

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Bradirizobios pre-incubados con  
flavonoides: una estrategia para  
mejorar el rendimiento de  
cultivos de soja**

*Braulio Riviezzi*

*Orientador: Dra. María A. Morel*

*Laboratorio de Ejecución: Unidad Microbiología  
Molecular, BIOGEM. Instituto de Investigaciones Biológicas  
Clemente Estable (IIBCE)*

*Enero de 2018*

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El cultivo de soja.....	1
1.1.1. Importancia.....	1
1.1.2. Historia y perspectivas.....	2
1.1.3. Usos.....	3
1.1.3.1. Alimentación animal.....	4
1.1.3.2. Alimentación humana.....	5
1.1.3.3. Biodiesel.....	5
1.1.3.4. Otros usos.....	6
1.1.4. Requerimiento de N.....	6
1.2. Establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio.....	7
1.2.1. Rol de los flavonoides.....	7
1.2.2. Genes <i>nod</i> y Factores Nod.....	9
1.2.3. Rol de los FN.....	10
1.3. Mecanismo de la FBN.....	11
1.3.1. Importancia de la simbiosis en la FBN.....	12
1.3.2. Importancia de la FBN en la biósfera.....	13
1.4. Inoculantes microbianos.....	15
1.4.1. Inoculantes mejorados.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
2.3. Objetivos educacionales.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Productos bacterianos y material vegetal.....	19

3.2.	Inoculación de las semillas .....	20
3.3.	Evaluación de la concentración bacteriana en semillas.....	21
3.4.	Diseño experimental del ensayo en invernáculo.....	23
3.4.1.	Siembra y crecimiento.....	23
3.4.2.	Muestreo .....	24
3.4.3.	Evaluación del efecto de INDUCER sobre la nodulación y el crecimiento vegetal .....	26
3.4.4.	Evaluación del efecto de INDUCER sobre el rendimiento en granos	26
3.4.5.	Análisis estadístico.....	27
3.5.	Análisis cromatográfico de muestras obtenidas en V4 y R2 .....	27
3.5.1.	Procesamiento de muestras.....	27
3.5.2.	Extracción de compuestos orgánicos.....	28
3.5.3.	Derivatización de extractos .....	29
3.5.4.	Análisis cromatográfico .....	30
3.5.5.	Identificación preliminar de compuestos .....	30
4.	RESULTADOS .....	33
4.1.	Evaluación de la concentración de bacterias por semilla .....	33
4.2.	Efecto de INDUCER sobre el crecimiento vegetal.....	34
4.2.1.	Estadio V4.....	34
4.2.2.	Estadio R2.....	35
4.3.	Efecto de INDUCER sobre la nodulación .....	37
4.3.1.	Estadio V4.....	37
4.3.2.	Estadio R2.....	38
4.4.	Efecto de INDUCER sobre el rendimiento en granos .....	39
4.5.	Composición química de extractos obtenidos de raíces de plantas en estadio V4 .....	41
4.6.	Composición química de extractos obtenidos de nódulos de plantas en estadio R2.....	46
5.	DISCUSIÓN.....	48

5.1. Concentración de bacterias por semilla.....	48
5.2. Efecto de INDUCER sobre la nodulación y el crecimiento vegetal	51
5.3. Efecto de INDUCER sobre el rendimiento en granos.....	54
5.4. Composición en metabolitos en raíces y nódulos.....	55
6. CONSIDERACIONES FINALES.....	62
7. PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9. ANEXOS.....	81
Anexo I.....	81
Medios y soluciones.....	81
Anexo II.....	82
Ficha técnica de LIKUIQ®.....	82
Ficha técnica de INDUCER®.....	88
Anexo III.....	92
Ficha técnica de Add-it®.....	92
Anexo IV.....	96
Instrucciones de uso de LIKUIQ.....	96
Anexo V.....	98
Análisis de contenido de nitrógeno en el sustrato.....	98

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolución del área sembrada, rendimiento y producción de soja en Uruguay .....	3
<b>Figura 2.</b> Destino de la soja cosechada en relación al volumen cosechado (A) y retorno económico en función de cada uso (B) .....	4
<b>Figura 3.</b> Estructura química de los flavonoides .....	8
<b>Figura 4.</b> Efecto de los flavonoides y factores nod (LCO, FN) sobre la simbiosis rizobio-leguminosa. ....	11
<b>Figura 5.</b> Etapas del desarrollo del cultivo de soja .....	25
<b>Figura 6.</b> Supervivencia bacteriana en semillas inoculadas con INDUCER o LIKUIQ .....	33
<b>Figura 7.</b> Placas con medio sólido YEM y crecimiento de bradirizobios. ....	34
<b>Figura 8.</b> Efecto de la inoculación sobre el crecimiento vegetal de plantas en estadio V4. ....	35
<b>Figura 9.</b> Efecto de la inoculación sobre el crecimiento vegetal de plantas en estadio R2.....	36
<b>Figura 10.</b> Número de nódulos por planta en estadio de desarrollo V4. .	37
<b>Figura 11.</b> Número de nódulos por planta en estadio de desarrollo R2. .	38
<b>Figura 12.</b> Peso seco de nódulos por planta, medido en estadio de desarrollo R2.....	39
<b>Figura 13.</b> Biomasa total obtenida en las plantas cosechadas en estadio de desarrollo R8.....	40
<b>Figura 14.</b> Número de vainas (A) y de granos (B) por planta.....	41
<b>Figura 15.</b> Rendimiento en granos estimado como peso de granos por planta (A) e índice de cosecha (B).....	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos de inoculación implementados durante el trabajo.	21
<b>Tabla 2.</b> Composición química de extractos de raíces de plantas en estadio V4: flavonoides (derivados trimetilsil) .....	42
<b>Tabla 3.</b> Composición química de extractos de raíces de plantas en estadio V4: compuestos de bajo peso molecular (CBPM, derivados trimetilsil) solubles en acetona:etanol .....	43
<b>Tabla 4.</b> Composición química de extractos de raíces de plantas en estadio V4: compuestos solubles en metanol (derivados trimetilsil). .....	44
<b>Tabla 5.</b> Composición química de extractos de nódulos colectados de plantas en estadio en R2: compuestos solubles en cloroformo:metanol:agua (derivados trimetilsil).....	47

## Lista de abreviaturas

ALUR – Alcoholes del Uruguay

ANOVA – Análisis de la varianza (del inglés Analysis Of Variance)

CBPM – Compuestos de Bajo Peso Molecular

DGSA – Dirección General de Servicios Agrícolas

DIEA – Dirección de Estadísticas Agropecuarias

DMFA - Dimetilformamida

FBN – Fijación Biológica del Nitrógeno

FD – Factor de dilución

FeMoCo – Cofactor hierro-molibdeno

FN, Factor Nod – Factores de Nodulación

GABA – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GC – Cromatografía de Gases (del inglés Gas chromatography)

GC-MS – Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (del inglés Gas Chromatography-Mass spectrometry)

KI – Índices de Kovats (del inglés Kovats Index)

Lb – Leghemoglobina

LC-MS – Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (del inglés Liquid chromatography-mass spectrometry)

LCO – Lipoquitoligosacáridos

LPA – Largo de Parte Aérea

MGAP – Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca

MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

N – Nitrógeno

N<sub>2</sub> – Dinitrógeno, nitrógeno gaseoso

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – Amonio

NIST – Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (National Institute of Standards and Technology)

NMR – Resonancia Nuclear Magnética

OCDE – Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

PA – Parte Aérea

PFA – Peso Fresco de Parte Aérea

PFR – Peso Fresco de Raíz

PS – Peso Seco

PSN – Peso Seco de Nódulos

PSPA – Peso Seco de Parte Aérea

PSR – Peso Seco de Raíz

R – Raíces sin nódulos

R2 – Estadio del desarrollo de la soja donde las plantas se encuentran en floración completa

R8 – Estadio del desarrollo de la soja donde las plantas alcanzan la madurez fisiológica

UFC – Unidades Formadoras de Colonias

USDA – Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)

V4 – Estadio del desarrollo de la soja donde las plantas presentan cuatro nudos con hojas trifoliadas



## RESUMEN

La soja (*Glycine max*), es un cultivo altamente demandante de nitrógeno, y puede obtener este nutriente por fijación biológica de nitrógeno (FBN) cuando se asocia simbióticamente con bradirizobios. Esta asociación es el resultado de una comunicación a nivel molecular entre microorganismos y plantas que lleva a la formación de nódulos radicales donde ocurre el proceso de FBN. Los flavonoides exudados por las raíces, cumplen un rol clave en el inicio de este diálogo molecular, desencadenando la producción de factores de nodulación por los rizobios (y finalmente la formación de nódulos). Nuestros objetivos fueron evaluar el efecto de pre-incubar a bradirizobios con flavonoides sobre la nodulación y el rendimiento de soja en condiciones de invernáculo, y la sobrevivencia de los bradirizobios sobre las semillas inoculadas. Las semillas se inocularon con dos formulaciones a base de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302 crecidos previamente en presencia y ausencia de flavonoides. Se realizaron además dos testigos que implicaron semillas sin inocular y semillas que recibieron flavonoides pero no bradirizobios. Se cosecharon plantas en tres estadios de crecimiento: cuarto nudo (V4), floración completa (R2) y madurez fisiológica (R8). En V4 y R2 se analizó el peso seco (PS) de parte aérea (PA) y raíz, el largo de PA, y número y PS de nódulos. En R8 se analizó la biomasa aérea, el número y peso de vainas y granos, e índice de cosecha. Los datos se sometieron a análisis estadístico. A su vez, se tomaron muestras de raíces de plantas en V4 y de nódulos de plantas en R2, se liofilizaron, se procesaron y se realizaron sobre las mismas extracciones orgánicas. Los extractos obtenidos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa con el fin de elaborar perfiles metabólicos de las plantas, en función de los distintos tratamientos. Se observó que el agregado de flavonoides no afecta la adherencia ni sobrevivencia de los bradirizobios sobre las semillas, y que incrementa la biomasa aérea seca y el número y

PS de nódulos en raíces secundarias de plantas en R2. En R8 se obtuvo una mayor producción de biomasa en las plantas inoculadas con bradirizobios en flavonoides respecto a los testigos sin inocular, sin registrarse diferencias significativas entre las dos formulaciones evaluadas. Respecto al rendimiento en grano, se obtuvo un menor índice de cosecha en plantas inoculadas con bradirizobios pre-incubados en flavonoides. Por otra parte, los perfiles de metabolitos obtenidos para raíces en etapas tempranas del cultivo y nódulos de plantas en floración presentaron pocas variaciones entre tratamientos. Los resultados sugieren que algunos metabolitos, involucrados en la comunicación microorganismo-planta, en especial los flavonoides, pueden ser útiles para la mejora de los inoculantes tradicionales aunque es necesaria la evaluación del rendimiento final del cultivo en condiciones agrnómicas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El cultivo de soja

### 1.1.1. Importancia

La soja (*Glycine max*) es uno de los cultivos más extendidos y es la leguminosa de mayor importancia económica a nivel mundial. A diferencia de la mayoría de las leguminosas que se utilizan para la producción de legumbres y/o forraje, la soja se clasifica como oleaginosa (FAO, 2017; USDA, 2017). Su relevancia a nivel agronómico se debe principalmente al alto contenido de proteínas que poseen las semillas. Es justamente su valor proteico y nutricional lo que la convierte en un cultivo altamente demandado para nutrición humana y animal.

Como cultivo, tolera a la mayoría de los suelos, aunque prefiere aquellos con cierto buen drenaje, fertilidad y humedad. Como leguminosa, cubre sus requerimientos de nitrógeno (N) a través de la fijación biológica realizada por rizobios asociados simbióticamente a ella, y de la absorción de N inorgánico del suelo. El inicio de la floración es controlada por el fotoperíodo, la temperatura y el genotipo, y sus granos se cosechan cuando las hojas caen de la planta y el contenido de humedad en las semillas se reduce al menos a 13%, lo que permite su correcto almacenamiento (Berón & Muzio, 2013).

En Uruguay, la soja es uno de los tres principales productos de exportación, debajo de la carne y la celulosa. Según el Banco de Desarrollo de América Latina (CAF), las exportaciones de oleaginosos rondaron los US\$ 820 millones en el 2016. El sector, además, sostiene más de 14.000 empleos, entre trabajadores agrícolas, proveedores de servicios y de transporte. Considerando los impactos directos e indirectos del cultivo, la CAF estima que por cada US\$ 100 que se exportan de soja, poco más de US\$ 70 constituye valor agregado para el país (CAF, 2016),

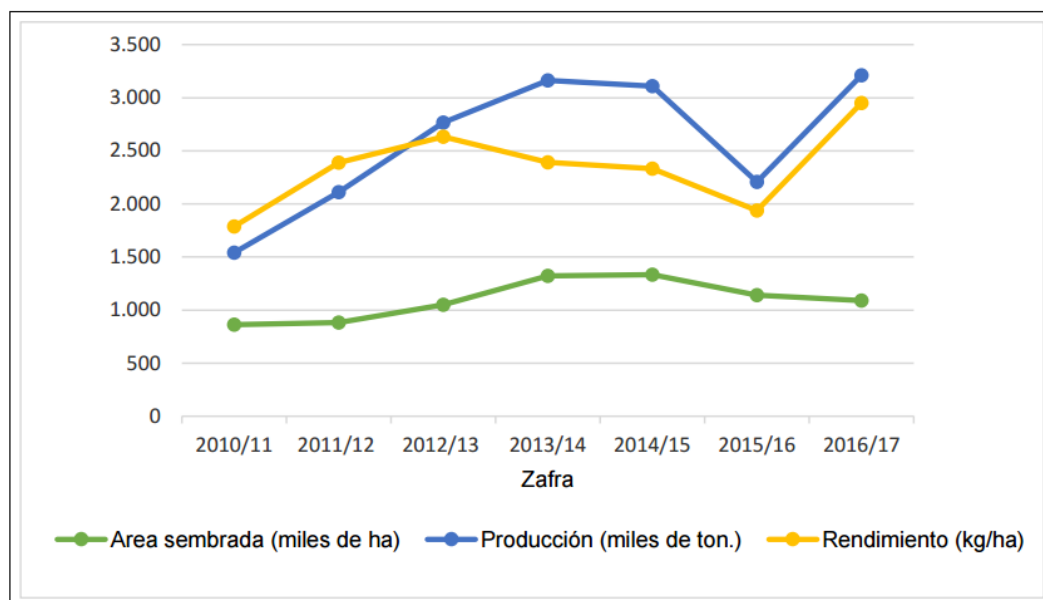
### 1.1.2. Historia y perspectivas

El origen de esta leguminosa anual es China, donde se encuentra ampliamente distribuida, y donde presenta la mayor diversidad de variantes (Qiu & Chang, 2010). Aunque el cultivo en China existe desde hace más de 5000 años, ha tenido relevancia mundial únicamente desde hace 200 años, coincidiendo con su introducción en América, en 1804 (Singh & Shivakumar, 2010; WWF, 2017). China fue el mayor productor y exportador de soja durante la primera mitad del siglo XX. A partir de la década de 1950 se produjo un rápido desarrollo de este cultivo en América, posicionando actualmente a los Estados Unidos, Brasil y Argentina como los mayores productores actuales, y a China como principal consumidor (Qiu & Chang, 2010; USDA, 2017; FAO, 2017).

La producción mundial de soja en el año 2017 fue de aproximadamente 348 millones de toneladas, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), con un área cosechada de 117.549 miles de hectáreas (USDA, 2017). Según la USDA además, para la zafra actual se proyectó una disminución en la producción pero un aumento en el área sembrada en los tres principales productores mundiales (USA, Brasil y Argentina). Como perspectivas para la próxima década, según un informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), se espera que la producción global de soja continúe en expansión, aunque a menor ritmo anual (1,9%) (OECD-FAO, 2017).

En nuestro país, la importancia de la soja para la economía se encuentra ligada a la producción y exportación de granos, y al agregado de valor que significa el desarrollo de la industria aceitera. A pesar del fuerte retroceso en el precio mundial, el cultivo de soja continúa siendo el más importante en producción y representa actualmente uno de los cultivos más extendidos, con un área cultivada de 1.100,0 miles de hectáreas para la zafra de 2016/2017 (Figura 1). Según la Dirección de Estadísticas

Agropecuarias (DIEA), del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), se estima que la última producción de soja en la zafra 2016-2017 fue la mayor obtenida en la historia del país, con 3,4 millones de toneladas, más del 50% superior a la zafra anterior (MGAP-DIEA, 2017; Figura 1). De acuerdo a la intención de siembra, registrada por la DIEA-MGAP mediante encuestas, el área a sembrar con soja para la zafra agrícola 2017/18 se estima en 1.047 miles de hectáreas (DIEA-MGAP, 2017).

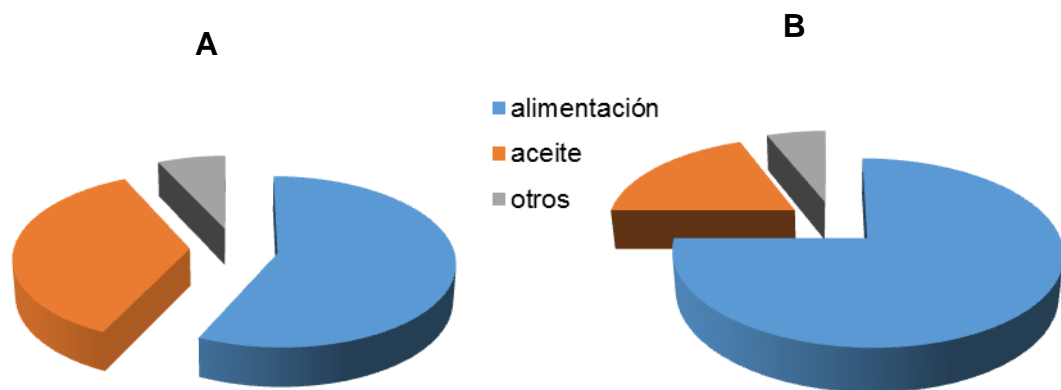


**Figura 1.** Evolución del área sembrada, rendimiento y producción de soja en Uruguay. Tomado de DIEA-MGAP, 2017.

### 1.1.3. Usos

De la soja lo que más importa es el grano, y la mayor parte de este es procesado por su aceite, cuyo retorno económico es elevado (Figura 2). A nivel mundial los granos de soja son la segunda mayor fuente de aceite vegetal (USDA, 2017).

Las semillas contienen hasta un 17% de aceite que, luego de procesado, puede ser utilizado para alimentación humana, producción de biodiesel u otros productos industriales menores como tintas, pinturas y poliéster (Ali, 2010; Hartman, West, & Herman, 2011; Raghuvanshi, 2010). Los restos del procesamiento para la obtención del aceite constituyen subproductos muy ricos en proteína, que se destinan a la alimentación animal. En volumen, la mayor parte de la producción de soja es utilizada como fuente de proteína para la industria ganadera (Figura 2).



**Figura 2.** Destino de la soja cosechada en relación al volumen cosechado (A) y retorno económico en función de cada uso (B). Adaptado de WWF, 2017.

#### 1.1.3.1. Alimentación animal

Durante el proceso de extracción de aceites desde el grano de soja se generan varios subproductos, que van desde harinas, cascarillas, gomas, lecitinas, entre otros, que son utilizados en otras industrias y para alimentación. La mayor parte de los subproductos es molida y utilizada como alimento para animales, rico en proteínas (Figura 1). Los subproductos de soja constituyen una excelente fuente de energía y

proteína, conteniendo además importantes nutrientes esenciales. Su valor nutritivo es excelente para dieta de cerdos y aves domésticas (WWF, 2017).

#### 1.1.3.2. Alimentación humana

Cerca del 7% de los granos de soja producidos son consumidos por humanos, tanto en forma de grano entero como, y mayoritariamente, de forma procesada (WWF, 2017). El consumo humano de soja se ha popularizado en los últimos años debido al aumento en la demanda y consumo de nuevos productos comestibles derivados. Los granos presentan un alto contenido calórico, proteico (hasta el 40%) y de ácidos grasos (20%). (FAO, 2017). Este alto contenido nutricional incluye a los 8 aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y antioxidantes. Del grano de soja se obtiene una amplia gama de alimentos de alta calidad, como la leche, manteca, aceites de cocina, suplementos dietarios, agentes medicinales, suplementos nutricionales, harina, proteína granulada, y productos de grano entero como el germen de soja, los brotes verdes, salsa, tofu, entre otros (AOU, 2014).

#### 1.1.3.3. Biodiesel

Si bien en Uruguay gran parte de la soja producida no es procesada internamente sino exportada como grano, el procesamiento que se realiza está relacionado mayormente con la producción de biodiesel y los co-productos que se generan de esta (glicerol, forraje, raciones para animales y aceite refinado, AOU, 2014). En este sentido, parte del gran crecimiento que ha tenido la soja se debe al impulso por parte de Alcoholes del Uruguay (ALUR) para la producción de biodiesel. Este combustible es más limpio que los derivados de petróleo, reduce las emisiones de materiales particulados, es renovable y aporta a la

sustentabilidad del medio. Es por esas razones que ha ganado atención como sustituto de los combustibles fósiles.

#### 1.1.3.4. Otros usos

Otros productos derivados de la soja se relacionan con productos sustitutos de derivados de petróleo, e incluyen ceras, jabones, anticorrosivos, y tintas no tóxicas, espumas refrigerantes, entre otros (Ali, 2010; Hartman y col., 2011; Raghuvanshi & Visht, 2010). Otros usos industriales incluyen revestimientos de papel, tableros particulados, productos de limpieza, entre muchos más (AOU, 2014).

#### 1.1.4. Requerimiento de N

La soja es un cultivo altamente demandante de N y, a pesar de la abundancia de N en la atmósfera, este compuesto se presenta como factor limitante para el crecimiento vegetal. Esto se debe a que el N se encuentra en la atmósfera en forma de dinitrógeno ( $N_2$ ), un gas inerte inutilizable por la mayoría de los organismos, a excepción de los microorganismos diazotófos. Estos son capaces de reducir el  $N_2$  atmosférico mediante un proceso llamado Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y son responsables de alrededor del 60% del ingreso anual de N en los ecosistemas (Newton, 2007). La soja, como otras leguminosas, puede beneficiarse de la capacidad fijadora de N de un grupo de diazotófos conocidos como rizobios, mediante el establecimiento de una asociación simbiótica entre ambos.

Los rizobios son bacterias del suelo, que tienen la particularidad de ser capaces de fijar N atmosférico únicamente luego de asociarse endosimbioticamente con plantas leguminosas. Existen rizobios representantes de varios géneros dentro de las clases  $\alpha$  y  $\beta$  proteobacteria. En el caso particular de la soja, los rizobios que la nodulan



son generalmente cepas del género *Bradyrhizobium* (Singh & Shivakumar, 2010).

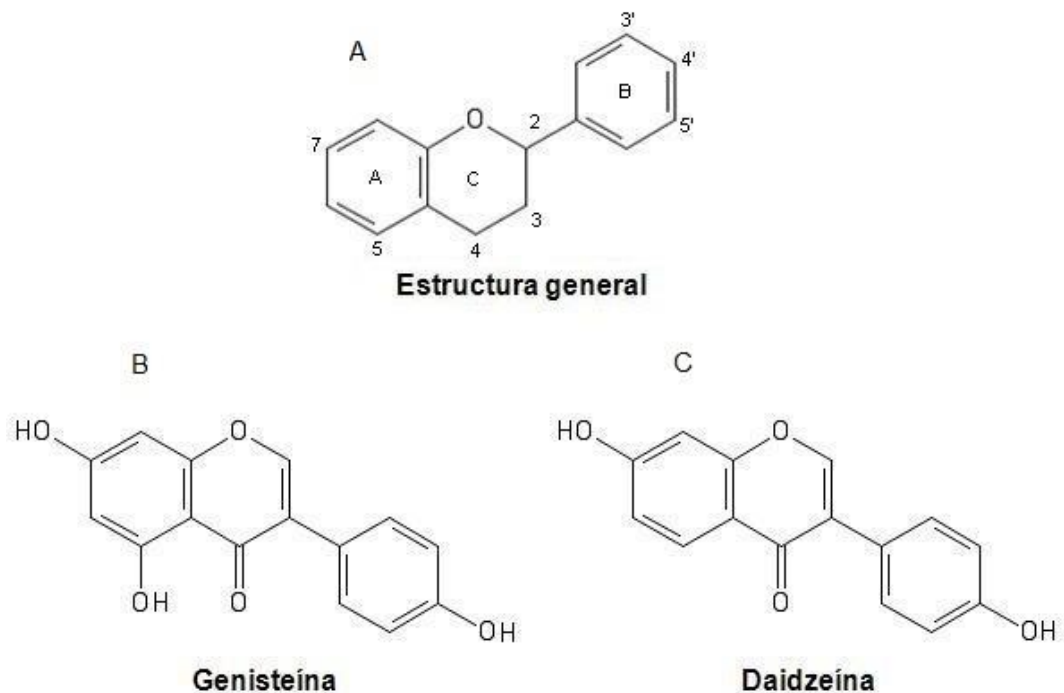
## 1.2. Establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio

La asociación simbiótica establecida entre los rizobios y las leguminosas es uno de los sistemas de interacción planta-bacteria más estudiados. El establecimiento de esta simbiosis depende de diversas moléculas producidas por ambos simbioses, que permiten el reconocimiento específico, el desarrollo de un proceso de infección y finalmente la formación de los nódulos radicales.

### 1.2.1. Rol de los flavonoides

La primera señal química que aparece en el comienzo de la interacción entre los simbioses la constituyen los flavonoides. Estos compuestos fenólicos son producto del metabolismo secundario vegetal, y son exudados por las raíces hacia la rizósfera. Su estructura general consiste en un esqueleto de 15 carbonos distribuidos entre dos anillos aromáticos bencénicos conectados por un anillo heterocíclico, con una estructura base C6-C3-C6. Las diferencias entre las subclases de flavonoides están determinadas por los tipos y posiciones de los grupos funcionales que poseen en su estructura (Fig. 3). Existen varias sub clases de flavonoides, siendo las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas las más estudiadas (Brodowska, 2017).

Los flavonoides se pueden encontrar en forma libre o unidos a azúcares formando glicósidos hidrosolubles. En el caso de la soja, los principales flavonoides encontrados en sus granos y hojas son la genisteína, la quercetina, el cumestrol, y la daidzeína y los glicósidos genistina y daidzina, (Ho y col., 2002; Porter y col., 1986).



**Figura 3.** Estructura general de los flavonoides (A). Las isoflavonas genisteína (B) y daidzeína (C) son producidas mediante una serie de modificaciones sobre la estructura general, incluyendo migración de un grupo areno e hidroxilación.

Las plantas secretan una mezcla de flavonoides que contribuye a la especificidad del reconocimiento entre simbioses (Gibson y col., 2008; M. A. Morel & Castro-sowinski, 2013). Ese es el principal rol de los flavonoides en la simbiosis leguminosa-rizobio: activar la expresión específica de los genes *nod* en los rizobios, desencadenando los sucesos posteriores implicados en la nodulación (Peters y col., 1986; Sugiyama y col., 2007). Los flavonoides poseen además otra función crucial en las etapas tempranas de señalización, atrayendo a los microsimbiontes hacia las raíces mediante el fenómeno de quimiotaxis (Morel & Castro-sowinski, 2013).

### 1.2.2. Genes *nod* y Factores Nod

Una vez en la rizósfera, los flavonoides son captados por rizobios específicos mediante sus receptores NodD. Estos receptores pertenecen a la familia de factores de transcripción del tipo LysR. Poseen un dominio C-terminal de unión a ligando que reconoce y une flavonoides, y un dominio hélice-vuelta-hélice de unión al ADN en su extremo N-terminal (Gibson y col., 2008; Kobayashi & Broughton, 2008). Una vez formado el complejo NodD-flavonoide, se produce en la bacteria una respuesta transcripcional causada por la unión de NodD a regiones reguladoras que se encuentran corriente arriba de los promotores de los genes de nodulación *nod*, *noe* y *nol* (Poinsot y col., 2016).

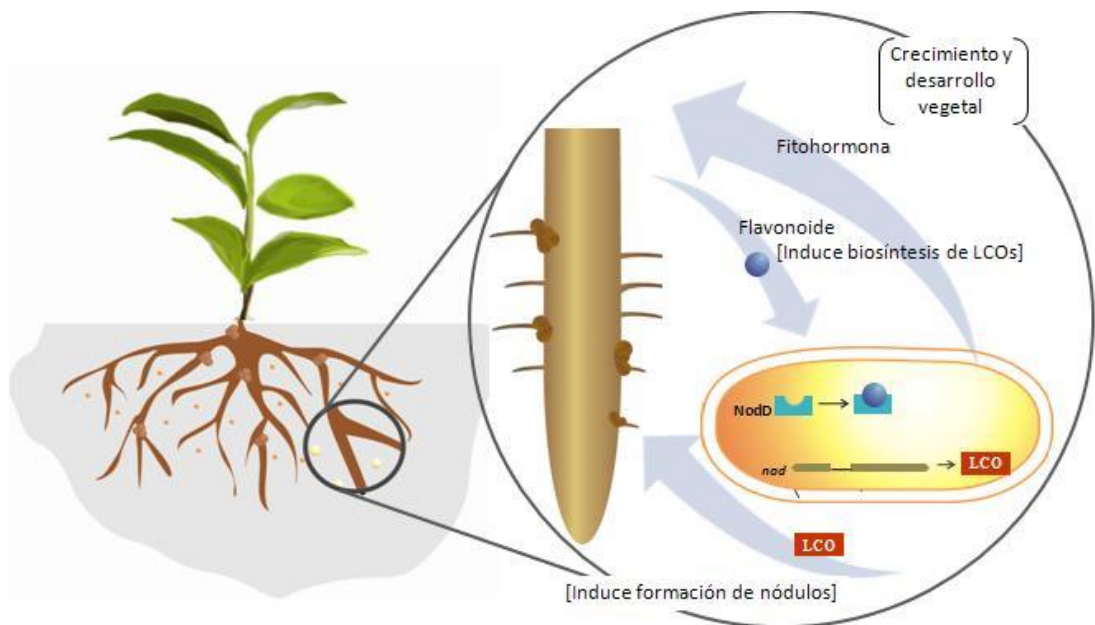
La expresión de los genes de nodulación es crucial para el establecimiento de la simbiosis, ya que está involucrada en la síntesis y secreción de lipoquitooligosacáridos (LCO), conocidos como Factores de Nodulación (Factor Nod, FN). Los FN son moléculas complejas formadas por un esqueleto de tres a cinco N-acetil glucosaminas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. Poseen además un ácido graso de longitud y saturación variable en su extremo no reductor y diversas *decoraciones* o sustituciones tanto en el extremo reductor como en el no reductor.

Si bien un rizobio puede formar más de un tipo de FN, la estructura molecular del FN determina en gran parte la compatibilidad entre un rizobio y una leguminosa dada (D'Haese & Holsters, 2002). Esta especificidad se encuentra en gran medida determinada por la longitud del esqueleto de residuos de N-acetilglucosamina y, principalmente, por el conjunto de sustituciones presentes en la estructura del FN (Dénarié y col., 1996; Oldroyd & Downie, 2008).

### 1.2.3. Rol de los FN

Los FN participan en el reconocimiento de los rizobios por la planta y como resultado se dan cambios en la expresión génica de esta, que llevan al desarrollo del nódulo radicular, que es la estructura visible en las raíces de las leguminosas y donde se da la FBN.

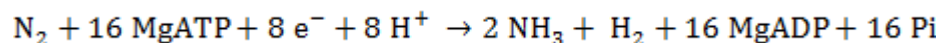
El mecanismo de infección rizobiana mejor conocido implica cambios directos en la morfología que preparan y facilitan la entrada de las bacterias a la planta, y como primer consecuencia luego de la adhesión y reconocimiento de los rizobios, se produce la deformación de los pelos radicales. De esta forma, las bacterias quedan atrapadas por las raíces, generándose un foco de infección, a partir del cual se extiende una vía de infección hacia el interior del tejido vegetal, que permite la invasión bacteriana del córtex. Las bacterias son posteriormente rodeadas por porciones de membrana citoplasmática vegetal formando los simbiosomas, dentro de los cuales los rizobios se diferencian en bacteroides capaces de fijar N (Gibson y col., 2008; Haag y col., 2012; Maunoury y col., 2008; Morel & Castro-sowinski, 2013; Oldroyd & Downie, 2008). El rol de los FN y flavonoides sobre la simbiosis rizobio-leguminosa se resumen en la Figura 3.



**Figura 4.** Efecto de los flavonoides y factores nod (LCO, FN) sobre la simbiosis rizobio-leguminosa. La planta libera hacia la rizosfera flavonoides de distinta naturaleza según la especie de que se trate. Ciertos flavonoides específicos se unen al producto del gen *nodD* bacteriano. Este complejo induce la transcripción del resto de los genes *nod* que deriva en la síntesis rizobiana del FN correspondiente. El FN es la señal bacteriana que induce el proceso de infección radicular. Adaptado de Morel y col., 2016.

### 1.3. Mecanismo de la FBN

Mediante la FBN el nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) es reducido a amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en un proceso que puede resumirse en la siguiente ecuación:



Este proceso es llevado a cabo por la acción del complejo enzimático nitrogenasa, el cual consiste en dos proteínas distintas: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. Ambas contienen hierro (Fe) y la primera contiene además molibdeno (Mo). En la dinitrogenasa, estos metales se

encuentran dentro de un cofactor (cofactor hierro-molibdeno, FeMoCo), donde se lleva a cabo la reducción de  $N_2$  (Franche y col., 2009).

De esta forma y gracias a la nitrogenasa, el  $N_2$ , que es poco reactivo, se vuelve biológicamente disponible y puede ser aprovechado por la planta mediante la asimilación en compuestos orgánicos como aminoácidos y nucleótidos.

### 1.3.1. Importancia de la simbiosis en la FBN

Tal como se desprende de la ecuación de reducción, el proceso de FBN requiere un alto costo energético. Las bacterias diazótroficas obtienen esa energía de la oxidación de compuestos orgánicos. Mientras que los diazótroficos fotosintéticos, como las cianobacterias, utilizan los azúcares producidos mediante fotosíntesis, los no fotosintéticos obtienen esa energía de otros organismos.

En el caso de la simbiosis leguminosa-rizobio, los rizobios obtienen estos compuestos de las plantas que los hospedan (Hubbell & Kidder, 2009). De esta forma, la planta leguminosa provee azúcares, derivados de la fotosíntesis, que son utilizados por los rizobios para obtener la energía necesaria para cubrir la FBN. A cambio de esta fuente de carbono, la bacteria provee de N fijado a la planta, que lo utiliza para su crecimiento. El acceso a más N le permite a la planta crecer y producir más hojas ricas en N, aumentando su capacidad fotosintética, lo que en definitiva produce un mayor rendimiento vegetal.

La actividad de la nitrogenasa es altamente sensible al  $O_2$ , e incluso concentraciones tan bajas como 57 nM de  $O_2$  pueden reducir la actividad de la enzima en un nódulo de soja (Kuzma y col., 1993). En consecuencia, se requieren bajas concentraciones de  $O_2$  dentro del nódulo (o en el entorno de la nitrogenasa en diazótroficos de vida libre), para el correcto funcionamiento de la enzima, pero sin comprometer la producción del ATP necesario para impulsar el proceso.

Existen diversos mecanismos adoptados por los distintos organismos diazótrofos para proteger a la enzima de la exposición al oxígeno. En el caso particular de la simbiosis rizobio-leguminosa, la concentración de O<sub>2</sub> se mantiene en los niveles adecuados, debido tanto a la barrera de difusión que representa el nódulo en si, como a la presencia de leghemoglobina (Lb).

La Lb es una hemo-proteína que se encuentra en altas concentraciones en los nódulos fijadores de nitrógeno, que les da el color rojizo interno característico, cuando estos están activamente fijando N y que tiene como función la unión y el transporte de O<sub>2</sub>. Para la producción de Lb el simbiote bacteriano sintetiza el grupo hemo y el simbiote hospedero vegetal la globina (Becana y col., 1995; O'Brian y col., 1987). El balance entre la difusión del O<sub>2</sub> y su transporte mediado por Lb provee a los simbiosomas el O<sub>2</sub> necesario para la respiración celular, sin afectar la actividad de la nitrogenasa.

### 1.3.2. Importancia de la FBN en la biósfera

La FBN es la principal fuente de N asimilable de origen no antropogénico (Fowler y col., 2013). Se estima que a nivel mundial aporta alrededor de 107 Tg N año<sup>-1</sup> de forma natural en los ecosistemas terrestres (Galloway y col., 2004), mientras que los sistemas agrícolas de cultivo fijan entre 33 y 43 Tg por año, y en su mayoría debido a la simbiosis leguminosa-rizobio (Do Vale Barreto Figueiredo y col., 2013). Los cultivos de soja fijan alrededor de 16,4 Tg N año<sup>-1</sup> como resultado de su asociación con rizobios, representando el 77% del N fijado por los cultivos de leguminosas (Herridge, 2008). En promedio, el N obtenido por la soja mediante FBN es suficiente para cubrir el 50-60% del requerimiento de este cultivo (Salvagiotti y col., 2008).

Por otra parte, la fijación antropogénica de N por el proceso de Haber-Bosch genera aproximadamente 120 Tg anuales de N reducido ( $\text{NH}_3$ ). El proceso de Haber-Bosch permite la síntesis industrial de amoníaco a gran escala, a partir de hidrógeno y N sometidos a altas presiones. El 80% del amoníaco producido es utilizado como fertilizante en la agricultura (Fowler y col., 2013). Como fuente de N, este proceso posibilitó un enorme aumento en la producción de los cultivos mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados cumpliendo un rol crucial en la llamada *revolución verde* (Erisman y col., 2008; FAO, 1996). Esta producción de fertilizantes nitrogenados requiere un importante consumo de combustibles fósiles, lo que implica precios altos y muy variables, además de ser una práctica poco sustentable (Morel y col., 2012; Vieira y col., 2010).

Como consecuencia del permanente aumento de la población mundial, es necesario un suministro constante de N para los cultivos que permita una producción capaz de satisfacer las necesidades de una población en crecimiento (Olivares y col., 2013; Vieira y col., 2010). En tal sentido, los aportes de la fijación simbiótica de N no se limitan únicamente al cultivo de leguminosa asociado con los microorganismos fijadores, sino que también representa un beneficio para los cultivos subsecuentes aumentando la fertilidad de los suelos y reduciendo la necesidad de utilizar fertilizantes nitrogenados (Morel y col., 2012). En el caso de la soja, por ejemplo, esto se debe a que el cultivo produce grandes cantidades de biomasa en sus hojas, siendo sus nutrientes reciclados en el suelo luego de la cosecha (Vieira y col., 2010). Dadas las grandes extensiones de territorio destinado al cultivo de soja, la FBN resulta de particular relevancia debido a que permite una reducción en la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados, promoviendo de esta forma la utilización sustentable del suelo y disminuyendo tanto el impacto medioambiental como el costo de producción. Dentro de este contexto crece la importancia y el impacto económico y ecológico del uso de



microorganismos fijadores de N eficientes, incluidos en diversas formulaciones (biofertilizantes) utilizadas para inocular suelos y/o semillas (Morel y col., 2012).

#### 1.4. Inoculantes microbianos

La soja es capaz de asociarse simbióticamente con distintas especies de rizobios. Estos microorganismos pueden ser incluidos en formulaciones comerciales para ser utilizadas por los productores como inóculo a la hora de la siembra. Se encuentran en el mercado formulaciones tanto en soportes sólidos como líquidos, cuyas principales diferencias se centran en la protección de los rizobios, la eficacia de nodulación y la facilidad de uso (Herridge, 2008). De acuerdo a Bashan y col. (2013), las características fundamentales para todos los inoculantes deben ser: (1) que el medio permita el crecimiento de los microorganismos de interés, (2) que estos se mantengan en un cierto número de células viables y en buen estado fisiológico por un período de tiempo dado, y (3) que permitan alcanzar, al momento de su inoculación, una concentración de células suficiente para observar una respuesta por parte de la planta.

La utilización de inoculantes para semillas a nivel de campo es una práctica habitual de manejo para mejorar la productividad de las leguminosas sembradas (Morel y col., 2012). En el caso de la soja en Uruguay, ésta se inocula tradicionalmente con *Bradyrhizobium elkanii*, con buenos resultados para el rendimiento, y solamente se encuentran autorizadas para su comercialización las formulaciones a base de dos cepas de *B. elkanii*, la U1301 y la U1302 (MGAP-DGSA, 2017). Esto se presenta como una limitante para el aprovechamiento de este proceso biológico en el área productiva y resalta la importancia de mejorar las tecnologías de inoculantes existentes.

#### 1.4.1. Inoculantes mejorados

La calidad de una formulación de inoculante depende mayormente de la presencia de los microorganismos en un estado metabólico activo y que los mismos se encuentren contenidos en un medio adecuado, con aditivos que aseguren su sobrevivencia durante el almacenamiento y transporte del producto (Morel y col., 2012). Por lo tanto, uno de los enfoques más frecuentes utilizados para mejorar una formulación se basa en modificar el medio de cultivo con el fin de aumentar la sobrevivencia y multiplicación celular. Esto puede lograrse mediante la adición de nutrientes u otros compuestos sintéticos (López y col., 1998; Morel y col., 2012). Nápoles y col. (2011), por ejemplo, mediante la utilización de diversas fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes, obtuvieron formulaciones que alcanzaron un mayor número de células que la formulación convencional en el mismo período de tiempo.

Entre las nuevas modalidades en auge en la producción de inoculantes para leguminosas se encuentra, por un lado, el agregado de metabolitos secundarios y/o productos bacterianos a la formulación que contiene a los rizobios como forma de obtener una mayor nodulación, una reducción del tiempo requerido para la formación de nódulos y un aumento en el rendimiento (Nápoles y col., 2011; Zhang & Smith, 1995); y por otro, la utilización de consorcios microbianos, que combinan a los rizobios con hongos micorrícicos y/u otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal, que actúan de forma sinérgica, afectando positivamente el desarrollo y crecimiento de las plantas, aumentando la absorción de nutrientes por las plantas, y favoreciendo la FBN (Morel y col., 2012).

En este trabajo se explora la primera mejora mencionada: el agregado de metabolitos secundarios vegetales implicados en las primeras etapas de la interacción que ocurre entre los bradirizobios y las raíces de soja, al medio de crecimiento de los bradirizobios. La hipótesis del trabajo fue que el agregado de flavonoides al medio de crecimiento de los bradirizobios

podría preparar a estos microorganismos para una nodulación más eficiente que conlleve a una mejora sustancial en el desarrollo y el rendimiento del cultivo.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. Objetivo general

Contribuir a la validación tecnológica de una nueva formulación comercial donde los bradizobios se pre-incuban con flavonoides.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Cuantificar el efecto de incubar a los bradirizobios con flavonoides sobre el crecimiento y nodulación de soja en condiciones de invernáculo.
- 2) Evaluar la adhesión y sobrevivencia de las bacterias en las semillas a lo largo del tiempo.
- 3) Caracterizar fisiológicamente la respuesta de la planta a través del análisis cromatográfico de muestras de raíces y nódulos.

### 2.3. Objetivos educacionales

1. Desarrollar una práctica durante la cual se adquiera formación teórica y aplicada en el campo de la investigación científica.
2. Ganar experiencia en técnicas microbiológicas básicas, ensayos agronómicos de inoculación y técnicas analíticas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Productos bacterianos y material vegetal

El presente fue un estudio comparativo entre dos formulaciones bacterianas desarrolladas para soja por la empresa LAGE y Cia S.A. (<http://www.lageycia.com>). Ambas formulaciones industriales contienen a las cepas de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302 sobre un soporte líquido estéril.

Por un lado, se utilizó el inoculante comercial LIKUIQ: una formulación pura de U1301 y U1302, con una concentración promedio de  $5 \times 10^9$  bacterias viables por mililitro de inoculante (<http://www.lageycia.com/producto.php/14>).

Por otro lado, se evaluó una nueva formulación de inoculante, denominada INDUCER, obtenida mediante la incubación de los mismos bradirizobios U1301 y U1302, en el medio de fermentación YEM (Anexo I) modificado, suplementado con una solución de flavonoides (composición final confidencial). INDUCER presenta una concentración promedio de  $5 \times 10^9$  bacterias viables por mililitro de inoculante.

El proceso industrial de fermentación, el medio utilizado y las condiciones empleadas en la empresa para producir ambas formulaciones, fueron similares y constituyen información confidencial de la empresa. Las Fichas técnicas comerciales de los productos se muestran en el Anexo II.

Para los ensayos de crecimiento de plantas se utilizaron semillas de soja (*Glycine max*), de la variedad GE 590 Ci (<http://www.gye.com.uy/Web/productos-2/semillas-2/>).

Tanto las formulaciones, los aditivos comerciales, las semillas y la solución de flavonoides utilizadas durante el trabajo práctico, fueron facilitados por la empresa LAGE y Cia S.A.

### 3.2. Inoculación de las semillas

Las semillas de soja, sin desinfectar, se inocularon con LIKUIQ o INDUCER en condiciones similares a las utilizadas para la inoculación de semillas a campo.

Para ello, cada formulación o inoculante se mezcló, previo a la inoculación, con el protector de semillas Add-it ®, en proporción 3:1. Add-it ® es una formulación líquida estéril que, al ser utilizada en conjunto con el inoculante, otorga protección a las bacterias reduciendo la desecación celular, al mismo tiempo que les aporta nutrientes, favoreciendo la sobrevivencia de las mismas una vez inoculada la semilla (Ficha técnica en Anexo III, <http://www.lageycia.com/producto.php/50>). Para la inoculación de 250 g de semillas (aproximadamente 1600 semillas) se utilizó 1 ml de esta mezcla de inoculante+Add-it, siguiendo las instrucciones dadas para LIKUIQ en el envase (Anexo IV). Las semillas y el inoculante+Add it se mezclaron de forma manual simulando las condiciones de inoculación realizadas en condiciones agronómicas.

Se realizaron, además, dos controles o testigos de inoculación de semillas, tal como se especifica en la Tabla 1. Los tratamientos testigo CONTROL y FLAVO consistieron en semillas (250g) que recibieron buffer fosfato 50mM, pH7 (1ml) y solución de flavonoides (1ml), respectivamente (Tabla 1). En el caso del tratamiento testigo FLAVO, las semillas recibieron una concentración de flavonoides igual a la concentración estimada que reciben las semillas inoculadas con INDUCER (solución de flavonoides preparada y proporcionada por la empresa, concentración confidencial). Los cuatro tratamientos de inoculación se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tratamientos de inoculación implementados durante el trabajo.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>INOCULACIÓN</b>
<b>Control</b>	Ninguna. Sin fertilización con N
<b>LIKUIQ</b>	<i>B. elkanii</i> U1301 y U1302
<b>INDUCER</b>	<i>B. elkanii</i> U1301 y U1302 (incubados en presencia de flavonoides)
<b>FLAVO</b>	Ninguna. Agregado de solución de flavonoides en una concentración por semilla igual a la estimada para el tratamiento INDUCER

### 3.3. Evaluación de la concentración bacteriana en semillas

Con el fin de evaluar la adhesión y la sobrevivencia de las bacterias en las semillas luego de su inoculación, se realizaron recuentos periódicos de los bradirizobios liberados desde las semillas. La sobrevivencia bacteriana se evaluó a lo largo de 28 días post-inoculación mediante el *recuento de colonias en placa*, en base al crecimiento bacteriano sobre medio YEM. Para ello, luego de la inoculación de las semillas, se tomaron 20 muestras de 10 semillas cada una, de cada tratamiento. Cada muestra se colocó en tubos Falcon de 50 ml que se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización en el recuento.

Para el recuento de bacterias viables, se tomó un falcon de cada tratamiento de forma diaria durante la primera semana post-inoculación, cada dos días durante la segunda semana y a continuación cada 6-7 días, hasta completar 28 días post-inoculación. A cada falcon se le agregó 10 ml de buffer fosfato 50 mM (relación semillas:buffer de 1:1, Anexo X) y se le incubó durante 10-15 minutos en agitación y temperatura ambiente. Al cabo de la incubación, se realizaron diluciones seriadas de 1/10 de la solución obtenida, rica en bradirizobios liberados desde las semillas. Estas diluciones seriadas se utilizaron para el recuento en placa mediante

el *método de gotas extendidas en superficie*. Mediante este método, muestras pequeñas, o “gotas”, de cada dilución se sembraron sobre la superficie de medio YEM sólido en condiciones de esterilidad, y se “extendieron” por movimientos bidireccionales suaves de la placa, de forma tal que cada gota forme una línea de siembra sobre la placa. Cada placa conteniendo medio YEM sólido fue sembrada con 3 gotas de solución bacteriana, en las diluciones correspondientes. De esta manera, cada placa constituyó un triplicado de cada dilución.

Luego de inoculadas, las placas se incubaron a 30°C y oscuridad durante 7 días aproximadamente, tiempo necesario para que las colonias de bradirizobios sean visibles a simple vista a lo largo de las líneas de crecimiento. Se tomaron en cuenta para el recuento solo aquellas diluciones que originaron colonias separadas que se pudieran contar, con un número de colonias por cada gota extendida mayor a 30 y menor a 300, y considerando un rango de 100 a 200 colonias como ideal (Breed & Dotterer, 1916; Sieuwerts y col., 2008)

Las colonias desarrolladas sobre el medio sólido se contabilizaron primero por cada gota extendida, y luego se promediaron los tres recuentos de cada placa. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por semilla, calculadas con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{semilla} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias promedio} \times FD}{vol \text{ sembrado (en ml)}}$$

Donde:

*N° de colonias promedio* = promedio de colonias desarrolladas por gota extendida

FD: factor de dilución empleado (inversa de la dilución)

Vol. sembrado: volumen sembrado en placa, por gota (0,01 ml)

Los datos se presentaron en curvas de sobrevivencia en base al logaritmo del número de UFC/semilla en función de los días post-inoculación.



### 3.4. Diseño experimental del ensayo en invernáculo

La evaluación comparativa del nuevo inoculante INDUCER se realizó mediante un ensayo de crecimiento de plantas en el Invernáculo.

El sustrato de crecimiento para las plantas fue una mezcla de arena de río, tierra negra sin abonar y vermiculita de grano fino, en proporción 2:2:1. La mezcla de estos sustratos se realizó mediante mezcladora eléctrica. Previo a la mezcla, se corroboró el bajo contenido de nitrógeno en la tierra (10 ppm) determinado por el Laboratorio de análisis de suelo EcoLab (Anexo V).

Los soportes utilizados fueron macetas de nylon de 4 y 8 kg que se llenaron hasta 3/4 partes de su volumen con el sustrato de crecimiento que se hidrató previo a la siembra de las semillas.

#### 3.4.1. Siembra y crecimiento

La siembra se realizó en el invernáculo y se sembraron 3 semillas previamente inoculadas (Tabla 1) por cada maceta. Luego de la siembra, las semillas se cubrieron con un manto de sustrato de crecimiento.

Al cabo de aproximadamente 15 días luego de la siembra, se eliminaron dos plantas por maceta. De esta forma, se mantuvo solo una planta por maceta hasta el final del ensayo. La selección de plantas para raleo se realizó en función del estado fisiológico aparente y el mejor establecimiento de la planta al momento del raleo. El experimento completo constó de 50 repeticiones para cada tratamiento (50 macetas o 50 plantas por tratamiento).

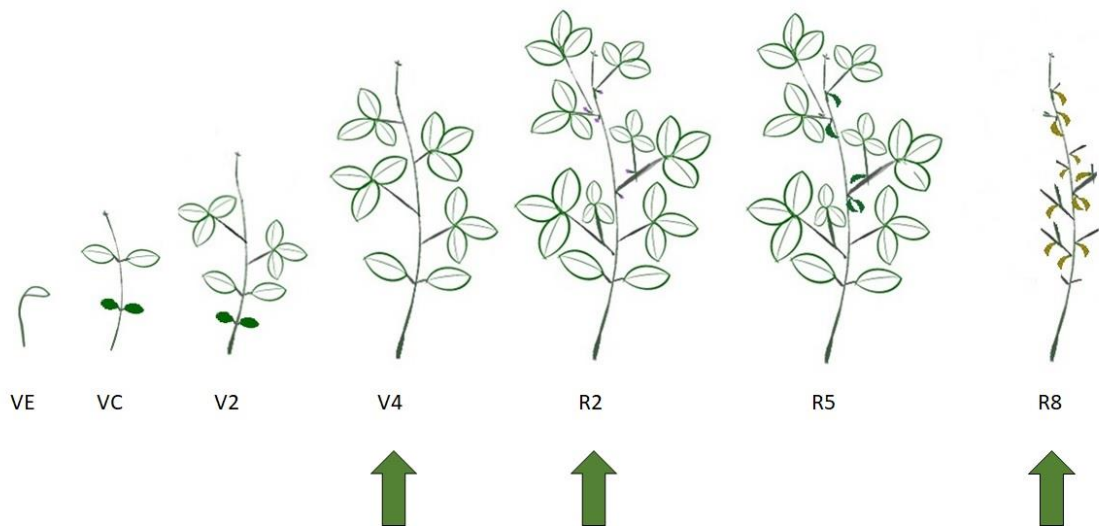
Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernáculo durante todo el ciclo del cultivo, con un rango de temperaturas que varió entre 15-30°C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, controlado utilizando tubos "Gro-lux" (Gro-lux™, Sylvania). Durante el crecimiento, las plantas se regaron de forma alternada y hasta capacidad de campo con agua de

grifo, solución de hiperfosfato (1 g/l, Anexo I) y medio nutritivo Jensen diluído al décimo (Anexo I).

#### 3.4.2. Muestreo

Se realizaron muestreos de material vegetal en tres períodos de desarrollo vegetal diferentes:

1. en estadio V4, cuando las plantas presentaron cuatro nudos con hojas trifoliadas completamente desarrolladas y expandidas (Fehr y col., 1971; Fig. 5).
2. en estadio R2, cuando las plantas alcanzaron la floración completa. En esta etapa se observa al menos una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal, y ocurre acumulación constante de materia seca y de nutrientes. Es la etapa previa al inicio de la formación de vainas (Fehr y col., 1971; Fig. 5).
3. en estadio R8, cuando las plantas alcanzaron la madurez fisiológica. Esta etapa se caracteriza por el secado de las partes aéreas (PAs) de las plantas y el dismantelamiento de las raíces. Las vainas en esta etapa han perdido la coloración verde y las semillas pierden considerablemente su humedad (Fehr y col., 1971; Fig. 5).



**Figura 5.** Etapas del desarrollo del cultivo de soja: emergencia de la plántula (VE), cotiledones y unifoliadas (VC), segundo nudo (V2), cuarto nudo (V4), floración completa (R2), inicio de la formación de semillas (R5), madurez fisiológica (R8). Las flechas indican los estadios en los que fueron colectadas las muestras durante el ensayo de invernáculo.

Mientras que para los dos primeros muestreos las plantas crecieron en macetas con 4 kilos de sustrato de crecimiento, para el último estadio del ciclo las plantas requirieron macetas con 8 kilos de sustrato. Estas últimas son necesariamente más grandes para permitir que la planta se desarrolle completamente y produzca eficientemente granos (R8).

En los dos primeros estadios de desarrollo (V4 y R2) se cosecharon 20 plantas por tratamiento, mientras que en el último solo se cosecharon 10 plantas. Consecuentemente, se utilizaron un total de 200 macetas: 160 macetas de 4kg para las plantas cosechadas en V4 y R2, y 40 macetas de 8kg para R8.

### 3.4.3. Evaluación del efecto de INDUCER sobre la nodulación y el crecimiento vegetal

Las plantas cosechadas en V4 y R2 se fraccionaron en tres partes vegetales: las raíces sin nódulos (R), las partes aéreas (PAs) y los nódulos. Sobre estas fracciones se realizaron medidas de peso fresco de parte aérea (PFPA) y de R (PFR), largo de parte aérea (LPA) y número de nódulos, diferenciando aquellos nódulos ubicados en la raíz principal de aquellos ubicados en las raíces secundarias.

A continuación, las fracciones correspondientes a 10 plantas de cada tratamiento se guardaron en sobres de papel y se secaron en estufa a 60°C, hasta alcanzar un peso constante. Luego del secado de estas muestras se realizaron sobre ellas medidas de peso seco de PA (PSPA), peso seco de R (PSR) y peso seco de nódulos (PSN).

Las restantes muestras de las fracciones no secadas (10 plantas de cada tratamiento) se liofilizaron en tubos Falcon de 50 mL por 5 días empleando un equipo BW-18B Freeze Dryer, y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis cromatográfico.

### 3.4.4. Evaluación del efecto de INDUCER sobre el rendimiento en granos

En el estadio de madurez fisiológica (R8) se cosecharon únicamente las PAs de las 10 plantas muestreadas por cada tratamiento. Con ellas se obtuvieron las medidas de biomasa aérea total mediante pesado. Luego, se separaron en primera instancia las vainas, que se contabilizaron y pesaron, y luego se separaron los granos de cada vaina, para determinar su número y peso.

Finalmente, se calculó el índice de cosecha como la relación entre el peso de los granos y la biomasa aérea total producida.

### 3.4.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis univariado (ANOVA) utilizando un  $p < 0,05$ . En caso de obtener diferencias significativas entre tratamientos, estos se compararon empleando el test *a posteriori* de comparación de medias de Tukey (para datos paramétricos). En aquellos casos en que el conjunto de datos no mostró distribución normal u homogeneidad de varianza, se aplicaron pruebas no paramétricas a los datos (Kruskal Wallis). Para todos estos análisis se utilizó el software libre InfoStat en su versión estudiantil (Di Rienzo y col., 2008).

## 3.5. Análisis cromatográfico de muestras obtenidas en V4 y R2

Con el fin de llevar a cabo una primera aproximación al perfilado metabolómico de los diferentes extractos vegetales se analizaron muestras de nódulos y raíces mediante cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS).

### 3.5.1. Procesamiento de muestras

Las fracciones liofilizadas de R y nódulos obtenidas de plantas en V4 y R2 (ver Punto 3.4.3.) se procesaron utilizando N líquido. El total de cada muestra liofilizada se molió con mortero o molinillo eléctrico, hasta obtener mezclas homogéneas y desintegradas.

Con el fin de lograr suficiente cantidad de material homogeneizado para realizar el proceso extractivo y analítico, las 10 muestras de cada fracción se dividieron en 3 sub-muestras compuestas, por tratamiento, cada una conteniendo 3 o 4 fracciones de R o nódulos. La única excepción fue el tratamiento Control de V4, en el que debido al poco material producido,

las 10 muestras se dividieron en 2 sub-muestras compuestas de 5 fracciones cada una

### 3.5.2. Extracción de compuestos orgánicos

Sobre las muestras compuestas de raíces de plantas obtenidas en V4 se realizaron extracciones orgánicas de flavonoides y otros compuestos de bajo peso molecular (CBPM) con metanol y acetona/etanol como solventes de extracción, respectivamente. Por otro lado, desde los nódulos de plantas obtenidas en R2 se realizó la extracción de aminoácidos utilizando metanol/cloroformo/agua, como se describe a continuación.

Para la extracción de CBPM, las muestras procesadas de raíces se mezclaron con acetona/etanol (1:1) en relación 1:30. Para ello, se depositaron en tubos de vidrio Corex 0,03g de cada sub-muestra compuesta y se adicionaron 0,9ml de la mezcla de solventes antes mencionada. Los tubos se taparon con parafilm y se incubaron a -20°C por 24 hs. Luego de una centrifugación a 10000 rpm y 4°C por 15 min se colectó el sobrenadante y se concentró por evaporación a baja presión en un concentrador speed vac®, por aproximadamente 4 horas a 45°C (Sérandour y col., 2008).

Para la extracción de flavonoides y otros compuestos solubles en el solvente de extracción, las muestras procesadas de raíces se mezclaron con metanol (90%) en relación 0,02:1 y se incubaron a 60 °C por 15 min. Para ello, se pesaron 0,03g de cada sub-muestra compuesta en tubos Eppendorf (1,5 ml), donde posteriormente se agregaron 1,35ml y 0,15ml de metanol y agua desionizada, respectivamente. Luego de una centrifugación a 3000 g por 15 min a temperatura ambiente se colectó el sobrenadante y se concentró por evaporación a baja presión en un concentrador speed vac® por aproximadamente 4 horas a 45°C (modificado de Juge y col., 2012).

Para la extracción de aminoácidos y otros compuestos solubles en el solvente de extracción, las muestras procesadas de nódulos se mezclaron con metanol: cloroformo:agua (12:5:3, v/v/v), en una relación 1:25. Se partió de 60 mg de nódulos liofilizados y triturados que se suspendieron en un volumen total de 1500  $\mu$ L de la mezcla de solventes de extracción. La mezcla se incubó a 65 °C por 30 min para detener la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos. Luego de una centrifugación a 1500 g por 10 min y 4 °C, se colectó el sobrenadante al cual se le adicionó 0,25 mL de agua miliQ. Para conseguir una separación de fases, se centrifugó por 3 min a 21000 g y se colectó la fase acuosa, que se concentró por evaporación a baja presión en un concentrador speed vac® (Juge y col., 2012).

### 3.5.3. Derivatización de extractos

Los residuos secos de las tres extracciones se suspendieron en dimetilformamida (DMFA, 0.6 ml) y se derivatizaron por sililación, para convertirlos en compuestos volátiles que puedan ser detectados por cromatografía gaseosa.

Mediante este proceso los átomos de hidrógeno activo (-OH, =NH, -SH) de los componentes de la muestra, son sustituidos por grupos trimetilsililo (ej., trimetilsilil, TMS) formando “derivados sililados” de los componentes. La sililación de compuestos polares tiene como consecuencia la reducción de la polaridad y el aumento de la volatilidad y la estabilidad térmica. Esto permite el análisis mediante GC-MS de muchos compuestos que no son volátiles o son muy inestables para ser analizados por esta técnica (Van Look y col., 1995).

El agente derivatizante utilizado en la sililación fue el N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA, Sigma M7891), que aporta grupos TMS para el reemplazo de hidrógenos. Se utilizaron viales específicos para el equipo de GC. Cada vial contenía un inserto de vidrio que se utiliza comúnmente para volúmenes de muestra demasiado pequeños.

Durante la derivatización, se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  del extracto suspendido en DMFA con igual volumen de MSTFA. La mezcla se realizó directamente en los insertos de los viales. A continuación, se incubó a 60°C por 20 min y por último se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta su inyección automática en el equipo

#### 3.5.4. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de los correspondientes derivados TMS se llevó a cabo en un equipo GCMS-QP 2010 ULTRA (Shimadzu), equipado con un auto-inyector (AOC-20i, Shimadzu), una columna HP-5MS (0.25 $\mu\text{m}$ ×30m, Agilent 19091S-433) y flujo de gas Helio de 1,7ml min<sup>-1</sup>. El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: 80°C por 2 min, luego un aumento hasta 290°C (80°C min<sup>-1</sup>) mantenido por 3 min y por último un nuevo aumento hasta 310°C (20°C min<sup>-1</sup>) mantenido por 10 min. El inyector, la interfaz y la fuente de iones fueron mantenidos a 300°C durante todo el tiempo de análisis. Se inyectó 1 $\mu\text{l}$  de cada muestra en modo de inyección "splitless" (Morel y col., 2015).

#### 3.5.5. Identificación preliminar de compuestos

A partir de los cromatogramas, los espectros de masas experimentales, y los tiempos de retención observados, se identificaron preliminarmente los compuestos presentes en las muestras.

Por un lado, se compararon los espectros de masas obtenidos de los componentes de cada muestra, frente a los espectros de masa presentes en librerías de referencia (NIST y Wiley libraries).

A su vez, para aumentar el grado de confiabilidad en la comparación de los datos y permitir la identificación preliminar de los analitos, se calcularon los índices de retención de Kovats para cada compuesto identificado. La identificación de compuestos desconocidos mediante los índices de Kovats (KI) se basa en el uso de alcanos como sustancias de



referencia. Los KI para cada compuesto se hallan mediante la medición de los tiempos de retención relativos de cada analito desconocido con respecto a los de una serie de n-alcenos, corridos bajo las mismas condiciones cromatográficas experimentales utilizadas para la muestra.

Para ello se inyectaron en el GC-MS tres mezclas de n-Alcanos que cubrieron un rango de C8 a C36. Posteriormente, se normalizaron los tiempos de retención de cada compuesto (analito desconocido que tiene x carbonos) con respecto a los tiempos de retención de los n-Alcanos adyacentes (con x-1 y x+1 carbonos), mediante el cálculo de los KI experimentales, con base en la siguiente fórmula:

$$KI = 100n + 100 \frac{tRx - tRn}{tRN - tRn}$$

donde: n es el Número de carbono del alcano que eluye inmediatamente antes del analito de interés; tRx es el tiempo de retención de la sustancia desconocida X, y tRn y tRN es el tiempo de retención de los alcanos que eluyen inmediatamente antes y después del analito de interés, respectivamente (van Den Dool & Kratz, 1963).

Estos KI experimentales calculados se compararon con los índices teóricos obtenidos de las bases de datos de compuestos orgánicos de la NIST (National Institute of Standards and Technology; <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>).

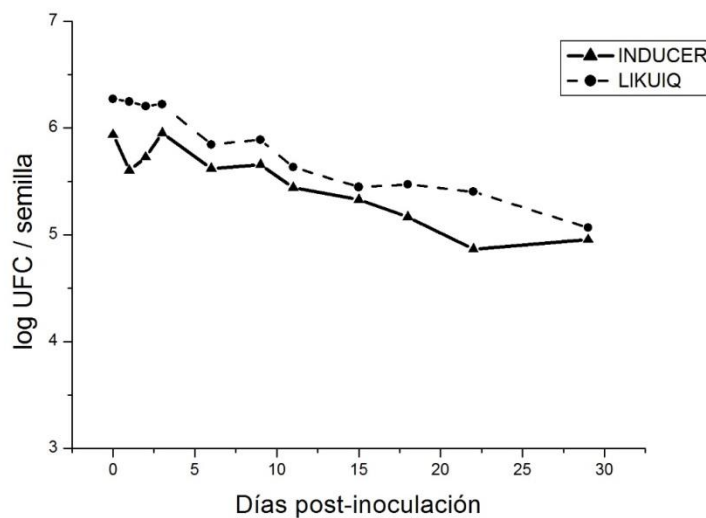
Para el caso de la identificación de aminoácidos y flavonoides se emplearon además patrones externos para la comparación de espectros de masas. Para ello se utilizó una mezcla de aminoácidos calidad estándar analítico (Sigma-Aldrich; AAS18-10X1ML) y genisteína, luteolina y daidzeína calidad estándar (98% de pureza, Sigma-Aldrich), como patrones externos, respectivamente.

Finalmente, con los compuestos identificados de forma preliminar se elaboraron perfiles metabólicos que se compararon en función del tratamiento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación de la concentración de bacterias por semilla

Mediante el recuento en placa, se lograron recuperar bacterias viables desde las semillas en todo el período evaluado y en los dos tratamientos inoculados con bradirizobios (INDUCER y LIKUIQ) (Fig. 4). Las placas donde fueron sembradas las muestras correspondientes a los tratamientos testigos (CONTROL Y FLAVO) no presentaron crecimiento.

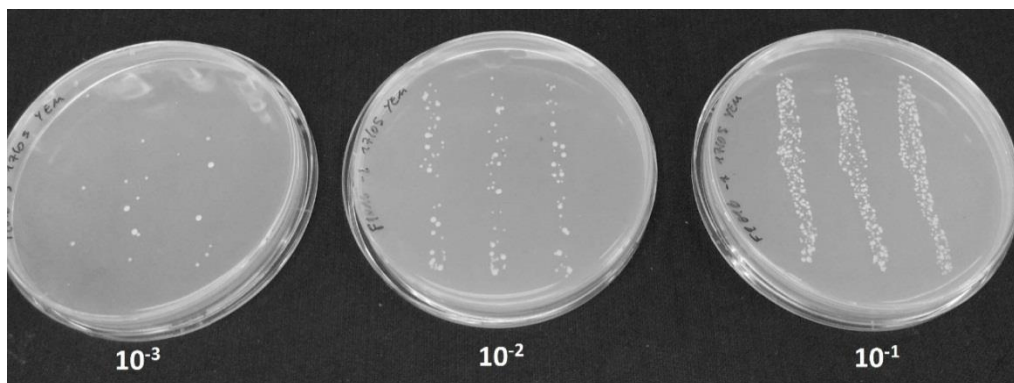


**Figura 6.** Sobrevivencia bacteriana en semillas inoculadas con INDUCER o LIKUIQ y mantenidas a temperatura ambiente luego de la inoculación.. Los resultados se expresan como el logaritmo de las UFC por semilla en función del tiempo transcurrido luego de la inoculación (días post-inoculación).

Al momento de la inoculación, se determinó un orden de  $10^6$  UFC/semilla en ambos tratamientos. Esta concentración bacteriana disminuyó a lo largo del período evaluado, aunque la mayor disminución de bacterias se observó en los primeros 10 días, en los cuáles los valores medios de UFC/semilla disminuyeron un orden. Al final del período de evaluación se registraron valores en el orden de  $10^5$  UFC/ml para las dos formulaciones evaluadas y con una tendencia a mantenerse en el tiempo. El

comportamiento observado en la sobrevivencia bacteriana fue similar en semillas inoculadas con LIKUIQ como con INDUCER (Fig. 4).

En la Figura 5 se muestran placas con medio YEM que presentan crecimiento de bradirizobios provenientes de la formulación INDUCER en tres diluciones seriadas. Luego de 7 días de incubación se observan las tres líneas de crecimiento esperadas por placa (ver Materiales y Métodos).



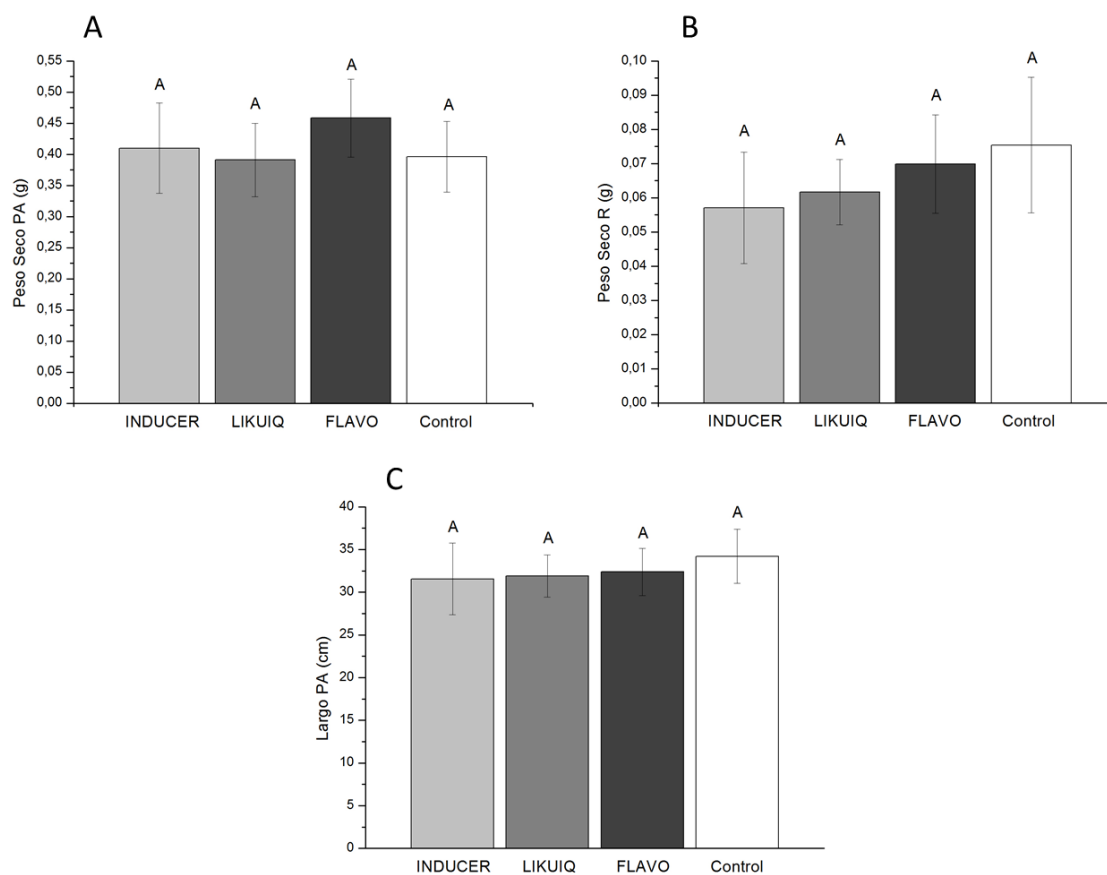
**Figura 7.** Placas con medio sólido YEM y crecimiento de bradirizobios. Las colonias corresponden a bradirizobios de la formulación INDUCER diluída al décimo ( $10^{-1}$ ), 100 veces ( $10^{-2}$ ) y 1000 veces ( $10^{-3}$ ) antes de sembrar.

#### 4.2. Efecto de INDUCER sobre el crecimiento vegetal

##### 4.2.1. Estadio V4

Las plantas alcanzaron el estadio V4 a los 42 días de la siembra de las semillas en el invernáculo. Unas pocas plantas no alcanzaron este estadio por completo, con las hojas trifoliadas del cuarto nudo todavía sin separarse.

Las medidas de crecimiento vegetal obtenidas para las plantas cosechadas fueron muy similares, sin observarse diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 6).



**Figura 8.** Efecto de la inoculación sobre el crecimiento vegetal de plantas en estadio V4. **A.** Peso seco de Parte aérea (PA), **B.** Peso seco radicular (R), y **C** Largo de Parte aérea. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ).

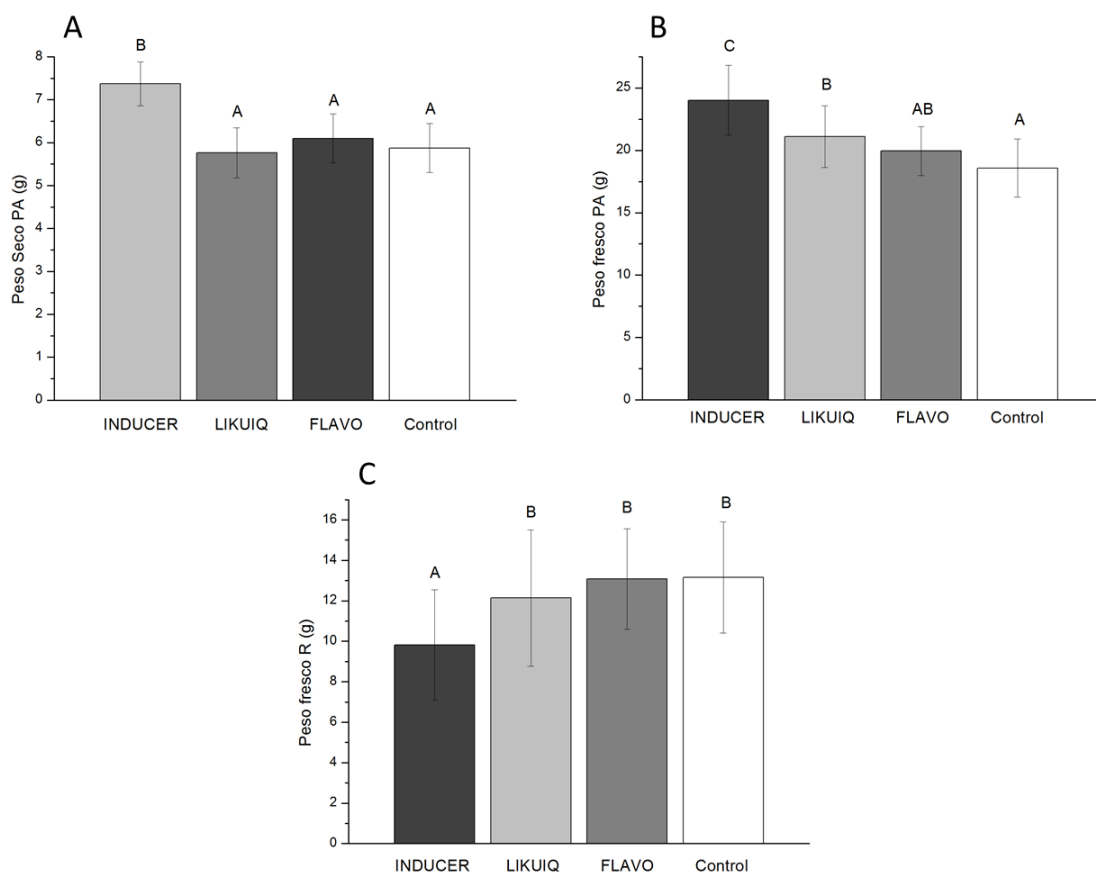
#### 4.2.2. Estadio R2

El segundo muestreo se realizó a los 108 días luego de la siembra, cuando la mayoría de las plantas presentaron flores abiertas en los nudos superiores del tallo principal.

La variación entre plantas para los parámetros de crecimiento vegetal evaluados fue muy grande. Al respecto, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el PFA y el PSA entre las plantas inoculadas con INDUCER y los restantes tratamientos (Fig. 7). El PSA de

las plantas inoculadas con la formulación INDUCER fue, en promedio, un 28% mayor que el de aquellas inoculadas con LIKUIQ (Fig. 7A). En biomasa aérea seca, las plantas inoculadas con LIKUIQ no presentaron un mayor rendimiento respecto a los testigos, aunque si se diferenciaron en el peso fresco aéreo (Fig. 7B).

No se observaron diferencias entre tratamientos en los pesos secos de raíces y largos de partes aéreas. Para los datos de peso fresco de parte radicular, el tratamiento de plantas inoculadas con la nueva formulación presentó un rendimiento en biomasa radicular menor que las restantes plantas (Fig. 7C).



**Figura 9.** Efecto de la inoculación sobre el crecimiento vegetal de plantas en estadio R2. **A.** Peso seco de Parte aérea (PA), **B.** Peso fresco PA, y **C.** Peso fresco radicular (R). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ).

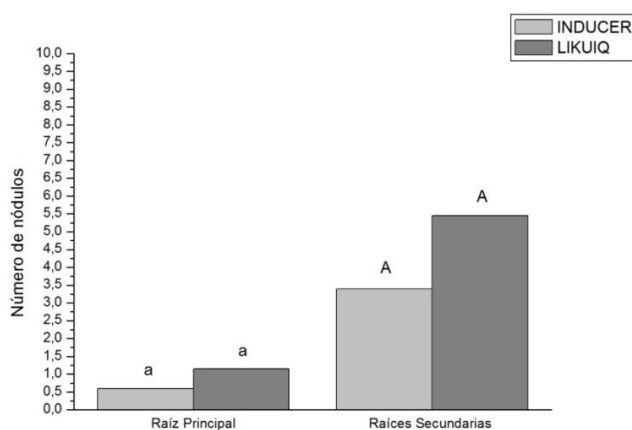
### 4.3. Efecto de INDUCER sobre la nodulación

#### 4.3.1. Estadio V4

Luego de 42 días de crecimiento en invernáculo se observó nodulación en todas las plantas inoculadas con INDUCER y LIKUIQ.

Se registró un mayor número promedio de nódulos en raíces de plantas inoculadas con LIKUIQ en relación a las inoculadas con INDUCER, tanto en la raíz primaria como en las secundarias. La variación entre las plantas fue muy grande y las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas (Fig. 8). Los tratamientos de plantas sin inocular no presentaron nódulos.

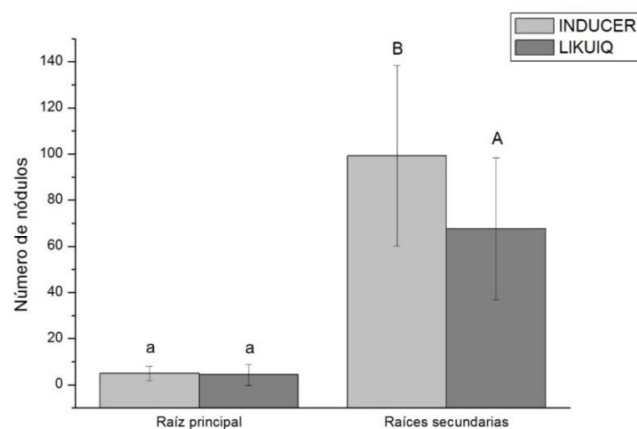
No se pudieron obtener medidas de peso seco de nódulos debido al bajo número y tamaño de nódulos obtenidos por planta.



**Figura 10.** Número de nódulos por planta en estadio de desarrollo V4. Se muestran los nódulos en raíz principal y raíces secundarias de las plantas inoculadas con INDUCER y LIKUIQ. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Estadio R2

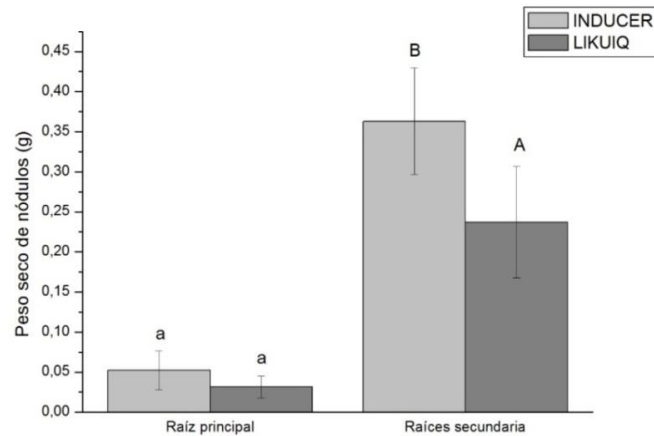
En el segundo muestreo, realizado al completarse la floración, se observó un mayor número de nódulos en las raíces de las plantas inoculadas con la nueva formulación respecto a las inoculadas con LIKUIQ. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente para el número de nódulos en las raíces secundarias (Fig. 9).



**Figura 11.** Número de nódulos por planta en estadio de desarrollo R2. Se muestran los nódulos en raíz principal y raíces secundarias de las plantas inoculadas con INDUCER y LIKUIQ. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

A su vez, los nódulos de las raíces secundarias de las plantas inoculadas con INDUCER presentaron un mayor peso seco con respecto a las inoculadas con LIKUIQ, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Fig. 10).



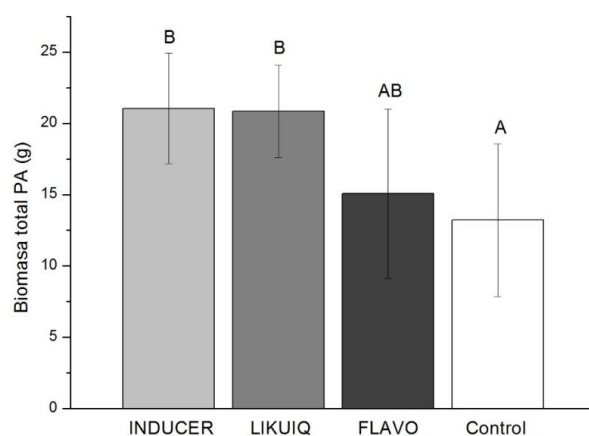


**Figura 12.** Peso seco de nódulos por planta, medido en estadio de desarrollo R2. Se muestran los nódulos de la raíz principal y de las raíces secundarias de las plantas inoculadas con INDUCER y LIKUIQ. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Efecto de INDUCER sobre el rendimiento en granos

Las plantas llegaron a la etapa de madurez fisiológica luego de los 240 días post-siembra, y de forma no pareja. Las plantas que se inocularon maduraron antes, y algunas plantas de los tratamientos Control y FLAVO no estaban completamente secas al momento de la cosecha.

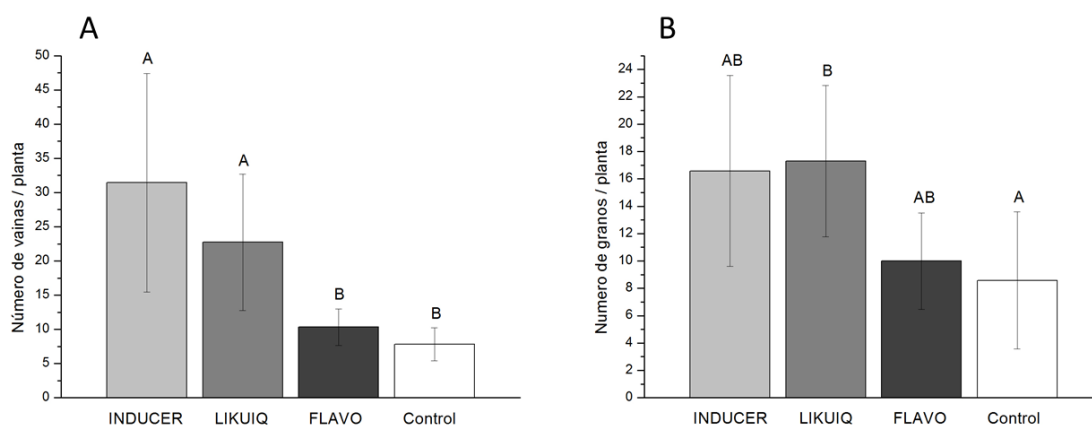
A pesar de esa diferencia visible en la humedad de las PAs se encontró un mayor peso fresco de la PA de las plantas (secas) de los tratamientos INDUCER y LIKUIQ (Fig. 11).



**Figura 13.** Biomasa total obtenida en las plantas cosechadas en estadio de desarrollo R8. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ).

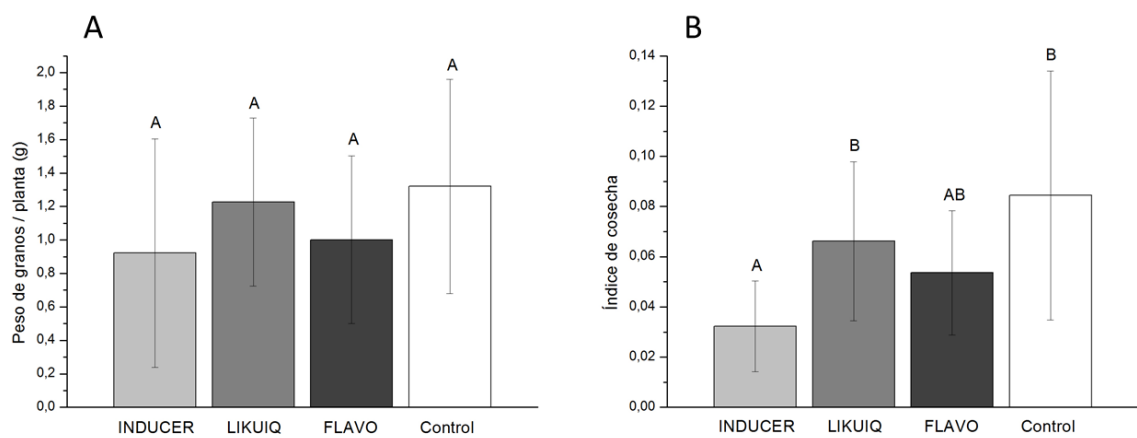
El rendimiento biológico de las plantas inoculadas con bradirizobios, estimado como biomasa total producida, no presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos INDUCER y LIKUIQ (Fig. 11).

Los parámetros independientes del estado de sequedad de la biomasa aérea, como el número de vainas y de granos por planta, fueron mayores siempre en las plantas inoculadas, frente a los tratamientos testigos (Fig. 12).



**Figura 14.** Número de vainas (A) y de granos (B) por planta. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ).

No se observaron diferencias entre tratamientos en relación al rendimiento en granos por planta (Fig. 13A), pero sí en cuanto al índice de cosecha calculado con el total de las plantas (Fig. 13B).



**Figura 15.** Rendimiento en granos estimado como peso de granos por planta (A) e índice de cosecha (B). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de inoculación (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Composición química de extractos obtenidos de raíces de plantas en estadio V4

Sobre las muestras compuestas de raíces se realizaron dos extracciones orgánicas, utilizando acetona:etanol o metanol como solventes de extracción (ver Materiales y Métodos). En ambos casos se logró extraer y detectar una variedad de compuestos orgánicos.

Entre las moléculas de reconocimiento entre leguminosas y rizobios, los flavonoides liberados por las plantas son de las más relevantes. Para su identificación en las muestras se tomaron en cuenta las dos extracciones orgánicas realizadas, ya que en ambas se detectaron flavonoides. Se lograron identificar tres flavonoides en las muestras: daidzeina, genisteina y coumestrol (Tabla 2). Estos tres flavonoides son los mayormente encontrados en soja. La principal diferencia se observó en los extractos de las raíces de plantas inoculadas con LIKUIQ e INDUCER. En ellas se detectó una acumulación de genisteina que no aparece en los otros dos tratamientos. La falta de patrones externos para corroborar la presencia de otros flavonoides en las muestras limitó la detección.

**Tabla 2.** Composición química de extractos de raíces de plantas en estadio V4: flavonoides (derivados trimetilsil). (+) presencia del compuesto (-) ausencia del compuesto.

	<b>INDUCER</b>	<b>LIKUIQ</b>	<b>FLAVO</b>	<b>Control</b>
Daidzeina	+	+	+	+
Coumestrol	+	+	+	+
Genisteina	+	+	-	-

Con la extracción metanólica, además de flavonoides, se identificaron algunos compuestos orgánicos. Las tablas 3 y 4 muestran las listas completas de compuestos que se lograron identificar por comparación con bases de datos públicas, en base al solvente de extracción utilizado.

Debido a que no todos los compuestos pudieron identificarse mediante los estándares disponibles y las bases de datos, se detectó un bajo número de compuestos. De un total de 42 CBPM detectados, 37 de ellos se detectaron en raíces de plantas Control, mientras que tan solo 19, 17 y 14 se encontraron en raíces de plantas de los tratamientos INDUCER, FLAVOS y LIKUIQ, respectivamente. Once metabolitos se encontraron en las raíces de todas las plantas inoculadas, y solo 8 aparecieron en el

tratamiento INDUCER pero no en LIKUIQ. Estos 8 metabolitos que marcaron la gran diferencia entre los dos tratamientos de inoculación fueron los ácidos azelaico, pentadecílico, oleico, araquídico, adenina y otra purina no identificada, inositol y el glicerol fosfato (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición química de extractos de raíces de plantas en estadio V4: compuestos de bajo peso molecular (CBPM, derivados trimetilsil) solubles en acetona:etanol. (+) presencia del compuesto (-) ausencia del compuesto.

	INDUCER	LIKUIQ	FLAVO	Control
<b>AMINOACIDOS, PURINAS Y DERIVADOS</b>				
L-Prolina	+	+	+	+
L-cisteína o glicina	-	+	-	-
γ-aminobutírico (GABA, 4-aminobutanoico)	-	-	-	+
Adenina	+	-	+	-
Purina	+	-	+	-
Purina-amina	+	+	+	-
Adenosin ribosido	-	-	-	+
<b>ACIDOS CARBOXILICOS</b>				
Azelaico (nonanodioico)	+	-	-	+
Láctico (α-hidroxi-propanoico)	-	-	+	+
Benzoico	-	-	-	+
Vanílico (4-Hidroxi-3-metoxibenzoico)	-	-	-	+
Valérico (pentanoico)	-	-	-	+
<b>AZUCARES</b>				
beta-D-Glucopiranososa	+	+	+	+
D-fructosa	-	-	+	-
Sacarosa	-	+	+	+
D-arabinosa o arabinopiranososa	-	-	-	+
Galactofuranosa	-	-	-	+
Maltosa	-	-	-	+
Heneicosano	-	-	-	+
<b>ACIDOS GRASOS</b>				
Laurico (dodecanoico, C12 saturado)	-	-	-	+
Mirístico (tetradecanoico, C14 saturado)	-	+	+	-
Pentadecílico (pentadecanoico, C15)	+	-	-	+
Palmitico (hexadecanoico, C16 saturado)	+	+	+	+
Palmitelaidico (trans-9-hexadecenoic acid,	-	-	-	+
Margarico (heptadecanoico, C17 saturado)	-	-	-	+
Linoleico (cis,cis-9,12-Octadecadienoico,	+	+	-	+
Oleico (cis-9-Octadecenoico, C18)	+	-	-	+
Esteárico (Octadecanoico, C18 saturado)	+	+	+	+
Araquídico (eicosanoico, C20 saturado)	+	-	-	+

Behenico (docosanoico, C22 saturado)	-	-	-	+
1,1'-Biciclopropil-2-octanoico (C21)	-	-	-	+
<b>DERIVADOS DEL BENCENO</b>				
Benzoilecgonina	+	+	+	+
<b>FITOESTEROLES</b>				
Estigmasterol	+	+	+	+
beta-Sitosterol	+	+	+	+
Campesterol	-	-	-	+
Stigmastanol (sitostanol)	-	-	-	+
<b>ALCOHOLES Y DERIVADOS</b>				
Inositol	+	-	-	+
Glicerol fosfato (éster fosfórico del glicerol)	+	-	-	-
2-Furanona o butenolida	-	-	-	+
Arabinitol, xilitol, ribitol	-	-	-	+
Nonadecanol	-	-	-	+
$\alpha$ -Gliceril 1-palmitato (1-monopalmitin)	-	-	-	+

**Tabla 4.** Composición química de extractos de raíces de plantas en estadio V4: compuestos solubles en metanol (derivados trimetilsil). (+) presencia del compuesto (-) ausencia del compuesto.

	INDUCER	LIKUIQ	FLAVO	Control
<b>AMINOACIDOS, PURINAS Y DERIVADOS</b>				
$\gamma$ -aminobutírico (GABA, 4-aminobutanoico)	+	+	+	-
Purina	+	+	+	-
L-Alanina	-	+	+	-
Serina	-	+	+	-
L-Prolina	-	+	+	-
Guanina	-	-	+	-
<b>ACIDOS CARBOXILICOS</b>				
Láctico	+	+	+	-
Fumárico	+	+	+	-
Málico	+	+	+	-
L-treónico	+	+	+	-
Benzoico	-	+	-	-
<b>AZUCARES</b>				
beta-D-Glucopiranososa	+	+	+	+
alfa-D-Glucopiranosido	-	-	+	-
<b>ACIDOS GRASOS</b>				
Palmitico (hexadecanoico, C16 saturado)	+	+	+	-
Esteárico (Octadecanoico, C18 saturado)	-	+	+	-
<b>DERIVADOS DEL BENCENO</b>				
Benzoilecgonina	-	+	+	-

<b>FITOESTEROLES</b>				
Estigmasterol	-	+	+	-
beta-Sitosterol	-	+	+	-
<b>ALCOHOLES Y DERIVADOS</b>				
$\alpha$ -Gliceril palmitato	-	+	-	-
Inositol	-	-	+	+

Se detectaron en todos los tratamientos diversos ácidos orgánicos, incluyendo ácidos grasos, que fueron los compuestos más abundantes, en especial los ácidos palmítico y esteárico (Tabla 3 y 4). Las plantas de los tratamientos INDUCER y LIKUIQ mostraron un perfil similar de ácidos grasos, sin embargo, solo en las plantas del tratamiento INDUCER se detectaron los ácidos Pentadecílico, Oleico y Araquidico (Tabla 3). De forma interesante, en los extractos obtenidos de las plantas Control se observó también la presencia de estos tres ácidos grasos.

Se detectó una mayor variedad de azúcares, ácidos carboxílicos y polioles, como el inositol, xilitol, ribitol, y el arabinol, en las raíces del tratamiento Control en relación a los restantes tratamientos (Tabla 3).

Entre los fitoesteroles presentes se identificó al campesterol, estigmasterol, sitosterol y sitostanol. Particularmente estos dos últimos fueron detectados únicamente en las plantas control.

Los aminoácidos detectados fueron la L-prolina, L-cisteína, L-alanina y la serina, y, entre ellos, la alanina y la serina no aparecieron en los tratamientos INDUCER y Control (Tabla 4). Destaca además la presencia de bases nitrogenadas púricas, como la adenina y la guanina, y derivados aminados especialmente en tratamientos INDUCER y FLAVOS (Tabla 3 y 4).

#### 4.6. Composición química de extractos obtenidos de nódulos de plantas en estadio R2

Se realizó una extracción orgánica sobre extractos de nódulos de plantas en R2 utilizando cloroformo:metanol:agua para obtener aminoácidos y otros compuestos (ver Materiales y Métodos). La identificación de compuestos por comparación con bases de datos públicas se muestra en la Tabla 5, según el grupo químico al que pertenece cada compuesto. En el caso de los aminoácidos, se utilizaron patrones externos para confirmar la identidad por comparación de espectros de masa (ver Materiales y Métodos).

Comparando los tratamientos INDUCER y LIKUIQ, se encontraron pocas diferencias en el perfil de compuestos presentes en los extractos de nódulos (Tabla 5). El perfil de aminoácidos identificados fue similar en los nódulos de las plantas de ambos tratamientos. Sin embargo, sólo en los nódulos de las plantas inoculadas con LIKUIQ se identificó la treonina.

Se observó una gran variedad de ácidos carboxílicos. Entre ellos, el metilcitrato y fumarato, solo aparecieron en el tratamiento LIKUIQ. Por otro lado no se detectaron flavonoides en ningún extracto de nódulos, independientemente del tratamiento.



**Tabla 5.** Composición química de extractos de nódulos colectados de plantas en estadio en R2: compuestos solubles en cloroformo:metanol:agua (derivados trimetilsil). (+) presencia del compuesto (-) ausencia del compuesto.

	INDUCER	LIKUIQ
<b>AMINOACIDOS, PURINAS Y DERIVADOS</b>		
L-Alanina	+	+
Valina	+	+
Serina	+	+
L-treonina	-	+
<b>ACIDOS CARBOXILICOS</b>		
Láctico ( $\alpha$ -hidroxi-propanoico)	+	+
(R)-3-Hidroxibutirico	+	+
Benzoico	+	-
Málico	+	+
L-aspártico	+	+
Isoftálico	+	+
Tereftálico	+	+
D-glucónico	+	+
Fumárico	-	+
Metilcítrico	-	+
<b>AZUCARES</b>		
beta-D-Glucopiranososa	+	+
alfa-D-Glucopianosido	+	+
<b>ACIDOS GRASOS</b>		
Palmitico (hexadecanoico, C16 saturado)	+	+
Elaidico (trans-9-octadecenoico, C18 mono)	+	+
Esteárico (Octadecanoico, C18 saturado)	+	+
<b>ALCOHOLES Y DERIVADOS</b>		
Sorbitol	+	+
Mio-Inositol	+	+
$\alpha$ -Gliceril palmitato	+	-

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Concentración de bacterias por semilla

La concentración de rizobios en un inoculante para leguminosas es una de las características más comúnmente utilizadas como indicador de calidad del producto final. En el presente trabajo se evaluó la sobrevivencia de los bradirizobios provenientes de la formulación INDUCER, sobre las semillas desde el momento de su inoculación y hasta 28 días luego de la misma.

En los suelos suelen co-existir normalmente los rizobios nativos y aquellos que provienen de inoculaciones previas realizadas sobre el suelo o sobre semillas sembradas en el mismo, aun cuando sus leguminosas huéspedes no está presentes. Sin embargo, en el caso de la soja, al ser una planta introducida, no existen rizobios nativos capaces de nodular esa planta. La inoculación es clave porque de ella dependerá la formación de nódulos y es la forma de garantizar que los rizobios adecuados lleguen a la semilla en las cantidades adecuadas. En este contexto la importancia de evaluar la concentración de bacterias por semilla y su sobrevivencia en el tiempo, es clave para corroborar que un buen producto inoculante provee abundante número de rizobios, asegurando un alto impacto económico de la FBN en el cultivo (Lodeiro, 2015).

En Uruguay, los protocolos técnicos del sistema de registro y control de inoculantes rizobianos de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del MGAP especifican que la concentración mínima de rizobios requerida en las formulaciones comerciales debe ser del orden de  $10^9$  UFC/ml para inoculantes líquidos, como lo son LIKUIQ e INDUCER. Para ello y como parte de la evaluación de productos para registrar, se realiza, entre otros análisis, la verificación de la concentración de rizobios por

unidad de producto y su sobrevivencia en el soporte. La exigencia, para inoculantes líquidos, es de  $2 \times 10^9$  rizobios por ml de producto a la comercialización y de  $1 \times 10^9$  rizobios por ml de producto al vencimiento (MGAP-DGSA, Protocolo técnico para registro de inoculantes). En tal sentido, tanto LIKUIQ como INDUCER contienen bradirizobios en el orden de  $10^9$  UFC/ml de producto, según lo declarado por la empresa (Anexo II, [www.lage.com.uy](http://www.lage.com.uy)).

No existen en Uruguay especificaciones ni exigencias para la concentración de rizobios en semillas, una vez inoculadas en el campo. Sin embargo, si existen exigencias para las semillas que se comercializan pre-inoculadas. Según la DGSA, las semillas de soja que se comercializan pre-inoculadas deberán contener una concentración no menor a  $10^5$  UFC/semilla, valor compatible con los exigidos para los inoculantes en función de la dosis de inoculación (Reglamento técnico MERCOSUR/GMC/RES. No 28/98; MGAP-DGSA, Protocolo de Registro de Semilla Pre-Inoculada). Los estándares mínimos aceptados en otros países para semillas grandes como las de soja son también de  $10^5$  rizobios por semilla (Lupwayi y col., 2000). Sin embargo, los reportes sobre exigencias mínimas de rizobios por semilla son variados y escasos.

LIKUIQ e INDUCER son formulaciones que consisten en microorganismos contenidos en un soporte líquido estéril, pero que son utilizados sobre material no estéril, como lo son las semillas. Una vez aplicado el inoculante, los rizobios ven su sobrevivencia afectada por la edad del inóculo, la presencia de otros microorganismos en las semillas y condiciones abióticas a las cuáles las semillas están expuestas antes de su siembra, como temperatura y desecación, entre otras (Lodeiro, 2015; Penna y col., 2011). Una vez sembradas las semillas, la carga de rizobios por semilla disminuye aún más debido a múltiples factores, entre ellos, la competencia con poblaciones autóctonas de rizobios introducidos por inoculaciones previas (Lodeiro, 2015). Se estima que la cantidad de

inóculo que sobrevive sobre la semilla inoculada es baja (entre el 5-10% de lo inoculado; Benintende, 2010). Para contrarrestar esa disminución, muchas veces se recurre a aumentar la dosis de aplicación y/o a incrementar la cantidad de rizobios por ml o g de producto. En tal sentido, Olsen y col. (1994) propusieron incrementar los estándares exigidos de rizobios por semilla, para Cánada, en un factor de 10. Por ejemplo, para semillas de gran tamaño, como la soja, proponen una exigencia mínima de  $10^6$  rizobios por semilla (Olsen y col., 1994). De acuerdo con lo reportado por Weaver & Frederick (1974), son necesarias más de  $10^5$  células de *Bradyrhizobium japonicum* por semilla de soja para obtener el máximo número de nódulos. Lodeiro (2015) asegura que la inoculación debería proveer de  $10^4$ - $10^5$  rizobios por raíz de soja para las primeras etapas post- germinación. Según Benintende (2010), para Argentina, un inoculante debe proveer como mínimo  $8 \times 10^4$  rizobios sobre cada semilla de tipo soja hasta la fecha de vencimiento del producto.

Teniendo en cuenta las dosis de aplicación recomendada para LIKUIQ y la cantidad de bradiriozbios por ml de producto, se espera recuperar concentraciones teóricas del orden de  $10^6$  bacterias por semilla. Este dato teórico se corroboró experimentalmente en los recuentos realizados al momento de la siembra. En base a los antecedentes, se concluye que la carga rizobiana detectada por semilla, al momento de la inoculación, es adecuada.

A su vez, si tomáramos en cuenta que la concentración de rizobios sobre semilla necesaria para no tener problemas en la nodulación y en el rendimiento del cultivo es la misma que la propia DGSA exige para semillas de soja pre-inoculadas, entonces el agregado de flavonoides durante el proceso de producción de INDUCER no causaría ninguna interferencia para la recuperación de un número adecuado y suficiente de UFC desde las semillas al momento de la siembra.

Al comparar las UFC recuperadas por semilla entre tratamientos de inoculación (LIKUIQ vs INDUCER), se observó que la concentración bacteriana en semillas disminuyó de forma muy similar en ambos tratamientos. Este comportamiento de disminución ha sido descrito antes. Lodeiro (2015) describe 2 fases de mortandad de los rizobios sobre semilla, una primera en la que disminuye abruptamente el número de rizobios por semilla en pocas horas luego de la inoculación, y una segunda fase en la que el ritmo de disminución cae y se estabiliza a las 24 hs. Penna y col. (2011) describe también una rápida muerte de rizobios en las primeras horas. En nuestro caso no se observó una caída tan abrupta en el número de rizobios por semilla. Los valores de UFC/semilla se mantuvieron por encima de  $1 \times 10^5$  UFC/semilla (10% del inóculo inicial), durante todo el período evaluado y para ambas formulaciones. Es posible que esta menor disminución, en relación a los antecedentes, se deba a la utilización de Add-it que actúa como protector.

La sobrevivencia en semillas, sostenida en el tiempo, es de particular importancia ya que asegura que siempre existan bradirizobios en cantidades adecuadas en la semilla, más cuando se considera el período que transcurre en el campo entre el momento en que el productor inocula sus semillas y el momento en que las siembra. Una vez más, se confirma que el agregado de flavonoides al caldo de cultivo no estaría afectando de forma negativa la adherencia ni sobrevivencia de los bradirizobios sobre las semillas.

## 5.2. Efecto de INDUCER sobre la nodulación y el crecimiento vegetal

Los efectos del agregado de flavonoides tanto al suelo rizosférico como a las formulaciones bacterianas, sobre el crecimiento y el desarrollo vegetal han sido ampliamente reportados para una gran variedad de simbiosis rizobio-leguminosa. Muchos estudios demuestran que el agregado de

flavonoides en el suelo incrementa la nodulación en varias leguminosas. Por ejemplo, el agregado directo de flavonoides al suelo rizosférico de alfalfa (*Medicago sativa*) promueve la nodulación de las plantas por *Sinorhizobium meliloti* (Kapulnik y col., 1987). En arveja (*Pisum sativum*) inoculada con *Rhizobium leguminosarum*, el agregado de naringenina a la rizosfera incrementa la biomasa, el número de nódulos y la relación parte radicular-parte aérea (Bandyopadhyay col., 1996; Novák y col., 2002). En soja, el agregado de flavonoides al suelo rizosférico aumenta el rendimiento en grano, el contenido en N en hojas, y el tamaño, número y peso de nódulos de soja no inoculada (Feng Zhang & Smith, 1996; Pan y col., 1998). Xie y col. (1995) demostraron además que el agregado de flavonoides promueve la colonización radicular por micorrizas (Vierheilig y col., 1998; Xie y col., 1995).

Por otro lado, son numerosos los reportes sobre el agregado de flavonoides al medio de crecimiento de determinados rizobios, y la promoción resultante en la nodulación, fijación de N y el crecimiento de las leguminosas inoculadas, en relación a los resultados obtenidos con la inoculación de rizobios crecidos en ausencia de los flavonoides (Paau y col., 1990; Zhang & Smith, 1995; Pan & Smith, 2000; Dashti y col., 2000).

En el experimento realizado durante este trabajo, los microorganismos pre-activados no produjeron mayor nodulación al momento del primer muestreo (42 días de crecimiento en invernáculo), ni tampoco se observaron diferencias significativas en los rendimientos en biomasa aérea y vegetal entre los tratamientos. En este muestreo se registró además una baja nodulación en las plantas inoculadas. El bajo número de nódulos por planta y el tamaño de los mismos es consistente con la ausencia de diferencias en las medidas de crecimiento entre tratamientos para el estadio V4. Es posible que la ausencia de efectos positivos en plantas crecidas hasta estadio V4 se deba a que los 42 días transcurridos desde la siembra hasta alcanzar este estadio, no fueran suficientes para

observar los esperados beneficios de la pre-incubación de los bradirizobios con los flavonoides sobre el rendimiento en biomasa, al menos en condiciones de invernáculo.

Durante el estadio de floración completa (R2) ocurre una elevada acumulación de materia seca y nutrientes en la planta, lo que tiene consecuencias directas sobre el siguiente paso en el desarrollo de la soja: el llenado de las vainas (Fehr y col., 1971). El suministro de nutrientes, y en particular de N, es crucial en esta etapa para el adecuado desarrollo del cultivo y el rendimiento final del mismo. Por lo tanto, un mayor número y biomasa de nódulos por planta puede generar grandes beneficios en cuanto a la producción de granos. En el segundo estadio de muestreo del presente trabajo, se observaron diferencias entre INDUCER y LIKUIQ en la producción de biomasa aérea, con un rendimiento superior obtenido con la nueva formulación. Además, se observó un mayor número y peso de nódulos en las raíces de plantas inoculadas con INDUCER. Estos resultados positivos podrían ser atribuidos a la “activación” de los bradirizobios por el agregado de los flavonoides al caldo de fermentación.

Varios reportes similares han sido descritos en interacciones *B. japonicum*-soja. En términos generales, la inoculación de soja con bradirizobios pre-incubados con flavonoides resulta en una mayor producción de biomasa vegetal, mayor tamaño, número y peso seco de nódulos, y mayor rendimiento en grano, al compararse con el efecto de los mismos microorganismos sin ser tratados con flavonoides, según numerosos autores (Zhang & Smith, 1995, 1996; Muñoz y col., 2014; Pan & Smith, 2000; Miransari & Smith, 2008; Marks y col. 2013). La mayoría de estos efectos previamente reportados se observaron cuando las plantas inoculadas con los bradirizobios pre-incubados con flavonoides crecieron bajo condiciones de estrés. La inoculación con rizobios pre-incubados con flavonoides promueve el crecimiento de leguminosas que crecen en condiciones de salinidad (Abd-Alla, 2014a, Muñoz y col., 2014),

acidez (Mohammad Miransari & Smith, 2008), baja temperatura (Zhang & Smith, 1995; Begum y col., 2001; Broughton y col., 2003), estrés hídrico (Napoles y col., 2009) y hasta en condiciones de alta concentración de metales pesados (Abd-Alla, 2014b).

### 5.3. Efecto de INDUCER sobre el rendimiento en granos

Al igual que la nodulación y el crecimiento vegetal, la producción en granos del cultivo de soja puede verse incrementada por la inoculación con bradirizobios pre-incubados con flavonoides. Las evidencias de estos efectos son más escasas ya que la mayoría de los estudios enfocados en el uso de flavonoides en la producción de inoculantes a base de rizobios son llevados a cabo en condiciones *in vitro* o en invernáculo y hasta etapas tempranas del cultivo. Particularmente, se han reportado mejoras en el rendimiento final del cultivo en condiciones de estrés abiótico, mediante el agregado de flavonoides en los medios de crecimiento de los bradirizobios (Pan & Smith, 2000; Zhang & Smith, 1995, 1996; Miransari & Smith, 2007, 2009).

En experimentos realizados en campo, Zhang y Smith (1996) corroboraron el efecto de incubar a *B. japonicum* con genisteína, previo a su inoculación en soja, sobre el rendimiento en grano. Los mismos autores ya habían demostrado el efecto sobre la nodulación y la fijación de N en soja en condiciones de laboratorio (Zhang & Smith, 1995). En condiciones de campo se obtuvo un incremento tanto en el rendimiento en granos como en el contenido proteico de los mismos (Zhang & Smith, 1996). Del mismo modo, Leibovitch y col. (2001) en experimentos a campo mostraron que la pre-incubación de *B. japonicum* con genisteína y daidzeína llevaba a aumentos de hasta el 7% en rendimientos finales de grano. Sin embargo, estos autores demostraron también que este incremento es mayor en plantas expuestas a temperaturas relativamente



bajas, y tiende a disminuir cuanto más tardía es la época de siembra (Leibovitch y col., 2001).

Durante este experimento no se registraron diferencias significativas en cuanto al peso de granos por planta entre las plantas inoculadas con INDUCER y LIKUIQ, lo que sugiere que el agregado de flavonoides a la formulación de bradirizobios no disminuye el peso de los granos. Lamentablemente el índice de cosecha dio significativamente menor para plantas inoculadas con INDUCER, en comparación con la inoculación tradicional. Estos resultados indican que en condiciones de invernáculo, el rendimiento final en granos del cultivo no se favorecería por la nueva formulación.

#### 5.4. Composición en metabolitos en raíces y nódulos

Las raíces de las plantas son importantes para mantener actividades vitales como la absorción de agua y nutrientes y de ellas depende el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos. Bajo cualquier tipo de estrés, tanto el crecimiento como la fisiología de las plantas se afectan significativamente, y las raíces son uno de los órganos más sensibles debido a que están en contacto directo con el suelo. Pero las raíces juegan además otro rol, desde ellas se liberan los exudados radiculares, un coctél de compuestos secretados que median en las interacciones biológicas que ocurren en la rizosfera (Morel y col., 2015).

La acumulación de metabolitos vegetales derivados principalmente del metabolismo secundario está estrechamente ligada al crecimiento vegetal pero regulada a su vez por factores ambientales (Zhang y col., 2016). Tecnologías como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la resonancia nuclear magnética (NMR) o la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) son las más ampliamente utilizadas para los análisis de perfiles de metabolitos

de una muestra biológica (metabolómica). En el presente trabajo se caracterizaron los cambios metabólicos en raíces de soja expuesta a diferentes tratamientos de inoculación mediante GC-MS.

En base al estudio metabolómico en las raíces colectadas en estadio V4 y nódulos colectados en estadio R2, los perfiles de metabolitos realizados en este estudio cambiaron levemente en función del tratamiento. La mayoría de los metabolitos identificados forman parte del metaboloma de raíces en soja (Li y col., 2017) y si se observa rápidamente la Tabla 4, se nota una mayor detección de compuestos en raíces del tratamiento Control, frente a los demás.

En términos generales, el metabolismo de los ácidos carboxílicos, ácidos grasos y de azúcares y polioles se promovió en plantas del tratamiento Control, mientras que pocas diferencias se encontraron entre las plantas inoculadas. El análisis metabolómico revela además que las plantas inoculadas con INDUCER se comportaron de una manera homeostática, respecto al tratamiento LIKUIQ, debido a las pocas diferencias detectadas en los perfiles metabolómicos entre ambos tratamientos. El 80% de los metabolitos identificados en las raíces del tratamiento LIKUIQ no cambiaron en el tratamiento INDUCER. Asimismo, en los nódulos desarrollados hasta floración se lograron identificar un total de 22 metabolitos que constituyen una mezcla que proviene tanto de la planta como de los bradirizobios, y de los cuales 17 fueron identificados en nódulos correspondientes a ambos tratamientos. Resultados similares fueron descritos por Furlan y col. (2017) luego de un análisis metabolómico sobre nódulos de diferentes cultivares de arveja.

Existen muy pocos estudios metabolómicos a la fecha sobre los cambios metabólicos en soja bajo diferentes condiciones de crecimiento. La mayoría de los existentes fueron realizados bajo condiciones de estrés abiótico (Li y col., 2017; Lu y col., 2013; Zhang y col., 2016; Zhang y col., 2014).

Los ácidos orgánicos fueron los compuestos más abundantes y son, a su vez, uno de los componentes más importantes de los exudados radiculares. Su liberación desde las raíces hacia la rizosfera los convierte en fuente de nutrientes para los microorganismos del suelo, actuando como quimioatrayentes e induciendo la proliferación microbiana en la rizosfera (Zhang y col., 2014). Los ácidos carboxílicos y los ácidos grasos fueron más abundantes en plantas Control que no recibieron inoculación donde su función quimioatrayente, de rizobios de la rizosfera probablemente estuvo muy activa. Entre los ácidos orgánicos detectados en las raíces, el málico apareció en todos los tratamientos excepto en el Control. Este ácido es la principal fuente de carbono transportada a los bacteriodes (Udvardi & Poole, 2013).

Luego de las plantas Control, la mayor acumulación de ácidos grasos se detectó en las raíces de plantas del tratamiento INDUCER. Los ácidos pentadecílico, oleico y araquídico se detectaron en el tratamiento INDUCER pero no en LIKUIQ. En un estudio metabolómico desarrollado por Li y col. (2017) sobre raicillas de soja expuesta a estrés salino, los autores encontraron una acumulación radicular de algunos ácidos asociados al metabolismo de los ácidos grasos. Entre ellos resaltan el pentadecílico, el araquidónico y el oleico.

Otros ácidos grasos encontrados en nuestro estudio fueron el laurico, mirístico, palmítico, palmiteláidico, margárico, linoleico, esteárico y behénico, con cadenas que van desde 12 a 22C y cuya función, sobre todo relacionada a la fluidez de la membrana vegetal afectando su colonización, depende del largo de cadena y del grado de insaturaciones (Brechenmacher y col., 2010). Acorde con Li y col. (2017), los ácidos oleico y linoleico son sustancias relacionadas a estrés en soja.

Al comparar los tratamientos INDUCER y LIKUIQ, se observó que los aminoácidos alanina, serina y cisteína-glicina (este último no diferenciado) solo aparecen en LIKUIQ. Los resultados sugieren que el metabolismo

aminoácido está más activo en estas plantas, llevando a la acumulación de estos aminoácidos en plantas inoculadas con LIKUIQ, aunque también se acumularon en plantas del tratamiento testigo FLAVO.

La acumulación de bases nitrogenadas, como las purinas detectadas en la mayoría de las plantas, y de ácidos nucleicos en extractos de raíces de soja no es extraña y ya ha sido previamente reportada (Li y col., 2017).

Los azúcares fueron especialmente abundantes en las raíces de las plantas Control. Del mismo modo, se observó una acumulación de polioles y alcoholes en ese tratamiento. Se ha reportado que el inositol se acumula en condiciones de estrés. Li y col. (2017), por ejemplo, encontraron una acumulación en raíces de soja frente a estrés salino, de azúcares y alcoholes, incluyendo arabinol e inositol. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es otro metabolito con funciones protectoras reportadas en plantas (Furlan y col., 2017) que se acumuló en las plantas Control. La presencia de estos y otros polioles en niveles detectables en plantas Control podría ser un indicativo de estrés en la planta, posiblemente por la falta de nitrógeno.

El metabolismo secundario de antioxidantes, como los fitoesteroles y los flavonoides, suele estar más activo cuando una planta se enfrenta a alguna condición limitante para su crecimiento (Li y col., 2017). Entre los fitoesteroles presentes en soja, el campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol son los más abundantes y característicos de la especie vegetal. Mientras que el estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol fueron detectados en las plantas de todos los tratamientos, el campesterol solo se encontró en plantas Control.

Como ya se mencionó previamente, la primera fase en el establecimiento de la simbiosis entre los bradirizobios y la soja implica el intercambio de moléculas de reconocimiento entre ambos miembros de la asociación. Un intercambio adecuado y preciso de estas señales moleculares es esencial

para el establecimiento de una simbiosis efectiva. Entre estas moléculas de reconocimiento, los flavonoides liberados por las plantas son de las más tempranas en ser secretadas. El reconocimiento de los flavonoides adecuados por parte de los bradirizobios lleva a la activación y expresión coordinada en la bacteria de los genes *nod*. De esta expresión génica resulta la producción de FN que una vez reconocidos por las raíces de la planta, desencadenan la formación de los nódulos y la FBN (Passaglia, 2017; Suzaki & Kawaguchi, 2014, Figura 3). Podría esperarse que la incubación de los rizobios en presencia de los flavonoides específicos que activan la expresión de sus genes *nod* lleve a la producción “temprana” de FN. Incluso podría esperarse la presencia de FN en el caldo de cultivo de los rizobios. De producirse ese resultado, las raíces de las plantas tendrían FN de forma más inmediata y podrían tener una nodulación temprana, en relación a las plantas que reciben los rizobios sin pre-incubarse en flavonoides.

En el presente trabajo, entre los muy escasos flavonoides detectados en las raíces se encuentran la daidzeína, el coumestrol y la genisteína que son los principales flavonoides responsables de la expresión de los genes *nod* en bradirizobios (Miransari & Smith, 2009; Takeshima y col., 2013). Otro flavonoide descrito como inductor de la expresión de genes *nod* en *B. japonicum*, y presente en exudados radiculares de soja es la isoliquiritigenina, reportada por Kape y col. en 1992. El jasmonato es también capaz de inducir la síntesis de FN en *B. japonicum* (Mabood y col., 2006).

El coumestrol y la daidzeína fueron de los primeros flavonoides en detectarse en exudados radiculares de soja (D’Arcy-Lameta & Jay, 1987), mientras que la genisteína, además de la daidzeína y el coumestrol se hallaron por vez primera en extractos de raíces de soja por Porter y col. (1985). El coumestrol además, es uno de los más abundantes polifenoles presentes en las hojas de la soja (Yuk y col., 2011).

En relación al perfil de estos flavonoides en el presente análisis, en el caso de la daidzeina y el coumestrol, estos se hallaron en plantas de todos los tratamientos, pero la genisteina solo se detectó en plantas inoculadas. La mayor acumulación de flavonoides en las raíces de las plantas inoculadas (tanto LIKUIQ como INDUCER) en estadio V4, podría indicar una activa producción y posterior secreción de este flavonoide por las raíces hacia la rizosfera, como forma de reclutar bradirizobios y activar la producción de FN y la nodulación en las plantas por estas bacterias. Distintos autores han reportado aumentos en la producción de flavonoides por la planta debido a la presencia de rizobios, tanto para soja (Brechenmacher y col., 2010; Schmidt y col., 1994) como para otras leguminosas (Dakora y col., 1993a, 1993b). Incluso, Schmidt y col. (1994) demostraron que los FN llevan a la producción de flavonoides (daidzeina, genisteina y coumestrol) en raíces de soja utilizando un mutante de *B. japonicum* incapaz de producir FN que, contrariamente a la cepa de tipo salvaje, no provocó un aumento en la producción de estos compuestos. A su vez, estos autores registraron aumentos en la producción de flavonoides al agregar FN puros de *B. japonicum* a la soja.

En los extractos de nódulos no se detectaron flavonoides, resultado que podría indicar una secreción activa de estos compuestos hacia la rizosfera. Por otra parte, Liu & Murray (2016) sostienen que la expresión de los genes de biosíntesis de flavonoides se ve muy reducida en las zonas del nódulo donde está ocurriendo la fijación de N. Esto no solo ayuda a explicar la ausencia de flavonoides en nódulos de plantas en R2, sino que también sugiere una fijación de N activa en los nódulos analizados.

Dado que los bradirizobios fueron pre-incubados frente a determinados flavonoides previo a su inoculación a las semillas, una producción temprana de FN por parte de los bradirizobios “activados”, podría explicar un menor contenido de flavonoides en plantas inoculadas con INDUCER

respecto a LIKUIQ. Los flavonoides presentes en el medio de crecimiento podrían desencadenar la activación de los genes *nod* de forma más temprana y producir consecuentemente una nodulación también temprana, respecto a lo observable con LIKUIQ. Por otro lado, si el contenido en flavonoides fuera mayor en plantas inoculadas con INDUCER respecto a LIKUIQ, podría indicar que los FN producidos por los bradirizobios “activados” en el medio de fermentación pueden inducir la biosíntesis de flavonoides, aumentando el pool de los mismos en las raíces. Nada de esto se observó en los resultados debido a que no se cuantificaron los metabolitos identificados durante el análisis. No se logró cuantificar en este estudio los niveles de flavonoides en las raíces, ni de FN, ni tampoco se detectó una nodulación temprana en plantas inoculadas con INDUCER frente a las inoculadas con LIKUIQ. Asimismo, no se diseñaron ensayos específicos de nodulación (ver Perspectivas).

## 6. CONSIDERACIONES FINALES

*B. japonicum* y *B. elkanii* son comúnmente utilizados de forma comercial como fuente de formulaciones o inoculantes para soja. En Uruguay solo están permitidos para su uso comercial en soja las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302 (MGAP-DGSA, 2017). Las variantes que se realizan en las formulaciones a base de estas cepas dependen del soporte utilizado, la concentración bacteriana y los aditivos y protectores que se le adjuntan. INDUCER presenta la novedad de agregarle a la formulación original (en base a LIKUIQ) compuestos claves y determinantes de la nodulación del cultivo que podrían asegurar, teóricamente, un mayor éxito en la producción. En este estudio no siempre se obtuvieron beneficios debido a INDUCER en la nodulación y el crecimiento vegetal, que dependió del estado de la planta al momento del muestreo. Tampoco se obtuvieron mejores retornos productivos en cuanto al rendimiento en grano, principal parámetro que importa en el cultivo de soja. Sin embargo, el rendimiento en grano es difícil de determinar en condiciones de invernáculo, por ser el ciclo del cultivo relativamente largo (mayor a 6 meses) y ser las condiciones de luz y temperaturas muy variables dentro del invernadero. Es un hecho a resaltar que son ideales los ensayos de productividad en condiciones agronómicas para evaluar la productividad del cultivo.

Los ensayos aquí descritos se realizaron en el marco de un proyecto en colaboración con la empresa Lage y Cía S.A., cuyo objetivo principal es la validación tecnológica del inoculante INDUCER. De acuerdo al protocolo técnico para registro de nuevos inoculantes líquidos rizobianos del MGAP, estos deben cumplir con el requisito de: *mostrar una respuesta igual o superior a la inoculación patrón* (Inoculación convencional a campo) *con inoculante turba en los ensayos de eficiencia en condiciones controladas*. Superado este requisito (entre otros) se podría proceder a instalar



ensayos de eficiencia agronómica en campo (MGAP, Protocolo técnico para registro de inoculantes). Teniendo esto en consideración, y a fin de contribuir a la validación técnica de la nueva formulación, resulta necesario que las plantas inoculadas con la nueva formulación INDUCER presenten al menos la misma respuesta que la observada en plantas inoculadas con LIKUIQ (producto comercial convencional). Esto significa que las plantas inoculadas con INDUCER deberían presentar una igual o mejor nodulación en ensayos en condiciones controladas; mejor o igual nodulación y crecimiento en estadios vegetativos, en condiciones de invernáculo, e igual o mejor rendimiento en grano, en condiciones agronómicas de crecimiento, respecto a las plantas inoculadas con LIKUIQ. Los resultados del presente trabajo permiten validar los efectos de INDUCER sobre las plantas solo en estadios vegetativos (principalmente R2) de crecimiento.

## 7. PERSPECTIVAS

Los resultados nos permiten concluir que la pre-incubación de los bradirizobios U1301 y U1302 en una solución de flavonoides tiene un efecto positivo en el crecimiento de soja en etapas avanzadas del cultivo de soja (R2) pero que no afecta positivamente el rendimiento en grano, en condiciones de invernáculo. Además, la pre-incubación en presencia de flavonoides no afecta la sobrevivencia de los bradirizobios sobre las semillas inoculadas de soja y mantenidas en condiciones de Temperatura ambiente hasta la siembra. Asimismo, los perfiles de metabolitos presentes en extractos de raíces en etapas tempranas del cultivo y en extractos de nódulos de plantas en plena floración, no presentan grandes cambios en composición. Sin embargo, se debería hacer un estudio más profundo en el que se incluyan:

- La evaluación del efecto de la inoculación de las semillas con INDUCER sobre el rendimiento en grano en condiciones agronómicas.
- La evaluación del efecto de la inoculación de las semillas con INDUCER sobre la tasa de nodulación de las plantas, en condiciones *in vitro* que permitan realizar cinéticas de nodulación.
- La evaluación del efecto de la inoculación de las semillas con INDUCER sobre la nodulación de las plantas y la FBN, mediante medidas de N total y ensayos de reducción de acetileno, para determinar la actividad nitrogenasa en las plantas.
- Análisis y cuantificación de flavonoides y otros metabolitos presentes en raíces y nódulos de plantas inoculadas con INDUCER por HPLC-LC. Esta metodología es ampliamente utilizada para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos, especialmente de flavonoides, (Konar y col., 2011).
- El análisis de compuestos, especialmente de flavonoides, en exudados radiculares de soja inoculada con INDUCER.

- El análisis y cuantificación de los FN presentes en los exudados radiculares de plantas inoculadas con INDUCER. Es posible que en este tratamiento, los bradirizobios produzcan FN de forma más temprana y/o en mayor cantidad en respuesta a la detección de los flavonoides agregados al medio de cultivo de los bradirizobios.
- El análisis y cuantificación de compuestos orgánicos en granos de soja, en especial de ácidos grasos que indiquen el estado nutritivo de los mismos.
- En base a los numerosos reportes sobre el efecto de los flavonoides sobre el crecimiento de leguminosas en condiciones de estrés, se sugiere evaluar el efecto de INDUCER sobre soja expuesta a las condiciones de estrés que más comúnmente se presentan en Uruguay.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd-Alla, M. H., Bagy, M. K., El-enany, A. W. E. S., & Bashandy, S. R. (2014b). Activation of *Rhizobium tibeticum* with flavonoids enhances nodulation, nitrogen fixation, and growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) grown in cobalt-polluted soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(2), 303–315. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9980-7>

Abd-Alla, M. H., El-Enany, A. W. E., Bagy, M. K., & Bashandy, S. R. (2014a). Alleviating the inhibitory effect of salinity stress on nod gene expression in *Rhizobium tibeticum* - fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) symbiosis by isoflavonoids treatment. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 275–284. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.824622>

Ali, N. (2010). Soybean Processing and Utilization. *The Soybean: Botany, Production and Uses*, 345–347. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr16.3ed.c20>

Bandyopadhyay, A. K., Jain, V., & Nainawatee, H. S. (1996). Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 21(3), 189–192. <https://doi.org/10.1007/s003740050047>

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Becana, M., Moran, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Gogorcena, Y., & Escuredo, K. (1995). *Structure and function of leghemoglobins*.

Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P., & Zhang, F. (2001). Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of

Rhizobium leguminosarum increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1537–1543. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.360.1537>

Benintende, S. (2010). Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: Concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 129–132.

Berón García, M., Muzio Braga, M. (2013). Rendimiento del cultivo de soja de segunda según historia de chacra. Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Agronomía. URL: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/1727/1/3854ber.pdf>

Brechenmacher, L., Lei, Z., Libault, M., Findley, S., Sugawara, M., Sadowsky, M. J., Stacey, G. (2010). Soybean Metabolites Regulated in Root Hairs in Response to the Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*, 153(4), 1808–1822. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157800>

Breed, R. S., & Dotterer, W. D. (1916). The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates. *Journal of Bacteriology*, 1(3), 321–331.

Brodowska, K. M. (2017). European Journal of Biological Research Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*, 7(2), 108–123. <https://doi.org/10.5281/zenodo.545778>

Broughton, W. J., Zhang, F., Perret, X., & Staehelin, C. (2003). Signals exchanged between legumes and Rhizobium: Agricultural uses and perspectives. In *Plant and Soil* (Vol. 252, pp. 129–137). <https://doi.org/10.1023/A:1024179717780>

CAF. (2016). Los desafíos para la producción de soja, según el estudio sobre la zafra 2015 – 2016 que presentó el Observatorio de Oleaginosos del Uruguay. Banco de Desarrollo de América Latina (CAF). URL: <https://www.caf.com/es/actualidad/noticias/2016/08/los-desafios-para-la-produccion-de-soja-segun-el-estudio-sobre-la-zafra-2015-2016-que-presento-el-observatorio-de-oleaginosos-del-uruguay/> Fecha de acceso: Noviembre de 2007.

D'Arcy-Lameta, A., & Jay, M. (1987). Study of soybean and lentil root exudates. *Plant and Soil*, 101, 267–272. <https://doi.org/10.1007/BF02370654>

D'Haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12(6), 79R–105R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.6.79R>

Dakora, F. D., Joseph, C. M., & Phillips, D. A. (1993). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Root Exudates Contain Isoflavonoids in the Presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, 101(3), 819–824. <https://doi.org/10.1104/PP.101.3.819>

Dakora, F., Joseph, C. M., & A Phillips, D. (1993). *Common Bean Root Exudates Contain Elevated Levels of Daidzein and Coumestrol in Response to Rhizobium Inoculation. Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1094/MPMI-6-665>

Dashti, N., Prithviraj, B., Zhou, X., Hynes, R. K., & Smith, D. L. (2000). Combined effects of plant growth-promoting rhizobacteria and genistein on nitrogen fixation in soybean at suboptimal root zone temperatures. *Journal of Plant Nutrition*, 23(5), 593–604. <https://doi.org/10.1080/01904160009382043>

Dénarié, J., Debelle, F., & Promé, J.-C. (1996). *Rhizobium* Lipochitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating

Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 503–535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>

DIEA-MGAP. (2017). Encuesta agrícola “Invierno 2017”. Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA), del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). URL: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/enc\\_agricola\\_inv2017.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/enc_agricola_inv2017.pdf).

Fecha de acceso: noviembre de 2017.

Do Vale Barreto Figueiredo, M., Do Espírito Santo Mergulhão, A. C., Sobral, J. K., De Andrade Lira, M., & De Araújo, A. S. F. (2013). Biological nitrogen fixation: Importance, Associated Diversity, and Estimates. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances* (pp. 267–289). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_10)

Erisman, J. W., A. Sutton, M., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarer, W. (2008). *How a century of ammonia synthesis changed the world. Nature Geoscience - NAT GEOSCI* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1038/ngeo325>

FAO (2017). Cultivos oleaginosos y productos derivados (nota). Food and agriculture organization (FAO). URL: <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/faodef/faodefs/h65f.html>.

Fecha de acceso: noviembre de 2017.

Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., & Pennington, J. S. (1971). Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11, 929–931. <https://doi.org/10.2135/cropsci1971.0011183X001100060051x>

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. a, Cape, J. N., Reis, S., Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1621), 1–13. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>

- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1–2), 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Castro, S., & Dietz, K. J. (2017). Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. *Plant Science*, 263, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.06.009>
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Vörösmarty, C. J. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 413–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>
- H. Kobayashi and W. J. Broughton. (2008). Fine-Tuning of Symbiotic Genes in Rhizobia: Flavonoid Signal Transduction Cascade. In N. W. E. Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I. (Ed.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress*, vol 7 (pp. 117–152). Springer. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7\\_5](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7_5)
- Haag, A. F., Arnold, M. F. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Ferguson, G. P. (2012). Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*- legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.2012.12003>
- Hartman, G. L., West, E. D., & Herman, T. K. (2011). Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x>



Herridge, D. (2008). *Inoculation Technology For Legumes*.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7_4)

Ho, H. M., Chen, R. Y., Leung, L. K., Chan, F. L., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2002). Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *56*(6), 289–295.  
[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00304-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00304-9)

Hubbell, D. H., & Kidder, G. (2009). *Biological nitrogen fixation. Univ Fla IFAS Ext Publ SL16*.

Juge, C., Prévost, D., Bertrand, A., Bipfubusa, M., & Chalifour, F. P. (2012). Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with Bradyrhizobium, Azospirillum and arbuscular mycorrhizae. *Applied Soil Ecology*, *61*(May 2015), 147–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.05.006>

Kape, R., Parniske, M., Brandt, S., & Werner, D. (1992). Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(5), 1705–1710.

Kapulnik, Y., Joseph, C. M., & Phillips, D. A. (1987). Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiology*, *84*(4), 1193–6. <https://doi.org/10.1104/pp.84.4.1193>

Kuzma, M. M., Hunt, S., & Layzell, D. B. (1993). Role of Oxygen in the Limitation and Inhibition of Nitrogenase Activity and Respiration Rate in Individual Soybean Nodules. *Plant Physiology*, *101*(1), 161–169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158660/>

Leibovitch, S., Migner, P., Zhang, F., & Smith, D. (2001). *Evaluation of the Effect of SoyaSignal Technology on Soybean Yield [Glycine max (L.) Merr.] under Field Conditions Over 6 Years in Eastern Canada and the*

Northern United States. *Journal of Agronomy and Crop Science* (Vol. 187). <https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2001.00524.x>

Li, M., Guo, R., Jiao, Y., Jin, X., Zhang, H., & Shi, L. (2017). Comparison of Salt Tolerance in Soja Based on Metabolomics of Seedling Roots. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01101>

Lodeiro, A. R. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.006>

López, N. I., Ruiz, J. A., & Méndez, B. S. (1998). Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 681–684. <https://doi.org/10.1023/A:1008857420434>

Lu, Y., Lam, H., Pi, E., Zhan, Q., Tsai, S., Wang, C., Ngai, S. (2013). Comparative metabolomics in *Glycine max* and *Glycine soja* under salt stress to reveal the phenotypes of their offspring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(36), 8711–8721. <https://doi.org/10.1021/jf402043m>

Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., & Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65(2–3), 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00091-X)

Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W., & Smith, D. L. (2006). Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11–12), 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.10.025>

María C, N., Gretel, G., Costales, D., Freixas-Coutin, J., Guevara, E., S, M., A, F. (2011). *Signals in Soybean's Inoculants*. <https://doi.org/10.5772/14882>

Marks, B. B., Megías, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2013). Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-21>

Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., & Mergaert, P. (2008). Cell Biology Of Nodule Infection And Development. In N. W. E. Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I. (Ed.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, vol 7* (pp. 153–189). Springer. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7\\_6](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7_6)

MGAP-DGSA. (2017). Sistema de Control de Calidad de Inoculantes. Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA), del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). URL: <http://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/inicioweb.aspx> Fecha de acceso: noviembre de 2017.

Miransari, M., & Smith, D. (2008). Using signal molecule genistein to alleviate the stress of suboptimal root zone temperature on soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis under different soil textures. *Journal of Plant Interactions*, 3(4), 287–295. <https://doi.org/10.1080/17429140802160136>

Miransari, M., & Smith, D. L. (2007). Overcoming the stressful effects of salinity and acidity on soybean nodulation and yields using signal molecule genistein under field conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 30(12), 1967–1992. <https://doi.org/10.1080/01904160701700384>

Miransari, M., & Smith, D. L. (2009). Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) – *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis, using signal molecule genistein. *European Journal of Soil Biology*, 45(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.11.002>

Morel, M. a., Braña, V., & Castro-Sowinski, S. (2012). Legume crops, importance and use of bacterial inoculation to increase production. *Crop Plant*, 217–240. <https://doi.org/10.5772/37413>.

Morel, M. A., Cagide, C., Minteguiaga, M. A., Dardanelli, M. S., & Castro-Sowinski, S. (2015). The Pattern of Secreted Molecules During the Co-Inoculation of Alfalfa Plants With *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An Interaction That Improves Plant Yield. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 28(2), 134–42. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0229-R>

Morel, M. A., & Castro-sowinski, S. (2013). *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4>

Muñoz, N., Soria-Díaz, M. E., Manyani, H., Sánchez-Matamoros, R. C., Serrano, A. G., Megías, M., & Lascano, R. (2014). Structure and biological activities of lipochitooligosaccharide nodulation signals produced by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 138 under saline and osmotic stress. *Biology and Fertility of Soils*, 50(2), 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0843-1>

Napoles, M. C., Guevara, E., Montero, F., Rossi, A., & Ferreira, A. (2009). Role of *Bradyrhizobium japonicum* induced by genistein on soybean stressed by water deficit. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7(3), 665–671. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009073-451>

Newton, W. E. (2007). Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 109–129). <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50009-6>

Novák, K., Chovanec, P., Skrdleta, V., Kropáčová, M., Lisá, L., & Nemcová, M. (2002). Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 53(375), 1735–1745. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf016>

O'Brian, M. R., Kirshbom, P. M., & Maier, R. J. (1987). Bacterial heme synthesis is required for expression of the leghemoglobin holoprotein but not the apoprotein in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(23), 8390–8393. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC299548/>

OECD-FAO. (2017). *Perspectivas agrícolas 2017-2026* (OECD-FAO Agricultural Outlook). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. URL: [http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2017-2026\\_agr\\_outlook-2017-en](http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2017-2026_agr_outlook-2017-en). Fecha de acceso: noviembre de 2017.

Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>

Olivares, J., Bedmar, E. J., & Sanjuán, J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *26*(5), 486–94. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0293-CR>

Olsen, P. E., Rice, W. A., Bordeleau, L. M., & Biederbeck, V. O. (1994). Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: The need for an increase in standards. *Plant and Soil*, *161*(1), 127–134. <https://doi.org/10.1007/BF02183093>

Paau, A. S., Bennett, M. L., Kurtenbach, C. J., & Graham, L. L. (1990). Improvement of inoculant efficiency by strain improvement and formulation manipulations BT - Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. In P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, & W. E. Newton (Eds.) (pp. 617–624). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6432-0\\_53](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6432-0_53)

Pan, B., & Smith, D. L. (2000). Preincubation of *B-japonicum* cells with genistein reduces the inhibitory effects of mineral nitrogen on soybean nodulation and nitrogen fixation under field conditions. *Plant and Soil*, 223(1–2), 235–242.

Pan, B., Zhang, F., & Smith, D. L. (1998). Genistein addition to the rooting medium of soybean at the onset of nitrogen fixation increases nodulation. *Journal of Plant Nutrition*, 21(8), 1631–1639. <https://doi.org/10.1080/01904169809365509>

Passaglia, L. M. P. (2017). Bradyrhizobium elkanii nod regulon: Insights through genomic analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3), 703–716. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0228>

Penna, C., Massa, R., Olivieri, F., Gutkind, G., & Cassán, F. (2011). A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-21>

Peters, N., Frost, J., & Long, S. (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233(4767), 977–980. <https://doi.org/10.1126/science.3738520>

Poinsot, V., Crook, M. B., Erdn, S., Maillet, F., Bascaules, A., & Ané, J. M. (2016). New insights into Nod factor biosynthesis: Analyses of chitooligomers and lipo-chitooligomers of *Rhizobium* sp. IRBG74 mutants. *Carbohydrate Research*, 434, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.08.001>

Porter, P. M., Banwart, W. L., & Hassett, J. J. (1985). HPLC isolation and GC-MS identification of genistein, daidzein, and coumestrol from unhydrolyzed soybean root extracts. *Environmental and Experimental Botany*, 25(3), 229–232. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(85\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0098-8472(85)90006-1)

Porter, P. M., Banwart, W. L., & Hassett, J. J. (1986). Phenolic acids and flavonoids in soybean root and leaf extracts. *Environmental and Experimental Botany*, 26(1), 65–73. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(86\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0098-8472(86)90054-7)

Qiu, L., & Chang, R. (2010). The origin and history of soybean. In *The soybean: botany, production and uses* (Vol. 5, pp. 1–23). <https://doi.org/10.1079/9781845936440.0001>

Raghuvanshi, R. (2010). Uses of soybean: products and preparation. *The Soybean: Botany,,* 404–426. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

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*. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.001>

Schmidt, P. E., Broughton, W. J., & Werner, D. (1994). Nod Factors of Bradyrhizobium-Japonicum and Rhizobium Sp Ngr234 Induce Flavonoid Accumulation in Soybean Root Exudate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-7-0384>

Sérandour, J., Reynaud, S., Willison, J., Patouraux, J., Gaude, T., Ravanel, P., Raveton, M. (2008). Ubiquitous water-soluble molecules in aquatic plant exudates determine specific insect attraction. *PLoS ONE*, 3(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003350>

Sieuwert, S., De Bok, F. A. M., Mols, E., De Vos, W. M., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 275–278. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>

Singh, G., & Shivakumar, B. G. (2010). The Role of Soybean in Agriculture. *The Soybean: Botany, Production and Uses.*, 24–47.

Sugiyama, A., Shitan, N., & Yazaki, K. (2007). Involvement of a Soybean ATP-Binding Cassette-Type Transporter in the Secretion of Genistein, a Signal Flavonoid in Legume-Rhizobium Symbiosis. *Plant Physiology*, 144(4), 2000–2008. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096727>

Suzaki, T., & Kawaguchi, M. (2014). Root nodulation: A developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Current Opinion in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.06.002>

Takeshima, K., Hidaka, T., Wei, M., Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Ohwada, T. (2013). Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr. *Microbes and Environments / JSME*, 28(4), 414–21. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13057>

Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 781–805. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>

USDA. (2017). Soybeans & Oil Crops. United States Department of Agriculture (USDA). URL: <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/>. Fecha de acceso: noviembre de 2017.

van Den Dool, H., & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)

Van Look, Gert; Simchem, Gerhard; Heberle, J. (1995). *Silylating Agents*. Fluka Chemie AG. <https://doi.org/10.1002/chin.200740266>

Vieira, R. F., C. Mendes, I., Reis-Junior, F. B., & Hungria, M. (2010). Symbiotic Nitrogen Fixation in Tropical Food Grain Legumes: Current



Status BT - Microbes for Legume Improvement. In M. S. Khan, J. Musarrat, & A. Zaidi (Eds.) (pp. 427–472). Vienna: Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-99753-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-211-99753-6_18)

Vierheilig, H., Bago, B., Albrecht, C., Poulin, M. J., & Piché, Y. (1998). Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5335-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5335-9_2)

W. Weaver, R., & R. Frederick, L. (1974). *Effect of Inoculum Rate on Competitive Nodulation of Glycine max L. Merrill. I. Greenhouse Studies*. *Agronomy Journal - AGRON J* (Vol. 66). <https://doi.org/10.2134/agronj1974.00021962006600020014x>

WWF. (2017). Soy and its uses (nota). World Wide Fund (WWF) For Nature. URL:

[http://wwf.panda.org/what\\_we\\_do/footprint/agriculture/soy/soyreport/soy\\_and\\_its\\_uses/](http://wwf.panda.org/what_we_do/footprint/agriculture/soy/soyreport/soy_and_its_uses/). Fecha de acceso: noviembre de 2017.

Xie, Z. P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Boller, T. (1995). Rhizobial Nodulation Factors Stimulate Mycorrhizal Colonization of Nodulating and Nonnodulating Soybeans. *Plant Physiology*, 108(4), 1519–1525. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1519>

Yuk, H. J., Lee, J. H., Curtis-Long, M. J., Lee, J. W., Kim, Y. S., Ryu, H. W., Park, K. H. (2011). The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Food Chemistry*, 126(3), 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.125>

Zhang, F., & Smith, D. L. (1995). preincubation of bradyrhizobium-japonicum with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root-zone temperatures. *Plant Physiology*, 108(3), 961–968.

Zhang, F., & Smith, D. L. (1996). Inoculation of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil*, 179(2), 233–241. <https://doi.org/10.1007/BF00009333>

Zhang, J., Yang, D., Li, M., & Shi, L. (2016). Metabolic profiles reveal changes in wild and cultivated soybean seedling leaves under salt stress. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159622>

Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374(1–2), 689–700. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1915-6>

## 9. ANEXOS

### Anexo I

#### Medios y soluciones

##### Medio YEM

Componente	Cantidad
Manitol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.75 g
Agua destilada csp	1000 ml
pH	7

##### Medio Jensen 10X

Componente	Cantidad
CaHPO <sub>4</sub>	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	2 g
NaCl	2 g
FeCl <sub>3</sub> 3.4%	2.5 ml
Solución de micronutrientes	10 ml
Agua destilada	1 l
pH	7

**Medio YEM sólido:** YEM adicionado con Agar-Agar 16 g/l

##### Solución de micronutrientes

Componente	Cantidad
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.75 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.04 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.04 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agua destilada	500 ml

##### Buffer fosfato (0.2 M, pH7)

Solución A 0.2 M - fosfato de sodio monobásico: 27.8 g/l

Solución B 0.2 M - fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O): 53.65 g/l

Solución A 39.0 ml + Solución B 61.0 ml + Agua destilada csp en un volumen total de 200 ml.

Se utiliza a una concentración de 50 mM.

**Solución Hiperfosfato:** Fosforita natural – 1 g/l en agua.

Anexo II

Ficha técnica de LIKUIQ®

**Excelencia en inoculación**

**Biopack LIKUIQ**      **Biopack NITRASEC**

**Las mejores herramientas para asegurar la máxima fijación de nitrógeno**

- Seguridad en todos los ambientes.
- Bioprotector Add-It líquido estéril, listo para usar.
- Efecto osmoprotector para mayor sobrevivencia de los rizobios.
- Excelente respaldo técnico.

**+ SOJA**

**+ NITRÓGENO**

**Mejor nodulación, más nitrógeno, más grano, más rendimiento.**

**LAGE y Cía. S.A.**



## FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El nitrógeno es el nutriente más importante para cualquier vegetal, por ser el componente principal de las proteínas. Su adecuado suministro es imprescindible para la formación de todos los tejidos vegetales.

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es el proceso mediante el cual las bacterias denominadas rizobios toman el nitrógeno (N) del aire que se encuentra en una forma química no aprovechable por los vegetales, lo reducen y se lo entregan a la planta de una forma utilizable para su nutrición.

Es importante señalar que 78 % del aire es nitrógeno y por lo tanto la atmósfera constituye un enorme reservorio de este elemento. Los rizobios son uno de los muy pocos géneros de microorganismos y seres vivos del planeta que pueden aprovechar este N a través de la FBN. Para que ésta pueda expresarse, se debe establecer una simbiosis entre los rizobios y la planta leguminosa huésped. En ella, los rizobios alimentan con N a la planta y ésta alimenta los rizobios con fotosíntatos. Si bien la planta debe alimentar con fotoasimilados a las bacterias, esta asociación le permite a la planta el abastecimiento de un altísimo porcentaje del nitrógeno total necesario.

Los rizobios son bacterias de suelo. Para poder establecer simbiosis con la soja, deben infectar la radícula de la planta y luego alojarse en las estructuras radiculares llamadas nódulos. La simbiosis es específica; esto significa que sólo una determinada especie de rizobio puede asociarse con la leguminosa huésped. Los rizobios capaces de nodular y fijar N para la soja pertenecen al género *Bradyrhizobium* (bradyrizobios).

En Uruguay no existen bradyrizobios específicos nativos que puedan infectar la raíz de la soja y fijar nitrógeno. La mejor forma de introducirlos al sistema es a través de la inoculación con inoculantes específicos, a través de la inoculación de la semilla o al surco en la línea de siembra.

El correcto manejo de diversos factores permitirá maximizar la cantidad real de N que aproveche el cultivo por la vía de la FBN, entre ellos la selección de la mejor tecnología de inoculación y el cuidado de todos los aspectos relacionados.

En nuestros ambientes, la FBN es el factor más determinante del rendimiento de la soja. Existe una relación directa y lineal entre el aporte de nitrógeno que realizan los bradyrizobios a la planta y el crecimiento y producción de grano de la misma. Estas razones hacen necesario considerar la inoculación de la soja como una de las principales medidas de manejo del cultivo.





## MÁS BRADYRIZOBIOS POR SEMILLA... MEJOR NODULACIÓN

El número de bradyrizobios por semilla es un excelente indicador de la cantidad de N total que podrá fijar el cultivo de soja y por lo tanto, del rendimiento potencial del mismo. Existe una correspondencia entre la cantidad de bacterias por semilla y el momento de aparición y el número total de nódulos logrados. Cuanto más temprano se formen los nódulos, antes podrá comenzar el abastecimiento del cultivo a partir del N del aire y más eficientes serán los nódulos en su capacidad de fijación de N. Por esta razón, es necesario lograr un alto número de nódulos por planta, correctamente ubicados en su sistema radicular, con gran proporción de nódulos en la parte superior de la raíz principal, para que la FBN exprese todo su potencial.

### CLAVES PARA UNA EXITOSA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

- Planificar la tarea de inoculación y cuidar todos los aspectos relativos a la misma.
- Tener en cuenta que una vez sembrada la semilla no hay posibilidad de corregir fallas cometidas durante el proceso.
- Considerar las necesidades del cultivo respecto de otros nutrientes más allá del N, entre ellos fósforo, azufre y potasio.
- Utilizar semilla de máxima calidad.
- Asesorarse a la hora de elegir la formulación inoculante, de forma que ésta sea la que más se adecue a las condiciones particulares de su cultivo: NITRASEC en turba esterilizada o LIKUIQ acuoso. En situaciones de chacras sin antecedentes de siembra de soja, se recomienda emplear doble dosis de inoculante NITRASEC.
- Siempre sumar al inoculante el tratamiento de las semillas con Bioprotector ADD-IT.
- Utilizar sistemas de inoculación que permitan una correcta dosificación de los productos y un mezclado uniforme de los mismos con la semilla, de forma que todas ellas queden tratadas en forma homogénea.
- En todas las situaciones de inoculación, conservar y almacenar las semillas tratadas en adecuadas condiciones, sin exponer las mismas a la radiación solar directa ni altas temperaturas.
- Si existe la necesidad de utilizar curasemillas fungicidas o insecticidas, seleccionar solamente aquellos productos que aseguren ser compatibles con el inoculante.
- Sembrar en buenas condiciones de humedad en suelo. La siembra "en seco" es perjudicial para el inoculante.
- La utilización de altas cantidades de fertilizante en la línea de siembra afectará la viabilidad de las bacterias del inoculante.

### ¿CUÁNTO NITRÓGENO PRECISA LA SOJA?

El grano de soja es uno de los más ricos en proteínas. Esto implica una alta necesidad de nitrógeno para la formación y llenado de los granos.

Para producir 1 tonelada de grano de soja se precisan 80 Kg de nitrógeno. A modo de ejemplo, para lograr un rendimiento de 3500 Kg/Há, se necesitan 280 Kg/Há de N (esto significa aproximadamente unos 600 Kg/Há de urea, siempre y cuando fuera 100 % aprovechada), lo cual es una cantidad muy elevada. Si bien el suelo aporta parte de ese N, la magnitud de su entrega dependerá del tipo de suelo, su fertilidad natural y otros factores ambientales, pero para las condiciones de Uruguay, la contribución del mismo siempre es muy baja respecto a la necesidad de un cultivo de buen rendimiento. Debido a la altísima cantidad de nitrógeno requerido, la entrega del mismo vía fertilizantes químicos sería económica y ambientalmente impracticable.

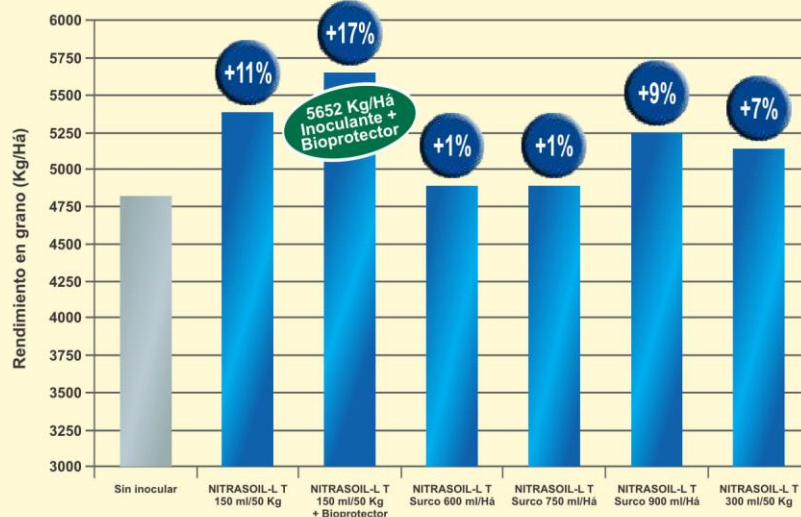
La posibilidad de lograr una exitosa FBN en soja a través de una correcta inoculación permite abastecer al cultivo con elevadas cantidades de nitrógeno de muy bajo costo, de manera ecológica, posibilitando la obtención de los máximos potenciales de rendimiento. Investigaciones realizadas a nivel regional y nacional indican que para nuestros ambientes, la FBN aporta entre un 35 a 80 % del nitrógeno total que necesita la soja, lo cual representa cantidades extremadamente importantes para el cultivo.

**NO ARRIESGUE, INOCULE CON LA CALIDAD PROBADA  
Y APORTE EL MÁXIMO NITRÓGENO A SU SOJA**

**INTA Unidad de Extensión y Experimentación Adaptativa 9 de Julio, Prov. de Buenos Aires  
Ing. Agr. Luis Ventimiglia**

Cultivo antecesor: Soja de 1ra  
Laboreo Convencional  
Fecha de siembra: 10/11/09  
Variedad: DM 3700  
Densidad: 17 semillas/m lineal

Espaciamento: 35 cm  
Repeticiones: 4  
Métodos de inoculación utilizados: Inoculado en semilla y chorreado en el surco.  
El chorreado fue realizado con caudal 40 l/ha = 1,4 ml por metro lineal.



NITRASOIL es marca registrada de LAGE Y CIA. S.A.

**USO DE CURASEMILLAS COMPATIBLES**

En situaciones donde se requiera la utilización de curasemillas, es sumamente importante utilizar solamente aquellos de probada compatibilidad con el inoculante. Se debe priorizar la funcionalidad del inoculante, para asegurar un adecuado suministro de nitrógeno a la planta, por lo que la selección y la forma de aplicación del curasemillas deberá contemplar esta necesidad.

Lage y Cia. S.A. cuenta con una muy amplia línea de curasemillas compatibles, tanto fungicidas como insecticidas, para las distintas situaciones de siembra.

El departamento técnico de la empresa se encuentra a su disposición ante cualquier consulta.



**NUEVOS  
CURASEMILLAS**

Fungicida Curasemillas



Insecticida Curasemillas



## INOCULACIÓN AL SURCO DE SIEMBRA

La aplicación de inoculantes en la línea de siembra es una alternativa válida al tratamiento convencional de las semillas. LIKUIQ es un inoculante que cumple con todas las condiciones necesarias para su aplicación al surco. Las principales características de este sistema son:

### VENTAJAS

- ✓ Reduce el tiempo de exposición de los bradyrizobios a condiciones ambientales adversas.
- ✓ Reduce el tiempo de contacto entre los curasemillas y el inoculante, minimizando así la interferencia negativa de los productos químicos sobre las bacterias del inoculante.
- ✓ Minimiza el período inoculación-siembra, mejorando las condiciones para lograr una adecuada provisión de bacterias vivas al cultivo en implantación, favoreciendo la nodulación.
- ✓ Evita los stocks de semilla inoculada que no pudieron ser sembrados a tiempo.

### SEMBRADORA EQUIPADA CON DOSIFICADOR PARA INOCULACIÓN AL SURCO



### DETALLE DE CHORREADO DEL INOCULANTE



### DETALLE DEL CAÑO DE BAJADA DEL INOCULANTE ENTRE LOS DISCOS

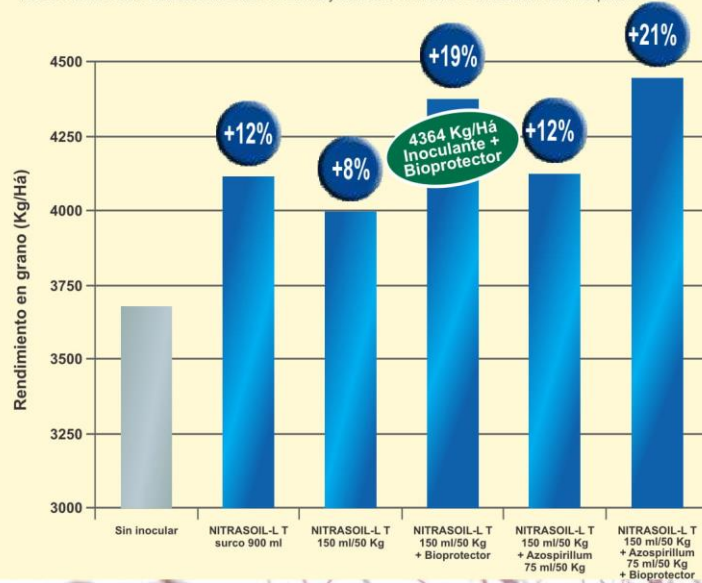




**INTA Unidad de Extensión y Experimentación Adaptativa 9 de Julio, Prov. de Buenos Aires  
Ing. Agr. Luis Ventimiglia**

Cultivo antecesor: Maíz  
Laboreo Convencional  
Fecha de siembra: 14/12/10  
Variedad: NA 4613  
Densidad: 17/18 semillas/m lineal  
Espaciamiento: 0,35 m  
Repeticiones: 4  
Métodos de inoculación utilizados: Inoculado en semilla y chorreado en el surco. Coinoculación con Azospirillum.

**NITRASOIL es  
marca registrada  
de LAGE Y CIA. S.A.**




- **TECNOLOGÍA DE AVANZADA**
- **MÁXIMA CALIDAD DE FORMULACIÓN**
- **ESTRICTOS CONTROLES DURANTE TODAS LAS ETAPAS DE ELABORACIÓN Y ALMACENAMIENTO**
- **PROBADA TRAYECTORIA DE EXCELENTES RESULTADOS EN TODAS LAS CONDICIONES DE CHACRA Y TIPOS DE SUELO DEL PAÍS**
- **LA MEJOR PERFORMANCE, TANTO EN AMBIENTES DE ALTO POTENCIAL COMO EN AQUELLOS CON LIMITACIONES**
- **SÓLIDO RESPALDO TÉCNICO**

Cno. Carrasco 6948 - 11500 Montevideo, Uruguay  
Telefax: 2600 2714\* - [lage@lageycia.com](mailto:lage@lageycia.com) - [www.lageycia.com](http://www.lageycia.com)

**LAGE y Cía. S.A.**

representadidad.com - 2010/10

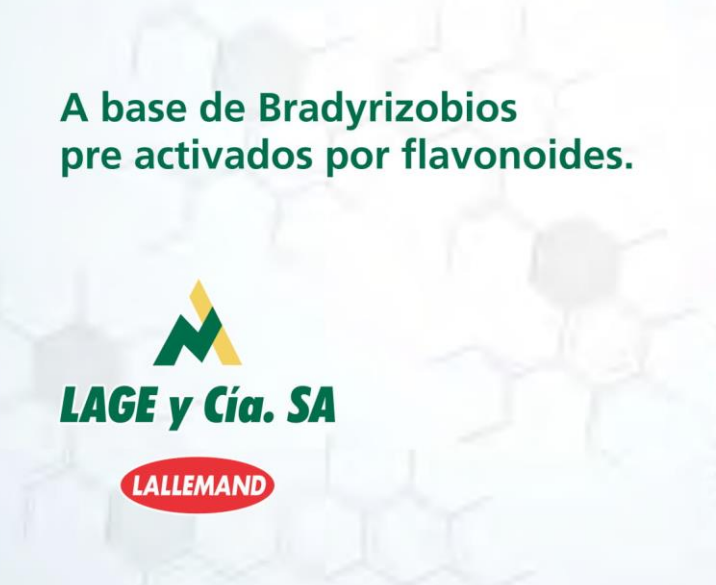




# Inducer®


*Inductor de señales*

**Nodulación exitosa  
garantizada  
aún en situaciones  
de máximo estrés.**

**A base de Bradyrizobios  
pre activados por flavonoides.**



  
**LAGE y Cía. SA**



## ENSAYO DE CAMPO

Empresa consultora: RAKTAL S.A.

Ensayo de eficiencia agronómica – zafra 2016/17

Evaluación del INDUCER comparado ante un testigo comercial inoculado con inoculante base turba.

El ensayo se desarrolló en Ruta 3, Km 381,5 (Paysandú), en un suelo libre de bacterias fijadoras de nitrógeno específicas para soja. El diseño fue en bloques completamente al azar, con cuatro repeticiones. Se tomaron precauciones para evitar riesgos de contaminación entre los distintos tratamientos como desinfección de la sembradora y distancia entre parcelas.

Fecha de siembra: 18 de noviembre del 2016

Historia de chacra: campo natural

Fecha de cosecha: 25 de abril del 2017

N-NO<sub>3</sub> en la implantación: 18 ppm.

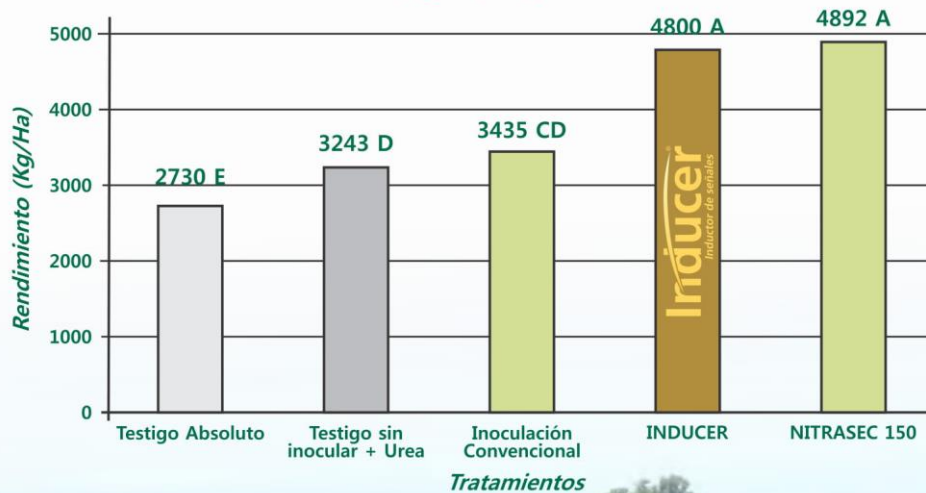
### Tratamientos:

- 1) Testigo absoluto (sin inocular y sin aplicación de nitrógeno como fertilizante)
- 2) Testigo sin inocular y con fertilización nitrogenada, con 100 Kg/Ha de urea a la siembra y 100 Kg/Ha de urea en floración
- 3) Testigo referente comercial con inoculante de turba + protector, inoculado el día de la siembra (Inoculación Convencional)
- 4) Semilla inoculada con INDUCER + Add-It
- 5) Semilla inoculada con NITRASEC 150 + Add-It \*

Todos los tratamientos (1 al 5) fueron curados con curasemilla Trilogy (Fludioxonil 25g/L + Thiabendazole 150 g/L + Metalaxil-M 20 g/L).

\*NITRASEC 150 es una nueva formulación de inoculante en soporte de turba

### Evaluación de rendimiento (Kg/Ha) según tratamiento.



## ENSAYO DE CAMPO

Empresa consultora: SERVAG S.A.

Ensayo de eficiencia agronómica – zafra 2016/17

Evaluación del INDUCER comparado ante un testigo comercial inoculado con inoculante base turba.

En la zafra 2016/17 en Ruta 20, Km 55,5 (Río Negro), se evaluó la cantidad y peso de nódulos de INDUCER frente a un testigo comercial en un campo sin historia de soja.

Durante la determinación de la nodulación, no se presenció contaminación de los testigos (los testigos sin inocular no presentaron nódulos).

Las muestras se extrajeron con el cultivo en R2-R3, con la presencia de autoridades del MGAP-DGSA y posteriormente fueron analizadas por dicha autoridad.

### Tratamientos:

- 1) Testigo absoluto (sin inocular y sin aplicación de nitrógeno como fertilizante)
- 2) Testigo sin inocular y con fertilización nitrogenada, con 100 Kg/Ha de urea a la siembra y 100 Kg/Ha de urea en floración
- 3) Testigo referente comercial con inoculante de turba + protector, inoculado el día de la siembra (Inoculación Convencional)
- 4) Semilla inoculada con INDUCER + Add-It
- 5) Semilla inoculada con NITRASEC 150 + Add-It \*

Todos los tratamientos (1 al 5) fueron curados con curasemilla Trilogy (Fludioxonil 25g/L + Thiabendazole 150 g/L + Metalaxil-M 20 g/L).

\*NITRASEC 150 es una nueva formulación de inoculante en soporte de turba

### Promedio de número de nódulos por planta según tratamiento

Tratamiento	Medias (nódulos/planta)	Diferencia significativa
Testigo sin inocular y sin N	0	A
Testigo sin inocular y con N	0	A
Inoculación Convencional	29	B
INDUCER	37	BC
NITRASEC 150	56	C

### Promedio de peso seco de nódulos por planta (mg/planta)

Tratamiento	Medias (mg/planta)	Diferencia significativa
Testigo sin inocular y sin N	0	A
Testigo sin inocular y con N	0	A
Inoculación Convencional	194	B
INDUCER	203	B
NITRASEC 150	166	B







Formulación que incluye señales moleculares  
junto con los Bradyrizobios específicos.

La adición de flavonoides estimula el  
proceso de reconocimiento planta-bacteria.

Muy elevada concentración de Bradyrizobios con  
excelente estabilidad y protección osmótica incorporada.

Favorece una excelente nodulación y el  
establecimiento de una simbiosis exitosa.



Cno. Carrasco 6948 / 11500. Montevideo, Uruguay  
Tel: (598) 2600 2714 / [www.lageycia.com](http://www.lageycia.com)

Anexo III

Ficha técnica de Add-it®



**Bioprotector  
Add-it**

*Producto estéril  
Máxima protección  
Formulación líquida  
Más práctico de usar*

**LAGE y Cía. S.A.**

The advertisement features a central image of a tree's root system, showing some roots with dark, possibly diseased areas. The text 'Bioprotector Add-it' is overlaid in large, bold, blue letters with a white outline. Below this, four lines of text describe the product's benefits: 'Producto estéril', 'Máxima protección', 'Formulación líquida', and 'Más práctico de usar'. At the bottom left, two bags of the product are shown: one blue and one brown, both with labels that include the product name and technical details. At the bottom right, the logo for 'LAGE y Cía. S.A.' is displayed, consisting of a stylized green and yellow 'M' shape above the company name in bold green letters.



Bioprotector Add-it ha sido especialmente desarrollado por Lage y Cía. para maximizar el desempeño de las formulaciones de inoculantes NITRASEC y LIKUIQ en todo tipo de condiciones ambientales.

Bioprotector Add-it es una formulación líquida, estéril, de máxima pureza, superior a los adherentes convencionales.

Bioprotector Add-it aumenta el número y la sobrevivencia de los bradyrizobios sobre la semilla y a nivel de suelo.

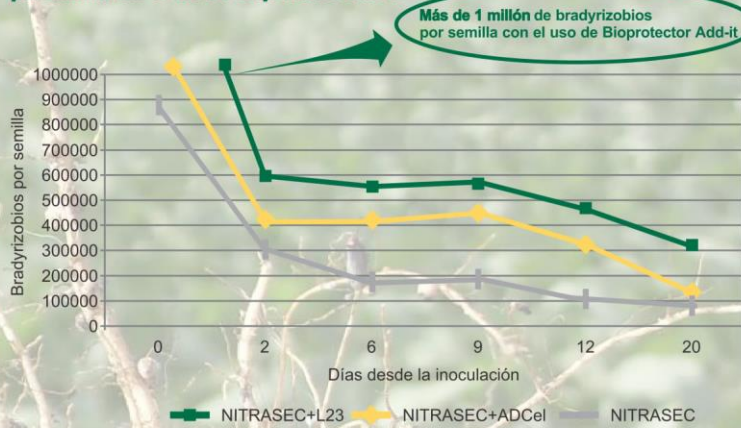
*Cuando se inoculan semillas con LIKUIQ, la formulación de Add-it tiñe las semillas de color azul, lo que permite verificar la calidad del tratamiento.*

**NITRASEC + Bioprotector Add-it**  
**LIKUIQ + Bioprotector Add-it Azul**

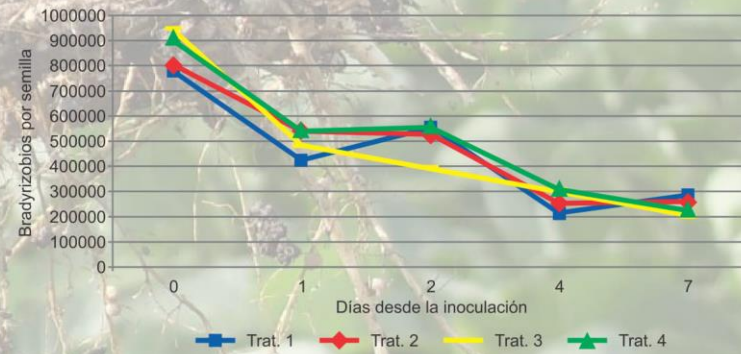
### **PRINCIPALES FUNCIONES DE Bioprotector Add-it**

- **PROTEGE** los bradyrizobios del inoculante de las condiciones de desecación y alta temperatura.
- **ADHIERE** los bradyrizobios a las semillas, de forma que las altísimas concentraciones de bacterias de nuestras formulaciones NITRASEC y LIKUIQ se trasladen a las semillas.
- **MINIMIZA** los efectos tóxicos nocivos que pueden presentar determinadas formulaciones curasemillas fungicidas o insecticidas.
- **NUTRE** a los bradyrizobios con fuentes de carbono, macro y micronutrientes hasta que los mismos logren establecer la simbiosis con la planta y nutrirse de los fotoasimilados.

**Aumento de la sobrevivencia de bradyrizobios por semilla con el uso de Bioprotector Add-it**



**La siguiente gráfica muestra la excelente sobrevivencia de bacterias por semilla lograda con Likuiq + Bioprotector Add-it Azul, independientemente de que se agregue o no agua en el tratamiento.**



Según el equipo a utilizar (máquina Treater, carro o tolva de semillas), se puede realizar el tratamiento sin agua o con un máximo de hasta 250 ml de agua cada 50 Kg de semillas sin afectar el número de bradyrizobios por semilla.

- Trat. 1: LIKUIQ + BIOPROTECTOR Add-it
- Trat. 2: LIKUIQ + BIOPROTECTOR Add-it + agua 50 ml / 50 Kg de semilla
- Trat. 3: LIKUIQ + BIOPROTECTOR Add-it + agua 150 ml / 50 Kg de semilla
- Trat. 4: LIKUIQ + BIOPROTECTOR Add-it + agua 250 ml / 50 Kg de semilla

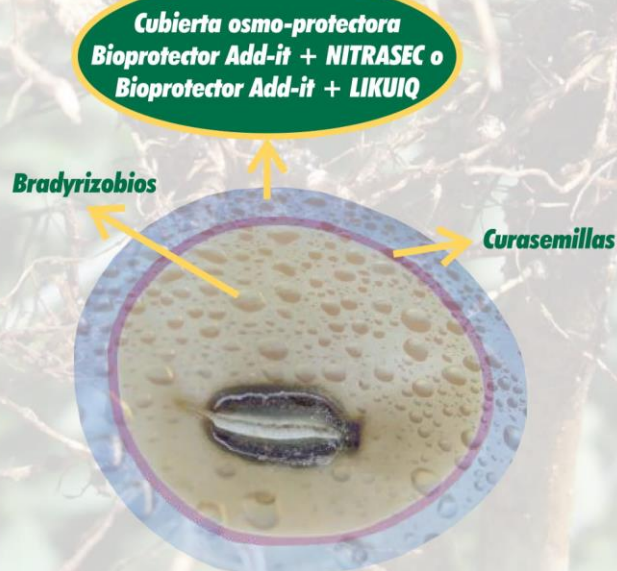




El uso de Bioprotector Add-it permite aumentar la sobrevivencia de las bacterias provenientes del inoculante sobre las semillas de soja. Esto significa que cada semilla tendrá una mayor cantidad de bradyrizobios viables durante más días y en adecuadas condiciones para infectar correctamente la raíz de la planta.

Además de lograr una alta carga de bacterias por semilla, Bioprotector Add-it asegura el mantenimiento de las bacterias en un óptimo estado fisiológico para poder establecer rápidamente la simbiosis con la soja.

**La matriz formada por Bioprotector Add-it en el entorno de la semilla brinda un efecto osmo-protector que permite mantener a los bradyrizobios en forma metabólicamente activa.**



Cno. Carrasco 6948 - 11500 Montevideo, Uruguay  
Telefax: 2600 2714\* - [lage@lageycia.com](mailto:lage@lageycia.com) - [www.lageycia.com](http://www.lageycia.com)

  
**LAGE y Cía. S.A.**

rapirepublicidad.com - Julio 2011

## Anexo IV

### Instrucciones de uso de LIKUIQ

## EXCELENCIA EN INOCULACIÓN



### RECOMENDACIONES GENERALES

La tecnología de inoculación en soja es una de las medidas de manejo del cultivo de mayor impacto productivo y económico. La misma permite, a través del proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno, el suministro de altísimas cantidades de nitrógeno de excelente aprovechamiento por parte de la planta. La correcta implementación de la tecnología de inoculación requiere de una adecuada planificación y cuidado de diversos aspectos durante su ejecución.

La inoculación de las semillas implica utilizar productos biológicos que contienen bacterias vivas, por lo cual el manejo de los mismos y de la semilla inoculada debe ser tal que permita el mantenimiento de las bacterias en un adecuado estado fisiológico hasta la infección de la raíz y posterior formación de nódulos.

El tipo de formulación inoculante, **NITRASEC en soporte turba** o **LIKUIQ en soporte acuoso** es un factor de suma importancia. La elección del mismo dependerá de la situación particular de la chacra o lote a sembrar, tipo de laboreo, fecha de siembra y aspectos logísticos de la operativa de inoculación y siembra.

**ADD-IT** es una herramienta tecnológica que brinda efecto osmoprotector para los *Bradyrhizobium* del inoculante. Su formulación estéril a base de polímeros y sustancias nutritivas logra una excelente adherencia y aumenta la sobrevivencia de las bacterias del inoculante sobre las semillas y en el suelo, favoreciendo una mejor y más temprana nodulación.

En situaciones de chacras sin antecedentes de siembra de soja, se recomienda emplear doble dosis de inoculante **NITRASEC**.

En situaciones donde además de inocular las semillas se decida tratarlas con curasemillas fungicidas o insecticidas, repelentes de pájaros, fertilizantes, polímeros o cualquier otro tipo de productos de aplicación en semilla, se deben utilizar solamente aquellos productos probadamente compatibles con los inoculantes, para no afectar el desempeño de los mismos. La compatibilidad de los curasemillas y otros productos de aplicación en semillas no depende solamente del principio activo, sino también del resto de los agentes de formulación (tales como colorantes, solventes, excipientes, conservantes). No se deben utilizar aquellos productos de los cuales no se conozca el nivel de compatibilidad con los inoculantes. Cuando se utilicen curasemillas compatibles, éstos nunca deben ser mezclados en forma conjunta con el inoculante en un recipiente de preparación o en un tacho dosificador de la máquina aplicadora. En este último caso, las tareas pueden hacerse en forma simultánea, ubicando el inoculante en el cajón superior de la curadora e inoculadora **TREATER** y el otro tratamiento de semillas en el cajón inferior.

### ASPECTOS RELEVANTES A NIVEL DE CAMPO

Se señalan diversas condiciones de manejo del tratamiento de semillas y del cultivo, que son de gran relevancia para la optimización de la tecnología de inoculación en soja:

Evitar por completo la exposición de la semilla inoculada al sol o el mantenimiento de la misma en condiciones de alta temperatura. Llevar a la chacra solamente la cantidad de semilla a sembrar seguidamente.

Sembrar en condiciones de buena humedad en suelo. La siembra "en seco" es perjudicial para el inoculante. La siembra en suelo con adecuada cobertura de rastrojo favorece el mantenimiento de la humedad del suelo y por lo tanto mejora las condiciones para la expresión de la nodulación en las plantas.

La utilización de altas cantidades de fertilizante en la línea de siembra afectará la viabilidad de las bacterias del inoculante.

En aquellas situaciones de suelos de elevada fertilidad natural, antecesor pradera o cultivos antecesores que conllevan altos niveles de fertilización nitrogenada (como el cultivo de papa), o chacras con laboreo convencional, se deben extremar los cuidados de inoculación y manejo de semilla inoculada, ya que la disponibilidad de altos niveles de nitrógeno en suelo retrasa el inicio de la nodulación y limita su adecuada expresión.

Realizar una adecuada fertilización del cultivo con otros nutrientes más allá del nitrógeno, tales como fósforo, potasio, azufre y micronutrientes.

Condiciones de siembra en suelos de alta acidez, estructura inadecuada, compactados o con riesgo de anegamiento, afectan el normal crecimiento del cultivo y por lo tanto también afectan el logro de una adecuada nodulación.





# INOCULACIÓN CON LIKUIQ Y ADD-IT

## APLICACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y TRATAMIENTO DE LA SEMILLA

### INSTRUCCIONES DE USO

Verifique la fecha de vencimiento de los productos.

Conserve los productos **LIKUIQ** y **ADD-IT** a la sombra y en un lugar fresco, preferentemente a temperatura no superior a los 20°C.

Las tareas de preparación de los productos y de inoculación de las semillas deben realizarse a la sombra y en un lugar fresco.

Emplee utensilios y herramientas limpios, sin residuos de agroquímicos, combustibles o lubricantes.

El agua a utilizar debe ser libre de cloro.

La semilla inoculada debe ser mantenida a la sombra y en un lugar fresco hasta ser sembrada.

**DOSIS DE INOCULACIÓN:** 300 ml de **LIKUIQ** + 100 ml de **ADD-IT** para tratar 100 Kg de semillas de soja.

### TABLA DE DOSIFICACIÓN CON INOCULANTE LIKUIQ

SEMILLAS	INOCULANTE LIKUIQ	ADD-IT
50 Kg	150 mililitros	50 mililitros
100 Kg	300 mililitros	100 mililitros
1000 Kg	3 litros	1 litro
3000 Kg	9 litros	3 litro

### MÉTODO DE APLICACIÓN

Utilizar una máquina inoculadora **TREATER**, especialmente diseñada para realizar este tratamiento de semillas, pues optimiza la inoculación, mejora la población final de bacterias sobre cada semilla y evita pérdidas mecánicas, sin dañar las semillas.

En caso de definir el tratamiento de la semilla con otros productos además del inoculante, se deben utilizar solamente aquellos productos probadamente compatibles con el inoculante. Nunca se debe mezclar el inoculante con el curasemillas.

### PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INOCULANTE Y TRATAMIENTO DE SEMILLAS

Agitar los envases de **ADD-IT** y **LIKUIQ** antes de abrir. Utilizar todo el contenido de los envases de **ADD-IT** y **LIKUIQ** en el mismo día de abiertos. Descartar excedentes.

En un recipiente limpio mezclar según las proporciones de la tabla dosificadora las cantidades necesarias de **LIKUIQ** y **ADD-IT** (según el sistema de aplicación del inoculante y tipo de máquina inoculadora a utilizar, puede ser necesario el agregado de cierta cantidad de agua en la preparación de los productos). Calibre la máquina inoculadora con la mezcla preparada anteriormente corroborando que 400 ml de la mezcla **LIKUIQ + ADD-IT** (en caso de no utilizar agua) sean descargados en el tiempo de pasaje de 100 Kg de semillas. Comience el tratamiento de la semilla, verificando que todas queden recubiertas de manera uniforme.

**El Departamento Técnico de Lage y Cía. S.A. se encuentra a su disposición ante cualquier consulta.**

Lage y Cía. S.A. garantiza la calidad de este producto al momento de ser entregado al comprador. Dado que el transporte, almacenaje, manejo y aplicación del mismo se realiza fuera de su control y en condiciones de medio variables, Lage y Cía. S.A. no se hace responsable por los daños y perjuicios que pudieran derivarse del empleo del producto, o por el incumplimiento de las recomendaciones detalladas especialmente en este envase para su conservación, uso y aplicación. En caso de reclamo, la garantía de este producto se limita únicamente a su reposición, siempre y cuando se hubieren cumplido con las instrucciones y recomendaciones detalladas en cada envase, así como en este instructivo.

**LIKUIQ**

**LAGE y Cía. S.A.**

## Anexo V

### Análisis de contenido de nitrógeno en el sustrato

Montevideo, 28/6/2016

**Atte. : Lage SA**

Fecha: 28/6/2016

#### ANALISIS DE SUELOS

	Ppm N-NO3
Ignacio Sicardi	10

- El laboratorio no se responsabiliza por el muestreo realizado.
- El presente informe no puede ser reproducido total o parcialmente sin la autorización expresa de Ecolab.

Sin otro particular, saluda atte. :

MSc Gonzalo Heijo