

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ORIENTACIÓN MICROBIOLOGÍA

Fijación de nitrógeno en soja (*Glycine max* L. Merr.) inoculada con cepas comerciales de *Bradyrhizobium elkanii* y *B. japonicum*

Año 2012

Autor: Lucía Núñez Buzó

Tutor: Dra. Ing. Agrónoma Margarita Sicardi

Tribunal: Dra. Ing. Agrónoma Elena Beyhaut

Dra. en Ciencias Biológicas Andrea Rodríguez

Laboratorio de Microbiología del suelo, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA).

AGRADECIMIENTOS

Un largo camino he recorrido para llegar a la meta que tanto anhele desde el momento que entre a la Facultad de Ciencias a mediados de Marzo del año 2006.

A pesar de los tropiezos y dificultades que se me presentaron, nunca baje los brazos y seguí firme aprendiendo de los errores. La perseverancia me ha llevado a un importante triunfo en mi vida y hoy me siento muy feliz por ello.

Este trabajo y mi formación como profesional no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres a los que tanto les debo por su amor y comprensión. A mi hermano por hacerme reír aún en los momentos difíciles y sacarme de mi estudio los domingos por la tarde para ir a ver a su glorioso Nacional. A mis abuelos por su enorme cariño.

A mi tutora Margarita Sicardi por confiar en mí, abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme sus sabios conocimientos.

A los integrantes (Adriana, Hugo y Diana) y ex integrantes (Claudia y Martín) del Lab. Microbiología en Suelos de la Facultad de Ciencias, por estar siempre dispuestos a ayudarme y sobre todo por la enorme calidad humana que encontré me hicieron sentir como en casa.

Al laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, principalmente a Verónica Giacri y Nicolás Glison.

A Elena Beyhaut y Andrea Rodríguez por ayudarme a enriquecer este trabajo.

A Dios y San José de Cupertino, mi fe en ellos ha sido mi fortaleza, muchas veces como científico es muy difícil de creer en algo que no vemos, pero la fe es como el aire que respiramos para vivir aunque no lo podamos ver sabemos que existe.

A todos uds. gracias.

Dedicado a mi abuelo tata, a un año de su partida de este mundo se que estaría muy contento por este momento que tan ansioso me preguntaba cuándo iba a llegar. Dios te bendiga.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El nitrógeno.....	1
1.2. Fuentes de nitrógeno para las plantas	1
1.2.1. Fertilizantes nitrogenados	1
1.2.2. Fijación biológica de nitrógeno	2
1.3. Diazótrofos de vida libre, asociativos no simbióticos y simbióticos.....	4
1.4. Promoción del crecimiento vegetal por rhizobios.....	8
1.5. El cultivo de soja en Uruguay	9
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo general.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Cepas de rhizobios.....	15
3.2. Características de las colonias.....	15
3.3. Producción de sideróforos in vitro	16
3.4. Capacidad de promoción del crecimiento vegetal por U-1302 en medio líquido	16
3.5. Eficiencia simbiótica de Bradyrhizobio spp. en invernáculo.....	17
3.5.1. Inoculación de semillas.....	18
3.5.2. Determinaciones	19
3.5.2.1. Área foliar	19
3.5.2.2. Peso seco de nódulos y parte aérea (44 días y 60 días).....	20
3.5.2.3. Carbohidratos solubles totales	20
3.5.2.4. Fijación de nitrógeno por abundancia natural de ¹⁵ N.....	21
3.6. Análisis estadísticos.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22

4.1. Características de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp.	23
4.2. Eficiencia simbiótica de <i>Bradyrhizobium</i> spp. en invernáculo.....	27
4.2.1 Parámetros fisiológicos relacionados a la fijación de N ₂	28
4.2.2. Parámetros simbióticos: peso seco de nódulos, raíces y parte aérea	32
4.2.3. Estimación de la FSN por la técnica de abundancia natural ¹⁵ N.....	41
5. CONCLUSIONES	45
6. ANEXOS.....	47
1. Medio de cultivo: EMA (Extracto de Levadura Manitol y Agar, Vincent, 1970)	47
2. Preparación medio CAS (Chrome Azurol S) para la determinación de sideróforos.....	47
3. Solución Nutritiva Fahraeus sin N (Fahraeus, 1957).....	48
7. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE FIGURAS y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Esquema del mecanismo de acción del complejo enzimático nitrogenasa.....	4
Figura 2. Infección del pelo radical.....	7
Figura 3. Plantas de soja, ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 60 días (T2).....	23
Figura 4. Tubos con plántulas de soja inoculadas con U-1302.....	26
Figura 5. Plantas de soja ensayo en macetas en invernáculo (T2).....	37

TABLAS

Tabla 1. Origen y denominación de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp. utilizadas en el trabajo.....	15
Tabla 2. Tratamientos evaluados en el ensayo en invernáculo.....	18
Tabla 3. Carbohidratos solubles totales (CST) de la parte aérea de plantas de soja.....	32
Tabla 4. Índice de eficiencia relativa (ER).....	40
Tabla 5. Valores de $\delta^{15}\text{N}$, %N _{dda} , N total%, PSPA, acumulación de N y concentración N en parte aérea de plantas de soja inoculadas y sin inocular.....	43

ÍNDICE GRÁFICAS

Gráfica 1. Peso seco de raíces y parte aérea de las plántulas inoculadas con U-1302.....	26
Gráfica 2.a. Área foliar a los 31, 39, 45 y 53 días luego de la siembra para los tratamientos inoculados.....	29
Gráfica 2.b. Área foliar acumulada a los 31, 39, 45 y 53 días luego de la siembra para los tratamientos inoculados	29
Gráfica 3. Respuesta en peso seco nódulos de los tratamientos inoculados, 44 días, T2....	33
Gráfica 4. Respuesta en peso seco parte aérea de los tratamientos inoculado y controles sin inocular, 44 días, T2.....	34
Gráfica 5. Respuesta en peso seco nódulos de los tratamientos inoculados y pre-inoculados, 60 días, T2.....	36
Gráfica 6. Respuesta en peso seco parte aérea de los tratamientos inoculados, pre-inoculados a la inoculación y controles sin inocular, 60 días, T2.....	38
Gráfica 7. Respuesta en peso seco de hojas y tallos de los tratamientos inoculados.....	39
Gráfica 8. Análisis de regresión entre el PSN y PSPA de los tratamientos inoculados.....	40
Gráfica 9. Análisis de regresión entre la acumulación de N y $\delta^{15}\text{N}$ de los tratamientos inoculados.....	44

Resumen

En la última década, el cultivo de soja ha presentado en nuestro país un aumento muy significativo en el área sembrada alcanzando casi a 1 millón de ha. en el ciclo 2010/2011. Toda la soja en nuestro país se siembra inoculada por lo que se ha visto en los últimos años un renovado interés en ampliar los conocimientos sobre nuevas cepas de rhizobios para nuevas formulaciones de inoculantes y técnicas de inoculación. Desde la década del 70 se producen inoculantes con cepas de rhizobios altamente eficientes para soja y en el campo es una tecnología exitosa. El Departamento de Microbiología de Suelos (DMS) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) evalúa y reglamenta las cepas de rhizobios a utilizar en los inoculantes nacionales para todas las leguminosas sembradas. Desde la década del 80 hasta la actualidad la mezcla de dos cepas *Bradyrhizobium elkanii* U-1301+U-1302 son las recomendadas en nuestro país en los inoculantes para soja. En el presente trabajo se midieron en invernáculo diferentes parámetros fisiológicos y simbióticos (área foliar, peso seco de nódulos y parte aérea, carbohidratos solubles totales, abundancia natural ^{15}N , nitrógeno total, acumulación de N y concentración de N) en los tratamientos U-1301, U-1302, U-1301+U-1302, U-741 y pre-inoculados U-1301+U-1302 y U-741 para determinar la eficiencia de fijación de N_2 . A partir de los resultados obtenidos, se concluye que la cepa U-1302 fue la más eficiente simbióticamente ya que fijó más N_2 en condiciones de invernáculo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El nitrógeno

El nitrógeno (N) es uno de los nutrientes más abundantes de la materia viva y por lo tanto es fundamental para el desarrollo de todos los seres vivos. Está presente en la síntesis proteica, en ácidos nucleicos, clorofila y en otras moléculas de importancia para la célula (Urzúa, 2000). Se encuentra en la atmósfera en un 80% aproximadamente, bajo la forma de gas diatómico N_2 , pero el mayor reservorio de N es la litosfera, en las rocas primarias y sedimentarias alcanzando un nivel 50 veces mayor al de la atmósfera. En el suelo está en forma orgánica (98%) y es mineralizado para ser empleado por las plantas (Becana y Bedmar, 1991; Mayz-Figueroa, 2004).

1.2. Fuentes de nitrógeno para las plantas

El N es un nutriente esencial para la producción agrícola, con incidencia en el crecimiento de los cultivos en su rendimiento, tamaño de los granos, contenido de proteínas y absorción de otros nutrientes como el fósforo y el potasio (Niklas, 2008). Las fuentes principales de N para los cultivos son los fertilizantes químicos nitrogenados y la fijación biológica de N_2 (FBN) (Urzúa, 2005).

1.2.1. Fertilizantes nitrogenados

Los fertilizantes se producen por el proceso industrial Haber-Bosch, se genera amoníaco (NH_3) a partir de la unión de N_2 con H_2 en presencia de un catalizador como el osmio o uranio a alta temperatura y presión, siendo el gas natural la fuente de energía utilizada (Postgate, 1991). Uruguay no produce fertilizantes nitrogenados por lo que debe importarlos (Tommasino, 2008) con el consiguiente

alto precio en el país, que afecta al sector agropecuario por incidir significativamente en los costos de producción de la mayoría de los cultivos.

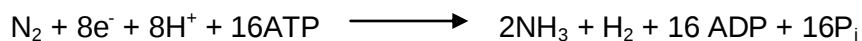
La creciente e inevitable demanda de alimentos en el mundo ha llevado a que los agricultores utilicen cada vez más grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados en sus cultivos para aumentar los rendimientos (Smil, 1999). Además, se observa falta de información técnica por parte del agricultor en cuanto a la cantidad y momento de su aplicación. Esto ha provocado, en varios países, efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente por contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Rodríguez, 1993). Por otra parte, ocasionan desequilibrios nutricionales en el suelo que afectan su fertilidad y su uso agrícola (Hallberg, 1989; Yepis *et al.*, 1999). A estas desventajas se suma la volatilización del N durante su aplicación, lo que ocasiona deterioro de la capa de ozono y efecto invernadero por la concentración de óxidos de N en la atmósfera (Miller y Cramer 2004).

1.2.2. Fijación biológica de nitrógeno

El N₂ en la atmósfera es muy estable, su triple enlace covalente hace que la mayoría de los seres vivos no lo puedan utilizar directamente. Solo un pequeño grupo de microorganismos, muy especializados, denominados diazótrofos pueden reducir el N₂ a amonio (NH₄⁺), forma asimilable por las plantas (Frioni, 2011). Este proceso, conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un componente de gran importancia en el ciclo biogeoquímico del N en el suelo, conjuntamente con los diferentes estados de oxidación de ese elemento producto de la actividad metabólica de microorganismos, plantas y animales (Taiz y Zeiger, 2010). La importancia de la FBN radica en que es responsable de la entrada a los

ecosistemas terrestres de unas 250×10^6 toneladas de N anuales, aporte esencial para la alimentación humana y animal (Monza y Palacios, 2004).

Los diazótrofos fijadores de N_2 comprenden un grupo de protistas inferiores que tienen distintas formas de vida, libre, asociados no simbióticos y simbióticos. Incluye bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas; bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos (bacterias y cianobacterias), (Ledgard y Giller, 1995; Halbleib y Ludden, 2000). Este grupo de procariotas tienen de común el complejo enzimático nitrogenasa que cataliza la reacción de reducción del N_2 a NH_4^+ utilizando energía metabólica (ATP) a temperatura y presión normales (Becana y Bedmar, 1991). El proceso de FBN implica un alto costo energético por la gran estabilidad que presenta el triple enlace de la molécula N_2 como se observa en la reacción estequiométrica correspondiente (Rees y Howard, 2000; Taiz y Zeiger, 2010).



La enzima nitrogenasa (figura 1) está formada por dos componentes metaloproteicos y es sintetizada como resultado de la expresión de los genes *Nif* (Dean y Jacobsen, 1992). El componente I denominado proteína Mo-Fe o dinitrogenasa codificado por los genes *NifD* y *NifK*, es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de 220 KDa que presenta dos centros metálicos conocidos como “agrupamientos P” y dos cofactores de hierro y molibdeno (FeMoCo). El componente II codificado por el gen *NifH*, es un dímero α_2 de 62 KDa con un agrupamiento metálico (4Fe-4S) entre los dos monómeros que forman el dímero (Monza y Palacios, 2004).

El mecanismo de acción de la nitrogenasa requiere de la reducción del componente II por donadores de electrones como la ferredoxina o flavodoxina, la transferencia de electrones al componente I, y la transferencia interna de electrones desde las

agrupaciones P hasta los cofactores de hierro molibdeno (FeMoCo) del componente I (Sánchez, 2009). La enzima nitrogenasa es inactivada en presencia de O_2 sin embargo los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias de protección (Sanjuán y Olivares, 1991).

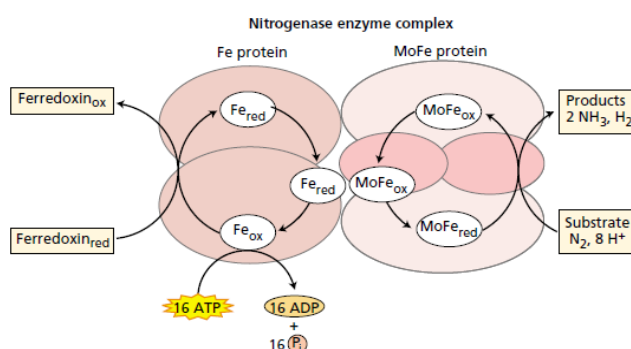


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción del complejo enzimático nitrogenasa. La ferredoxina reduce la proteína Fe. Unión e hidrólisis de ATP a la proteína Fe provocando un cambio conformacional en dicha proteína que facilita las reacciones redox. La proteína Fe reduce la proteína MoFe y esta reduce el N_2 . Fuente: Taiz y Zeiger, 2010.

1.3. Diazótrofos de vida libre, asociativos no simbióticos y simbióticos

Los diazótrofos de vida libre viven en el suelo o agua y fijan el N_2 en forma asimbiótica (no están asociados ni a plantas ni animales). La mayoría son bacterias heterótrofas y en general se encuentran en la zona adyacente a la raíz (rizósfera), contribuyen en pequeñas cantidades de N en el suelo (<5 kg N/ha por año) (Mayz-Figueroa, 2004; Unkovich *et al.*, 2008). Dentro de estas podemos encontrar aerobias estrictas (familia *Azotobacteriaceae*, *Pseudomonas*); anaerobios facultativos (géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*); microaerofílicos (*Azospirillum*, *Mycobacterium*, *Acetobacter*) y anaerobios estrictos (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*) (Baldani *et al.*, 1997). Además, se ha descrito un

representante quimioautótrofo *Thiobacillus ferrooxidans*; el resto de los diazótrofos son bacterias fotosintéticas (cianobacterias y bacterias sulfurosas y no sulfurosas anaerobias) que contribuyen entre 10-30 Kg N/ha (Ledgar y Giller, 1995; Peoples *et al.*, 1995; Unkovich y Pate, 2000; Giller, 2001; Frioni, 2011).

Por otra parte, las asociaciones no simbióticas comprenden a bacterias que se multiplican en la rizósfera de las plantas favorecidas por los exudados radicales que proporcionan un ambiente nutricional muy enriquecido y los compuestos nitrogenados que dejan las bacterias son aprovechados por las plantas. A su vez, hay asociaciones que ocurren en la filósfera de plantas (Mayz-Figueroa, 2004), comprende a bacterias pigmentadas como *Methylobacterium mesophilicum* y *Pseudomonas syringae*. Los compuestos nitrogenados liberados por las bacterias son lavados de las hojas por la lluvia y absorbidos por las raíces de las plantas (Sanchez, 2009).

Por último, existen microorganismos que establecen simbiosis muy precisas con sus hospederos: a) actinomicetos del género *Frankia* con no leguminosas b) el helecho *Azolla* con cianobacterias, de importancia en los países asiáticos en el cultivo de arroz; y c) entre las bacterias rhizobios y las leguminosas (Franche *et al.*, 2009; Frioni, 2011). Esta última es la simbiosis más estudiada y de mayor importancia en el mundo por la cantidad de N que aporta a los ecosistemas naturales y agrícolas, puede alcanzar a los 150 Kg N/há en el suelo, mayor a lo aportado por los fertilizantes y sin daño ambiental (Labandera, 2007).

Los rhizobios son diazótrofos que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*, habitantes naturales en el suelo, bacilos Gram (-), aerobios, quimioorganotrofos, no forman esporas y frecuentemente móviles. Se los cultiva en medios de cultivo con N y en general crecen a temperaturas de 25 °C – 30°C y pH 6,0- 7,0. (Somasegaran y Hoben, 1994; Twornlow, 2004).

Las leguminosas pertenecen a la familia *Fabaceae*, con unas 20.000 especies herbáceas y arbóreas, con múltiples usos y productos. Su alto contenido en proteínas las hace una familia de gran importancia en la alimentación humana y animal, se obtienen numerosos productos industriales, mejoran la fertilidad de los suelos, etc. (Mateo-Box, 2005).

La interacción entre ambos simbioses lleva a la formación de un órgano nuevo en las raíces de la leguminosa, el nódulo, en el cual ocurre la fijación de N_2 . El primer compuesto inorgánico de la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) es el NH_4^+ , el cual es utilizado directamente por la planta (Becana y Bedmar, 1991). La FSN puede suministrar todo o parcialmente el N que requiere la leguminosa para su desarrollo (Racca y Collino, 2005; Moreno, 2010). La asociación entre rizobios y leguminosas es específica y depende de las interacciones moleculares que ocurren en las etapas iniciales de la formación de los nódulos (Debellé, *et al.*, 2001); en general cada rizobio coloniza un tipo de leguminosa.

En la figura 2 se muestra un esquema de la formación del nódulo. El primer paso es un reconocimiento específico entre el rizobio y la leguminosa con adhesión del rizobio al pelo radical. En el reconocimiento actúan moléculas de la planta del tipo flavonoide (flavonas, flavononas e isoflavonas) exudadas por las raíces y moléculas de los rizobios, polisacáridos y proteínas específicas (ricadhesinas) (Jones *et al.*, 2007). Estas proteínas se encuentran en la pared celular bacteriana, captan calcio uniéndose a los complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. El rizobio produce los factores Nod o de nodulación (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995), moléculas complejas de lipoquitinolisacáridos (LQO) que incluyen de 3-6 residuos de N-acetil glucosamina, unidos a un ácido graso. La síntesis de LQO está determinada por los productos de los genes Nod ABC y la transcripción de ellos está controlada por la proteína sensora/reguladora Nod D que interacciona con los

flavonoides producidos por la leguminosa (Perret, *et al.*, 2000). Como resultado de los factores Nod se observa la curvatura de los pelos radicales. La siguiente etapa es la invasión del pelo radical por los rhizobios por acción de celulasas y síntesis por la planta del tubo de infección. El tubo penetra hasta las células corticales y los rhizobios son liberados dentro de ellas por endocitosis quedando envueltos en la membrana peribacteroidal de origen vegetal, dando origen a los simbiosomas que son vesículas membranosas donde los bacteroides reducen el N_2 a NH_3 . (Madigan *et al.*, 2006).

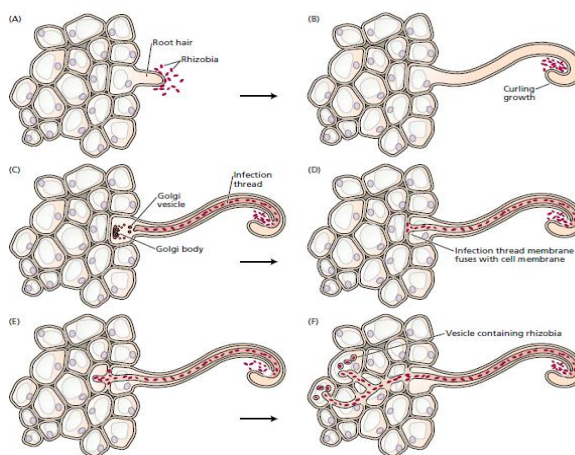


Figura 2. Infección del pelo radical. A) Adhesión de los rizobios al pelo radical. B) Curvatura del pelo radical C) Degradación de la pared del pelo y formación del canal de infección. D) Contacto de la membrana del tubo con la célula. E-F) El canal de infección se extiende y ramifica, los rhizobios dentro de las vesículas son liberados en el citosol. Fuente: Taiz y Zeiger, 2010.

En el nódulo, la proteína leghemoglobina controla la concentración de O_2 para que no afecte a la nitrogenasa. Para mantener una concentración baja y constante de O_2 la leghemoglobina realiza un ciclo desde la forma oxidada Fe^{+3} a la forma reducida Fe^{+2} , funcionando como un “tampón de O_2 ” (Madigan, *et al.* 2006).

1.4. Promoción del crecimiento vegetal por rhizobios

En la bibliografía sobre microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PCV) predominan las investigaciones con bacterias aisladas de la rizósfera y endófitas de plantas (Kloepper *et al.*, 1988; Shabayev *et al.*, 1996; Bashan y Holguín, 1998; Vessey, 2003; Kennedy *et al.*, 2008).

En las últimas décadas las investigaciones se han dirigido a detectar en cepas de rhizobios altamente eficientes en fijación de N₂, otras características de interés agronómico con potencial de PCV. Entre ellas, la producción de fitohormonas, sideróforos, control de fitopatógenos en raíces, solubilización de P, etc. (Miethke *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2007). Estos estudios se han realizado con rhizobios con el objetivo de detectar nuevas características deseables además de la FSN, por ejemplo en cepas de rhizobios eficientes se ha estudiado la producción de fitohormonas y sideróforos. Se ha encontrado que algunas cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (E-109; USDA110 y SEMIA5080) producen fitohormonas como ácido 3- indol acético (AIA), etileno, ácido abscisico (ABA) y giberelinas (Boeiro *et al.*, 2007), lo cual podría significar un beneficio adicional para las leguminosas.

La biosíntesis de sideróforos también ha despertado interés en relación a los rhizobios ya que son compuestos de bajo peso molecular con gran afinidad por el hierro (Fe), nutriente esencial para las plantas que a veces no está disponible en el suelo por su baja solubilidad a pH neutro y alcalino (Gupta, *et al.*, 2000; Frioni, 2011). Las raíces de las plantas prefieren absorber el Fe en su estado más reducido Fe²⁺, pero el ión férrico Fe³⁺ es más común en suelos aireados a pesar de que fácilmente precipita en formas de óxido de hierro. Se ha determinado que algunas bacterias rizosféricas sintetizan sideróforos favoreciendo la asimilación del Fe por las plantas en ambientes de baja disponibilidad (Vessey, 2003; García

Galavís *et al.*, 2007). A su vez, es de destacar que este elemento forma parte de varias proteínas de gran importancia para fijadores de N₂ como los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. Por lo tanto, en la síntesis de la nitrogenasa, leghemoglobina, ferredoxina; hidrogenasa y citocromos, las plantas y bacterias necesitan de un adecuado suministro de Fe (Guerinot, *et al.*, 1990). La falta de este provoca disminución del número de bacteroides en los nódulos (O'Hara, 1988). Asimismo, la producción de sideróforos puede indirectamente suprimir enfermedades estimulando la biosíntesis de sustancias antimicrobianas (Joseph *et al.*, 2007, Robin *et al.*, 2008).

1.5. El cultivo de soja en Uruguay

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es uno de los cultivos más importantes en muchos países del mundo. Fue domesticado en China en el siglo XI A.C y utilizado para consumo humano (Hymowitz y Shurtleff, 2005). El aumento de la población mundial ha llevado a la expansión de la soja y en la actualidad es un cultivo de gran importancia por su alto contenido proteico y subproductos industriales. El mismo es altamente dependiente de N, requiere 80 kg N/ha para producir 1 tonelada de grano y es mayoritariamente cubierta por la FSN (Racca y Collino, 2005, Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011).

Las numerosas ventajas de la FSN frente a los fertilizantes nitrogenados, han llevado al uso extendido de inoculantes de rhizobios (biofertilizantes) como fuente de N (Hungria *et al.*, 2006; Ferraris *et al.*, 2006) sobretudo en países como el nuestro que no produce fertilizantes nitrogenados (Montañes, *et al.*, 2004).

En Uruguay, la soja es el principal cultivo de grano y el área de siembra ha ido aumentando exponencialmente en los últimos años, alcanzando casi a 1 millón de ha en el ciclo 2010/2011 (fuente: Encuesta agrícola "2010" DIEA-MGAP). El

rendimiento promedio es de 1,99 t/ha y el cultivo se expande aceleradamente a zonas no agrícolas, con suelos de baja fertilidad y condiciones ambientales menos favorables. Teniendo en cuenta el alto precio internacional de la soja y el hecho de que se le aporta N por vía de la fijación simbiótica se ha reducido el costo de producción para los productores rurales que lo consideran uno de los cultivos más viables económicamente (Montañes *et al.*, 2004).

La soja en nuestro país se siembra inoculada (Labandera, 2003) por lo que se mantiene un continuo interés, por todos los participantes de la cadena productiva, en ampliar los conocimientos sobre nuevas cepas de rhizobios y formulaciones de inoculantes y técnicas de inoculación. Desde la década del 70 se producen comercialmente inoculantes de calidad con cepas de rhizobios eficientes para soja y la inoculación de su semilla es una tecnología exitosa. El sector agropecuario ha obtenido significativos beneficios económicos, calculados en divisas ahorradas para el país, por la diferencia entre el costo de los inoculantes y el de los fertilizantes nitrogenados (Labandera, 2007).

El Departamento de Microbiología de Suelos (DMS) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) es el responsable de evaluar y reglamentar las cepas de rhizobios a utilizar en los inoculantes nacionales para todas las leguminosas sembradas. Aplica criterios como nodulación, fijación de N₂, adaptabilidad ecológica, estabilidad genética, compatibilidad interespecífica y comportamiento frente a factores limitantes del suelo de carácter químico, físico y biológico (Punschke, 2010). El fabricante multiplica las cepas en medio líquido hasta concentraciones superiores de 5 x 10⁹ ufc/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro) y produce inoculantes sólidos (en turba) y líquidos en soporte estéril.

En Uruguay, los inoculantes para soja contienen dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* identificadas como U-1301 y U-1302 (origen Brasil) y tanto los inoculantes

sólidos como líquidos deben tener una población inicial no menor a 2×10^9 rhizobios/g de turba en el inicio y una población final de 1×10^9 rhizobios/g, con una vigencia del producto de 6 meses (fuente: <<http://www.mgap.gub.uy>>). Estos estándares de calidad de los inoculantes fueron establecidos por el DMS del MGAP y están en vigencia. Uno de los aspectos más importantes en la selección de cepas de rhizobios es la evaluación de la fijación de N_2 (Bergersen, 1980) por métodos cuantitativos. En general se utilizan peso seco de nódulos, parte aérea y métodos estimativos como el “método de diferencia de N” entre una planta fijadora y una no fijadora en el cual se asume que la planta no fijadora absorbe la misma cantidad de N del suelo que la planta fijadora. El método de “balance de N en el sistema suelo-planta” es también indirecto y mide todas las entradas y salidas de N en un sistema suelo-planta, incluyendo la FBN (Barea, 1991).

Otro método indirecto es el de “reducción de acetileno” basado en que la nitrogenasa cataliza la reducción de acetileno a etileno (Dilworth, 1966); el acetileno es un inhibidor competitivo de la FBN y la determinación cuantitativa de etileno es por cromatografía gaseosa. El método se usa para comparar gran cantidad de muestras como cepas, suelos, plantas noduladas. Además de este método, se encuentra otro que determina que el “contenido relativo de ureidos” en la parte aérea. Está basado en que leguminosas de clima tropical transportan por el xilema ácido alantoico y alantoína (ureidos) como principal producto de la FBN. Estos compuestos se acumulan en la planta y se determinan por un método colorimétrico (Herridge y Peoples, 1990; Barea, 1991).

En la determinación de la fijación de N_2 se usan los métodos isotópicos de ^{15}N que dan una estimación directa de la FBN: distinguen el N del suelo, fertilizante y de la atmósfera. El de abundancia natural en ^{15}N (AN) se basa en la abundancia de los isótopos ^{15}N y ^{14}N en la atmósfera, cuyos valores son 0,336% y 99,664 %,

respectivamente (Hardarson, 1990). Este método determina la diferencia en ^{15}N entre plantas fijadoras de N_2 y no fijadoras (controles), cuantificando el N_2 fijado por el cultivo fijador (Unkovich *et al.*, 2008). El dato de la discriminación isotópica en plantas totalmente dependientes de la fijación de N_2 (valor B) es necesario para una mayor exactitud de la estimación del N_2 fijado por el cultivo de interés. Se requiere que el valor de abundancia del isótopo ^{15}N en el suelo como resultado de las transformaciones de N sean más altos que el de la atmósfera (Houngnandan *et al.*, 2008). Las variaciones en la AN de ^{15}N se expresan en δ partes por mil relacionado al N_2 atmosférico. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ pueden ser positivos (hay más ^{15}N que en N_2 atmosférico) o negativos (hay menos ^{15}N que en N_2 atmosférico) (Unkovich *et al.*, 2008).

Por otra parte, numerosos estudios utilizan parámetros fisiológicos correlacionados con la FSN, tales como la determinación del área foliar, biomasa foliar, carbohidratos solubles totales, etc. El área foliar es una de las principales variables que incide en el crecimiento de las plantas y permite conocer las respuestas fisiológicas de las plantas frente a factores bióticos y abióticos (Awal, *et al.*, 2004). Las plantas con un área foliar mayor son más demandantes de luz, realizan más fotosíntesis y contienen altas concentraciones de N (Pérez- Amaro, *et al.*, 2004), relacionando la capacidad fotosintética con la eficiencia simbiótica de los rizobios para fijar el N_2 . Para que los bacteroides puedan mantener la actividad de la nitrogenasa necesitan un suministro continuo de carbohidratos aportados por la planta. Estos son imprescindibles para generar ATP y poder reductor para la nitrogenasa (Nelson y Cox, 2002; Monza y Palacios, 2004). Por lo tanto se asume que una leguminosa con mayor área foliar suministrará más energía para la nitrogenasa y es de esperar una mayor fijación de N_2 .

Como se mencionó la inoculación de soja en Uruguay alcanza a un 100% de los cultivos sin aplicación de fertilizante nitrogenado. Podemos decir que el empleo de inoculantes en leguminosas ha sido exitoso, sin embargo en la última década se detectan varias interrogantes en relación a la FSN con especial interés en la optimización de ese proceso para lograr un aumento en la productividad. Llama la atención el bajo rendimiento promedio, cuando en países de la región por ejemplo Argentina se alcanzan a las 3 ton/ha con suelos y condiciones ambientales similares. Por otra parte, han surgido nuevas cepas de *Bradyrhizobium spp.* y tecnologías de inoculación, en particular la pre-inoculación de las semillas (Perticari, 2003; Hungria *et al.*, 2005; Zilli, *et al.*, 2010). Este término significa inocular las semillas 10-20 días antes de la siembra, sin reducción del número de bacterias/semilla y en la nodulación en el campo. Los fabricantes de inoculantes que promueven la pre-inoculación, lo hacen en base al agregado de nuevos componentes en el adherente que aumentan la sobrevivencia de los rhizobios en la semilla. La pre-inoculación según los fabricantes facilita la comercialización de las semillas de soja ya que el distribuidor inocula y facilita las tareas del agricultor (fuente: <<http://biagrosa.com.ar>>). Sin embargo, también se sabe que tiene sus inconvenientes como la rápida disminución de los rhizobios en las semillas en las primeras 24 horas y en días sucesivos, con aumento de los riesgos de no tener una nodulación suficiente en campo (Thompson *et al.*, 1980). Si bien es recomendable inocular y sembrar inmediatamente en el momento hay trabajos en ejecución para evaluar científicamente los riesgos que se corren y tratar de definir si es o no recomendable la pre-inoculación (Brockwell *et al.*, 1995; Hungria *et al.*, 2005).

En este trabajo se planteó: a) conocer si las cepas U-1301, U-1302 y U-741 producen sideróforos *in vitro* como característica adicional a la fijación de N₂. b)

determinar su eficiencia simbiótica en condiciones de invernáculo incluyendo la mezcla de U-1301+U-1302 y la pre-inoculación de U-741 y de U-1301+U-1302.

La finalidad del trabajo fue aportar información sobre la respuesta en soja a la inoculación con una o dos cepas de rhizobios y a la pre-inoculación de las semillas.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

El objetivo general del trabajo es caracterizar cepas de *Bradyrhizobium spp.* recomendadas para soja y evaluar su comportamiento simbiótico en invernáculo por diferentes métodos.

2.2 *Objetivos específicos*

1. Conocer las características del cultivo y el potencial de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de *Bradyrhizobium elkanii* U-1301, U-1302 y *B. japonicum* U-741.
2. Conocer la eficiencia en fijación de N₂ de las cepas U-1301, U-1302, U-741, la mezcla U-1301+U-1302, y la pre-inoculación de semillas de soja en ensayo en invernáculo.
3. Determinar la contribución de la fijación de nitrógeno de las cepas en estudio por la técnica de abundancia natural de ¹⁵N.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de rhizobios

Las cepas de rhizobios utilizadas en este trabajo se obtuvieron del Departamento de Microbiología de Suelos (DMS) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) (Lic. Bioquímica Karina Punschke). Esta institución es responsable del curado de la colección nacional de rhizobios y del control de calidad de los inoculantes nacionales y extranjeros. Se utilizaron dos cepas de Brasil, *Bradyrhizobium elkanii* U-1301 y U-1302 recomendadas en Uruguay (Tabla 1) y una cepa *Bradyrhizobium japonicum* U-741, recomendada en Argentina.

Las tres cepas recibidas del MGAP se repicaron y guardaron en tubos con medio EMA (extracto de levadura-manitol-agar) a 4°C (Vincent, 1970), (anexo 1) para el trabajo diario y en glicerol 50 % a -80 °C como cultivos respaldo.

Tabla 1. Origen y denominación de las cepas de *Bradyrhizobium spp.* utilizadas en el trabajo.

Cepa	Origen y denominación
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U-1301	SEMIA 587 (Brasil)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U-1302	SEMIA 5019; IAC 29W; U-732.(Brasil)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> U-741	E-109. (Argentina)

3.2. Características de las colonias

Las características de las colonias U-1301, U-1302 y U-741 (Somasegaran y Hoben 1994) se observaron luego de sembradas (triplicado) en placas de Petri con medio EMA (anexo 1). Las placas se colocaron a 30°C por 7 días. Las colonias se describieron según: tiempo (días) en visualizarse, tamaño, color, superficie y elevación.

3.3. Producción de sideróforos *in vitro*

Las cepas en estudio se evaluaron por su capacidad de producir sideróforos *in vitro*. Se sembró por picadura (palillo estéril) cada cepa en placa con medio CAS (Schwyn y Neilands, 1987) conocido como Cromo Azurol Sulfonato (anexo 2), las placas se incubaron a 30° C por 7 días. Se observó el cambio en el color del medio de cultivo (de azul intenso a naranja) y la formación de un halo alrededor de las colonias.

3.4. Capacidad de promoción del crecimiento vegetal por U-1302 en medio líquido

Con el propósito de evaluar la posible capacidad de promoción del crecimiento por la cepa U-1302, se obtuvo el peso seco de la parte aérea (PSPA) de las plántulas de soja inoculadas con esa cepa. El ensayo *in vitro* se realizó debido a que se observó un rápido crecimiento de las plantas inoculadas con U-1302 durante el ensayo en invernáculo.

El inóculo de U-1302 se preparó en matraz con 100 ml de medio EMA (anexo 1). Siembra de la cepa en el medio e incubación a 30 °C por 48 horas y a 150 rpm (revoluciones por minuto) en agitador mecánico.

Se determinó la densidad óptica (D.O) a los 620 nm de los inóculos antes y después de su inoculación y preparación.

A partir del matraz donde creció U-1302 (D.O= 1,704) se realizaron 2 diluciones, una al ½ (25 ml del inóculo original madre mas 25 ml de agua destilada estéril) (D.O=0,999) y otra al ¼ (12,5 ml del inóculo original madre mas 37,5 ml de agua destilada estéril) (D.O=0,498) en un volumen total de 50ml. Se esterilizaron superficialmente semillas de soja con hipoclorito al 4% por 5 minutos, luego se realizaron 6 lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron pre-germinadas

en recipientes con arena estéril (autoclave 121°C por 1 h) y colocados en estufa a 30 °C por 48 horas.

Se eligieron semillas pre-germinadas con radícula emergente de tamaño homogéneo (5 mm) y se las colocó asépticamente en los inóculos de U-1302 (matraces) dejándolas embeber por 40 min. Luego de la imbibición, las semillas se colocaron asépticamente en tubos gruesos (220 mm x 20 mm) que tienen una “estrechez” a los 50 mm de la base del tubo, para sostén de la semilla. Los tubos contenían solución nutritiva estéril (Fahraeus, 1957) sin N (anexo 3). Los tratamientos fueron: inóculo original, diluido al ½, diluido al ¼ y control (medio de cultivo sin inocular) con 8 repeticiones por tratamiento. Los tubos se colocaron en cuarto de crecimiento de plantas a 20 °C, con 14 hrs. luz y 10 hrs. oscuridad. A los 15 días de instalado el ensayo se extrajeron las plántulas y se determinó el peso seco de raíces (PSR) y parte aérea (PSPA) después de la siembra, a 60°C, hasta peso seco constante.

3.5. Eficiencia simbiótica de *Bradyrhizobium* spp. en invernáculo

La eficiencia en fijación de N₂ de las cepas en estudio se determinó en un ensayo en invernáculo utilizando una variedad comercial de soja obtenida en la distribuidora CALVASE (Cooperativa Agraria de Responsabilidad Limitada Varelense de Semillas), José Pedro Varela, departamento de Lavalleja, Uruguay. Se utilizaron macetas (3 kg) con una mezcla estéril de arena y suelo, 2:1 respectivamente. El suelo elegido presentaba un bajo contenido de N (0,017%, Laboratorio Análisis de Suelo, Facultad de Ciencias). El diseño fue en bloques completos al azar, con 8 tratamientos (tabla 2) y 6 repeticiones de cada uno.

Tabla 2. Tratamientos evaluados en el ensayo en invernáculo.

Tratamientos
1. C (-) control sin inocular
2. C (+) control sin inocular + N-fertilizante*
3. inoculado con U-1301
4. inoculado con U-1302
5. inoculado con U-741
6. inoculado con U-1301 + U-1302
7. pre-inoculado U-741
8. pre-inoculado U-1301 + U-1302

*70 ppm de N aplicado como una solución de 0,05% de KNO₃ en el momento de la siembra y posterior (cada 10 días).

3.5.1. Inoculación de semillas

Una empresa comercial suministró los inoculantes individuales (turba) de las cepas U-1301, U-1302 y U-741, y dos adherentes en polvo: a) S1 que es comercial y utilizado en las siembras en general, y b) S2 producto recomendado por la empresa, aumenta la adhesión del inoculante a la superficie de la semilla, protege a las bacterias de condiciones ambientales adversas, mejorando la sobrevivencia de los rhizobios en la semilla. Por lo tanto, se recomienda usar en la pre-inoculación de la misma.

Se realizó el control de calidad de los 3 inoculantes (ufc rhizobios viables/g) (Somasegaran, 1994). Los tratamientos 3, 4, 5 y 6 se inocularon con la técnica clásica recomendada para soja en Uruguay. Para una hectárea de soja 60 Kg de semilla, 200 g de inoculante y 30 g de adherente S1 disuelto en 300 ml agua. Los tratamientos pre-inoculados (7 y 8) se prepararon 16 días antes de la siembra del ensayo, con S1 más el aditivo S2 y las mismas proporciones que en la técnica clásica. Las semillas pre-inoculadas se mantuvieron en condiciones de laboratorio hasta la siembra. Los tratamientos control incluyeron, un control sin inocular (1) y un

control sin inocular + N-fertilizante (2) 70 ppm de N aplicado como solución de 0,05% de KNO₃ en el momento de la siembra y luego aplicaciones cada 10 días.

Se realizó el recuento de rizobios viables en muestras de semillas de todos los tratamientos inoculados siguiendo la metodología usada para los inoculantes (Somasegaran, 1994) pero con modificaciones. Se prepararon diluciones seriadas al décimo a partir de 90 semillas en 90 ml de solución salina 0,85% + tween 0,01% estéril y agitación por 15 min. El recuento se expresó en unidades formadoras de colonias por semilla (ufc/semilla).

En la siembra se colocaron 3 semillas por maceta y luego de 15 días (1^{ra} hoja trifoliada) se realizó el raleo dejando 1 plántula por maceta como unidad experimental. Las macetas fueron colocadas en invernáculo y fueron regadas según sus necesidades día por medio con agua destilada y una vez por semana con solución nutritiva Farhaeus (Fahraeus, 1957) sin nitrógeno (anexo 3). Se realizó una rotación de las macetas de cada bloque cada 15 días.

3.5.2. Determinaciones

Con el fin de obtener datos más específicos y precisos de los tratamientos, se realizó la determinación de variables en 2 etapas del crecimiento de las plantas: 1) a los 44 días después de la siembra (T1) fase de crecimiento V5 quinto nudo y 2) a los 60 días (T2) inicio de la floración R1 (Fehr y Cavinese, 1971).

3.5.2.1. Área foliar

Con el objetivo de conocer si ocurren diferencias en el área fotosintéticamente activa (AFA) entre las plantas de los tratamientos inoculados con U-1301, U-1302, U-1301+U-1302 y U-741, y controles sin inocular con y sin N (c+ y c-, respectivamente), se obtuvo el área fotosintéticamente activa (cm²/pl.) de una

planta elegida al azar para cada tratamiento, debido a que las determinaciones se realizaron manualmente y en el mismo momento. Se midió el largo y ancho de cada hoja (cm) de la planta seleccionada una vez por semana, comenzando siempre desde la base (primer nodo) hacia el ápice. Los resultados se expresaron como AFA/planta a los 31,39, 45 y 53 días después de la siembra (Ryle, *et al.*, 1977).

3.5.2.2. Peso seco de nódulos y parte aérea (44 días y 60 días)

A los 44 días de la siembra (T1) y a los 60 días (T2) se realizó la determinación de peso seco de nódulos (PSN) y parte aérea (PSPA) de cada tratamiento (4 repeticiones). Se quitaron las plantas cuidadosamente de la maceta y se extrajeron los nódulos de las raíces. Se determinó el número nódulos/ planta, ubicación (raíz primaria o en todo el sistema radical) y su color interno indicador de efectividad (rojo o blanco). Todo el material preparado se secó en estufa a 65°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en g/pl. para PSN y PSPA respectivamente.

3.5.2.3. Carbohidratos solubles totales

Con el objetivo de conocer la energía directamente disponible en las plantas de los diferentes tratamientos, se determinó los carbohidratos solubles totales (CST) en extractos de muestras de biomasa aérea seca obtenidas a los 60 días después de la siembra, (T2), por el método colorimétrico de la Antrona, (Yemm y Willis, 1954).

Preparación de extractos

Se pesó 0,1 g de muestra seca de la parte aérea (folíolos + tallo), se molió en molino eléctrico (Foss Cyclotec 1093) y colocó en tubo de centrifuga con agregado de 3 gotas de etanol 80% a temperatura ambiente y 2,5 ml de agua destilada. Se

agitó en vortex por 2 min y se centrifugó a 3000rpm por 30 min a 20 °C. Se filtró el sobrenadante en un matraz aforado de 50 ml y se agregó lentamente al precipitado 15 ml de etanol 80% casi a ebullición. Este procedimiento se repitió 2 veces antes de aforar el matraz a 50 ml con etanol 80% a temperatura ambiente.

Desarrollo de color

Se colocaron en hielo tubos con 10 ml de la solución antrona- H_2SO_4 y se agregó a cada tubo 2 ml de extracto vegetal. Para la preparación de los blancos se agregó 2ml de etanol 80% en sustitución de los extractos. Se agitaron en vortex los tubos y se dejaron reposar por 5 min antes de colocarlos en baño de agua a 100°C por 10 min. Se midió la absorbancia a 625 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603) antes de 1h de finalizada la reacción. Para el desarrollo de color de los estándares y blanco se realizó por duplicado y para los extractos por triplicado. Para la construcción de la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de la solución estándar glucosa (10, 25, 50, 75 y 100 mg/L) a partir de una solución madre de 100 mg/L. Los resultados de CST se expresaron en mg/pl.

3.5.2.4. Fijación de nitrógeno por abundancia natural de ^{15}N

Se estimó el aporte de N obtenido por las plantas de los diferentes tratamientos inoculados a los 60 días después de la siembra (T2) por la técnica de abundancia natural de ^{15}N (Hardarson, 1990). El material seco de la parte aérea (tallo + hoja) de las plantas de cada tratamiento se molió en molino eléctrico (Foss Cyclotec 1093). Submuestras de 3g del material vegetal (mezcla de todas las repeticiones) se enviaron al Departamento de Producción vegetal, Facultad de Agronomía, para determinar el %N y $\delta^{15}\text{N}$ por espectrometría de masa (VG Prism Series II, Facultad de Ciencias). Se calculó el porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%Nda) según la fórmula:

$\%Nda = 100 * (\delta^{15}N \text{ trat. control(-)} - \delta^{15}N \text{ trat. inoculado} / \delta^{15}N \text{ trat. control(-)} - \text{valor B.}$

Se tomo como valor B= -2,58 para *B. elkanii* (U-1301 y U-1302) y B= -2,6 para *B. japonicum* (U-741), (Unkovich, et al., 2008).

Con los datos de PSPA y %N se calculó la acumulación de N (mg/pl.) y concentración de N (mg/g p.seco).

3.6. Análisis estadísticos

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de los datos de PSPA, PSR, PSN, (InfoStat, 2011) y el test de Fisher ($P < 0,05$). Se calcularon valores de correlación (Pearson) y de regresión entre variables.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *Bradyrhizobium spp.* utilizadas en este trabajo tienen gran importancia microbiológica e industrial por su empleo en los inoculantes uruguayos (U-1301 y U1302) y argentinos (U-741) para soja (*Glycine max* L. Merr.). Las dos primeras cepas son *Bradyrhizobium elkanii* y la argentina es *B. japonicum*.

En una primera etapa del estudio se evaluaron características del cultivo y de producción de sideróforos de esas cepas y en una segunda etapa se complementó la información con la determinación de sus características simbióticas en ensayo en condiciones de invernáculo (figura 3), con introducción de la metodología de abundancia natural ^{15}N .



Figura 3. Plantas de soja, ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 60 días (T2).

4.1. Características de las cepas de *Bradyrhizobium* spp.

Actualmente, los estudios en general de rhizobios y su taxonomía se basa en un enfoque polifásico, es decir una caracterización morfológica, bioquímica, fisiológica, y genética (Cuadrado *et al.*, 2009). Con el objetivo de determinar rasgos distintivos de las cepas en estudio, se evaluaron algunas características de cultivo útiles, como poderlas distinguir por la forma, color, tiempo de aparición, etc. de sus colonias en medio de cultivo clásico EMA (anexo 1) así como la producción de sideróforos *in vitro*.

A los 3 días de la siembra en medio EMA sólido se visualizaron colonias únicamente de la cepa U-741. Se observó crecimiento de la cepa U-1301 a los 4 días y luego de 24 h se visualizaron las colonias de U-1302. Las colonias de la cepa U-741 eran de color blanco rosáceo muy brillosas y elevadas con una textura más

gomosa (mayor producción de exopolisacáridos) y borde entero. Las cepas U-1301 y U-1302 presentaban colonias de color blanco, menos brillosas, gomosas y elevadas con borde entero. No se observó una diferencia marcada entre las cepas en su mayor o menor rapidez de crecimiento en medio sólido EMA, quizás la característica que las diferencia visualmente es el color de la colonia y la mayor o menor producción de gomosidad. El orden por rapidez de crecimiento sería U-741>U-1301≥U-1302, resultados que deben ser confirmados por crecimiento en medio líquido con recuento de rhizobios viables.

Con el propósito de detectar en las cepas utilizadas mecanismos vinculados con la promoción del crecimiento vegetal (PCV) se determinó la producción de sideróforos encontrándose que no producen sideróforos en las condiciones experimentales y metodologías utilizadas.

La búsqueda de mecanismos vinculados con la PCV en cepas de soja (*Glycine max*. L.Merr.) altamente eficientes, se ha realizado con el objetivo de lograr nuevos inoculantes y mayores rendimientos (Antoun y Prévost, 2006; Kennedy *et al.*, 2008). De ahí que la producción de sideróforos, compuestos de bajo peso molecular con afinidad por el Fe, se ha relacionado a los rhizobios (Frioni, 2011). El Fe forma parte de enzimas específicas de bacterias fijadoras de N₂ y a su vez es imprescindible para el crecimiento de las plantas (Guerinot, *et al.*, 1990). Además, la producción de sideróforos está relacionada a mecanismos de supresión indirecta de enfermedades provocadas por patógenos en la agricultura (Winkelmann *et al.*, 1987; Winkelmann, 1991; Neilands, 1995).

Recientemente se ha determinado que algunas cepas de *B. japonicum*, utilizadas en inoculantes para soja y no leguminosas (USDA 110, SEMIA 5080 y E-109) producen fitohormonas, característica adicional de gran importancia para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, no se ha observado la producción de

sideróforos o solubilización de fosfato por parte de estas cepas (Boiero *et al.*, 2007), lo cual en parte concuerda con los resultados de este trabajo

Fukuhara y colaboradores (1994) determinaron en cepas de *B. elkanii* la capacidad de producir fitohormonas como ácido-indol acético (AIA) que promueve la formación de raíces y nódulos.

Es de mencionar que, si bien las cepas estudiadas no produjeron sideróforos, no es de descartar que alguna de ellas los sintetice bajo otras condiciones y técnicas experimentales.

Por otra parte, en el ensayo en invernáculo, las plántulas de soja inoculadas con U-1302 mostraron un llamativo crecimiento inicial, con marcada diferencia visual en tamaño de las plántulas, comparadas con las de los otros tratamientos inoculados. Por lo tanto, se decidió estudiar en sistemas estériles (tubos) la posibilidad de que el crecimiento tuviera alguna relación con la producción de un “metabolito” por la cepa en presencia de la plántula (figura 4). En la Gráfica 1 se observa los valores de peso seco de raíces (PSR) y parte aérea (PSPA) de las plántulas a los 15 días de colocadas las semillas de soja en tubos con inóculo de U-1302 sin diluir y diluido.

El inóculo diluido al medio produjo un PSPA significativamente mayor que los otros tratamientos. El inóculo sin diluir y el diluido al cuarto no produjeron diferencias significativas en PSPA, este resultado podría deberse a que el “metabolito” puede tener un efecto variable según si el inóculo está o no diluido o a la concentración del inóculo. De los datos obtenidos con el inóculo diluido al medio se puede suponer la presencia de algún compuesto que estaría incidiendo en el crecimiento inicial de soja. Este resultado motiva a realizar otros estudios en el futuro, como determinar si se trata de un compuesto como una fitohormona que promueva el crecimiento y analizar más profundamente esa característica de la cepa.

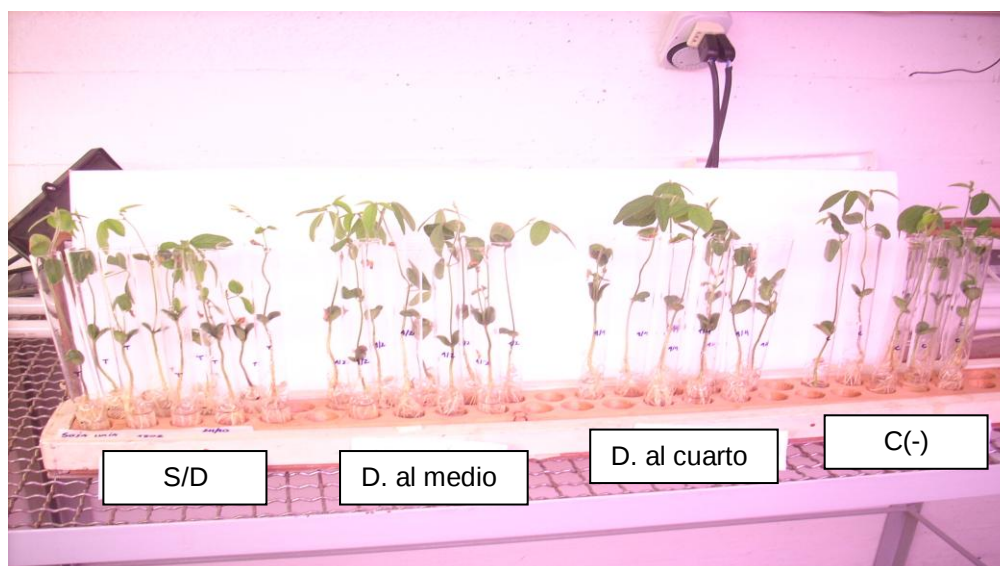
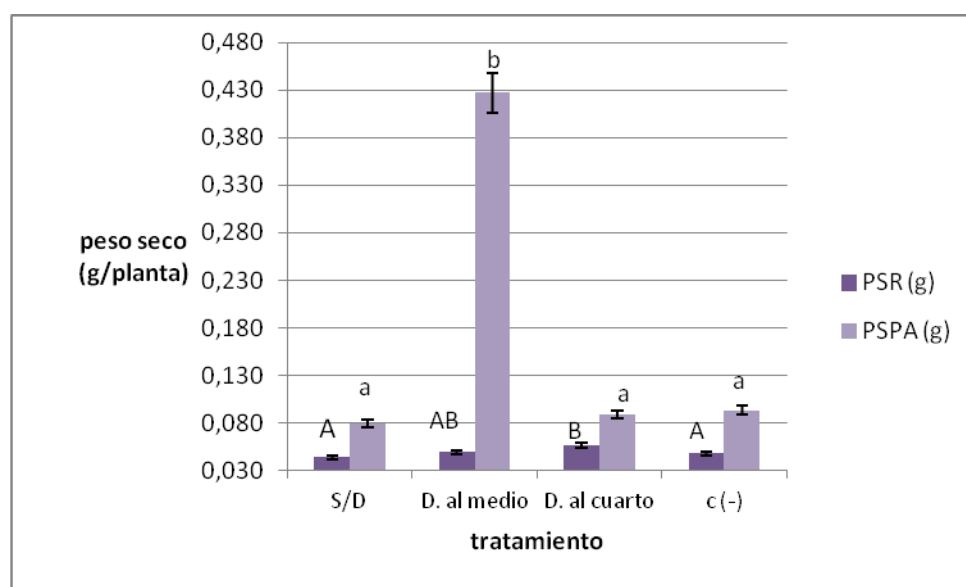


Figura 4. Tubos con plántulas de soja inoculadas con U-1302, (ensayo en cuarto de crecimiento de plantas, 20°C, 14 hrs. luz y 10 hrs. oscuridad). De izquierda a derecha: inóculo sin diluir (S/D), diluido al medio (D.al medio), diluido al cuarto (D. al cuarto) y control sin inocular (c-). (n=6).



Gráfica 1. Peso seco de raíces (PSR) y parte aérea (PSPA) de las plántulas inoculadas con U-1302. Inóculo de rhizobios sin diluir (S/D), diluido al medio (D.al medio) y diluido al cuarto (D. al cuarto) y control sin inocular (c-). Las barras corresponden a la desviación estándar de las medias (5%). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, LSD Fisher Test). (n= 6).

4.2. Eficiencia simbiótica de *Bradyrhizobium* spp. en invernáculo

Previo a la siembra del ensayo en macetas con suelo en invernáculo, se determinó el número de rizobios viables en turba y en semillas de cada tratamiento (luego de inoculadas). Así se conoció la calidad de los inoculantes utilizados y la presencia de poblaciones de rizobios similares (el mismo orden de magnitud) que avalan las comparaciones entre tratamientos.

El número de rizobios en los inoculantes U-1301, U-1302, U-741, la mezcla U-1301+U-1302 y los pre-inoculados U-1301+U-1302 y U-741 dieron valores superiores a 2×10^9 ufc /g de turba, validando su utilización por contener rizobios viables con el mismo orden de magnitud. El número de rizobios sobre las semillas al momento de la siembra fue para U-1301 de $1,09 \times 10^5$ ufc/semilla, U-1302 de $1,64 \times 10^5$ ufc/semilla, U-741 de $0,53 \times 10^5$ ufc/semilla, pre-inoculado U-1301+U-1302 de $6,0 \times 10^4$ ufc/semilla, y para pre-inoculado U-741 de 2×10^4 ufc/semilla. En los dos tratamientos pre-inoculados (16 días antes de la siembra) se obtuvieron diferencias en el número de rizobios/semilla presentando 1 orden de magnitud menor con respecto a los tratamientos inoculados en momento de la siembra.

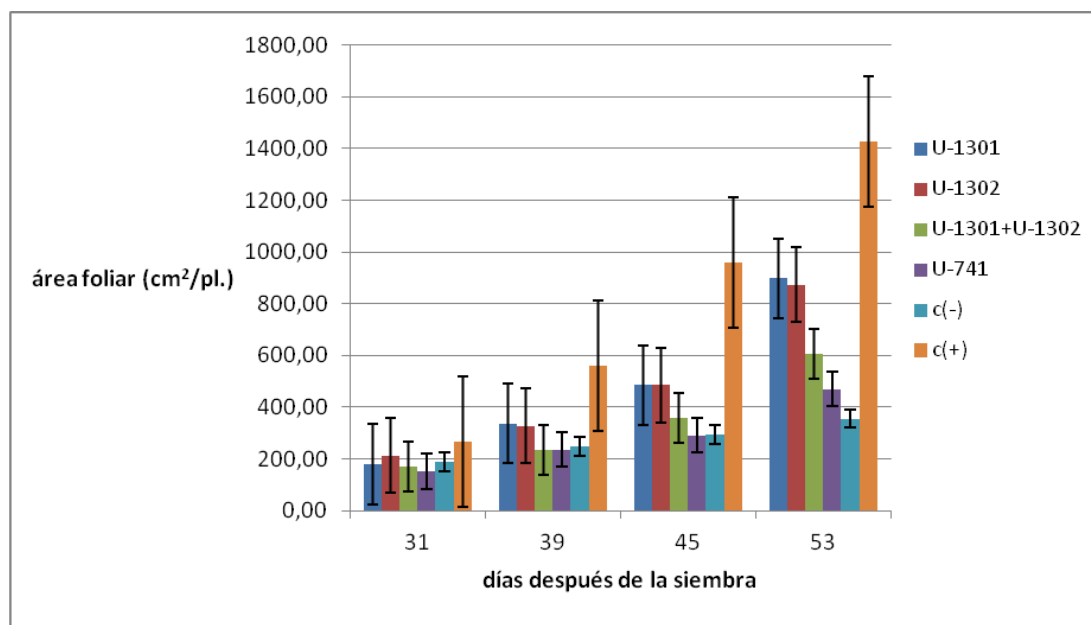
En el ensayo se comparó la respuesta de los tratamientos inoculados U-1301, U1302, U-741, U-1301+U1302, pre-inoculación U-741 y pre-inoculación U-1301+U1302, control absoluto (c-) y control + N fertilizante (c+). Las variables que se determinaron fueron parámetros fisiológicos relacionados a la fijación biológica de N_2 (FBN) y simbióticos.

4.2.1 Parámetros fisiológicos relacionados a la fijación de N_2

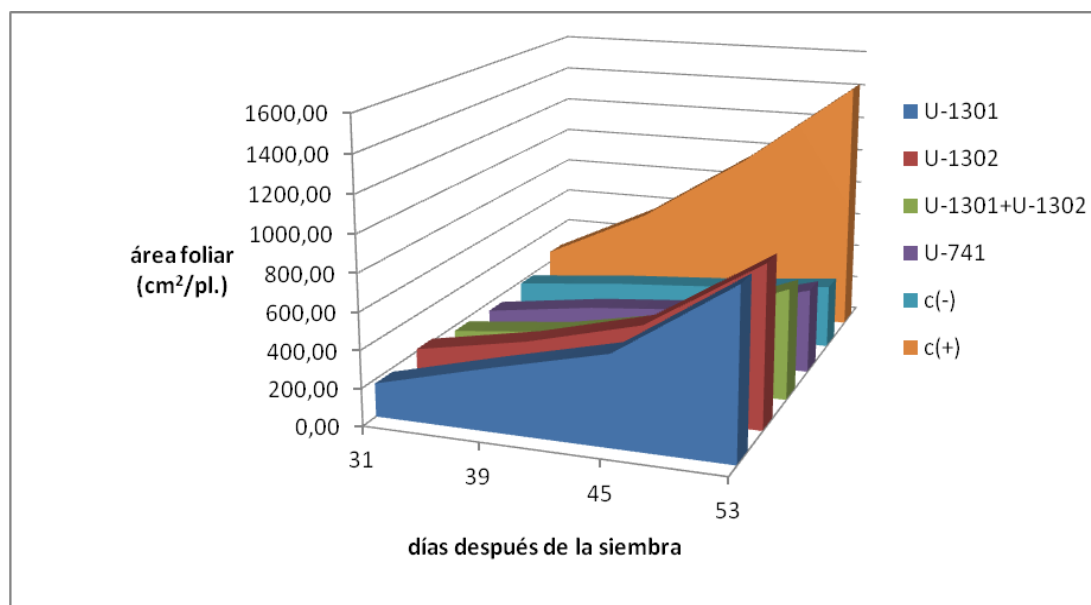
- **Área foliar**

Se determinó el área foliar de las plantas de soja como variable asociada a la FBN con el objetivo de conocer posibles diferencias entre los tratamientos en superficie foliar para captar la luz, realizar fotosíntesis y fijar N_2 . Se obtuvo el área fotosintéticamente activa ($cm^2/pl.$) de una planta elegida al azar en todos los tratamientos, con excepción de las plantas de los pre-inoculados debido a su poco crecimiento. En la gráfica 2.a. se muestra el área foliar medida cada día y en la gráfica 2.b. los valores acumulados en el tiempo. Se observó que las plantas control sin inocular + N (c+) (265g/pl.) tuvieron, un área foliar mayor al resto de los tratamientos desde los 31 días después de la siembra. En cuanto a los tratamientos inoculados, U-1302 (213 g/pl.) mostró mayor área foliar que U-1301 (179 g/pl.), U-1301+U-1302 (171 g/pl.) y U-741 (151 g/pl.) (gráficas 2.a y 2.b).

A los 53 días, inicio de floración, se observó un área foliar de 898 $cm^2/pl.$ (U-1301), 873 $cm^2/pl.$ (U-1302), 608 $cm^2/pl.$, (U-1301+U-1302), 469 $cm^2/pl.$ (U-741) y 355 $cm^2/pl.$ para c(-). La tendencia mostró que, de todos los tratamientos inoculados, el U-741 fue el que presentó menor área foliar. A su vez, el c(-) mostró una menor área foliar ya que no tenía ninguna fuente de N extra para el crecimiento de la planta (gráfica 2.a y 2.b).



Gráfica 2. a. Área foliar (cm²/planta) a los 31, 39, 45 y 53 días luego de la siembra para los tratamientos inoculados con las cepas U-1301, U-1302, U-1301+U1302 y U-741 y controles sin inocular con y sin N (c + y c - respectivamente), ensayo en macetas con suelo en invernáculo, (n=1). Las barras de error representan el error típico de la media.



Gráfica 2.b. Área foliar acumulada (cm²/planta) a los 31, 39, 45 y 53 días luego de la siembra para los tratamientos inoculados con las cepas U-1301, U-1302, U-1301+U1302 y U-741 y controles sin inocular con y sin N (c + y c - respectivamente), ensayo en macetas con suelo en invernáculo (n=1).

Como se mencionó, las diferentes simbiosis pueden generar en la etapa vegetativa de soja, según la interrelación de los genomas del micro y macrosimbionte, diferencias en área foliar que evidentemente se traducen en plantas más eficientes en FBN y con mayores rendimientos. Como se sabe, el área foliar es un parámetro fisiológico, con una alta correlación con la tasa de crecimiento de las plantas a través de la capacidad fotosintética que estas presentan (Pérez- Amaro *et al.*, 2004). Existe una marcada relación entre el N por unidad de área foliar y la fotosíntesis (Salvagiotti *et al.*, 2008). El N absorbido del suelo o fijado del aire, se incorpora primariamente en las hojas en forma de aminoácidos. A medida que la cantidad de N es mayor, las proteínas sintetizadas a partir de los aminoácidos aumentan el crecimiento de la planta incrementando la superficie fotosintética (Hernández, 2002). Las plantas de soja con un área foliar mayor presentan una capacidad fotosintética superior porque captan mas la luz obteniéndose más energía (ATP y NADPH) para fabricar compuestos orgánicos como glúcidos, lípidos y proteínas (Nelson y Cox, 2000).

Es de destacar que las plantas inoculadas con U-1302 a los 31 días presentaron un área foliar mayor comparada con la de los otros tratamientos inoculados (gráfica 2. a. y 2. b.), lo que llevó a realizar el estudio de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal por parte de esta cepa el cual ya fue mencionado anteriormente. Según los valores de área fotosintéticamente activa acumulada, las cepas se ordenan así: U-1302 > U-1301 > U-1301+U-1302 > U-741.

- **Carbohidratos solubles totales**

Como otro parámetro fisiológico relacionado a la FBN en soja, se determinó en la parte aérea (hojas+tallos) de las plantas los carbohidratos solubles totales (CST) a los 60 días después de la siembra, inicio de floración. Esta variable permite conocer la actividad metabólica de las plantas en un momento determinado de su desarrollo. Una mayor o menor disponibilidad de CST en la planta es un indicativo de mayor o menor energía disponible para las reacciones bioquímicas, incluyendo el metabolismo del carbono y del N en los nódulos, base de la FBN (Monza y Palacios, 2004).

Es de destacar, que el metabolismo del C en la FSN es sumamente importante ya que los nódulos necesitan ese elemento, producto de la fotosíntesis, como fuente de energía para los bacteroides (nitrogenasa) y disponibilidad de esqueletos de C para la síntesis de aminoácidos (Cardoso y Massena, 2008).

No se tuvieron diferencias significativas de CST entre los tratamientos aún cuando las plantas inoculadas con U-1301 y U-1302 presentaron una menor disponibilidad de CST (0,96 y 0,98 mg/pl respectivamente) que las inoculadas con U-741 (1,26 mg/pl.) y U-1301+U-1302 (1,20 mg/pl.). Se puede inferir que las plantas con U-1301 y U-1302 fijan más N_2 ya que hay un mayor uso (menor valor) de los carbohidratos en la parte aérea, probablemente por mayor demanda de los nódulos. Los tratamientos U-741 y U-1301+U-1302 indican menor fijación de N_2 por mayor concentración de CST (1,26 mg/pl. y 1,20 mg/pl. respectivamente) El tratamiento c (+) presentó una mayor concentración de CST (1,39 mg/pl.) que el resto de los tratamientos (tabla 3), debido a un metabolismo del N y del C diferente al de la FSN. La correlación entre CST y área foliar (AF) alta y negativa ($R=-0,99$).

Tabla 3. Carbohidratos solubles totales (CST) de la parte aérea de plantas de soja para los tratamientos inoculados con las cepas U-1301, U-1302, U-1301+U1302 y U-741 y controles sin inocular con y sin N (c+ y c- respectivamente). Ensayo en macetas con suelo en invernáculo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher Test).

Tratamiento	CST (mg/pl.)
U-1301	0,96 A
U-1302	0,98 A
U-1301+U-1302	1,20 A
U-741	1,26 A
C+	1,39 A
C -	1,07 A

4.2.2. Parámetros simbióticos: peso seco de nódulos, raíces y parte aérea

En general, la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios utilizadas en ensayos en invernáculo, se determina por el peso seco de nódulos, raíz y parte aérea. Los investigadores utilizan parámetros que permiten estimar directa e indirectamente la FSN, según la precisión, equipos y facilidades disponibles (Somasegaran y Hoben, 1994).

En este trabajo se determinó el peso seco de nódulos (PSN) y parte aérea (PSPA) de las plantas en dos momentos del ensayo: a los 44 días desde la siembra (T1) fase de crecimiento V5 quinto nudo y a los 60 días (T2) inicio de la floración R1 (Fehr y Cavinese, 1971).

• Peso seco de nódulos y parte aérea (T1)

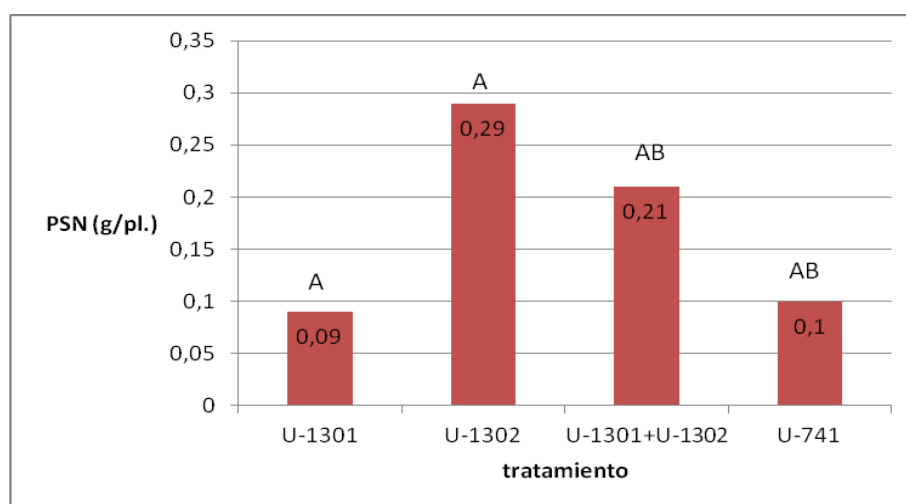
En T1 no se observaron diferencias significativas en PSN entre los tratamientos inoculados. Se observó que la cepa U-1302 (0,29 g/pl.) tuvo una tendencia a producir más biomasa nodular comparada con U-1301 (0,09 g/pl.), U-741 (0,1 g/pl.) y la mezcla U-1301+U-1302 (0,21 g/pl.) (gráfica 3). La inoculación con U-1302 presentó un 69% más de biomasa nodular que U-1301, 66% mayor que U-741 y un

28% más que la mezcla. La inoculación con la mezcla de cepas mostró un valor intermedio de PSN comparado con el de las cepas individuales (gráfica 3).

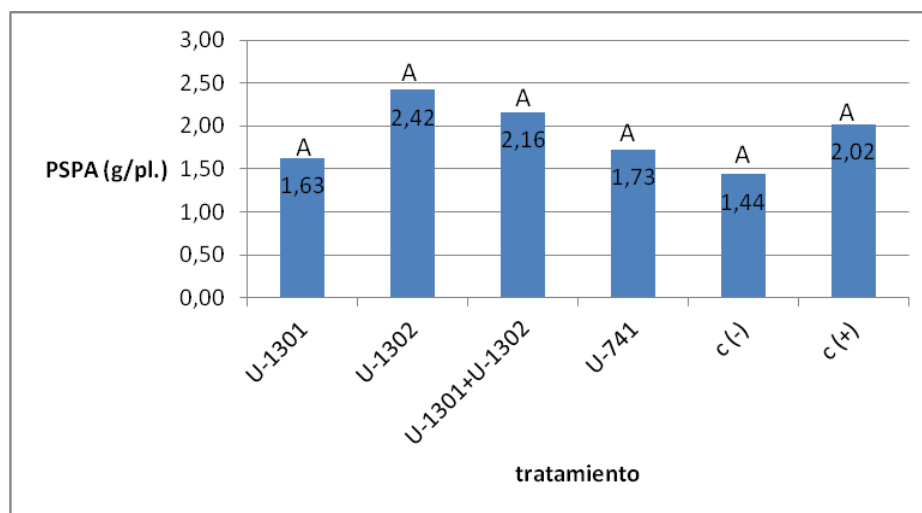
La rapidez de nodulación y una mayor formación de biomasa nodular es una característica importante en una cepa de rhizobio ya que indica potencial de eficiencia en fijación de N_2 (Somasegaran y Hoben, 1994).

En T1 no se obtuvo diferencias significativas en PSPA entre los tratamientos (gráfica 4). La cepa U-1302 (2,42 g/pl.) mostró el valor más alto de PSPA, inclusive al compararlo con el c (+) (2,02 g/pl.), lo cual coincide con los valores más altos de PSN obtenidos (gráfica 3).

El tratamiento mezcla (2,16 g/pl.), al igual que en el PSN, presentó un valor de PSPA intermedio entre las dos cepas individuales U-1301 (1,63 g/pl.) y U-1302 (2,42 g/pl.) indicando que no ocurre un “sinergismo” por la presencia de las dos cepas en el mismo inoculante (gráfica 4).



Gráfica 3. Respuesta en peso seco nódulos (PSN) de los tratamientos inoculados, U-1301, U-1302, U-1301+ U-1301 y U-741 (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 44 días, T1, n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher Test).



Gráfica 4. Respuesta en peso seco parte aérea (PSPA) a la inoculación con, U-1301, U-1302, U-1301+ U-1302, U-741 y controles sin inocular con (C+) y sin N (C-). Ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 44 días, T1, n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, LSD Fisher Test).

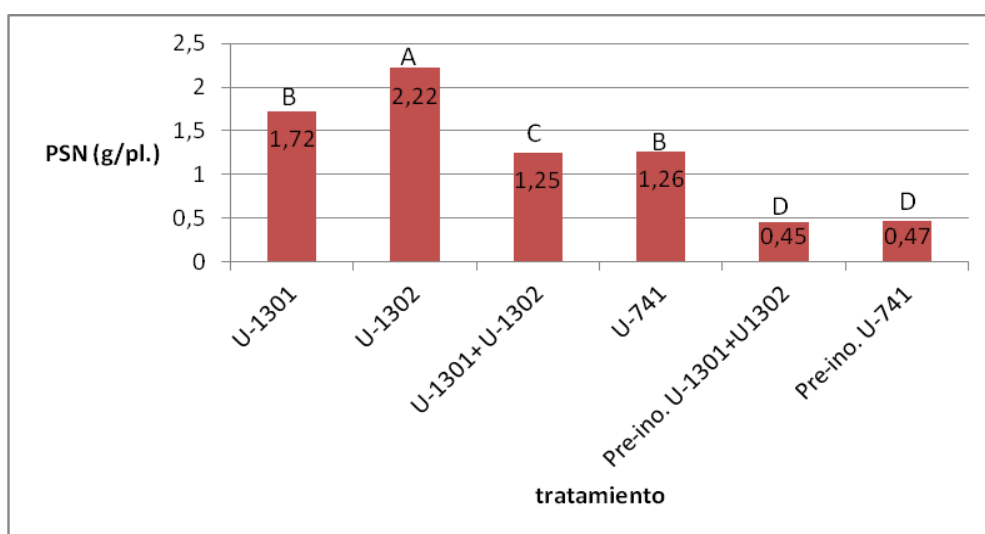
• **Peso seco de nódulos y parte aérea (T2)**

La evaluación realizada a los 60 días después de la siembra (T2) mostró diferencias significativas en PSN entre los tratamientos (gráfica 5). La inoculación con U-1302 (2,22 g/pl.) difirió significativamente del resto de los tratamientos, dio una media de PSN significativamente más alto que U-1301 (1,72 g/pl.), que U-741 (1,26 g/pl.) y U-1301+U-1302 (1,25 g/pl.) (gráfica 5). Estos resultados muestran que la cepa U-1302 fue capaz de formar un 25% más de nódulos con respecto a U-1301, un 44% mayor a U-1301+U-1302 y un 48% más que U-741. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos U-1301, la mezcla U-1301+U-1302 y U-741. A diferencia de lo observado en T1 la inoculación con el tratamiento mezcla presentó un valor de PSN menor al de las dos cepas individuales, lo cual indicaría un efecto adverso en el PSN cuando ambas cepas de rhizobios están presentes en el inoculante. Por lo general, en los inoculantes comerciales se recomienda una cepa de rhizobio. Los que tienen múltiples cepas se usan en diferentes huéspedes como

trébol (*Trifolium spp.*) y alfalfa (*Medicago sativa*) o para un único huésped como soja (Roughley, 1970; Keyser *et al.*, 1993). Si bien, la inoculación de más de una cepa puede ser útil en aumentar el número de variedades noduladas en soja, trae al mismo tiempo problemas de competencia entre ellas, debido a diferencias en su número en los caldos de cultivo y en los inoculantes preparados. Teniendo en cuenta que, las cepas crecen en diferentes fermentadores antes de ser mezcladas en el soporte, sigue siendo difícil asegurar un crecimiento balanceado de ambas cepas o una ocupación de nódulos similar. Esta situación probablemente explica las variaciones en fijación de N_2 cuando se usan inoculantes con más de una cepa (Bailey, 1988; Somasegaran y Bohlool, 1990). Los beneficios del uso de inoculantes con una sola cepa serían evitar los efectos antagonistas entre las cepas, diagnosticar con mayor facilidad la pérdida de efectividad, y un control de calidad más accesible y confiable (Thompson, 1980). Por otro lado, es importante tener en cuenta que las cepas recomendadas en los inoculantes deben además ser competitivas con las cepas naturalizadas en los suelos (Bizarro *et al.*, 2011).

Por otra parte, se observó que los tratamientos pre-inoculados (16 días antes de la siembra) U-1301+U-1302 (0,45 g/pl.) y U-741 (0,47 g/pl.) presentaron los valores de PSN más bajos (gráfica 5). Estos evidencian un menor número de rizobios sobre la semilla o algún efecto negativo, durante el almacenamiento de la semilla inoculada, en su potencial de nodulación. Los resultados concuerdan con los valores detectados de menor número de rizobios vivos sobre la semilla al momento de la siembra (pre-inoculado U-1301+U-1302 = $6,0 \times 10^4$ ufc/semilla, y pre-inoculado U-741 = 2×10^4 ufc/semilla) en comparación con los tratamientos inoculados (U-1301 = $1,09 \times 10^5$ ufc/semilla, U-1302 = $1,64 \times 10^5$ ufc/semilla y U-741 = $0,53 \times 10^5$ ufc/semilla). De acuerdo con nuestros resultados, se sugiere profundizar los conocimientos sobre la pre-inoculación de la semilla de soja. Esa

tecnología debe garantizar un número suficiente de rhizobios viables/semilla al momento de la siembra, de tal manera de obtener una buena nodulación. Ese número de bacterias está sujeto a múltiples factores adversos difíciles de controlar. El análisis de correlación entre PSN y área foliar dio un valor alto y positivo ($R=0,87$).



Gráfica 5. Respuesta en peso seco nódulos (PSN) de los tratamientos inoculados U-1301, U-1302, U-1301+U-1302, U-741 y de los pre-inoculados U-1301+U-1302 y U-741 (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 60 días, T2, n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, LSD Fisher Test).

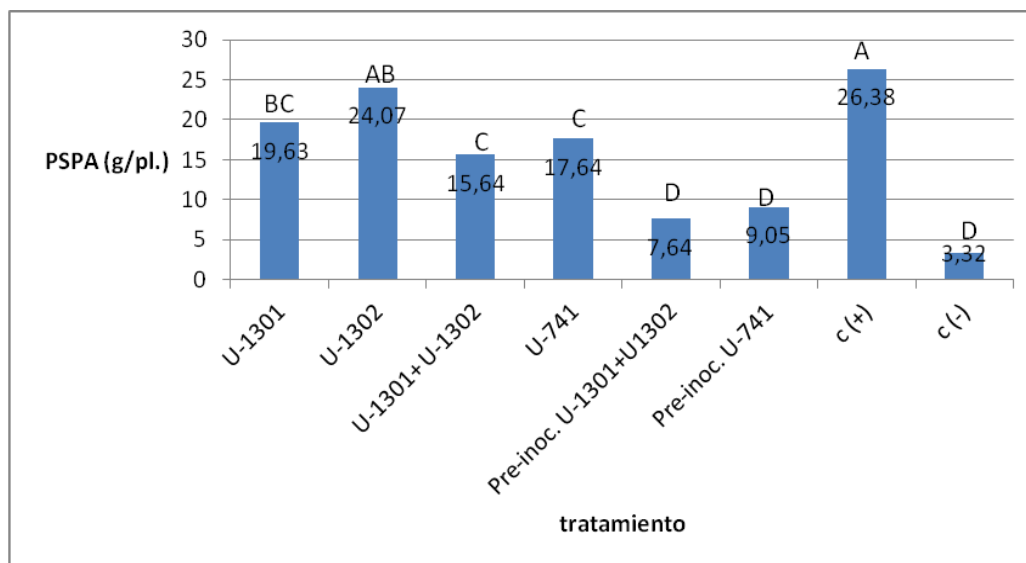
En cuanto a los datos de PSPA observamos que la cepa U-1302 y el c (+) produjeron los valores más altos, sin diferencias significativas entre ellos (gráfica 6). U-1302 también mostró valores más altos y diferencias significativas en PSPA (figura 5) con los tratamientos U-1301+U-1302 y U-741, pero no con U-1301 (gráfica 6). Se desprende de este resultado que la cepa U-1302 es altamente eficiente en fijación de N_2 en condiciones de invernáculo y que supera a U-741 y a la mezcla. Nuevamente el PSPA nos muestra un mejor rendimiento de U-1302 y U-1301 cuando se usan en inoculantes individuales que en mezcla, la cual presentó

un valor de PSPA menor que las cepas individuales y difirió significativamente de U-1302. Este resultado concuerda con lo mencionado por Thompson (1980) en cuanto a que el uso de cepas individuales en los inoculantes evita la competencia entre ellas (efecto de antagonismo). Los pre-inoculados no difirieron entre sí ni con el c (-) (gráfica 6) ratificando los resultados de PSN.

El análisis de correlación entre PSPA y área foliar dio alta y positiva ($R=0,76$) al igual que entre PSPA y PSN ($R=0,95$).



Figura 5. Plantas de soja ensayo en macetas en invernáculo (T2), de izquierda a derecha: tratamiento sin inocular+N fertilizante (c+), mezcla U-1301+U-1302, U-1301, U-1302 y U-741.

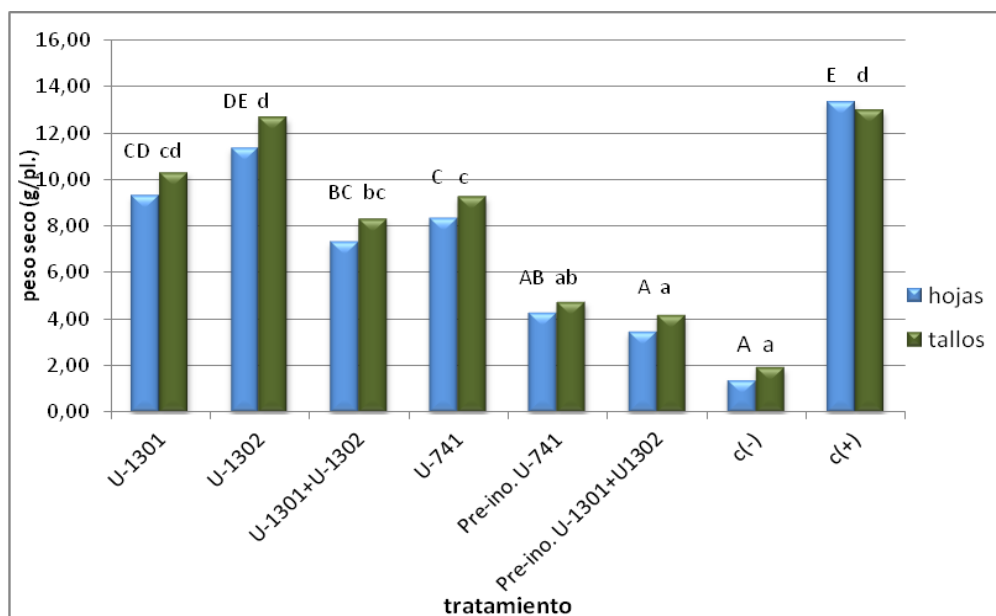


Gráfica 6. Respuesta en peso seco parte aérea (PSPA) a la inoculación con U-1301, U-1302, U-1301+U-1302 y U-741, de los pre-inoculados U-1301+U-1302, U-741 y controles sin inocular con (C+) y sin N (C-), (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 60 días, T2, n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, LSD Fisher Test).

Con la finalidad de determinar si hubo un efecto de los tratamientos inoculados en inducir diferencias en la composición de la biomasa aérea por separado de hojas y tallos, se obtuvieron los valores de peso seco (gráfica 7). Hubo diferencias significativas entre hojas de U-1302, U-741 y U-1301+U-1302. No hubo diferencias significativas entre U-1302 y c(+) ni en hojas ni en tallos, sin embargo otras cepas en tallo (U-741 y U-1301+U-1302) que difirieron con el c(+). Los pre-inoculados en tallos y hojas no difirieron entre sí ni con el control c(-).

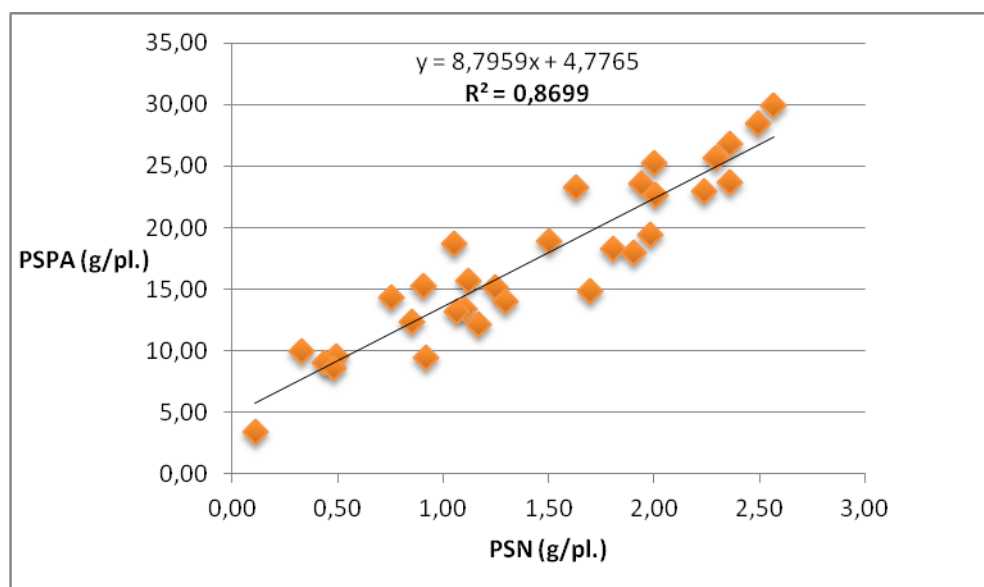
En todos los tratamientos se mantuvo la relación de mayor peso de tallo que de hojas, excepto en el c (+) que mostró una mínima diferencia a favor de las hojas. Estos resultados indican que la composición de la biomasa aérea es más bien una característica de la variedad de soja utilizada más que del microsimbionte utilizado.

En el caso del c(+) la diferencia puede deberse al metabolismo del N en una planta dependiente de fertilizante químico (gráfica 7).



Gráfica 7. Respuesta en peso seco de hojas y tallos (g/pl.) de los tratamientos inoculados U-1301, U-1302, U-1301+U-1302 y U-741 y de los pre-inoculados U-1301+U-1302, U-741 (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 60 días T2, n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, LSD Fisher Test).

El análisis de regresión entre el PSN y PSPA muestran una alta relación dada por el coeficiente de determinación ($R^2=0.87$) (gráfica 8). En otros trabajos se han encontrado altas correlaciones entre éstas variables (Montero *et al.*, 2001; Unkovich *et al.*, 2008; Salvucci *et al.*, 2012) por lo cual el PSN es incluido siempre en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas de rhizobios en invernáculo.



Gráfica 8. Análisis de regresión entre el PSN y PSPA de los tratamientos inoculados U-1301, U-1302, U-1301+U-1302 y U-741 (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, 60 días, T2).

Con los datos de PSPA de los tratamientos inoculados (T2), se calculó el índice de eficiencia relativa (ER) de las cepas en relación al c(+) a los efectos comparativos (Tabla 4). La cepa U-1302 presentó el valor más alto de ER (91%) seguida de U-1301 (74%), U-741 (67%) y el tratamiento mezcla (59%) confirmando los resultados de PSPA.

Tabla 4. Índice de eficiencia relativa (ER) de las cepas U-1301, U-1302, U-1301+U-1302 y U-741 en relación al c(+)=100% en base a PSPA (ensayo en invernáculo, 60 días, T2).

Tratamiento	ER (%)
U-1301	74
U-1302	91
U-1301+U-1302	59
U-741	67

Los resultados de PSN, PSPA y ER, indican que la inoculación de soja con U-1302 produce una simbiosis más eficiente en fijación de N₂ que la inoculación con U-1301, la mezcla U-1301+U-1302 y U-741.

4.2.3. Estimación de la FSN por la técnica de abundancia natural

¹⁵N

Existen numerosos métodos para evaluar la FSN en las leguminosas. Además de los métodos utilizados en este trabajo, hay estudios que emplean la reducción de acetileno (ARA), concentración de ureidos, N total (%), métodos isotópicos como el de dilución y abundancia natural de ¹⁵N y también el rendimiento de semillas (Unkovich *et al.*, 2008). Los métodos isotópicos como el de abundancia natural de ¹⁵N proporcionan información de mayor exactitud (Graham *et al.* 1988) aunque todo depende del cultivo fijador, del cultivo control, de los objetivos planteados y del lugar en donde se realizan los ensayos, laboratorio, invernáculo y campo (Witty, 1983; Chalk, 1986; Shearer y Kohl, 1986; Giller, 2001; Wanek y Arndt, 2002; Houngnandan *et al.*, 2008).

En este trabajo se determinó por abundancia natural ¹⁵N (AN) la contribución de la FSN a la nutrición nitrogenada de las plantas de soja, con el propósito de introducir esta metodología en un ensayo en invernáculo y con expectativas de su aplicación en campo. El método de AN se basa en el proceso de discriminación isotópica que ocurre entre el nitrógeno atmosférico y el ¹⁵N natural de los suelos durante las transformaciones del N (Shearer y Kohl, 1986; Peoples *et al.*, 1997). Se obtuvieron los valores de δ¹⁵N y de N total (%) de la parte aérea (tallo + hojas) de las plantas de soja (T2) de todos los tratamientos y se calculó el % de N derivado de la atmósfera (%N_{dda}), la acumulación de N (mg/pl.) y la concentración de N (mg/g p. seco aéreo) (tabla 5).

Las variaciones en la abundancia natural de ^{15}N se expresan en δ unidades, en partes por mil relacionado al N_2 atmosférico. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ pueden ser positivos (hay más ^{15}N que aquel en la atmósfera) o negativos (hay menos ^{15}N que en la atmósfera) (Unkovich *et al.*, 2008). Estudios previos han demostrado que valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ son frecuentes en la mayoría de los tallos de leguminosas dependiendo de la fijación de N_2 para su crecimiento, indicando una preferencia de ^{14}N sobre ^{15}N (Yoneyama *et al.*, 1986; Unkovich *et al.*, 1994; Gathumbi *et al.*, 2002)

Las plantas inoculadas con U-1302 presentaron el valor más bajo de $\delta^{15}\text{N}$ comparado con el de las plantas con U-1301, U-1301+U-1302 y U-741. Este resultado indica que la cepa U-1302 es la más fijadora de N_2 (tabla 5) ya que la mayor proporción de su N proviene de la atmósfera en forma de ^{14}N . El tratamiento U-1301+U-1302 mostró un valor de $\delta^{15}\text{N}$ mayor al obtenido con las cepas individuales, siendo la mezcla la menos fijadora de N_2 . En el caso del tratamiento U-741 presentó un valor de $\delta^{15}\text{N}$ menor que la mezcla y U-1301 (tabla 5). El c(+) presentó un valor $\delta^{15}\text{N}$ (0,25) mayor que las cepas debido a diferencias metabólicas y de distribución de N dentro de la planta (entre la fijadora y la no fijadora c +), así como una disimilitud en asimilación y transporte de N (Shearer *et al.*, 1980). El c(-) mostró el mayor valor de $\delta^{15}\text{N}$ (6,25) en comparación con el c(+) y las cepas indicando la falta de utilización de ^{14}N proveniente de la atmósfera (no fijadora), (tabla 5).

Estos resultados coinciden con los datos obtenidos de área foliar, carbohidratos solubles totales, PSN, PSPA y EF, concluyendo que U-1302 es la cepa más eficaz en fijar N_2 en condiciones de invernáculo.

En cuanto al %Nda (usando al valor de c(-) como control y teniendo en cuenta los valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$), la cepa U-1302 presentó el valor más alto (91,17%) con

respecto a U-1301+U-1302 (48,41%), U-1301 (57,95%) y U-741 (58,61%), (tabla 5). Este resultado pone en evidencia que las cepas de rizobios evaluadas son altas fijadoras de N₂, sin desestimar las diferencias encontradas entre ellas en las condiciones experimentales del ensayo. Los resultados mencionados concuerdan además con los datos de mayor acumulación de N en las plantas inoculadas con U-1302, así como en el c(+) (tabla 5).

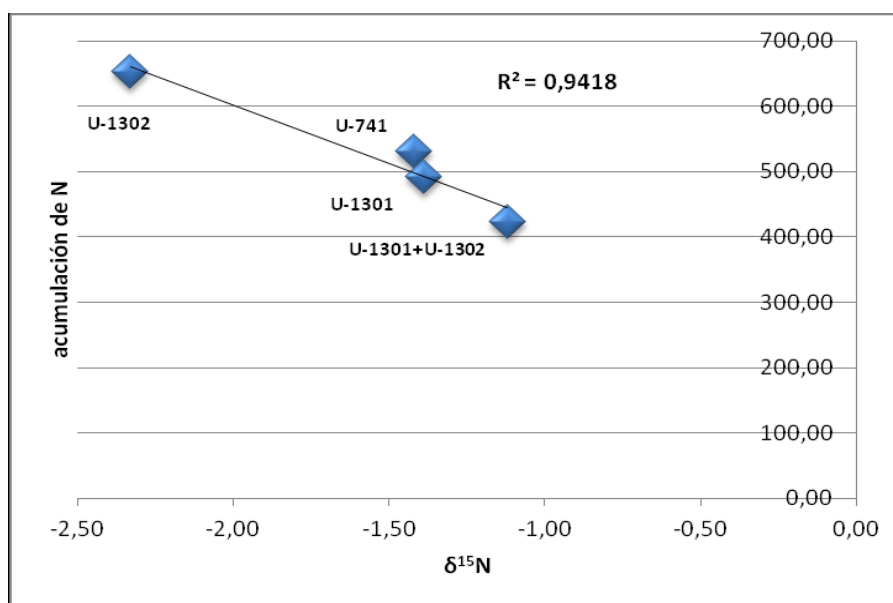
En la literatura se encuentran estudios que han demostrado una relación directamente proporcional entre el %Ndda y la concentración de N; y el PSPA y acumulación de N (Wanek y Arndt, 2002; Salvagiotti *et al.*, 2008), al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio.

Tabla 5. Valores de $\delta^{15}\text{N}$, %N derivado de la atmósfera (%Ndda), N total%, peso seco parte aérea PSPA (g/ pl.), acumulación de N (mg/pl.) y concentración N (mg/g p.seco) en parte aérea de plantas de soja inoculadas y sin inocular (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, T2).

Tratamiento	delta ¹⁵ N	%Ndda	%N	PSPA (g)	CST (g/ml)	Acumulación de N (mg/pl)	Concentración de N (mg/g p.seco)
U-1301	-1,39	57,95 ¹	2,50	19,64	1,88	490,89	25,00
U-1302	-2,33	91,17 ¹	2,71	24,07	1,96	652,31	27,10
U-1301+U-1302	-1,12	48,41 ¹	2,70	15,64	2,40	422,28	27,00
U-741	-1,42	58,61 ²	3,01	17,63	2,70	530,76	30,10
c(-)	6,12	—	1,48	3,98	2,01	58,91	14,80
c(+)	0,25	—	2,51	26,37	3,20	662,67	25,13

1. Valor B= -2,58 *B. elkanii*. 2. Valor B= -2,6 *B. japonicum*. Tomado de: Unkovich, 2008.

Se realizó un análisis de regresión entre la acumulación de N en la planta y los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los tratamientos inoculados. En la gráfica 9 se observa una relación inversa entre las variables. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otras leguminosas como habas (*Vicia faba*) y garbanzos (*Cicer arietinum*) (Unkovich *et al.*, 2008).



Gráfica 9. Análisis de regresión entre la acumulación de N y $\delta^{15}\text{N}$ de los tratamientos inoculados U-1301, U-1302, U-1301+U-1302 y U-741) (ensayo en macetas con suelo en invernáculo, T2).

En la regresión lineal se obtuvo un coeficiente de determinación alto ($R^2 = 0,94$) indicando el porcentaje de la variación de acumulación de N que se explica a través del modelo lineal que se ha estimado, es decir a través del $\delta^{15}\text{N}$.

Los resultados sugieren que U-1302 fue la cepa más eficiente en fijación de N, verificados con las variables fisiológicas de la planta así como las simbióticas, entre estas el PSN, PSPA, valor de $\delta^{15}\text{N}$, acumulación y concentración de N en la planta. Sin embargo, los ensayos de evaluación deben repetirse en suelos con diferentes propiedades, en especial en ensayos en campo. A su vez, no se debería dejar de

lado el estudio de otras características de estas cepas de rhizobios recomendadas ya que pueden ser de utilidad agrícola adicional a la fijación de N₂.

Finalmente, cabe mencionar, que los resultados de este trabajo hacen un llamado de atención sobre los beneficios de seguir recomendando dos cepas de rhizobios en los inoculantes para soja en Uruguay.

5. CONCLUSIONES

De este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. La caracterización de las cepas de *Bradyrhizobium spp.* para soja (*Glycine max* L. Merr) no mostró una diferencia marcada entre las cepas en su mayor o menor rapidez de crecimiento en medio sólido EMA. Tal vez, la característica que las diferencia visualmente es el color de la colonia y la mayor o menor producción de gomosidad. Las cepas en estudio no produjeron sideróforos. Por otro lado, U-1302 podría producir un “metabolito” vinculado probablemente con promoción del crecimiento vegetal, resultado que justificaría nuevos estudios.
2. Las plantas inoculadas con U-1302 mostraron mayor área fotosintéticamente activa al estado vegetativo de 31 días. La inoculación con la mezcla U-1301+U-1302 produjo menor área foliar (desde los 31 días hasta los 53 días) que las dos cepas individuales y que U-741. A su vez, U-1302 dio una menor cantidad disponible de carbohidratos solubles totales (CST). La mezcla presentó una mayor cantidad de CST que las cepas U-1301 y U-1302. El tratamiento U-741 mostró el mayor valor de CST de todos los inoculados.
3. Las plantas inoculadas con la cepa U-1302 produjeron mayor peso seco de nódulos y parte aérea con diferencias significativas de las otras cepas. La

inoculación con U-1302 aporta mayor cantidad de N_2 y se corrobora con el valor más alto de acumulación de N en las plantas.

La mezcla U-1301+U-1302 fue la menos eficiente en fijar el N_2 en condiciones de invernáculo en comparación con las cepas U-1301 y U-1302 individuales quedando en evidencia la falta de sinergismo cuando ambas cepas están juntas. La cepa argentina U-741 fijó más N_2 que el inoculante mezcla y menos que la inoculación con U-1301 y U-1302 por separado.

4. Las plantas de semilla pre-inoculada con la mezcla U-1301+U-1302 y con U-741, mostraron un menor desarrollo, por lo tanto, los resultados de la tecnología de la pre-inoculación deben analizarse con precaución.
5. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que la cepa U-1302 fue la más eficiente en fijación de N_2 en soja en invernáculo. En el futuro se debe continuar con la evaluación de las cepas en ensayos en campo, en condiciones agroecológicas diferentes, de manera de sumar información sobre la conveniencia o no de seguir recomendando dos cepas en los inoculantes para soja en Uruguay.

6. ANEXOS

1. Medio de cultivo: EMA (Extracto de Levadura Manitol y Agar, Vincent, 1970)

Componentes:	
Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	1 L
Rojo congo	10 ml
Agar	15 g
*pH 6,8	

2. Preparación medio CAS (Chrome Azurol S) para la determinación de sideróforos

Disolver 60,5mg de CAS en agua y mezclar con 10 ml de solución A (1mM de cloruro férrico ,10mM HCl). Bajo agitación agregar lentamente 72.9 mg HDTMA disuelto en 40 ml de agua. Autoclavar la solución azul resultante.

Por otro lado autoclavar una mezcla de 750 ml de agua, 100ml de sales MM9(X10), 15 g de agar, 30.24 g de Pipes (6.8). Luego de enfriar agregar 30 ml de solución de Casamino Acids al 10% y la fuente de carbono elegida (ej. 10 ml de solución de glucosa al 20%) como soluciones estériles. Agregar a solución azul obtenida anteriormente, por las paredes con suficiente agitación para lograr la mezcla pero no formar espuma.

Tomado de: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/Curso_CB/Anexo_practicos.pdf

3. Solución Nutritiva Fahraeus sin N (Fahraeus, 1957)

Componentes:	
CaCl ₂	0,100 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,120 g
KH ₂ PO ₄	0,100 g
NaHPO ₄	0,100 g
Citrato Férrico	0,005 g
solución stock de oligoelementos*	1,0 ml
Agua	1 L

*

Componentes por litro de agua:

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,03 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,14 g

**pH 7

7. BIBLIOGRAFÍA

- Antoun, H., Prevost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Siddiqui, Z. A. PGPR: *Biocontrol and Biofertilization*. Netherlands, Springer , p. 1-38.
- Awal, M.; Wan, I.; Endan, J.; y Haniff, M. (2004). Regression model for computing leaf area and assessment of total leaf area variation with fronda ages in oil palm. *Asian J. Plant. Sci.* Vol. 3, n° 5, p. 642-646.
- Bailey, L. D. (1988). Influence of single strains and a commercial mixture of *Bradyrhizobium japonicum* on growth, nitrogen accumulation and nodulation of two early-maturing soybean cultivars. *Can. J. Plant Sci.*, Vol. 69, p. 41-418.
- Baldani, J.I, Caruso, L., Baldani, V.L.D, Goi, S.R, Döbereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem*, Vol. 29, p.911–922.
- Barea, J. M. (1991). Cuantificación de la fijaciónEn: Olivares, J., Barea, J. M. *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Madrid, CSIC. Vol 2, p. 105-120.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth- promoting rhizobacteria into two classification: biocontrol-PGPB (Plant Growth Promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem*, Vol 30, p. 1225- 1228.
- Becana, M., Bedmar, E.J. (1991). Metabolismo del nitrógeno y oxígeno en nódulos de leguminosas. En: Olivares, J., ed.; Barea J. M., ed. *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes*.Vol.2. Madrid, CSIC, p. 33-45.
- Bergersen, J. (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. J. Wiley and sons, New York, 702 pp.
- Bizarro, M. J., Giongo, A., Kayser,V. L., Wurdig, R. L. F., Gano, K. A., Saccol de Sá, E. L.; Pereira, P. L. M., Selbach, P. A. (2011). Genetic variability of soybean bradyrhizobia populations under different soil managements. *Biol Fertil Soils*, Vol. 47, p.357-362.
- Boeiro, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains or *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological

and technological implications. *Applied Microbial and Cell Physiology*, Vol.74, p. 874-880.

Brockwell, J. Bottomley, P.J. (1995). Recent advances in inoculants technology and prospects for the future. *Soil. Biol. Biochem.*, Vol. 27, p. 683-697.

Chalk, P. M. (1985). Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: An appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 17 (4), p. 389 – 410.

Cardoso, R. M. Massena, R. V. (2008). Metabolismo do Carbono nos Nódulos [Internet], Embrapa Agrobiología Documentos 253, Rio de Janeiro, Seropédica. Disponible desde: <http://www.cnpab.embrapa.br>

Cuadrado, B., Rubio, G., Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 38 (1), p. 78-104.

Dean, D. R., Jacobsen, M. R. (1992). Biochemical genetics of nitrogenase. En: Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J. (eds). *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, NY. p. 763–834.

Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J., Boivin, C. (2001). Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim Pol.* Vol, 48(2), p. 359-65.

Dilworth, M.J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 127, p. 285-294.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL. Disponible desde: <http://www.infostat.com.ar>

Fahraeus G (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique. *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 16, p. 374-381..

- Ferraris, G. N., González Anta, G., Díaz-Zorita, M. (2006). Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. *En: Mercosoja 2006 – 3° Congreso de Soja del Mercosur. Soja Sudamericana Liderando el Porvenir. Rosario, SF, Argentina. Conferencias Plenarias-Foros-Workshops, p. 85–88.*
- Franché, C., Lindström, K., Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, Vol, 321, p. 35-59.
- Frioni, L. (2011). Microbiología. Básica, ambiental y agrícola. Uruguay. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía. Universidad de la República.
- Fukuhara, H., Minakawa, Y., Akao S, Minamisawa K. (1994). The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant Cell Physiol*, Vol.35, p. 1261–1265.
- García Galavís, P. A, Narajo Durán, S, Santamaría Linaza, C., Ruíz Porras, J.C., Daza Ortega, A. (2007). Mejora de la asimilación de hierro por las plantas propiciada por la inoculación con bacterias de la raíz productoras de sideróforos. *Actas de Horticultura nº 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*. Sevilla, IFAPA p. 570-574.
- Gathumbi, S. M., Cadisch, G., Giller, K. E. (2002). ¹⁵N natural abundance as a tool for assessing N₂-fixation of herbaceous, shrub and tree legumes in improved fallows. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 34 (8), p. 1059-1071.
- Giller, K. E. (2001). Nitrogen fixation in Tropical Cropping System. 2nd ed. CAB International, Wallingford, UK, 423 p.
- Graham, P. H., Bale, J., Baker, D. Friend, M., Roskoski, J., Mackay, K.T., Craswell, E. (1988). The contribution of biological nitrogen fixation to plant production: An overview of symposium and its implications. *Plant and Soil*. Vol. 108, p. 1-6.

- Guerinot, M. L., Meidl, E.J., Plessner, O. (1990). Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172, No. 6, p. 3298-3303.
- Gupta, A., Gopal, M., Tilak, K. V. B.R. (2000). Siderophore production by fast and slow growing greengram rhizobia (*Bradyrhizobium* sp. Vigna). *Agric. Sci. Digest.*, Vol. 20(1), p. 27-29.
- Hallberg, G. R. (1989). Nitrate in groundwater in the United States. En: Follet (Ed). *Nitrogen management and groundwater protection*. Elsevier, Amsterdam, p. 69-73.
- Halbleib, C.M. Ludden, P.W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Journal of Nutrition*, Vol .130, no 5, p. 1081-1084.
- Hardarson, G. (1990). En: Use of Nuclear Techniques in Studies of Soil- Plant Relationships. Vienna. Training course series N° 2. Vienna. *International Atomic energy Agency* (IAEA), p.129- 155.
- Hernández , G. R. (2002). Nutrición mineral en plantas [Internet]. Universidad de Los Andes - Mérida – Venezuela. Disponible desde:
<<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/nutricionmineral/>>
- Hernández, A.; y colaboradores. (2011) Encuesta Agrícola “2010”. Uruguay. Estadísticas Agropecuarias DIEA [Internet]. Disponible desde: <<http://www.mgap.gub.uy>>
- Herridge, D. F., Peoples, M.B. (1990). The ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. *Plant Physiology*, Vol. 93, p. 425-503.
- Houngnandan, P., Yemadje, R.G.H., Oikeh, S.O., Djidohokpin, C.F.; Boeckx, P., Van Cleemput, O. (2008). Improved estimation of biological nitrogen fixation of soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill) using 15N natural technique. *Biol Fertil Soils*. Vol. 45.p. 175-183.

- Hungria, M., Loureiro, M. F., Mendes, I. C., Campo, R. J., Graham, P. H. (2005). Inoculant Preparation, Production and Application. En: Werner, D.; Newton, W. E. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Netherlands, Springer, p. 223-253.
- Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C., and Graham, P. H. (2006). Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics; the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. En: R. P. Singh, N. Shankar, and P. K. Jaiwal (Eds.), *Focus on plant agriculture. 1. Nitrogen nutrition in sustainable plant productivity*. Houston, TX: Studium Press LLC. (p. 43-93).
- Hymowitz, T., Shurtleff, W.R. (2005). Debunking Soybean Myths and Legends in the Historical and Popular Literature, *Crop Sci.* Vol. 45, p. 473–476.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, E., Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Rev.* Vol.5, p. 619-633.
- Joseph, B.; Ranjan, P. R.; Lawrence, R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, Vol 1(2), p. 1-12.
- Keyser, H. H., Somasegaran P., and Bohlool, B. B. (1993). Rhizobial ecology and technology. In F. B. Metting, Jr. (Ed.), *Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management* (p. 205-226). New York, NY: Marcel Dekker.
- Kennedy, I.R. Kecskés, M. Deaker, R. Roughley, R.J. Marsh, S. Rose, M. Choudhury, A. Than Hien, N. Thi Cong, P. Van Toan, P. Thanh Be, T. (2008). Plant growth-promoting diazotrophs: optimizing their role as key agents in achieving more efficient nutrient use by field crops. En: Dakora, F.D. Chimphango, S. B. M. Valentine, A. J.

- Elmerich, C. Newton, W. E. *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation Through Sustainable Agriculture. Current Science Plant and Biothechnology in Agriculture*. Netherlands, Springer Vol. 42, p. 19-22.
- Kloepper, J. W., Hume, D. J., Scher, F.M., Singleton, C., Tipping, B., Laliberte, M., Frauley, K., Kutchaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I., Lee, L. (1988.) Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Dis*, Vol 72, p. 42-46.
- Labandera, C. (2007). Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. En: Izaguirre- Mayoral, M.L., ed.; Labandera, C., ed.; Sanjuán, J. ed. *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica científica y empresarial*. Montevideo, Cooperación Iberoamericana CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo – MGAP, p.75-78.
- Labandera, C. (2003). Soja: Inoculantes e Inoculación. *Revista del Plan Agropecuario*, N° 107.p.53-54. [Internet]. Disponible desde: <<http://planagropecuario.org.uy/Revistas/>>
- Ledgard, S. F., Giller, K. E. (1995). Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. En Bacon, P.E., Marcel Dekker (eds.), *Nitrogen Fertilization and the environment*. Inc: New York, p. 443-446.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. 10^a ed, Madrid. Pearson Prentice Hall.
- Mateo- Box. J. M., (2005). *Prontuario de agricultura*, Madrid, Mundi Prensa, Vol. 1, p. 940.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, Vol. 4 (1), p. 1-20.
- Miller, A.J., Cramer, M.D. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*. Vol. 274, p. 1–36.

- Miethke, M., Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev.* Vol. 71(3), p. 413–451.
- Montañes, A; Labandera, C; Solari, L. (2004). Fijación del nitrógeno a una escala nacional. *LEISA Revista de Agroecología* (Uruguay). Vol.19 (1), p.33.
- Montero, F.A., Filippi, K. M.; Sagardoy, M. A. (2001). Nodulación y nutrición nitrogenada en sojas convencionales y resistentes a glifosato inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum*. *Ciencia del Suelo*, Vol.19 (2), p. 1-4.
- Monza, J., Palacios, J. (2004). Fijación Biológica de Nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. En: Monza, J., Márquez, A., (eds.) *El Metabolismo del Nitrógeno en las plantas*. Córdoba, Almuzara, p. 15-38.
- Moreno, C. L.M. (2010). Caracterización de las cepas ICA L9 e ICA J96 bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de alverja y soya. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270, No. 45, p. 26723–26726.
- Neilands, J. B., Konopka, K., Schwyn, B., Coy, M., Francis, R. T., Paw, B. H., Bagg, A. (1987). Iron Transport in Microbes, Plants and Animals (Winkelmann, G., van der Helm, D., and Neilands, J. B., eds) Press, Weinheim. p. 3–33.
- Nelson, D. L. Cox, M. M. (2002). Fosforilación oxidativa y fotofosforilación. En: *Lehninger Principios de Bioquímica*. 3er ed. Barcelona, Omega, p. 659-721.
- Niklas, K.J. (2008). Carbon/nitrogen/phosphorus allometric relations across species. En: White, P.J., Hammond, J. P. (eds.) *The ecophysiology of plant- phosphorus interactions*. Vol. 7, p. 9-30.
- O'Hara, G. W., Dilworth, M. J., Boonkerd, N., Parkpian, P. (1988). Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytol.*, Vol. 108, p. 51-57.

- Pérez-Amaro, J. A. García, M. E. Enríquez, Q. J. F. Quero, C. A. R. Pérez, P. J. Hernández, G. A. (2004). Análisis del crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas de pasto "mulato" (*Brachiaria* híbrido, cv.). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 42 (3), p. 447-458.
- Perticari, A., Arias, N., Baigorri, H., De Battista, J.J., Montecchia, M., Pacheco Basrco, J.C., Simonella, A., Toresani, S., Ventimiglia, L., Vicente, R. (2003). Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. En: Satorre, E., ed. *El libro de la soja*. Buenos Aires. Servicios y Marketing Agropecuario, pp.69-76.
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., Ladha, J.K. (1995). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, Vol, 174, p. 3-28.
- Peoples, M. B., Turner, G. L., Sha, S., Aslam, M., Ali, S., Maskey, S., Bhattari, S., Afandi, F., Schwenke, D. G., Herridge, D.F.(1997). Evaluation of the ¹⁵N natural abundance technique for measuring N₂- fixation in experimental plots and farmers fields. En: Rupela, O. P., Johansen, C., Herridge, D.F. (eds). *Extending Nitrogen Fixation Research to Farmer's Fields*. Proceedings of an International Workshop on Managing Legume Nitrogen Fixation in Cropping Systems of Asia ICRISAT, Hyderabad, India, p. 57-75.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64(1), p.180-201.
- Postgate, J. (1991). Tendencias y perspectivas en fijación de nitrógeno. En: Olivares, J., ed.; Barea J. M., ed. *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes*. Vol.2. Madrid, CSIC, p. 1-15.
- Punschke, k. (2010) Colección Nacional de Cepas de Rhizobium spp. Departamento de Microbiología en Suelos. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. [Internet]. Disponible desde: <<http://www.cebra.com.uy/renare/adjuntos/2010/09/CATALOGO-FINAL-2010.pdf>>

- Racca, R.W., Collino, D.J. (2005). Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. Congreso Mundo Soja. Buenos Aires. p. 111-120.
- Revista Consumer Eroski. (2009). Vizcaya, España. La contaminación ahoga la agricultura sostenible. Edición Julio/Agosto 2009, p. 31-33. [Internet]. Disponible desde: <<http://revista.consumer.es/web/es/20090701/medioambiente/74967.php>>
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer J.M., Briat, J.F., Lemanceau, P. (2008). Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Adv Agron*, Vol. 99, p.183–225.
- Rodríguez, J. (1993). Manual de Fertilización. Colección en Agricultura. Facultad de Agronomía. Ediciones de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 362pp.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Margaret Oliver, I., Albareda Contreras, M., Ruiz-Sainz, J.E. (2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agron. Sustain. Dev.* Vol. 31, p.173–190.
- Ryle, G. J. A., Powell, C. E., Gordon, A. J. (1977). Effect of Source of Nitrogen on the Growth of Fiskeby Soya Bean: the Carbon Economy of Whole Plants. *Annals of Botany*, Vol. 42, p. 637-648.
- Roughley, R. J. (1970). The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant Soil*, Vol.32, p. 675-701.
- Salisbury, F.B; Ross C.W. (2000). En: Fisiología de las Plantas 2. Bioquímica vegetal. Madrid, Thomson Learning.
- Salvagiotti, F., Cassman, K. G., Specht, J. E., Walters, D. T., Weiss, A., Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research*. Vol. 108, Julio, p. 1-13.
- Salvucci, R. D., Aulicino, M., Hungria, M., Balatti, P. A. (2012). Nodulation Capacity of Argentinean Soybean (*Glycine max* L. Merr) Cultivars Inoculated with Commercial

- Strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *American Journal of Plant Sciences*, Vol. 3, p. 130-140.
- Sanchez, G. C. (2009). Producción de óxido nítrico en nódulos de soja. Implicación de la desnitrificación. Tesis de doctorado. Universidad de granada.
- Sanjuán, J., Olivares, J. (1991). Regulación de la fijación biológica de nitrógeno. En: Olivares, J., Barea, J. M. *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Madrid, CSIC. Vol 2, p. 19- 29.
- Shabayev, V. P., Yu, S. V., Mudrik, V. A. (1996). Nitrogen fixation and CO₂ exchange in soybeans (*Glycine max* L.) inoculated with mixed cultures of different microorganisms. *Biol Fertil Soils*, Vol, 23, p. 425-430.
- Schwyn, B., Neilands, J. (1987). Universal assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. Vol. 160, p. 47–56.
- Shearer, G., Kohl, D.H. (1986). N₂- fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal for Plant Physiology*, Vol. 13.
- Smil, V. 1999. Long-range Perspectives in Inorganic Fertilizers in Global Agriculture. 1999 Travis P. Hignett Lecture, IFDC, Alabama, USA, 80pp.
- Somasegaran, P., Bohlool, B. B. (1990). Single-strain vs. multistrain inoculation: Effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chickpea, soybean and drybean. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 56, p. 3298-3303.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Vol.2. New York, Springer-Verlag.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Plant Physiology. 5ed., U.S.A, SINAUER.
- Tommasino, H. (2008). Algunas consideraciones sobre fertilizantes en Uruguay. [Internet]. Montevideo, anuario OPYPA. Disponible desde:
<<http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario08/material/pdf/44.pdf>>

- Thompson, J. A. (1980). Production and quality control of legume inoculants. En: F.J. Bergersen (Ed.), *Methods for Evaluating Nitrogen Fixation* (pp. 489-533). New York, NY: John Wiley & Sons Inc.
- Twornlow, S. (2004) Increasing the role of legumes in smallholder farming systems. The future challenge. En: Rachid Serraj (ed). *Symbiotic Nitrogen Fixation*. Sci. Publ. Inc. USA. 328pp.
- Urzúa, H. (2000). Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una Agricultura Sustentable. Proc. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Arequipa, Perú. p. 211-227.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, Vol. 32 (2), p. 133-150.
- Unkovich, M. J., Pate, J. S. (2000). An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, Vol. 211, p. 211-228.
- Unkovich, M. J., Pate, J. S., Sanford, P., Armstrong, E.L. (1994). Potential precision of the delta 15N natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in South-West Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, Vol. 45, p. 119-132.
- Unkovich, M. J., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., Alves, B., Chalk, P. (2008). Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Australia, *Australian Centre for International Agricultural Research* (ACIAR), p. 1-258.
- Van Rhijn, P., Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.* Vol. 59 (1), p.124-142.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, Vol. 255, p. 571-586.

- Vincent, J. (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Program Handbook n^o.15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wanek, W., Arndt, S. K. (2002). Difference in $\delta^{15}\text{N}$ signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N_2 fixation to plant N. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 371, p. 1109-1118.
- Winkelmann G, Van der Helm D, Neilands J B. (1987). Iron transport in microbes, plants, and animals. En: Winkelmann G, Van der Helm D, Neilands J B, editors. *Iron transport in microbes, plants, and animals*. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH Press; p. 73–75.
- Winkelmann, G. (1991). Specificity of iron transport in bacteria and fungi. En: Winkelmann, G *Handbook of Microbial Iron Chelates*. Boca Raton, FL. CRC Press, p. 65-105.
- Witty, J.F. (1983). Estimating N_2 - fixation in the field using ^{15}N -labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol 15, p. 631-639.
- Yemm, E., Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, Vol. 57, p. 508-514.
- Yepis, V. O., Fundora H. O., Pereira, M.C., Crespo, B. T. (1999). La contaminación ambiental por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en el cultivo del tomate. *SCIENTIA gerundensis*. Vol. 24, p. 5-12.
- Yoneyama, T., Fujita, K., Yoshida, K., Matsumbo, T., Kambayashi, I., Yazaki, J. (1986). Variation of natural abundance of ^{15}N among plant parts and in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ fractionation during N_2 fixation in the legume-rhizobia symbiotic system. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 27, p. 791-799.
- Zilli, J. E., Campo, R. J., Hungria, M. (2010). Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. *Pesq. agropec. bras.* vol.45 no.3, p. 335-337.

