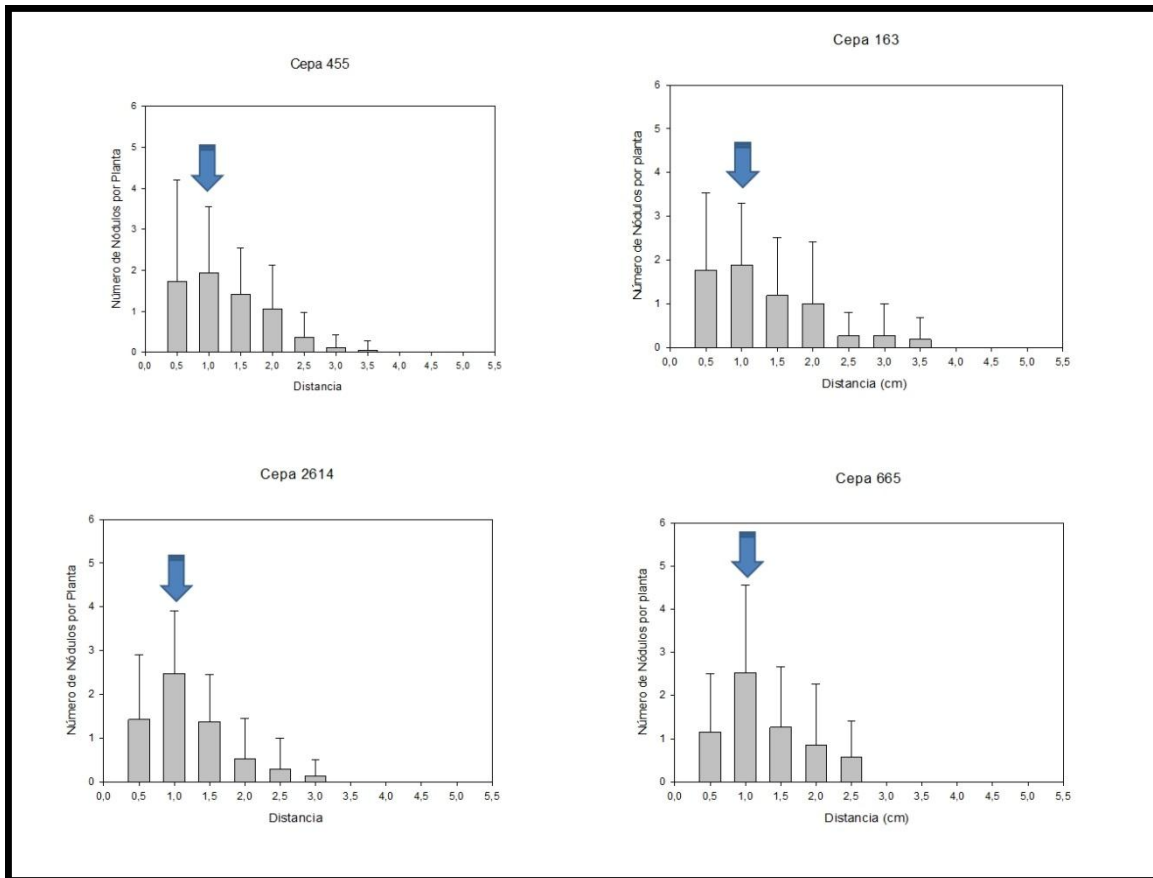


Figura 7: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal. Cepas evaluadas *Bradyrhizobium japonicum* 163, 455, 665 y 2614. Se representa el desvío estándar (DE).

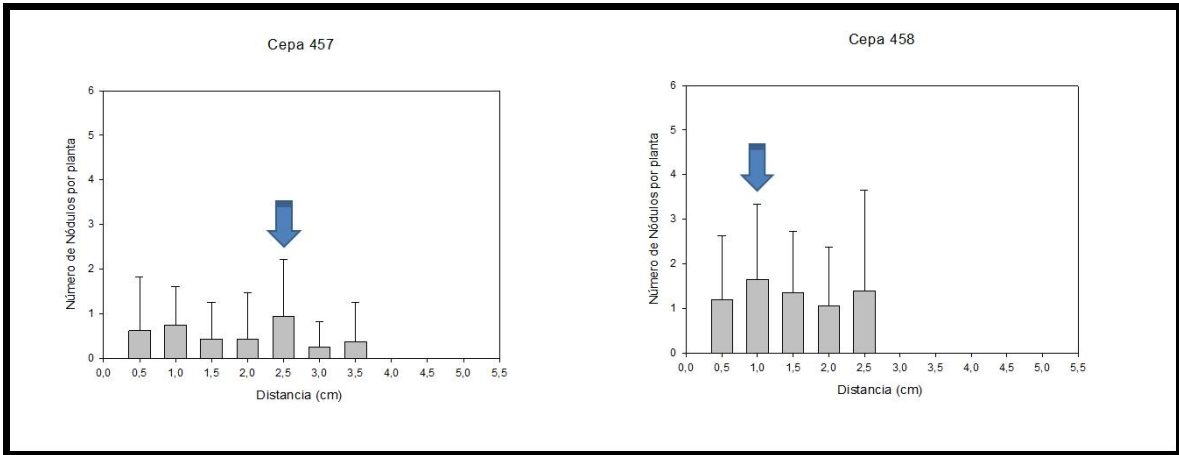


Figura 8: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal.

Cepas evaluadas 457 y 458. Se representa el desvío estándar (DE).

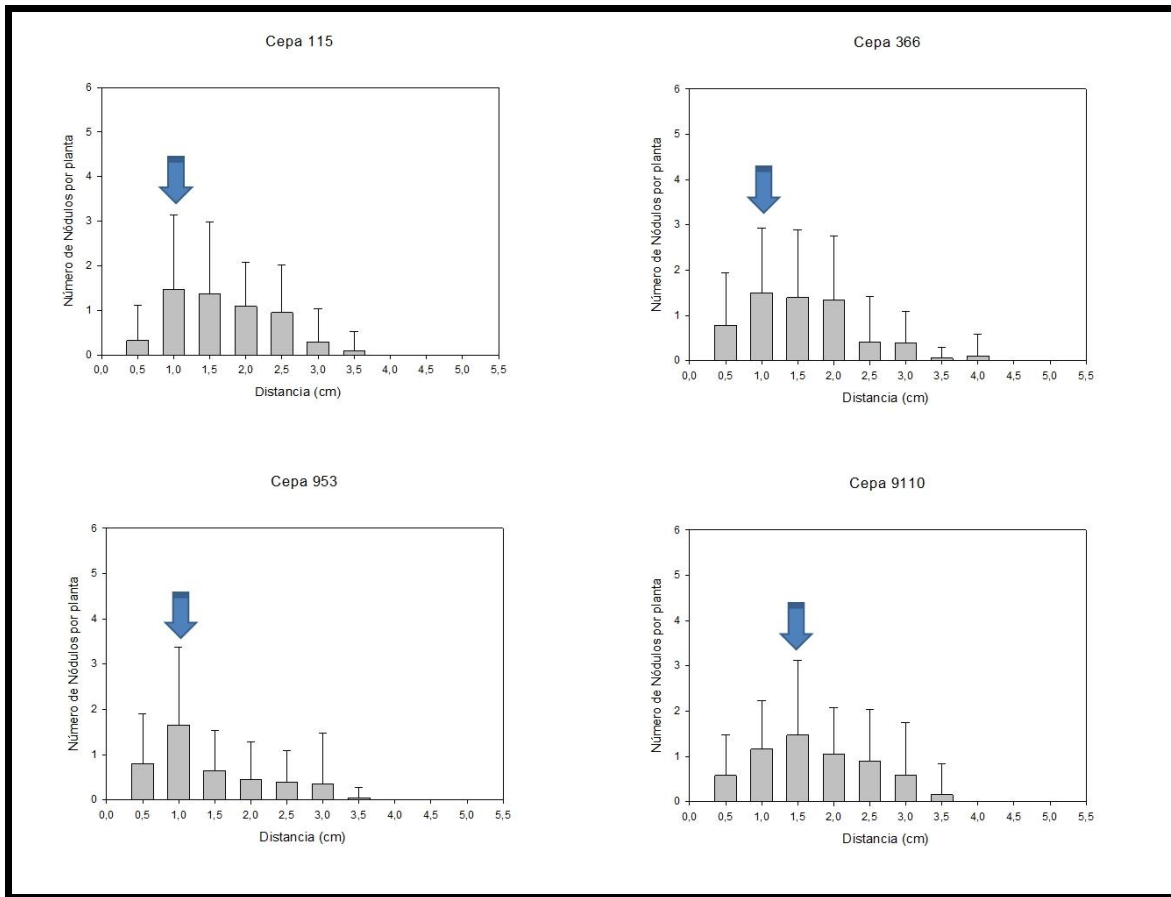


Figura 9: Perfil de distribución de nódulos sobre la raíz principal.

Cepas evaluadas 115, 366, 953 y 9110. Se representa el desvío estándar (DE).

En primer lugar vale la pena destacar que las cepas evaluadas presentan diversos perfiles de distribución de nódulos lo que sugiere diversidad de los rizobios para interactuar con la planta. Por un lado las cepas 655, 455, 163 y 2614 (Figura 7) presentaron la mayor cantidad de nódulos próximos al cuello de la raíz lo que sugiere que interactúan eficientemente con el cultivar de soja inoculado

Por otro lado los aislados 457 y 458 (Figura 8) cuando representamos el desarrollo de nódulos a lo largo de la raíz presenta una forma de meseta, lo que sugiere que el número de nódulos es similar a lo largo de la raíz, sugiriendo un comportamiento ineficiente por un lado pero por otro lado que el rizobio sobrevive en el medio y por ello

aparece distribuido a lo largo de la raíz. El resto de los aislados 115, 366, 953 y 9110 (Figura 9) mostraron un comportamiento intermedio entre los dos descritos anteriormente.

La presencia de nódulos en los primeros 2,50 cm de raíz, sugiere una mayor velocidad de nodulación de la cepa para interactuar con la raíz de la soja, aumentando su competitividad en relación a otras cepas y frente a los rizobios naturalizados (Handelsman et al, 1984). Esto sería una ventaja competitiva, en cuanto a la capacidad de infección, frente a los rizobios alóctonos que ya están presentes en la periferia de las zonas de infección de las raíces.

4.5. Determinación de la biomasa aérea de las plantas

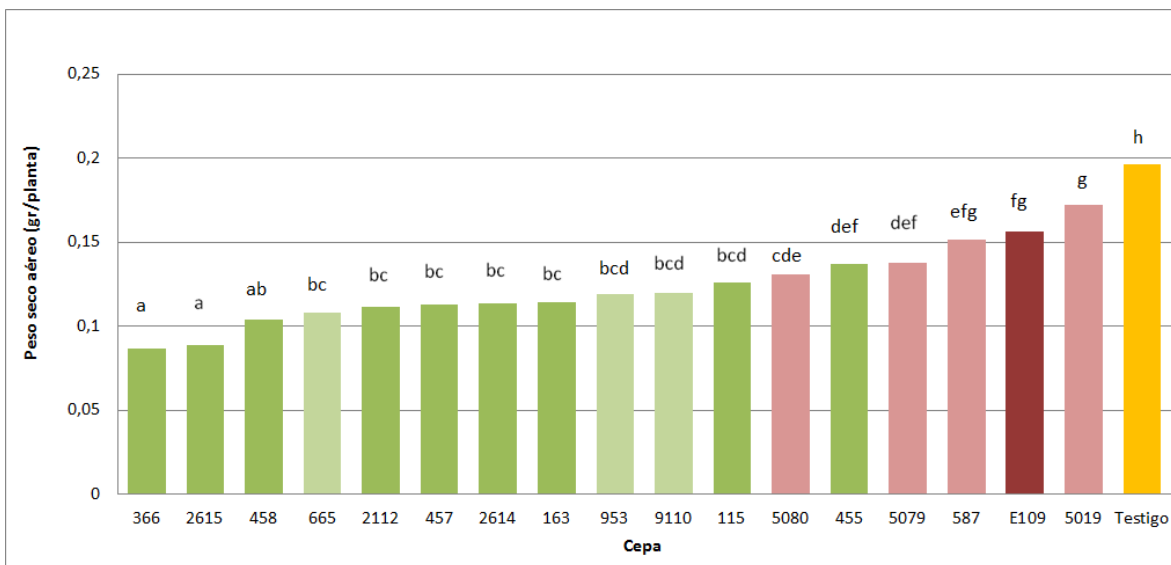


Figura 10: Peso seco de la biomasa aérea promedio en gramos por planta. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$).

Como puede observarse en la Figura 3 la cepa 455 presentó un comportamiento similar al control E109. Los aislados 366 y 2615 tuvieron el menor peso seco y tienen diferencias significativas con todas las cepas control. El resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas con los controles.

Las tres cepas (665, 953 y 9111) provenientes de suelos con labranza convencional no presentaron diferencias significativas entre ellas, ni en comparación con el resto de los aislados y controles. Por lo tanto no puede afirmarse un patrón de comportamiento según la procedencia.

El tratamiento del testigo sin inocular presentó el mayor peso seco y observándose diferencias significativas con todos los demás tratamientos según el test LSD, $p < 0.05$.

Hay que considerar que el tiempo de crecimiento de la planta fue de 25 días hasta el momento en el que se levantó el ensayo. En un período tan corto de tiempo el crecimiento continúa siendo a expensas de las reservas de la semilla y la FBN es probable que si bien puede estar comenzando no constituya un aporte de dimensiones tales que se pueda visualizar en un mayor crecimiento debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno. Por otro lado no se puede dejar de considerar que el peso seco de los nódulos tiene un costo energético importante para la planta, prueba de ello es que los mutantes super nodulantes de soja, siempre rindieron menos que los cultivares convencionales. Por lo tanto para ver el efecto de un mayor número de nódulos probablemente habría que realizar experimentos por un periodo de tiempo más prolongado, de manera de evaluar el impacto de la mayor fijación de N_2 que deviene de un mayor número de nódulos.

4.6. Determinación de la altura por planta

Las diferencias en el crecimiento pueden deberse al efecto que poseen ciertas bacterias sobre el crecimiento vegetal. Este grupo de bacterias se denomina bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs, del inglés Plant Growth-Promoting rhizobacteria).

Los mecanismos de acción de las PGPRs pueden ser directos o indirectos. Dentro de los directos se encuentran las PGPRs que modifican los niveles de reguladores del crecimiento (RCs) de la planta. Las giberelinas y citoquininas encuentran sistemas de transporte que pueden traslocarlos a las partes aéreas. Según Gutiérrez Mañero *et al* (2006), la producción y liberación de reguladores del crecimiento por bacterias provoca una alteración de los niveles endógenos de los mismos en la planta.

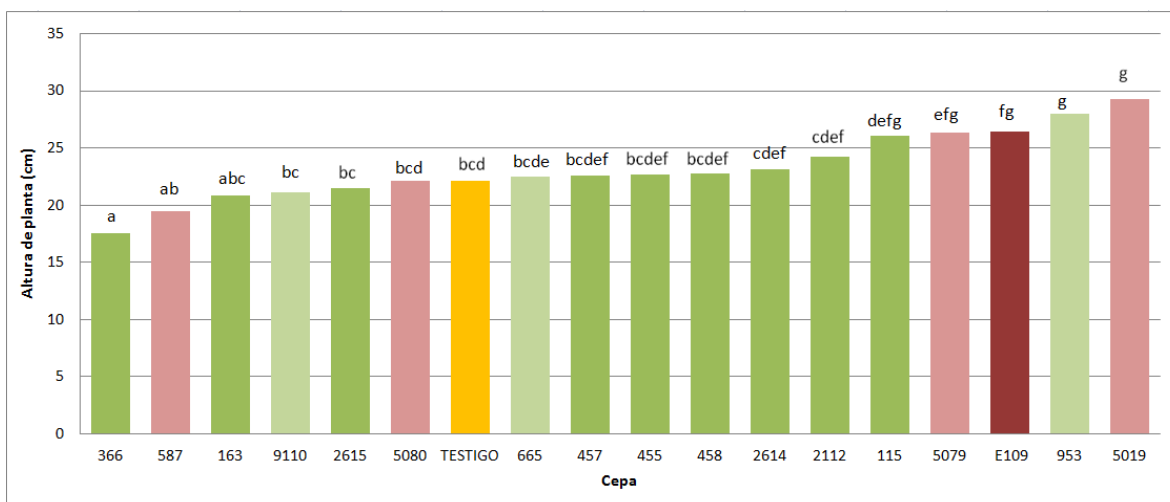


Figura 11: Altura de la parte aérea. Promedio por planta en cm. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD, $p < 0,05$).

Se observó que sólo el aislado 953 presentó diferencias significativas con el testigo sin inocular junto con las cepas control E109, 5079 y 5019.

El resto de los aislados evaluado no presentaron diferencias significativas según LSD (test LSD, $p < 0.05$) con el testigo sin inocular. La cepa 366 presentó el menor valor de crecimiento en altura y con diferencias significativas con el testigo sin inocular y las demás cepas. Considerando que las plantas inoculadas con la cepa 953, es probable que esta sintetice niveles más altos de giberelinas que el resto de los aislados lo cual amerita realizar análisis de la presencia de esta hormona en cultivos de la bacteria.

4.7. Consideraciones finales

- La inoculación con los aislados provenientes de los dos suelos en estudio mostraron altos niveles de eficiencia para nodular, similar a las estirpes testigo. Se identificaron dos aislados 455 y 665 con una capacidad de nodulación similar a la cepa control E109, inoculante comercial ampliamente utilizado.
- La distribución de nódulos de la raíz principal es una característica clave para seleccionar rizobios más eficientes que varía en los aislados de suelo. El aislado 455 proveniente de suelo con siembra directa se presentó altamente eficiente para inducir nódulos y similar al de la cepa comercial E109 y el resto de los estirpes control.
- Los parámetros evaluados en este trabajo presentan variabilidad en los aislados evaluados lo que sugiere que en el suelo los rizobios sufren cambios genéticos que devienen en cambios fenotípicos de relevancia para la nodulación.

- Es interesante continuar los estudios de estos aislados de Rizobios naturalizados en los suelos con distinta historia agrícola ya que pueden aportar ventajas en la competitividad y adaptación a diversos ambientes donde se cultiva la soja y por lo tanto ser una fuente importante en la fabricación de futuros inoculantes

5- CONCLUSIÓN

En este trabajo se estudiaron dos grupos de cepas aisladas de suelos con distinto tipo de labranza: labranza convencional y siembra directa. Cuando se evaluaron las siguientes características de la relación simbiótica: capacidad de formación de nódulos y ubicación de nódulos en la raíz principal, no se observaron diferencias significativas entre aislados provenientes de labranza convencional y aislados provenientes de siembra directa. No se puede establecer una relación directa entre el tipo de labranza efectuada en el suelo y la infectividad de los rizobios evaluados.

Se destacaron por su capacidad infectiva los aislados 455 y 665, provenientes de suelos con distinta labranza.

6- BIBLIOGRAFÍA

Albanesi A, Benintende S, Bonfiglio C, Cassan F, González Fiqueni F. 2006. N° 1: Control de calidad de inoculantes para leguminosas. REDCAI. AAM. Buenos Aires, Argentina.

Althabegoiti, M. J., López-García, S. L., Piccinetti, C., Mongiardini, E. J., Pérez-Giménez, J., Quelas, J. I., & Lodeiro, A. R. (2008). Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. FEMS microbiology letters, 282(1), 115-123.

Berrada H, Fikri-Benbrahim K. 2014. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. Br. Microbiol. Res. J. 4:616–639. 10.9734/BMRJ/2014/5635.

Bhuvaneswari,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.

Covelli, J. (2013). Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: Aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación. Tesis Doctoral Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Depto. Cs. Biológicas Biológicas Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. p. 178.

Curso Oleaginosas y Cultivos regionales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Apunte interno, UNLP. 2011.

Díaz Zorita, M. y M.V. Fernández Canigia, 1999. Patrones de nodulación de soja en relación con propiedades del suelo bajo tres sistemas de labranza. Rev. Fac. Agronomía, La Plata 104(1): 53-60.

Dorr de Quadros, P., Zhalnina, K., Davis-Richardson, A., Fagen, J. R., Drew, J., Bayer, C., Triplett, E. W. (2012). The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical Acrisol. *Diversity*, 4(4), 375-395.

Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D., & Gresshoff, P. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61-76.

Ferreira, M. C., Andrade, D. D. S., Chueire, L. M. D. O., Takemura, S. M., & Hungria, M. (2000). Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of Bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(5), 627-637.

González, N. 2006. Fijación de nitrógeno en soja. 3º Congreso de Soja del Mercosur, Workshop de Fijación Biológica de nitrógeno. Rosario. p.335.

Graham, P.H., 2008. Ecology of root-nodule bacteria of legumes. In W. E. Dilworth, M.J. James, E.K., Sprent, J.I., Newton, ed. *Nitrogen fixing. Leguminous Symbioses*. p. 419.

Gutiérrez Mañero, F., Lucas García, J., Probanza Lobo, A., Ramos Solano, B. 2006. Interacción planta-microorganismos en un ecosistema denominado rizosfera. Páginas: 244-254. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Granada. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno..

Handelsman J, Ugalde RA, Brill WJ. 1984. Rhizobium meliloti competitiveness and the alfalfa agglutinin. *Journal of Bacteriology* 157: 703–707.

Hymowitz, T. 1970 On the domestication of the soybean. 24: 408-421.

Jordan, D.C., 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In N. Krieg & R. G. Holt, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, pp. 234–235.

Kober, M.D.V. & Giongo, A., 2004. Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. *Ciencia Rural Santa María*, 34, pp.1459–1464.

Lodeiro, A., 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), p.261–273.

Lodeiro, A., 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), pp.261–273.

Lopez, S. (2016) Análisis de las alteraciones estructurales y/o regulatorias en los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, en aislados de *Bradyrhizobium japonicum* que difieren en su capacidad de fijar nitrógeno. Tesis Doctoral Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. p. 250.

Loureiro, M. F., Kaschuk, G., Alberton, O. & Hungria, M. (2007). Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping and inoculation managements. *Biol Fertil Soils* 43, 665–674.

Loureiro, M.D.F. et al., 2007. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), pp.665–674.

Martínez, F. 2010. Crónica de la soja en la región pampeana argentina. INTA EEA Oliveros, 1:6.

Melchiorre, M. 2011. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils*, 47(1), pp.81–89.

Morón, B., Dardanelli, M.S., Sousa, C. y Megias, M. Dialogo. 2006 Molecular en la Simbiosis Rizobio-Leguminosa. Pag. 160-171. En: Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Granada. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.

Pastorino, G. 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. FCNyM. UNLP. p. 212.

Penna, C., Benintende, S., Chiavelini, J., Albanesi, A., Cassan, F., Gonzales Fiqueni, M., Lett, L., Peticari, A., Rossi, A., Toresani, S., Massa, R., 2013. Recuento de rizobios viables sobre semilla en Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes. REDCAI. AAM. Buenos Aires, Argentina. Pag. 89.

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

PERTICARI, A. 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Congreso Mundo Soja. Buenos Aires. p. 121-126

Peticari, 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.

Pietrarelli, L., Zamar, J. L., Leguía, H. L., Alessandria, E. E., Sánchez, J., Arborno, M., & Luque, S. M. (2008). Efectos de diferentes prácticas de manejo en la nodulación y en el rendimiento del cultivo de soja. *Agriscientia*, 25(2), 81-88.

Santos, M., Vargas, M. & Hungria, M., 1999. Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. *FEMS microbiology ecology*, 30(3), pp.261–272.

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.

Streeter, J.G., 2007. Factors affecting the survival of Bradyrhizobium applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), pp.1282–90.

Thompson JA (1980) Production and quality control of legume inoculants. In: Bergersen FJ (ed) *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley, London, pp 489–533

Uribe, L. (1994). Formación de nódulos de Rhizobium: factores que pueden conferir ventaja competitiva Rhizobium. *Agronomía Costarricense (Costa Rica)* v. 18 (1) p. 121-131.

VINCENT, J.M. 1970 *Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford, Blackwell,. 164p.

Wang E.T., Martínez Romero, J. , López Lara, I . 2002 Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. En: *Microbios en línea*. Editores: Martínez Romero, E., Martínez Romero, J. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>

Ybran R. y Lacelli, G. (2016). Informe estadístico mercado de la soja. <http://inta.gob.ar/documentos/informe-estadistico-del-mercado-de-la-soja>. (03/2017)

Zengeni, R., Mpepereki, S. & Giller, K.E., 2006. Manure and soil properties affect survival and persistence of soyabean nodulating rhizobia in smallholder soils of Zimbabwe. *Applied Soil Ecology*, 32(2), pp.232–242.