

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

LIC. LUCÍA NUÑEZ BUZÓ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA VAZ  
DIRECTORA ACADÉMICA: DRA. NORA ALTIER

TRIBUNAL:  
DRA. NATALIA BAJSA  
DRA. SANDRA LUPO  
DRA. STELLA ZERBINO

Montevideo- Uruguay

**2017**

**Este trabajo fue realizado en:**

Laboratorio de Microbiología de Suelos

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria- Las Brujas

Canelones, Uruguay.

**Financiado por:**

ANNI

Proyecto INNOVAGRO FSA\_1\_2013\_1\_12444

## AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer muy especialmente a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

A Patricia Vaz y Nora Altier por brindarme la oportunidad y sus conocimientos para formarme como profesional.

Al tribunal Stella Zerbino, Sandra Lupo y Natalia Bajsa por sus valiosos consejos y aportes para mejorar esta tesis.

A los integrantes de los laboratorios de Microbiología de Suelos y de Bioprotección de INIA- Las Brujas.

A los investigadores Elena Beyhaut, Eduardo Abreo, Carlos Pérez, Silvina Stewart y Sebastián Martínez que colaboraron de distintas maneras en este proyecto.

A Omar Borsani por sus aportes en la presentación de avance de tesis.

A toda mi familia, por el apoyo incondicional de siempre.

A mi Arturo por esos días de pesca y mates a orillas del Arroyo Valentines escribiendo la tesis y por muchos días más juntos.

A todas las personas que estuvieron y me apoyaron para seguir adelante.

GRACIAS A TODOS !!!



# Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Salud del suelo	4
1.3 Indicadores de salud del suelo	6
1.4 Actinobacterias como indicadores biológicos	8
1.5 Sistema de estudio	9
1.5.1 Microorganismos causantes de enfermedades de implantación	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	14
2.1 Hipótesis del trabajo	14
2.2 Objetivos	14
2.2.1 <i>Objetivo general</i>	14
2.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	14
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
3.1 Muestreo de suelos	15
3.2 Aislamientos de <i>Pythium</i> spp.	17
3.3 Extracción de ADN de aislados de <i>Pythium</i> spp.	18
3.3.1 <i>Amplificación por PCR</i>	19
3.3.2 <i>Secuenciación, alineamiento y árbol filogenético</i>	19
3.4 Microorganismos utilizados	19
3.5 Ensayo para la determinación del índice de patogenicidad en suelo (IP)	20
3.6 Densidad bacteriana, de actinobacterias e inhibidores	21
3.6.1 <i>Siembra de organismos blanco:</i>	22
3.7 Propiedades fisicoquímicas de los suelos	23
3.8 Análisis estadísticos	24
<b>4. RESULTADOS</b>	25
4.1 Aislados de <i>Pythium</i> spp.	25
4.2 Índice de patogenicidad en suelo (IP)	27
4.3 Densidad e intensidad de inhibición de bacterias totales y actinobacterias	29
4.4 Densidad e intensidad de inhibidores para <i>Pythium</i> spp.	31
4.5 Densidad e intensidad de inhibición para <i>Bradyrhizobium</i> spp.	34
4.6 Relación entre las variables bióticas y abióticas de los suelos	38
<b>5. DISCUSIÓN</b>	42

5.1 Índice de patogenicidad en suelo (IP) .....	42
5.2 Densidad de bacterias totales y actinobacterias.....	42
5.3 Densidad e intensidad de inhibidores para <i>Pythium</i> spp.....	43
5.4 Densidad e intensidad de inhibidores para <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	44
5.5 Relación entre las variables bióticas y abióticas de los suelos.....	45
<b>6. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>47</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>48</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>54</b>
A. Medios de Cultivos y soluciones .....	54
B. Análisis fisicoquímicos .....	55
C. Salidas de ACP .....	57
<b>9. ABREVIATURAS .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Indicadores físicos, químicos y biológicos de salud del suelo.....	7
<b>Tabla 2.</b> Muestreo de los sitios del litoral oeste y este del país con y sin historia de soja el verano anterior.....	15
<b>Tabla 3.</b> Características de los microorganismos utilizados.....	20
<b>Tabla 4.</b> Germinación de semillas de soja .....	27
<b>Tabla 5.</b> Resultados de los contrastes para número de semillas germinadas sin microondas en papel y maceta.....	29
<b>Tabla 6.</b> Resultados de los contrastes para bacterias totales y actinobacterias.....	31
<b>Tabla 7.</b> Resultados de los contrastes de densidad de inhibidores de ILB322 e ILB315.....	33
<b>Tabla 8.</b> Resultados de los contrastes de intensidad de inhibición sobre el blanco ILB315 entre sitios.....	34
<b>Tabla 9.</b> Resultados de contrastes de densidad de inhibidores de las cepas <i>B. elkanii</i> U1301 y U1302.....	36
<b>Tabla 10.</b> Resultados de los contrastes de la intensidad de inhibición de las cepas U1301 y U1302 entre sitios.....	38
<b>Tabla 11.</b> Tabla de correlaciones entre las variables fisicoquímicas analizadas.....	39
<b>Tabla 12.</b> Propiedades físicas de los suelos de los 13 sitios.....	55
<b>Tabla 13.</b> Análisis químicos de los suelos de los 13 sitios.....	56

### FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Capas y componentes del suelo.....	2
<b>Figura 2.</b> Red trófica del suelo.....	2
<b>Figura 3.</b> Concepto de salud del suelo.....	5
<b>Figura 4.</b> Características de los suelos supresivos.....	6
<b>Figura 5.</b> Árbol filogenético de la vida.....	9
<b>Figura 6.</b> Semillas de soja con síntomas de damping-off.....	11
<b>Figura 7.</b> Sitios muestreados.....	16

<b>Figura 8.</b> Esquema del muestreo.....	17
<b>Figura 9.</b> Estructuras reproductivas de <i>Pythium</i> spp.....	18
<b>Figura 10.</b> Zonas de inhibición causadas por actinobacterias.....	23
<b>Figura 11.</b> Árbol filogenético de las especies de <i>Pythium</i> .....	26
<b>Figura 12.</b> Índice de patogenicidad (IP) de los suelos de los 13 sitios.....	28
<b>Figura 13.</b> Correlación entre el índice de patogenicidad (IP) en macetas y en papel.....	28
<b>Figura 14.</b> Recuento en placa de bacterias totales (log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>3</sup> ) para los 13 sitios.....	30
<b>Figura 15.</b> Recuento en placa de actinobacterias (log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>3</sup> ) para los 13 sitios.....	30
<b>Figura 16.</b> Densidad de inhibidores de <i>Pythium irregulare</i> (ILB322) en los suelos de los 13 sitios .....	32
<b>Figura 17.</b> Densidad de inhibidores de <i>Pythium paroecandrum</i> (ILB315) en los suelos de los 13 sitios.....	31
<b>Figura 18.</b> Valores promedio de intensidad de inhibición (mm) de <i>Pythium paroecandrum</i> (ILB315) en los suelos de los 13 sitios.....	33
<b>Figura 19.</b> Densidad de inhibidores de <i>B. elkanii</i> U1301 (UFC/cm <sup>3</sup> ) en los suelos de los 13 sitios.....	35
<b>Figura 20.</b> Densidad de inhibidores de <i>B. elkanii</i> U1302 (UFC/cm <sup>3</sup> ) en los suelos de los 13 sitios.....	35
<b>Figura 21.</b> Intensidad de inhibición de <i>B. elkanii</i> U1301 (mm) en los suelos de los 13 sitios.....	37
<b>Figura 22.</b> Intensidad de inhibición de la cepa U1302 (mm) en los suelos de los 13 sitios.....	37
<b>Figura 23.</b> Análisis de componentes principales (ACP).....	40

## RESUMEN

El término salud del suelo se refiere a las dinámicas biológicas que ocurren en él, entre otras, a la capacidad que tienen las comunidades del mismo de proteger a los cultivos de enfermedades provocadas por patógenos. La supresividad, patogenicidad y ciclado de nutrientes son propiedades dadas por las comunidades microbianas, quienes a su vez están influenciadas por la estructura química, física y el uso y manejo del suelo. Los suelos naturalmente supresivos tienen la capacidad de evitar el desarrollo de enfermedades en los cultivos incluso en presencia del agente fitopatógeno. En los mismos se suelen encontrar bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, capaces de producir compuestos supresores de patógenos como antibióticos. En nuestro país, para proteger a la semilla de soja de patógenos se utilizan comúnmente fungicidas curasemillas. Sin embargo, el uso de curasemillas afecta negativamente a los rizobios, bacterias responsables de la fijación biológica de nitrógeno en la soja. Este trabajo buscó identificar características bióticas y abióticas (tipo de suelo, historia de la chacra) asociadas a la presencia de comunidades microbianas capaces de reducir el efecto de patógenos de implantación, particularmente, del género *Pythium*. Se desarrollaron herramientas que contribuirán para el diseño de un índice de salud del suelo basado en la capacidad de las comunidades microbianas nativas de reducir las enfermedades de implantación. De esta manera se busca cooperar de forma rápida y eficaz con la toma de decisiones a la hora de la utilización de curasemillas.

Los resultados de este trabajo brindaron conocimiento de cómo las densidades de bacterias, actinobacterias, e inhibidores de *P. irregulare*, *P. paroecandrum*, *Bradyrhizobium elkanii* (U1301 y U1302) y *B. japonicum* (E109) varían entre suelos de distintas zonas del país con o sin historia de cultivo de soja. Así mismo, se encontraron correlaciones significativas entre variables físicas, químicas y biológicas, lo cual indica su potencial como factor indicador de salud del suelo.

## PALABRAS CLAVES:

Salud del suelo, comunidades microbianas, indicadores biológicos, *Pythium*, *Bradyrhizobium*.



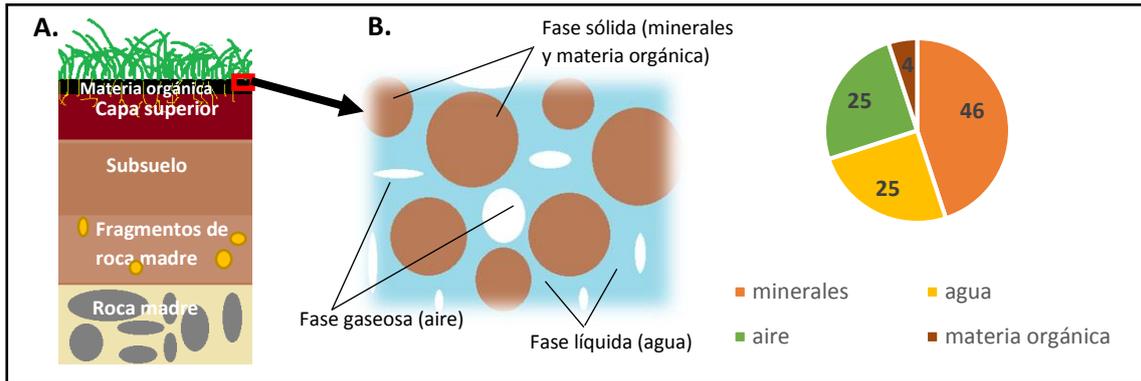
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción general

El suelo es un recurso fundamental para la producción agrícola que permite producir alimentos a gran escala y nutrir al ganado. Es el reservorio más importante de nutrientes para el crecimiento vegetal y contribuye al mantenimiento de los procesos ecosistémicos (Warkentin, 2001). Al ser un recurso no renovable a escala humana, se degrada fácilmente y su regeneración es lenta, difícil y costosa, requiriendo de cuidados especiales por parte de sus usuarios (FAO, 2011).

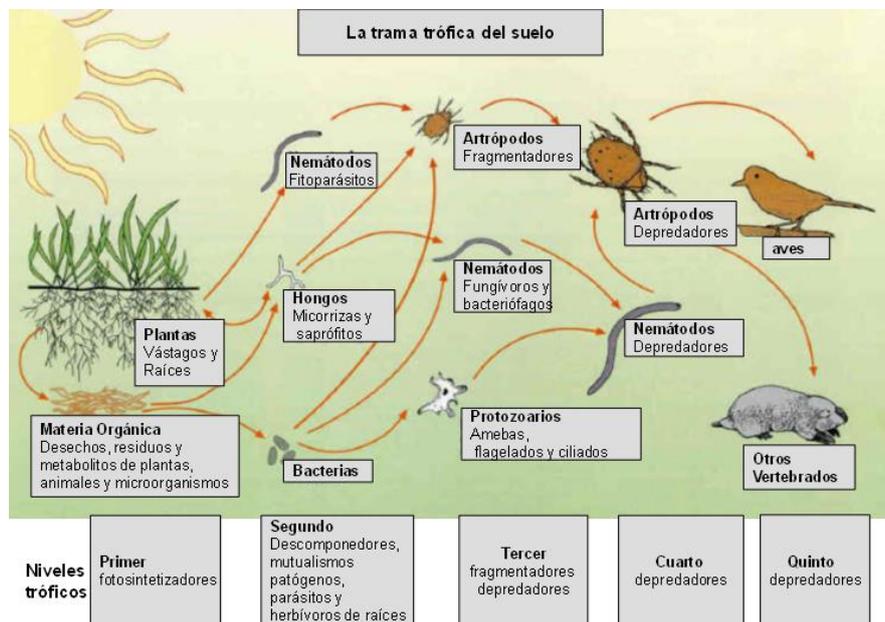
El suelo es la interfaz entre la litosfera (rocas), atmósfera (aire), la hidrósfera (agua), y la biósfera (seres vivos). En él ocurren interacciones entre sus diversos componentes físicos, químicos y biológicos (The Cornell Framework Manual, 2016).

Constituye una capa que se ha formado a través de los siglos junto con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento. Las plantas y animales que crecen y mueren dentro y sobre el suelo son descompuestos por los microorganismos que lo habitan, transformados en materia orgánica y mezclados con él (FAO, 1996). Es un sistema que contiene sólidos, líquidos y gases en una matriz tridimensional (figura 1). Los componentes sólidos incluyen rocas de varios tamaños, minerales y materia orgánica. A su vez, la materia orgánica se compone de restos de hojas, raíces y animales que sirven como fuente de energía para la biota que habita el suelo. Los organismos del suelo consumen estos nutrientes y lo transforman en materia orgánica, conocida como humus, que se une a los minerales del suelo formando agregados (fase sólida). Los espacios localizados entre los agregados sólidos, llamados poros, están ocupados por agua, aire y biota. La mayoría de las raíces de las plantas y organismos edáficos habitan en ellos; sin embargo, algunas bacterias habitan en diminutos microporos dentro de los agregados (Whalen y Sampedro, 2009). El agua (fase líquida) y el aire (fase gaseosa) son fundamentales para la vida en el suelo, porque la primera permite transportar los nutrientes para que sean tomados por las plantas y que los microorganismos se desplacen; por su parte el aire proporciona el oxígeno necesario para el funcionamiento celular de organismos aeróbicos.



**Figura 1.** Capas y componentes del suelo. A: Capas del suelo compuestas por materia orgánica, capa superior, subsuelo, fragmentos de la roca madre y roca madre. B: Componentes del suelo. Se observan tres componentes que corresponde a una fase sólida (minerales y materia orgánica que representan un 50%), líquida (agua, 25 %) y gaseosa (aire, 25%). Adaptado de: <https://www.earthsoils.com/soil-composition/>

El suelo es hábitat de una gran diversidad de organismos que forman parte de la red trófica del suelo, que incluye desde bacterias, algas, hongos y protozoos, hasta los más complejos nematodos, artrópodos, lombrices, pequeños vertebrados y plantas (figura 2; Ingham et al., 2000).



**Figura 2.** Red trófica del suelo (Soil Food Web, en inglés). El diagrama muestra la comunidad de organismos que habitan en el suelo y las conversiones (representadas por las flechas) de energía y nutrientes como un organismo se alimenta de otro. Modificado de: Ingham et al., 2000. Disponible en: <http://www.nrcs.usda.gov>

Muchos suelos representan un ambiente oligotrófico, es decir un medio nutricionalmente pobre. En consecuencia, los microorganismos y sus actividades no se encuentran homogéneamente distribuidos, sino que se concentran en ciertos nichos o manchas hospederas, ricas en nutrientes, tales como la rizósfera, el tracto digestivo de algunos animales, cerca de substratos orgánicos e inorgánicos disponibles, y, los más pequeños, en los poros del suelo llenos de agua donde sus depredadores se ven excluidos (England et al., 1993; Hassink, 1994).

Los organismos del suelo se asocian e interactúan entre sí, realizando diversas funciones. Cuando hay abundancia de nutrientes y mínima perturbación de este recurso, la red trófica del suelo ayuda a mantener la auto-regulación de los organismos que forman parte de la misma (Magdoff y van Es, 2009).

La biota microbiana participa en funciones esenciales de los ecosistemas, intervienen en la descomposición de la materia orgánica y en los ciclos de nutrientes, suprimen enfermedades, y regulan el crecimiento de las plantas (Parkinson y Coleman, 1991; Killham, 1994; van Elsas y Smalla, 1997), (Iglesias, 2008).

Bacterias y hongos cumplen un rol fundamental en el suelo como degradadores primarios de la materia orgánica, por lo que determinan los nutrientes disponibles para las plantas y la cantidad de carbono almacenado en el suelo. Estos microorganismos son abundantes en la rizósfera en donde regulan el crecimiento de la planta a través de múltiples procesos. Más del 80 % de las plantas están asociadas simbióticamente a hongos micorrízicos que le proporcionan nutrientes a las mismas y éstas compuestos azucarados de la fotosíntesis. Algunas especies de plantas se asocian con bacterias fijadoras de nitrógeno como las del género *Bradyrhizobium* proporcionando el nitrógeno necesario para el crecimiento de la planta (Lavelle et al., 2006, Wurst et al., 2012). Esto demuestra la importancia de la biota microbiana en el funcionamiento del suelo.

Muchos de los sistemas de manejo del suelo y los cultivos actuales son insostenibles. Por ejemplo, el uso excesivo de fertilizantes ha dado lugar a la acumulación de nitrógeno (N), lo que constituye una amenaza para los sistemas biológicos (Hettelingh et al., 2008). Wagg et al. (2014) demostraron que cambios en comunidades microbianas del suelo y la pérdida de la biodiversidad a causa de ciertas actividades antropogénicas, como la

intensificación de la agricultura y el uso y manejo del suelo tiene consecuencias en el mantenimiento de la sustentabilidad y funcionamiento del ecosistema.

Por otra parte, la biota microbiana del suelo, además de responder a las prácticas de manejo, sufre cambios estacionales que varían según los tipos de suelos (Dalal, 1998; Zoog et al., 1997). Altier et al. (2006) determinaron cambios en las poblaciones de actinobacterias y poblaciones microbianas según el método de preparación del suelo y la intensidad de uso de éste. Esto hace que la misma sea un indicador altamente sensible para determinar el estado de salud del suelo (Powlson et al., 1987; Sparling, 1992, Iglesias, 2008).

## 1.2 Salud del suelo

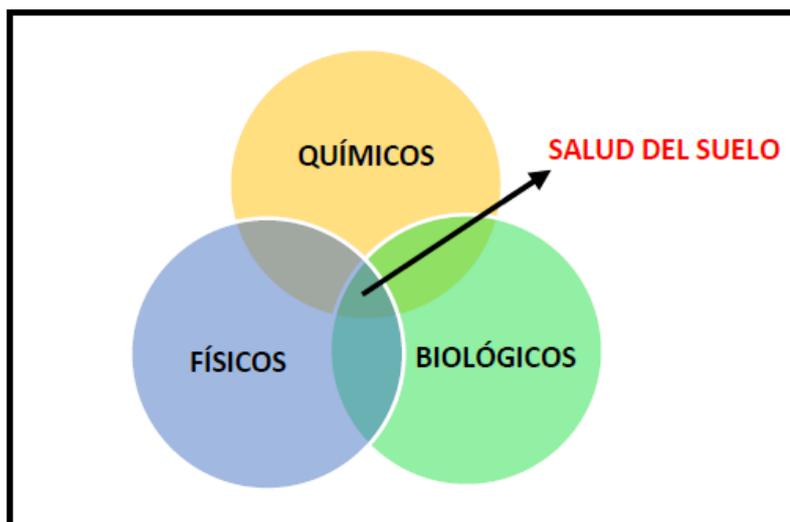
La salud del suelo se define como la capacidad de éste de funcionar como un sistema vivo, sosteniendo plantas, animales y seres humanos (The Cornell Framework Manual, 2016). Bajo esta definición subyace la importancia de realizar un manejo del suelo que asegure su salud para las futuras generaciones. (FAO, 2011; USDA, 2016). Un creciente interés en la salud del suelo está asociado al énfasis en una agricultura sustentable. Científicos y agricultores son conscientes de la importancia de la salud del suelo y de la relación de la productividad con la materia orgánica. Sin embargo, desde el siglo XVII existen reportes que resaltan la importancia de la materia orgánica del suelo, así como de los organismos que viven en él, para una producción agrícola sustentable. John Evelyn escribió en Inglaterra durante la década de 1670 acerca de la importancia de la capa superior del suelo y de cómo la productividad de los suelos tiende a perderse con el tiempo. Indicó además que su fertilidad podría mantenerse mediante la adición de compuestos orgánicos. Charles Darwin, en el siglo XIX desarrolló la teoría moderna de evolución, estudió y escribió sobre la importancia de las lombrices de tierra en el ciclo de los nutrientes y la fertilidad del suelo (Magdoff y van Es, 2009).

Posteriormente, a finales del siglo XX, surgió una nueva apreciación de la importancia de la salud del suelo, ya que se evidenció el desgaste de los suelos devenido principalmente por el agotamiento de la materia orgánica (Hills et al., 1908).

Coloquialmente, los agricultores utilizan el término salud del suelo para describir su idoneidad para la producción agrícola, y los agrónomos lo utilizan al describir las funciones del mismo. Ambos se refieren a la idea de qué tan bueno es el suelo en un rol de soportar el crecimiento de cultivos de calidad y de alto rendimiento. En general, el término salud del suelo se comenzó a utilizar al reconocer las funciones de éste (Doran y Parkin, 1994; Karlen et al., 1997), las cuales son las siguientes:

1. Promover la productividad del sistema sin perder sus propiedades físicas, químicas y biológicas (productividad biológica sostenible).
2. Atenuar los contaminantes ambientales y los patógenos (calidad ambiental).
3. Favorecer la salud de las plantas, los animales y los humanos.

En otras palabras, el concepto de salud del suelo se está usando cada vez más por todos los integrantes de la cadena productiva y hace referencia a la integración de los procesos físicos, químicos y biológicos que permiten una producción sustentable (figura 3).

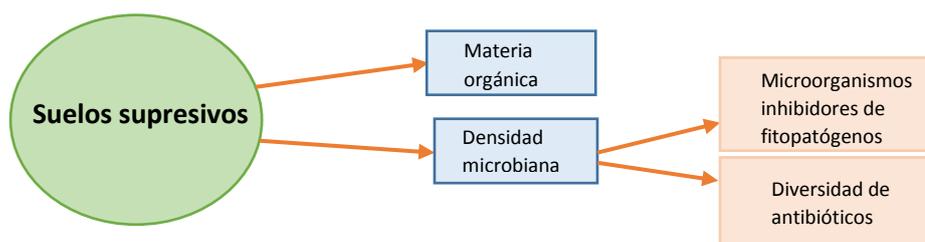


**Figura 3.** Concepto de salud del suelo. El mismo refiere a la integración de 3 componentes, químicos, físicos y biológicos. Adaptado de: Cornell Framework Manual, 2016.

Para que un suelo agrícola sea saludable debe tener una extensa población de organismos benéficos y alta cantidad de materia orgánica, además de un buen drenaje, suficiente profundidad para el crecimiento de cultivos de alto rendimiento, capacidad de intercambio de nutrientes, reducida población de malezas, de insectos plagas y

fitopatógenos (New England Vegetable Management Guide 2016-2017, University of Massachusetts).

Una elevada densidad microbiana en el suelo aumenta la probabilidad de tener una alta diversidad de antibióticos en la población y elevadas concentraciones de materia orgánica (Schlatter et al., 2009; Kinkel et al., 2011). Existe un especial interés en el estudio de los suelos supresivos que se definen como aquellos que son capaces de impedir el desarrollo de enfermedades en las plantas aún en presencia del fitopatógeno (figura 4). Kinkel et al. (2011) establecen que suelos con determinadas comunidades microbianas, características fisicoquímicas y manejos pueden tener una mayor supresividad de patógenos. Conocer la dinámica de las poblaciones de microorganismos de suelos supresivos puede determinar el éxito de implementar una estrategia de control biológico (Pérez et al., 2007; Kinkel et al., 2011).



**Figura 4.** Características de suelos supresivos. A una mayor concentración de materia orgánica y densidad microbiana, aumenta la probabilidad de que existan microorganismos inhibidores de fitopatógenos y más diversidad de antibióticos.

### 1.3 Indicadores de salud del suelo

Los indicadores de salud del suelo permiten medir las alteraciones en las funciones del suelo como resultado de las prácticas de manejo aplicadas (Kennedy y Papendick, 1995). Son una herramienta de medición que brinda información sobre las propiedades, los procesos y las características del suelo (USDA, 2016; Astier et al., 2002).

Son indicadores de salud del suelo las propiedades físicas, químicas y biológicas (Tabla 1), o los procesos que ocurren en él (SQI, 1996; García et al., 2012). Para que las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo sean buenos indicadores deben cumplir las siguientes condiciones (Masera et al., 1999, Ramírez, 2004):

1. ser integradores de los componentes físicos, químicos y biológicos,
2. ser fáciles de medir tanto en condiciones de campo como en el laboratorio,
3. estar basados en información objetiva y fácil de reconocer,
4. ser preferentemente aplicables a un rango de ecosistemas y condiciones,
5. reflejar el atributo de sostenibilidad que se quiere evaluar,
6. ser fáciles de entender,
7. permitir detectar cambios y diferencias.

**Tabla 1.** Indicadores físicos, químicos y biológicos de salud del suelo. Modificado de Acevedo et al., 2005.

Indicador	Relación con las funciones y condiciones del suelo
<b>Físicos</b>	
Textura del suelo	Retención y transporte de agua y minerales, erosión del suelo.
Profundidad del suelo	Estimación del potencial productivo y de erosión.
Infiltración y densidad aparente	Potencial de lixiviación, productividad y erosión.
Capacidad de retención del agua (CRA)	Relacionado con el contenido de humedad, transporte y erosión.
Estabilidad de agregados	Erosión potencial de un suelo, infiltración de agua.
<b>Químicos</b>	
Materia orgánica (C y N orgánico)	Fertilidad del suelo, estabilidad y grado de erosión. Potencial productivo.
pH	Actividad química y biológica, límites para el crecimiento de las plantas y actividad microbiana.
Conductividad eléctrica	Actividad microbiológica y de las plantas. Límites para el crecimiento de las plantas y la actividad microbiológica.
N, P y K extraíble	Disponibilidad de nutrientes para las plantas y pérdida potencial de N, indicadores de productividad y calidad ambiental.
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	Fertilidad del suelo, estabilidad y grado de erosión. Potencial productivo.
Metales pesados disponibles	Niveles de toxicidad para el crecimiento de la planta y la calidad del cultivo.
<b>Biológicos</b>	
Biomasa microbiana (C y N)	Potencial catalizador microbiano y reposición de C y N.
Potencial mineralizable de N (PMN)	Productividad del suelo y aporte potencial de N.
Respiración edáfica, contenido de agua, temperatura del suelo	Medición de actividad microbiana.
Número de lombrices	Relacionado con la actividad microbiana.
Rendimiento del cultivo	Producción potencial del cultivo. Disponibilidad de nutrientes.

Un indicador biológico es un organismo o un grupo de organismos, que proporcionan información sobre la calidad del ambiente. (Alkorta et al., 2003). Los indicadores biológicos se utilizan para evaluar el efecto de las prácticas de manejo agrícola sobre la fertilidad y la salud de los suelos. Algunos investigadores sostienen que reflejan los cambios con mayor sensibilidad que las determinaciones químicas de carbono y nitrógeno (Chaveli et al., 2006). Kapp et al. (2013) consideran que un indicador biológico

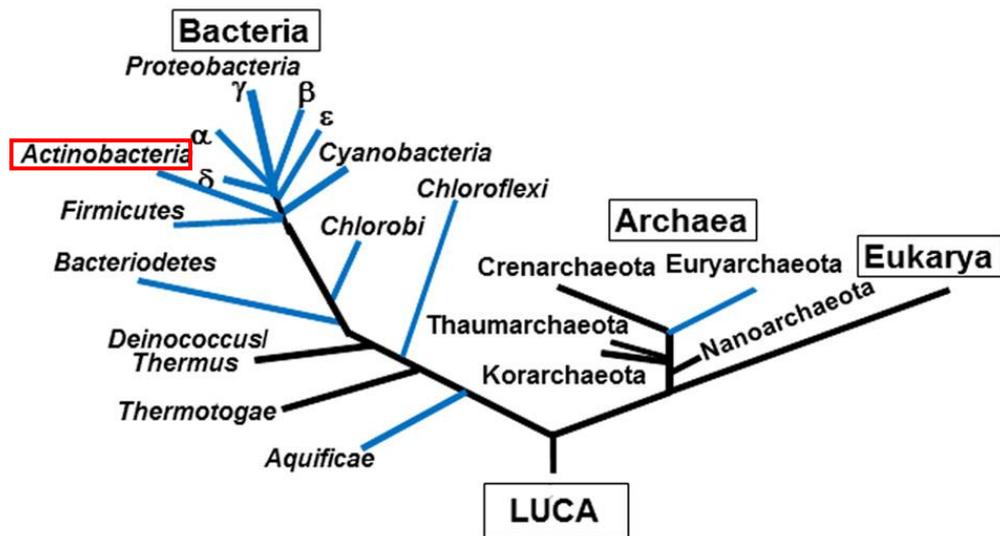
además de indicar los problemas ambientales luego de un hecho, debe predecir problemas futuros o carencias en el medio edáfico.

Algunos de los parámetros biológicos con potencial indicador de la salud del suelo son: la biomasa microbiana, la respiración basal, el nitrógeno mineralizable, las actividades enzimáticas específicas, los grupos funcionales de la microflora, la composición y diversidad de las comunidades microbianas, la abundancia y diversidad de macro-, meso- y microfauna, los patógenos de raíces, el crecimiento y la diversidad de plantas, etc. (Pankhurst et al., 1997). Los microorganismos cuya presencia elevada indica la supresión de enfermedades o altas densidades de promotores del crecimiento vegetal, y los asociados a los ciclos de nutrientes o enfermedades pueden ser adecuados indicadores biológicas.

La presencia de ciertos microorganismos del suelo puede ser indicadora de determinadas condiciones del mismo. La bacteria *Clostridium* spp. indica condiciones de anaeróbiosis, mientras que la presencia de actinobacterias, son indicadoras de salud del suelo, capaces de descomponer materia orgánica y de inhibir una variedad de fitopatógenos. Por otro lado, la presencia de actinobacterias patógenas (Ramos-Zapata, 2004), como *Streptomyces scabies*, causante de la sarna de la papa (Acuña, 2002), es un indicador del potencial patogénico del suelo.

#### **1.4 Actinobacterias como indicadores biológicos**

Las Actinobacterias es uno de los grupos bacterianos más comúnmente aislados del suelo, aunque se pueden encontrar en ambientes marinos (Schrey y Tarkka, 2008; Whalen y Sampedro, 2009; Schneeman et al., 2010). Son bacterias Gram positivas, y el género *Streptomyces* es el que tiene el mayor número de especies dentro de las Actinobacterias (Figura 5).



**Figura 5.** Árbol filogenético de la vida. En el Dominio Bacteria se representa el grupo Actinobacteria marcado en rojo. Tomado de Boyd y Peters, 2013.

Muchas especies de actinobacterias cumplen un rol fundamental en la descomposición de la materia orgánica y la fertilidad del suelo, y son responsables del olor a “tierra húmeda” por la producción de un metabolito secundario denominado geosmina (Sylvia et al., 2005; Tortora et al., 2007). Se caracterizan por presentar crecimiento micelar, esporular, y producir un amplio espectro de antibióticos (Valan Arasu et al., 2008; Duraipandiyar et al., 2010; Yekkour et al., 2012; Solecka et al., 2012).

En algunos países europeos se emplean formulaciones comerciales como el Mycostop, de origen Finlandés, a base de *Streptomyces griseoviridis*, que actúa como fungicida biocontrolador. Mycostop es utilizado contra enfermedades causadas por *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* en hortalizas, hierbas y plantas ornamentales (Mohammadi, 1992).

### 1.5 Sistema de estudio

La soja es una especie vegetal que pertenece a la familia *Fabacea* (leguminosas) y dentro de ésta a la subfamilia *Papilionoideae* y al género *Glycine* Willd. Este género incluye el subgénero *Soja* que consta de tres especies anuales procedentes de Asia: *G. max* L. (Merr), que es la soja cultivada, *G. soja* Sieb y Zucc, que es su forma silvestre y *G. gracilis* Skvortsov, considerada maleza (Hymowitz y Singh, 1987).

La soja fue domesticada en la mitad oriental de China entre los siglos VII y XI AC (Hymowitz y Shurtleff, 2005). Esta domesticación temprana denota la gran importancia cultural que tiene este cultivo en la región. (Blum et al., 2008). Este cultivo tiene importancia por su alto contenido proteico y subproductos comerciales. El incremento de la población mundial es uno de los factores responsables de la expansión de este cultivo.

La planta de soja se asocia simbióticamente con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium*. Es un cultivo altamente dependiente de N, requiere 80 Kg N/ha para producir una tonelada de grano; este requerimiento se suple mayoritariamente por la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN), (Racca y Collino, 2005; Rodríguez-Navarro et al., 2011). En Uruguay, los inoculantes para soja están compuestos por una combinación de dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* identificadas como U1301 y U1302 (originarias de Brasil), mientras que la cepa recomendada en Argentina es la E109 de *Bradyrhizobium japonicum* por su aptitud simbiótica y plasticidad a variadas condiciones edafoclimáticas (Peticari et al., 2003).

A comienzos del siglo XXI, al igual que lo ocurrido en el resto de los países sudamericanos (Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay), en Uruguay comienza un fuerte proceso de expansión de la agricultura de secano, impulsado principalmente por el crecimiento del área destinada al cultivo de soja (Pérez et al., 2011). Actualmente, es el principal cultivo de grano en nuestro país. En los últimos 15 años el área de siembra ha aumentado exponencialmente desde 2002 a 2016. En el periodo comprendido entre los años 2008 - 2016 el promedio de la superficie sembrada fue de 1174,67 miles de hectáreas y el rendimiento promedio fue de 2174 Kg/ha. (DIEA-MGAP). Los rendimientos logrados en el cultivo de soja son variables pero muestran en general un estancamiento. En los últimos años se ha observado una disminución en el rendimiento del cultivo por fenómenos climáticos como el exceso o déficit hídrico (Anuario OPYPA, 2016). Las enfermedades del cultivo de soja son considerados factores importantes en la reducción del rendimiento y pueden incluso provocar la pérdida total de la producción de un lote (Gally et al., 2000).

### 1.5.1 Microorganismos causantes de enfermedades de implantación

Un complejo de hongos y oomycetes patógenos de los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* son causantes de enfermedades de implantación (damping-off, en inglés), (Formento, 2013). Atacan antes de la emergencia de la plántula y luego de la emergencia de la misma (pre y post emergencia, respectivamente). En el damping-off de pre-emergencia los patógenos infectan las semillas cuando comienzan a germinar o poco después de su germinación, provocando en la mayoría de los casos la muerte de la plántula. El damping-off de post-emergencia se produce cuando las plántulas han emergido del suelo y son infectadas posteriormente (Strunk y Byamukama, 2015). Luego de esta etapa la planta aumenta su resistencia, ya que lignifica sus tejidos y el patógeno no es capaz de penetrarlos (Altier y Thies, 1995).

En soja, diversas especies de *Pythium* son responsables del damping-off (Broders et al., 2007). Las semillas infectadas antes o durante la germinación muestran una podredumbre húmeda o seca dependiendo del patógeno; aquellas que llegan a germinar, muestran raíces poco desarrolladas y decoloradas. Las plántulas afectadas que llegan a emerger muestran el hipocótilo en forma de gancho amarronado, este amarronamiento también puede verse en los cotiledones (figura 6) (Stewart y Rodríguez 2013).



**Figura 6.** Semillas de soja con síntomas de damping-off. Imagen tomada de: Chilvers et al., 2012, Michigan State University Extension.

Pérez et al. (2011) determinaron que en zonas de cultivo de soja se encuentran varios microorganismos fitopatógenos con potencial de afectar significativamente las plantas tanto al momento de la implantación como en etapas más avanzadas del desarrollo. Las condiciones óptimas para desarrollo de la enfermedad son suelos anegados, que favorecen la infección por *Pythium*, mientras que las temperaturas óptimas varían con la especie que esté presente (Stewart y Rodríguez, 2013). En estas situaciones, el cultivar y la calidad sanitaria de la semilla son características primordiales a tener en cuenta al momento de la siembra (Distéfano et al., 2015).

Los fitopatógenos pueden ser controlados por métodos culturales, químicos y/o biológicos. El control cultural considera la rotación de cultivos, alternando con especies no leguminosas. Sin embargo patógenos como *Pythium* o *Rhizoctonia* son difíciles de controlar, ya que infectan y se multiplican en numerosas gramíneas y otras familias de plantas (Formento, 2011). El uso de fungicidas curasemillas es el método de control químico comúnmente utilizado. Sin embargo, en estudios preliminares del Laboratorio de Microbiología de suelos de INIA-Las Brujas se observó que su uso afecta negativamente la nodulación de la soja con *Bradyrhizobium* spp. (Beyhaut y Sicardi, 2013). Como consecuencia de la poca efectividad y viabilidad del control cultural y químico, el control biológico se presenta como la mejor alternativa. Existen varias razones que lo justifican: a) los antagonistas pueden ser introducidos directamente en la zona de infección de manera sencilla con la tecnología aplicada para rizobios, b) en la mayoría de los casos, se requiere protección por un período corto hasta que la planta desarrolle defensas contra patógenos causantes de damping-off (Pérez et al., 2001).

La búsqueda de agentes de control biológico para enfermedades de implantación en soja resulta fundamental para la sustentabilidad de este cultivo. Varios géneros de bacterias y hongos han sido descritos como antagonistas y usados como controladores biológicos de patógenos de plantas. Entre las bacterias rizosféricas capaces de controlar fitopatógenos se encuentra el género *Pseudomonas* (O'Sullivan y O'Gara, 1992). Otros ejemplos de control biológico para *Pythium* es el uso de hongos del género *Trichoderma* y de algas marinas (Formento, 2011). Se ha reportado inhibición de *Pythium aphanidermatum* causante de damping-off en plantas de Kale utilizando a *Trichoderma* spp. como biocontrolador (Intana y Chamswarnng, 2007). Por otra parte, se determinó

que el uso de algas marinas estimula el crecimiento de hortalizas, frutas y otros cultivos por su contenido de nutrientes y poseen actividad biocontroladora. Sultana et al. (2011) demostraron que el uso del alga roja *Soliera robusta*, redujo la podredumbre de raíces causada por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum* y la acción del nemátodo *Meloidogyne javanica*.

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La estrategia del presente trabajo es evaluar la capacidad de las actinobacterias edáficas de inhibir microorganismos patógenos del género *Pythium*, y cepas de *Bradyrhizobium* utilizadas en inoculantes de soja, y explorar la relación de la capacidad de inhibición con las propiedades físicas y químicas del suelo.

### 2.1 Hipótesis del trabajo

Existe una asociación entre las comunidades microbianas que participan de la supresión de enfermedades de implantación en soja con otros factores bióticos y abióticos del suelo.

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo general

Desarrollar herramientas que contribuyan al diseño de un índice de salud del suelo para la toma de decisiones al momento de la siembra del cultivo de soja, teniendo en cuenta distintos factores bióticos y abióticos que pueden influir sobre las comunidades del suelo en cuanto a su capacidad de supresión de enfermedades de implantación y la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

#### 2.2.2 Objetivos específicos

- 1) Desarrollar un índice de patogenicidad de suelo.
- 2) Evaluar la capacidad de supresión de las actinobacterias del suelo frente a *Pythium*.
- 3) Evaluar la capacidad de inhibición de las actinobacterias frente a cepas de *Bradyrhizobium* utilizadas como inoculantes de soja.
- 4) Brindar las herramientas para el diseño de un índice integrado de salud del suelo.

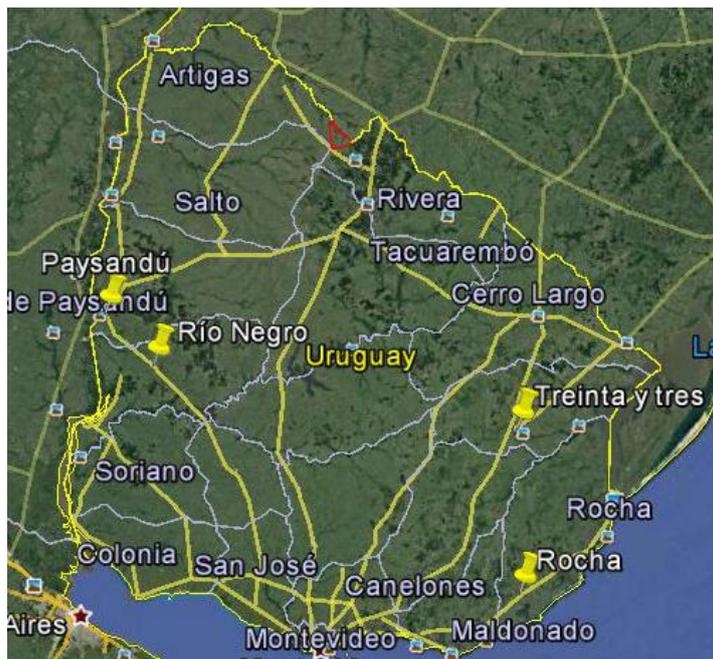
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Muestreo de suelos

Entre los meses de octubre y diciembre del 2014 fueron muestreados suelos de 13 sitios en las regiones litoral oeste (Paysandú y Río Negro) y este (Treinta y Tres y Rocha) del país, con y sin historia de siembra de soja el verano anterior (tabla 2 y figura 7).

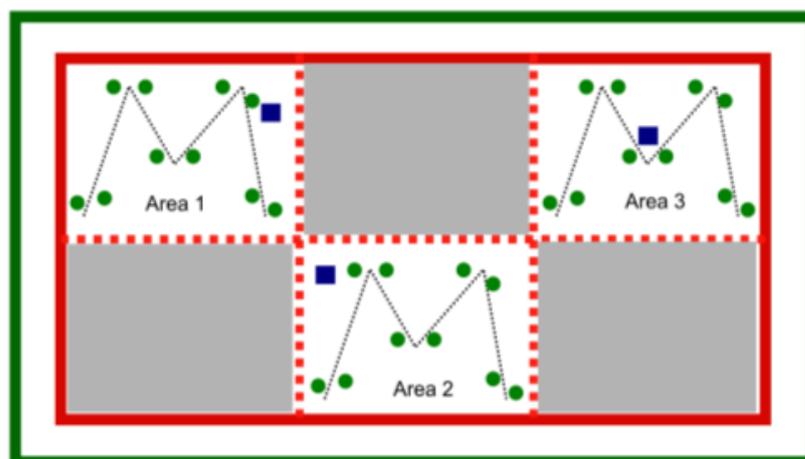
**Tabla 2.** Muestreo de los sitios del litoral oeste y este del país con y sin historia de soja el verano anterior.

Sitio	Región	Departamento	Con soja el verano anterior
1	Litoral oeste	Paysandú	no
2	Litoral oeste	Paysandú	no
3	Litoral oeste	Paysandú	no
4	Litoral oeste	Paysandú	no
5	Litoral oeste	Paysandú	si
6	Litoral oeste	Río Negro	si
7	Litoral oeste	Río Negro	si
8	Este	Rocha	no
9	Este	Rocha	si
10	Este	Rocha	no
11	Este	Treinta y tres	no
12	Este	Treinta y tres	si
13	Este	Treinta y tres	si



**Figura 7.** Sitios muestreados. Se observan los departamentos muestreados del litoral oeste (Paysandú y Río Negro) y este del Uruguay (Treinta y Tres y Rocha). Imagen satelital de Google Earth.

Para realizar los análisis fisicoquímicos y biológicos se tomaron en cada sitio tres muestras de suelo de 2500 g cada una, con calador a 10 cm de profundidad. En el laboratorio, las muestras fueron tamizadas (< 2mm) y secadas a temperatura ambiente, y luego conservadas en heladera a 4°C hasta ser utilizadas. Además, en cada sitio, con un cilindro de 100 cm<sup>3</sup> se obtuvo otra muestra a efectos de determinar la curva de retención de agua y la densidad del suelo (figura 8). Los análisis físicos y químicos de cada sitio se muestran en el anexo B.

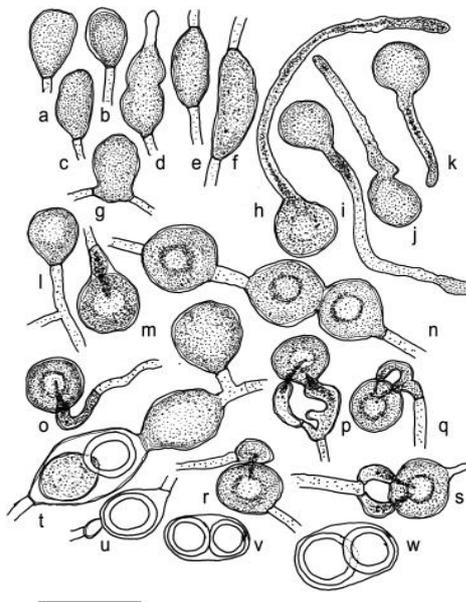


**Figura 8.** Esquema del muestreo. Se tomaron tres muestras por sitio (área 1, área 2 y área 3). Los puntos verdes corresponden a las muestras tomadas con calador y los cuadrados azules a las muestras para la determinación de la curva de retención de agua y densidad del suelo.

### 3.2 Aislamientos de *Pythium* spp.

Para obtener los aislamientos de *Pythium* spp. fueron utilizadas todas las muestras de suelos de los 13 sitios (3 muestras por sitio). El método empleado fue una modificación de la técnica de *baiting* descrita por Altier y Thies (1995). Sobre papel toalla estéril, se esparció una fina capa (2-3 mm de espesor) de la muestra de suelo y se humedeció con 10 ml de agua destilada estéril. Sobre la muestra de suelo fueron colocadas 8 semillas de soja previamente desinfectadas con etanol 90% por 1 minuto, hipoclorito 10% por 3 minutos y enjuagadas 5 veces con agua destilada estéril. El papel con las semillas se enrolló y colocó en una bolsa de nylon, posteriormente estos permanecieron en incubación a 22°C hasta que se observó crecimiento de micelio blanco en las semillas. Luego, las semillas infectadas se enjuagaron con agua durante 3 minutos hasta remover la tierra. Cada semilla fue colocada en una placa con medio PDA comercial (Potato Dextrose Agar, Oxoid) y se incubó a 22°C hasta observar crecimiento de micelio blanco. Los aislamientos se identificaron mediante la observación al microscopio (40x) de estructuras reproductivas características de *Pythium* spp. surgidas en los micelios (figura 9). Aquellos donde se observó las estructuras características del género *Pythium*, fueron purificados mediante cultivos sucesivos en medio PDA.

Estos aislamientos fueron utilizados posteriormente en el ensayo de Herr como organismos blanco frente a las actinobacterias (sección 3.6.1)



**Figura 9.** Estructuras reproductivas de *Pythium* spp. Cuerpos hifales terminales (a-d); cuerpos hifales intercalares (e-g); cuerpos hifales germinando (h-k); oogonia terminal (l, m); oogonia catelunada (n); oogonia provista de diferentes tipos de anteridios (o-s); oosporas (t-w). Escala de todas las figuras 35 mm. Tomado de Bernard, 2009.

### 3.3 Extracción de ADN de aislados de *Pythium* spp.

Se extrajo ADN de los *Pythium* obtenidos a partir de las muestras de suelos y de la colección de INIA-Las Brujas utilizando el kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN). Con bisturí estéril se tomó micelio blanco crecido en placas de PDA durante 3 días a temperatura ambiente. Se colocó el micelio en un tubo estéril de 1,5 ml. Se continuó con la extracción siguiendo las indicaciones del proveedor. Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Heraeus Biofuge Pico; Max. RCF 16,060 x g. La concentración de ADN fue determinada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 8000 a 260 nm (Thermo Scientific) y su calidad fue determinada por la relación OD260/OD280.

### **3.3.1 Amplificación por PCR**

Se realizó la amplificación por PCR de las regiones ITS del ARNr a partir del ADN genómico de los aislados de *Pythium* spp. La mezcla de reacción para la PCR fue la siguiente: 14 µl de H<sub>2</sub>O milliQ; 2,5 µl buffer 10X (Thermo Scientific); 3,75 µl MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific); 0,5 µl dNTPs (Thermo Scientific); 1 µl primer ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'); 1µl primer ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3'), (White et al., 1990); 0,25 µl taq polimerasa (Thermo Scientific); 1 µl ADNg (50ng/µl). La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador Eppendorf utilizando el siguiente ciclo: desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 1 minuto a 72°C y una extensión final de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa 1,5 % (p/v) en buffer Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 5X (Anexo A). Se agregaron 3,5 µl de Goodview (SBS Genetech Co., Ltd.) por cada 100 ml de gel. Para la corrida electroforética, se cargó 1 µl de buffer de carga 6X (Thermo Scientific) junto con 5 µl ADN. Se utilizaron 3 µl de marcador de PM AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder (MAESTROGEN). Las muestras se corrieron a 100 V durante 30 minutos. Los productos obtenidos fueron visualizados en un transiluminador UV y fotografiados; el tamaño de estas bandas fue entre 900 y 1000 pb.

### **3.3.2 Secuenciación, alineamiento y árbol filogenético**

Los productos de PCR de la región ITS del ARNr se enviaron a Macrogen (Corea) para su secuenciación. Se utilizó el programa NCBI BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) para su comparación con secuencias similares en la base de datos. Finalmente se realizó el análisis filogenético de secuencias para la identificación de los aislados por el método de máxima verosimilitud, utilizando el software MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net>).

### **3.4 Microorganismos utilizados**

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron los patógenos de implantación *Pythium irregulare* (ILB322) y *Pythium paroecandrum* (ILB315), las cepas U1301 y U1302 de *Bradyrhizobium elkanii*, empleadas en los inoculantes comerciales para soja en Uruguay y la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum*, empleada en Argentina.

Las características de los microorganismos utilizados en este trabajo se detallan a continuación en la tabla 3.

**Tabla 3.** Características de los microorganismos utilizados.

Especie	Código	Origen	Descripción	Colección
<i>Pythium irregulare</i>	ILB322	Uruguay	patógenos de implantación en soja	INIA Las Brujas, Plataforma de Bioinsumos
<i>Pythium paroecandrum</i>	ILB315			
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U1301	Brasil	cepas utilizadas en los inoculantes para soja en Uruguay	INIA Las Brujas, Laboratorio de Microbiología de Suelos
	U1302			
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	U741 (E109)	Argentina	cepas utilizadas en los inoculantes para soja en Argentina	

### 3.5 Ensayo para la determinación del índice de patogenicidad en suelo (IP)

Previo a la ejecución de los ensayos, se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas de soja. En placas con agar-agua fueron colocadas ocho semillas desinfectadas con etanol 90% por 1 minuto, hipoclorito 10% por 3 minutos y enjuagadas 5 veces con agua destilada estéril. Las placas fueron incubadas durante 4 días a 22 °C y 27 °C, dado que estas temperaturas favorecen la infección por *Pythium* spp. y la de germinación de la soja, respectivamente. Posteriormente, se evaluó el número de semillas germinadas. Los experimentos con la técnica baiting y de evaluación de la patogenicidad de los suelos fueron realizados a 22°C a los efectos de favorecer la infección por *Pythium*, a pesar que con esta temperatura hay una disminución en la velocidad de la germinación.

La patogenicidad de los suelos muestreados fue determinada con dos métodos, en macetas y en papel.

Para poder realizar el cálculo del índice, el suelo de cada sitio recibe dos procedimientos, uno es el suelo natural (sin microondas) y el otro es suelo esterilizado con microondas (Altier y Zerbino, 2012). Para el proceso con microondas, en bolsas de polietileno se colocó 2kg de suelo y se agregaron 180 ml de agua destilada estéril. La mezcla se homogeneizó y se permaneció en reposo toda la noche. Al día siguiente las bolsas se colocaron en microondas por 10 minutos a potencia máxima (1450W).

En el fondo de cada maceta de siete centímetros de diámetro por ocho centímetros de alto, se colocó un disco de papel de filtro estéril. Cada suelo se mezcló con 1/5 (v/v) de vermiculita estéril. Fueron sembradas 10 semillas de soja desinfectadas por maceta. Las macetas fueron colocadas en una sala de crecimiento a 22°C con 12 horas de luz. Las macetas fueron regadas por la parte inferior con 25 ml de agua destilada una vez a la semana. Se registró el número de plantas emergidas a los 10 y 15 días en ambos tratamientos en todos los suelos. Para la obtención del índice cada procedimiento de cada sitio fue repetido dos veces

Para determinar el IP en papel se utilizó una modificación de la técnica de *baiting* descrita por Altier y Thies (1995). Se esparció una fina capa (2-3 mm de espesor) de la muestra de suelo sobre papel toalla estéril y se humedeció con 10 ml de agua destilada estéril. Sobre la muestra de suelo se colocaron 8 semillas de soja previamente desinfectadas con etanol 90% por 1 minuto, hipoclorito 10% por 3 minutos y enjuagadas 5 veces con agua destilada estéril. Se enrolló el papel con las semillas y se colocó en una bolsa de nylon. Luego se incubaron a 22°C. Se registró el número de plantas emergidas a los 10 días de incubación en ambos tratamientos.

El IP fue determinado siguiendo la definición de Altier y Zerbino (2012):

$$IP = \frac{N^{\circ} \text{ plantas emergidas en suelo } M^* - N^{\circ} \text{ plantas emergidas en suelo sin } M}{N^{\circ} \text{ plantas emergidas en suelo } M}$$

\*M=microondas

### 3.6 Densidad bacteriana, de actinobacterias e inhibidores

Las determinaciones de la densidad bacteriana, de actinobacterias y de inhibidores se realizó mediante el método de Herr con algunas modificaciones (Herr, 1959). Con cada muestra se realizó una suspensión de 5 g de suelo en 50 ml de agua destilada estéril y se agitó a 175 rpm durante una hora a 4°C. Posteriormente, fueron realizadas diluciones seriadas en agua estéril y se plaquearon 100 µl de las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-2,5</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-3,5</sup>, en placas de petri con 15 ml de medio SCA (Starch-Casein Agar, Anexo A) por triplicado, cubriendo toda la placa. Se dejaron secar las placas, luego se agregaron sobre ellas 5 ml de SCA fundido y enfriado a 40°C, y se incubaron a 28°C por 3 días.

Se determinó el número de bacterias totales y actinobacterias en todas las placas en las cuales se encontró un número de entre 20-100 colonias. Las colonias de actinobacterias se diferenciaron del resto de las bacterias por su opacidad y por presentar un color crema claro, forma redondeada y borde regular y bien definido. Luego de los recuentos se sembró el organismo blanco correspondiente en todas las placas (ver 3.6.1).

Los organismos blanco seleccionados fueron dos especies de *Pythium*, una perteneciente a la colección de INIA-Las Brujas (*P. irregulare* ILB322) y otra aislada de suelo del sitio 2 del litoral oeste (*P. paroecandrum* ILB315) las cuales presentaron elevada virulencia frente a soja en ensayos de patogenicidad realizados en el laboratorio de Bioproducción- Bioinsumos agrícolas de INIA-Las Brujas, y tres cepas de *Bradyrhizobium* spp.: dos de *B. elkanii*, U1301 y U1302, que son utilizadas en los inoculantes para soja en Uruguay, y la cepa *B. japonicum* E109 utilizada en inoculantes para soja en Argentina.

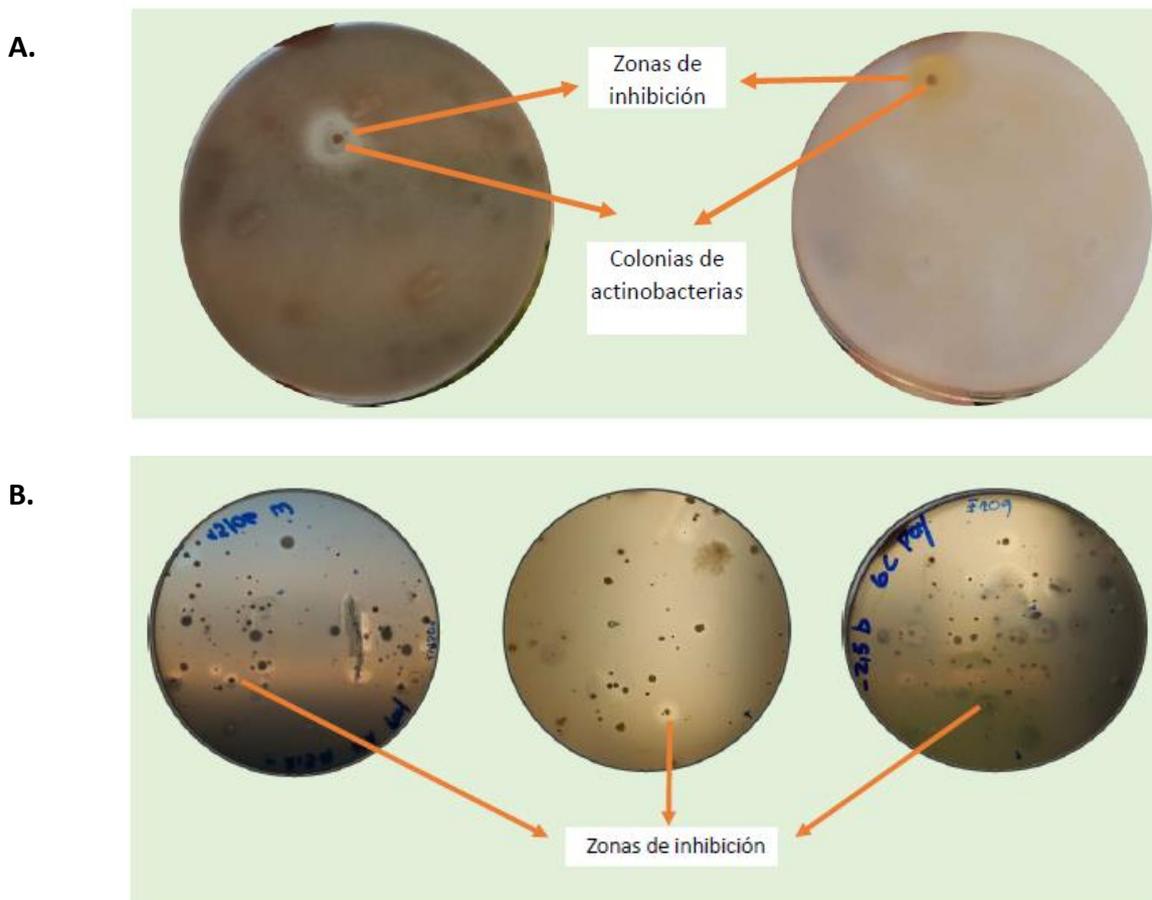
Los valores de densidad de bacterias, actinobacterias e inhibidores fueron calculados en función del espacio que ocupaban (UFC/cm<sup>3</sup>), teniendo en cuenta para cada suelo su densidad.

### **3.6.1 Siembra de organismos blanco:**

Para los ensayos con *Pythium* spp. como organismo blanco se agregaron sobre las placas descritas en la sección 3.6, 10 ml de PDA fundido y enfriado a 40°C. Una vez sólida la sobrecapa, se colocaron 3 inóculos equidistantes de un cultivo sólido de *P. irregulare* (ILB322) y *P. paroecandrum* (ILB315) crecidos en PDA durante 3 días a temperatura ambiente. Se incubaron las placas a 28 °C por 48 horas. Se cuantificaron y midieron las zonas de inhibición sobre la placa cubierta de *Pythium* (figura 10 A).

Para los ensayos con *Bradyrhizobium* spp. como organismo blanco, fueron utilizados cultivos en TY líquido (Anexo A) de U1301, U1302 y E109 incubados por 5 días a 28°C. Fue ajustada la D.O. a ~ 0,7 y se diluyeron 10 ml de inóculo en 60 ml de medio TY conteniendo 1 % agar. A las placas crecidas se agregaron 10 ml de la suspensión resultante y luego fueron incubadas durante 48 horas a 28°C. Posteriormente, fueron

cuantificadas y medidas las zonas de inhibición, que se visualizaron como zonas translúcidas (figura 10 B).



**Figura 10.** Zonas de inhibición causadas por actinobacterias A. sobre *P. irregularis* ILB322 (izquierda) y de *P. paroecandrum* ILB315 (derecha). B. sobre *Bradyrhizobium* spp. U1301, U1302 y E109, de izquierda a derecha.

### 3.7 Propiedades fisicoquímicas de los suelos

Las determinaciones de Ca y Mg (acetato de amonio pH 7 y absorción atómica); K y Na (acetato de amonio pH 7 y emisión atómica); acidez titulable ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  y titulación potenciométrica); CICpH7 (Bases + Acidez titulable); pH en agua (potenciométrico), bases titulables; % de saturación; N total (combustión a 900°C y posterior detección de  $\text{N}_2$  por conductividad térmica), PMN (incubación anaeróbica); carbono

orgánico (combustión a 900°C y posterior detección de CO<sub>2</sub> por infrarrojo); fósforo por los métodos: Bray I, resinas, y cítrico (extracción y colorimetría), de las muestras obtenidas de los 13 sitios fueron realizadas en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de INIA-La Estanzuela .

Por su parte, en el Laboratorio de Análisis Físicos de Suelos de INIA-Las Brujas fueron determinadas la textura (% arena, limo y arcilla) por el método de la Pipeta (USDA Soil Conser.- Serv. Report n.1-Washington 1972 63p.), la densidad del suelo que se calculó como el cociente entre la masa de la muestra de suelo (g) y el volumen del cilindro (cm<sup>3</sup>) y la capacidad de retención del agua que se determinó por el método Ollas de Richards.

### **3.8 Análisis estadísticos**

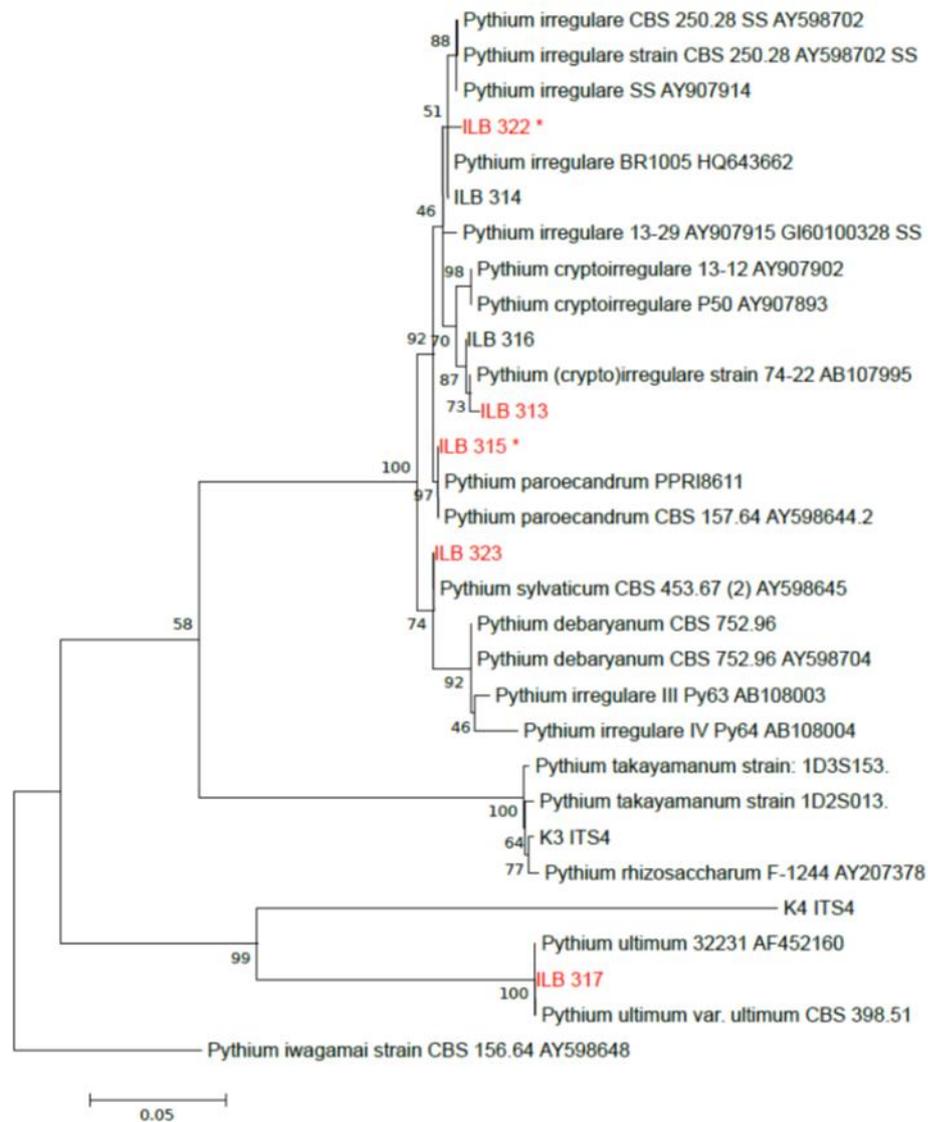
Las variables biológicas determinadas (bacterias totales, actinobacterias, densidad e intensidad de inhibidores de ILB322, ILB315, U1301, U1302 y E109; índice de patogenicidad en macetas y papel) fueron analizadas por modelos lineales generalizados (PROC GENMOD, SAS Institute, versión 9.4) con distribución Poisson o binomial negativa y función logarítmica. Para las distintas variables fueron realizados contrastes entre los sitios del litoral y del este; con y sin historia de soja el verano anterior; litoral con y sin historia; este con y sin historia; litoral y este con y sin historia.

Para explorar la relación entre las variables biológicas y fisicoquímicas se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Di Rienzo et al., 2008). La selección de las variables a utilizar en este análisis se realizó mediante un estudio de las correlaciones entre todas las variables.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aislados de *Pythium* spp.

De la totalidad de muestras de suelo analizadas (3 muestras por sitio), fueron obtenidos dos aislados de *Pythium* en muestras de suelos del litoral oeste. La comparación de las secuencias ITS de los mismos y de la colección depositada en INIA-Las Brujas sugiere que los aislados de las muestras de suelos de los sitios del litoral oeste (2 y 6) pertenecen a especies diferentes, con similitudes a *P. cryptoirregulare* (ILB313, 87% similitud) y *P. paroecandrum* (ILB315, 97% similitud). En cuanto a los aislados de la colección INIA-Las Brujas también se obtuvieron diferentes especies, con similitudes a: *P. irregulare* (ILB322, 88% similitud), *P. sylvaticum* (ILB323, 74% similitud) y *P. ultimum* (ILB317, 100% similitud) (figura 11).



**Figura 11.** Árbol filogenético de las especies de *Pythium*. Los aislados analizados se encuentran marcados en rojo y fueron identificados como ILB 322 que corresponde a *P. irregulare*; ILB 313 *P. cryptoirregulare*; ILB 315 *P. paroeocandrum*; ILB 323 *P. sylvaticum*; ILB 317 *P.ultimum*. Obtenido por el método de máxima verosimilitud, MEGA 6.

#### 4.2 Índice de patogenicidad en suelo (IP)

A la temperatura óptima para la germinación de semillas de soja (27°C), la media fue de 7 semillas, que equivale a un 88% de germinación ( $\chi^2=11,021$ , p-valor= 0,0009).

Con la temperatura óptima para la infección por *Pythium* (22°C) en promedio germinaron cinco semillas, que corresponde a 63% de germinación (tabla 4).

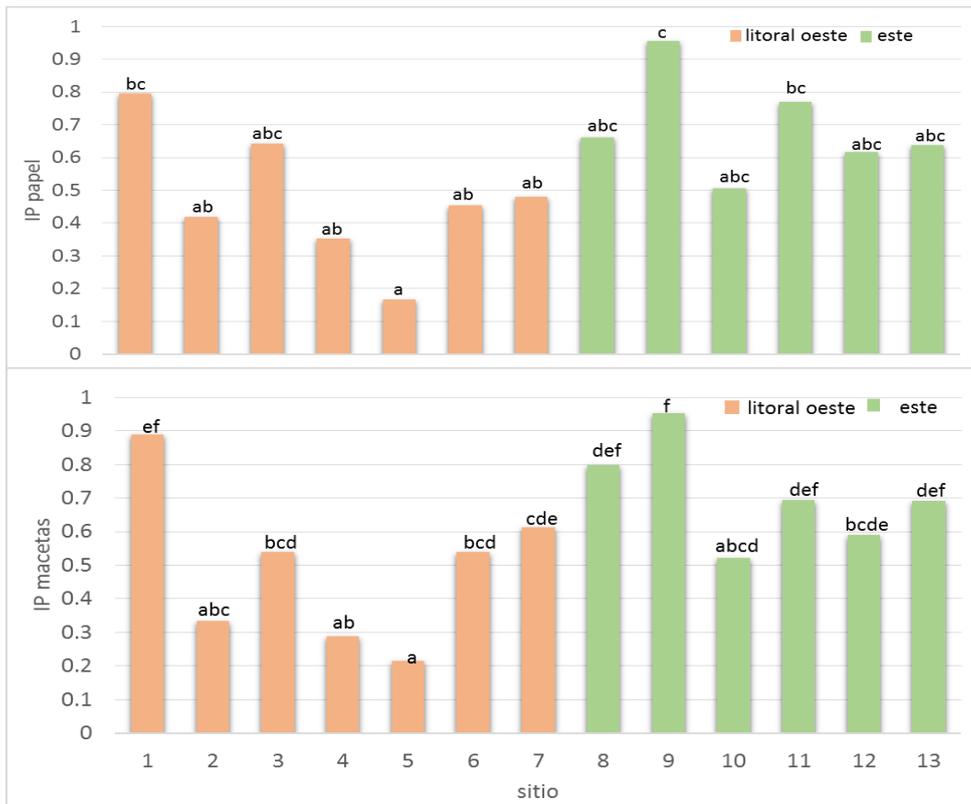
**Tabla 4.** Germinación de semillas de soja en placas de agar agua por triplicado a 22°C y a 27°C. n=8. Letras distintas indican diferencias significativas según el test MDS (p-valor  $\leq 0,05$ ).

Temperatura	Placa	Nº Semillas	% germinación
22°C	1	4	50
	2	5	63
	3	6	75
	<b>Media</b>	<b>5 a</b>	<b>63</b>
27°C	1	7	88
	2	7	88
	3	7	88
	<b>Media</b>	<b>7 b</b>	<b>88</b>

En la figura 12 A y B son presentados los valores de IP obtenidos con los métodos en papel y macetas para los suelos de los distintos sitios. En el mismo se puede apreciar que en general los valores obtenidos para los dos métodos fueron semejantes.

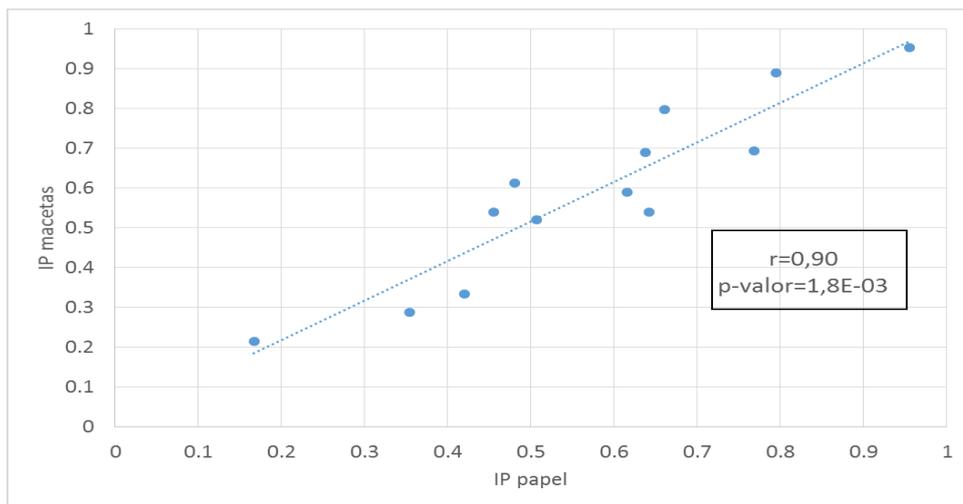
La mayoría de los suelos del litoral oeste registraron valores menores que los del este. El rango de IP papel estuvo entre 0,95 (sitio 9) y 0,17 (sitio 5) y el de IP macetas entre 0,95 (sitio 9) y 0,21 (sitio 5), (figura 12 A y B)). Hubo una correlación positiva significativa entre los valores de IP de ambos métodos ( $r= 0,90$ , p-valor=  $1, 8E-3$ ) (figura 13).

A.



B.

**Figura 12.** Índice de patogenicidad (IP) de los suelos de los 13 sitios. A. Valores obtenidos por la técnica en papel. B. valores obtenidos en macetas. Letras distintas indican diferencias significativas según el test MDS ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ).



**Figura 13.** Correlación entre el índice de patogenicidad (IP) en macetas y en papel.

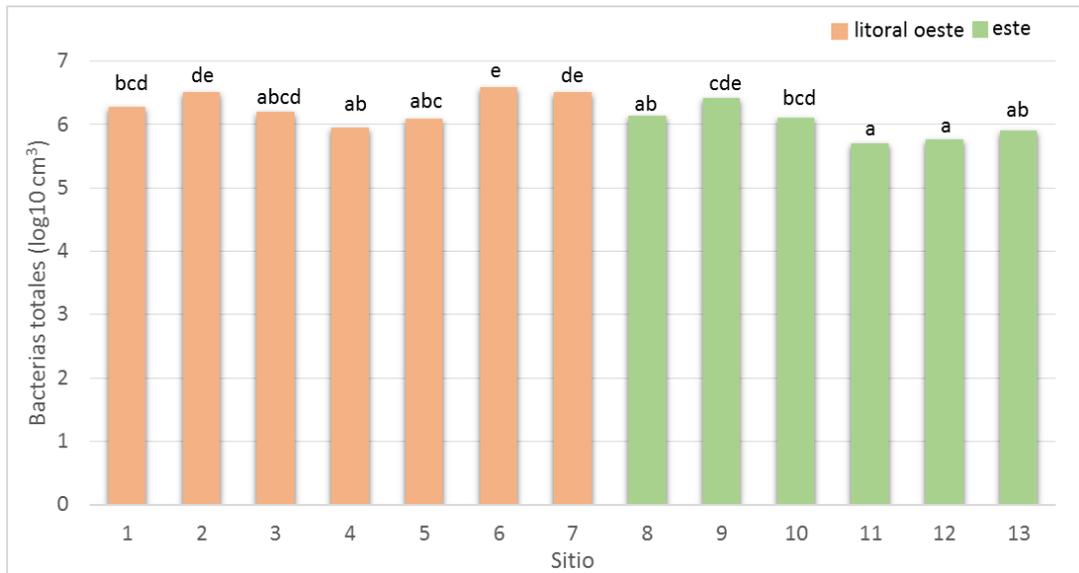
Los resultados de los contrastes realizados en el número de semillas germinadas en suelos sin microondas para ambos métodos (papel y macetas) indican que hubo diferencias significativas entre los suelos de los sitios del litoral oeste y los del este (p-valor =0,0027 y 0,0289, respectivamente); y entre los suelos de los sitios con historia de soja (p-valor=0,0007 y 0,0206, respectivamente) (tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de los contrastes en el número de semillas germinadas sin microondas en papel y maceta. Valores de p-valor  $\leq 0,05$  indican diferencias significativas.

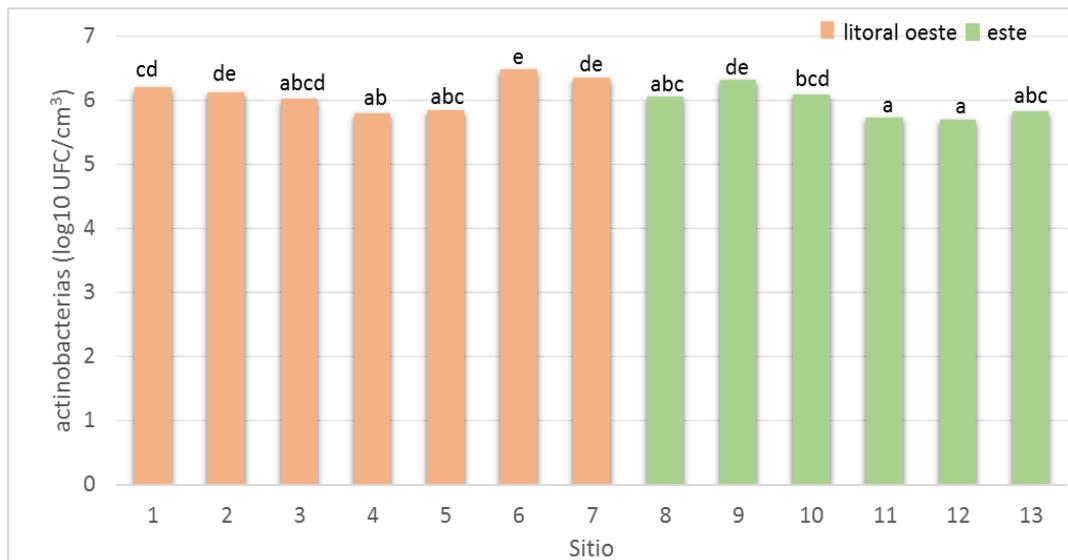
Contraste	Nro. semillas germinadas s/m papel		Nro. semillas germinadas s/m maceta	
	$\chi^2$	p-valor	$\chi^2$	p-valor
litoral oeste vs. este	8,97	0,0027	4,77	0,0289
c/historia vs. s/historia	0,74	0,3911	0,14	0,7104
litoral oeste: c/historia vs. s/his	1,46	0,2277	0,7	0,4013
este: c/historia vs. s/historia	2,82	0,0929	0,79	0,3749
c/historia: litoral oeste vs. este	11,43	0,0007	5,36	0,0206
s/historia: litoral oeste vs. este	0,75	0,3877	0,65	0,4203

### 4.3 Densidad e intensidad de inhibición de bacterias totales y actinobacterias

A partir de las placas utilizadas en el ensayo de Herr se realizaron recuentos de bacterias totales y de actinobacterias para cada uno de los suelos de los 13 sitios (figuras 14 y 15, respectivamente). Hubo diferencias significativas en la densidad de bacterias totales ( $\chi^2= 33,60$ , p-valor=0,0008) y de actinobacterias ( $\chi^2= 35,57$ , p-valor=0,0004) entre los suelos de los sitios. Estas variables estuvieron correlacionadas positivamente ( $r=0,96$ , p-valor=  $8,7E-4$ ). Los valores extremos de bacterias totales y actinobacterias, fueron registrados en los sitios 6 y 11 con la mayor y menor densidad respectivamente (6,59 y 5,70 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>, respectivamente; figura 14) y (6,58 y 5,69 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>, respectivamente; figura 15)



**Figura 14.** Recuento en placa de bacterias totales (log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>) para los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor ≤ 0,05).



**Figura 15.** Recuento en placa de actinobacterias (log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>) para los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor ≤ 0,05).

Los resultados de los contrastes muestran que los valores de densidad de bacterias totales y actinobacterias fueron significativamente diferentes entre los suelos de los sitios del litoral oeste y los del este (p-valor=0,0035 y 0,0131, respectivamente) y entre los suelos de ambas regiones con historia de soja (p-valor=0,0034 y 0,0115,

respectivamente). Por otra parte, dentro del grupo de suelos del litoral oeste hubo diferencias estadísticamente significativas entre los suelos con y sin historia de soja en la densidad de bacterias totales (p-valor=0,0448) (tabla 6).

**Tabla 6.** Resultados de los contrastes de bacterias totales y actinobacterias. Valores de p-valor  $\leq 0,05$  indican diferencias significativas.

Contraste	Bacterias totales		Actinobacterias	
	$\chi^2$	p-valor	$\chi^2$	p-valor
litoral oeste vs. este	8,5	0,0035	6,16	0,0131
c/historia vs. s/historia	1,88	0,17	1,53	0,216
litoral oeste: c/historia vs. s/historia	4,03	0,0448	3,18	0,0745
este: c/historia vs. s/historia	0,03	0,8597	0,03	0,8636
c/historia: litoral oeste vs. este	8,56	0,0034	6,39	0,0115
s/historia: litoral oeste vs. este	2,1	0,1474	1,0	0,1474

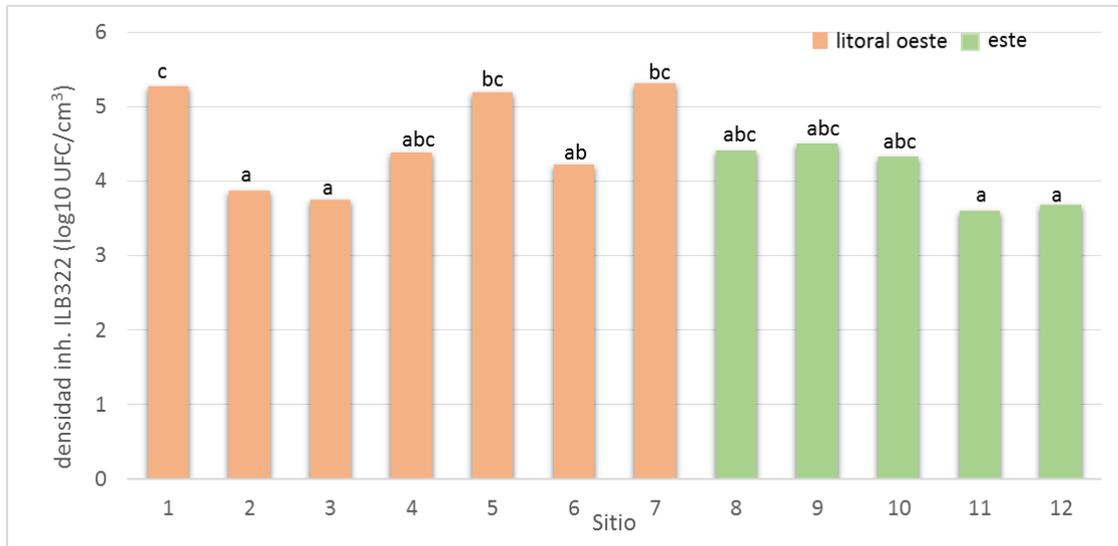
#### 4.4 Densidad e intensidad de inhibidores para *Pythium* spp.

Los resultados de los análisis indican que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los suelos de los 13 sitios en cuanto a la densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) y de *P. paroecandrum* (ILB315) ( $\chi^2 = 27,82$  y  $20,66$ , p-valor=0,0059 y 0,0555, respectivamente). La densidad de inhibidores de los aislados en los suelos varió entre 5,32 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitio 7) y 3,60 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitio 11) para el aislado ILB322 y entre 5,18 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitio 9) y 3,45 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitio3) para el aislado ILB315 (figuras 16 y 17, respectivamente).

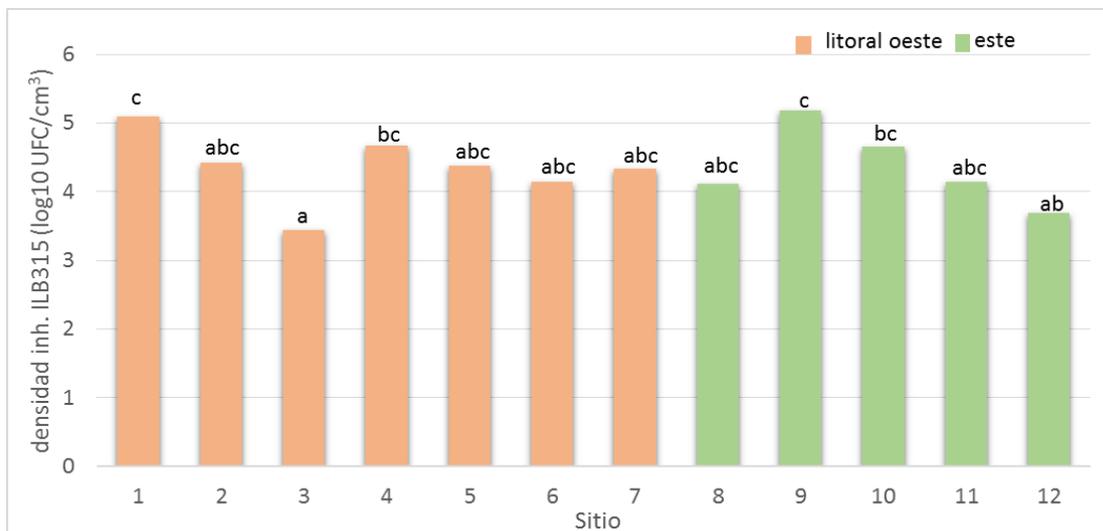
La densidad de inhibidores de ambos aislados estuvieron significativamente correlacionadas (r=0,43, p-valor=0,01). Particularmente, la densidad de inhibición de *P. paroecandrum* (ILB315) se correlacionó significativamente con la intensidad de inhibición de *P. irregulare* (ILB322) (r=0,50, p-valor= 1,7 E-3).

Los contrastes realizados indican que la densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) en el conjunto de los suelos del litoral oeste fue significativamente mayor que en los del este (p-valor= 0,0029). Al comparar los suelos con historia de soja de ambas regiones se obtuvo diferencias estadísticamente significativas (p-valor=0,0004). Los suelos de los sitios del litoral oeste registraron valores de densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) mayores que los del este, con máximos de 5,19 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitio 7) y 4,46 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitio 9), respectivamente (p-valor= 0,0004).

Para los inhibidores de *P. paroecandrum* (ILB315) entre los suelos con y sin historia de soja se obtuvo un p-valor de 0,0560. Los suelos del este con historia de soja presentaron menores valores de densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) y *P. paroecandrum* (ILB315) que aquellos sin historia (p-valor = 0,035 y 0,0355, respectivamente) (tabla 7).



**Figura 16.** Densidad de inhibidores de *Pythium irregulare* (ILB322) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor ≤0,05).

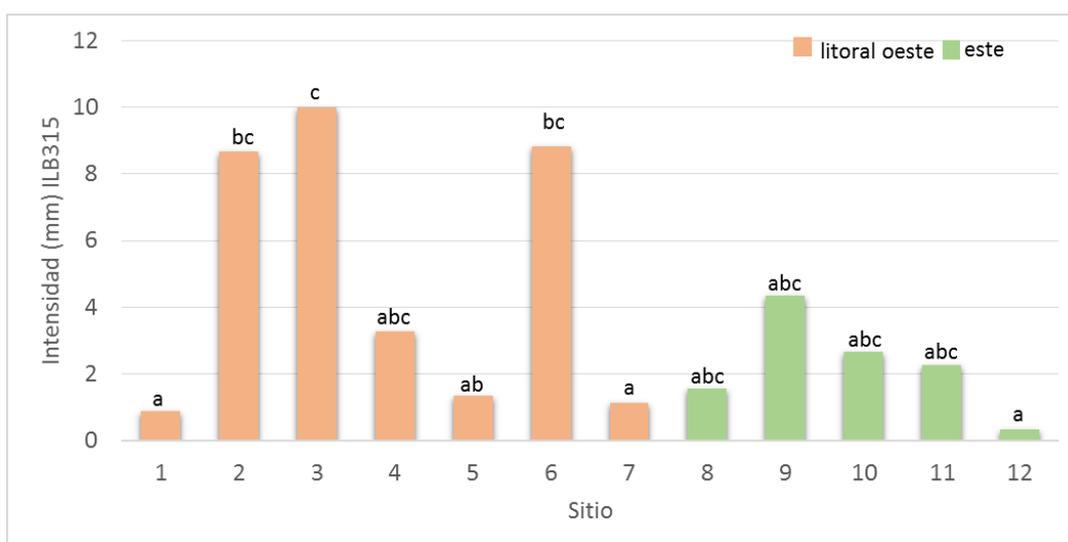


**Figura 17.** Densidad de inhibidores de *Pythium paroecandrum* (ILB315) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor ≤0,05).

**Tabla 7.** Resultados de los contrastes de densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) y *P. paroecandrum* (ILB315). Valores de p-valor  $\leq 0,05$  indican diferencias significativas.

Contraste	inhibidores ILB322		inhibidores ILB315	
	$\chi^2$	p-valor	$\chi^2$	p-valor
litoral oeste vs. este	8,89	0,0029	2,17	0,1407
c/historia vs. s/historia	0,18	0,6677	3,65	0,056
litoral oeste: c/historia vs. s/historia	3,29	0,0698	0,23	0,6294
este: c/historia vs. s/historia	4,4	0,0359	4,42	0,0355
c/historia: litoral oeste vs. este	12,57	0,0004	3,26	0,0709
s/historia: litoral oeste vs. este	0,18	0,6715	0,01	0,9162

La intensidad de inhibición frente a *P. irregulare* (ILB322) fue semejante en todos los suelos muestreados (p-valor=0,2943). Por el contrario, hubo diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de inhibición frente a *P. paroecandrum* (ILB315) entre los suelos de los sitios del litoral oeste y este (p-valor= 0,0138) y entre los suelos con y sin historia de soja (p-valor= 0,0172). En promedio el tamaño de halo en los suelos del litoral oeste fueron mayores que los del este (figura 18 y tabla 8). A su vez, dentro del grupo de sitios del este hubo diferencias estadísticamente significativas entre los con y sin historia de soja (p-valor= 0,0347) y entre todos los suelos con historia del litoral oeste y este (p-valor= 0,0325), (tabla 8).



**Figura 18.** Valores promedio de intensidad de inhibición (mm) de *Pythium paroecandrum* (ILB315) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor  $\leq 0,05$ ).

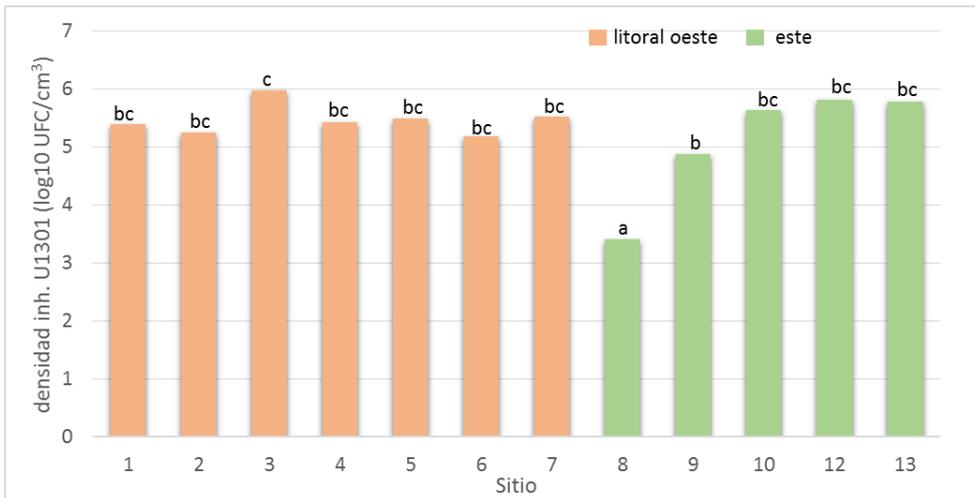
**Tabla 8.** Resultados de los contrastes de intensidad de inhibición de *P. paroecandrum* (ILB315). Valores de p-valor  $\leq 0,05$  indica diferencias significativas.

Contraste	intensidad ILB315	
	$\chi^2$	p-valor
litoral oeste vs. este	6,07	0,0138
c/historia vs. s/historia	5,68	0,0172
litoral oeste: c/historia vs. s/historia	1,06	0,3023
este: c/historia vs. s/historia	4,46	0,0347
c/historia: litoral oeste vs. este	4,57	0,0325
s/historia: litoral oeste vs. este	1,3	0,255

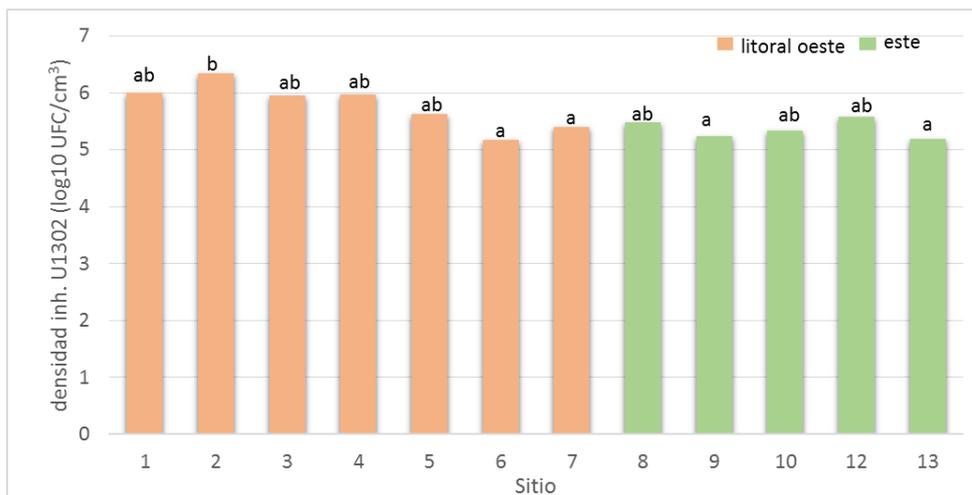
#### 4.5 Densidad e intensidad de inhibición para *Bradyrhizobium* spp.

Hubo diferencias significativas entre suelos en la densidad de inhibidores de las cepas U1301 y U1302 ( $\chi^2 = 26,44$  y  $26,52$ , p-valor=0,0093 y 0,0091), figuras 19 y 20. Sin embargo, no hubo diferencias significativas para la cepa E-109 en los suelos muestreados ( $\chi^2 = 12,38$ , p-valor= 0,4155).

El rango de la densidad de inhibidores del blanco U1301 estuvo entre 5,97 y 3,41 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitios 3 y 8, respectivamente, figura 19), el de U1302 entre 6,34 y 5,17 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitios 2 y 6, respectivamente, figura 20), y el de E109 entre 6,30 y 3,41 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup> (sitios 5 y 8, respectivamente). los valores registrados de la densidad de inhibidores en las tres cepas estuvieron significativamente correlacionados con un rango de r entre 0,58 y 0,66 y una probabilidad para las tres correlaciones de p-valor < 0,0002.



**Figura 19.** Densidad de inhibidores de *B. elkanii* U1301 (UFC/cm<sup>3</sup>) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor ≤0,05).



**Figura 20.** Densidad de inhibidores de *B. elkanii* U1302 (UFC/cm<sup>3</sup>) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS (p-valor ≤0,05).

Los resultados de los contrastes realizados en la densidad de inhibidores de *Bradyrhizobium* spp. permitieron establecer diferencias significativas entre los suelos de los sitios del litoral oeste y del este para las cepas U1301 y U1302 (p-valor= 0,0009 y 0,0001, respectivamente), con valores más altos en el litoral oeste respecto al este en ambas cepas. Hubo variaciones en la densidad de inhibidores de U1301 y U1302 en los suelos sin historia de soja del litoral y este (p-valor= <0,0001 y <0,0001

respectivamente, tabla 9). Para los suelos del este, en los inhibidores de estas mismas cepas, fueron determinadas diferencias entre los grupos con y sin historia de soja (p-valor= <0,0001 y 0,0026 respectivamente). En el caso de los suelos del litoral oeste con y sin historia sólo hubo diferencia respecto a la densidad de inhibidores de la cepa U1302 (p-valor=0,0026), con valores más altos los que tenían historia de soja.

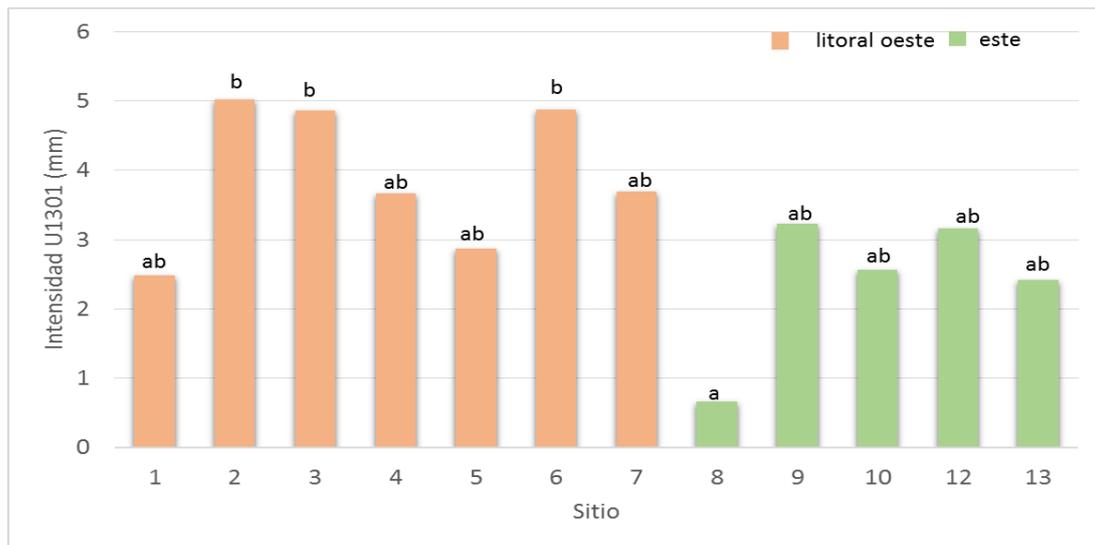
**Tabla 9.** Resultados de contrastes de densidad de inhibidores de las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 entre sitios. Valores de p-valor  $\leq$  0,05 indican diferencias significativas.

Contraste	densidad de inhibidores U1301		densidad de inhibidores U1302	
	$\chi^2$	p-valor	$\chi^2$	p-valor
litoral oeste vs. este	10,99	0,0009	14,75	0,0001
c/historia vs. s/historia	8,98	0,0027	0,05	0,8158
litoral oeste: c/historia vs. s/historia	0,19	0,6645	4,96	0,0259
este: c/historia vs. s/historia	17,52	<0,0001	9,09	0,0026
c/historia: litoral oeste vs. este	0,2	0,6566	0	0,9661
s/historia: litoral oeste vs. este	17,8	<0,0001	19,37	<0,0001

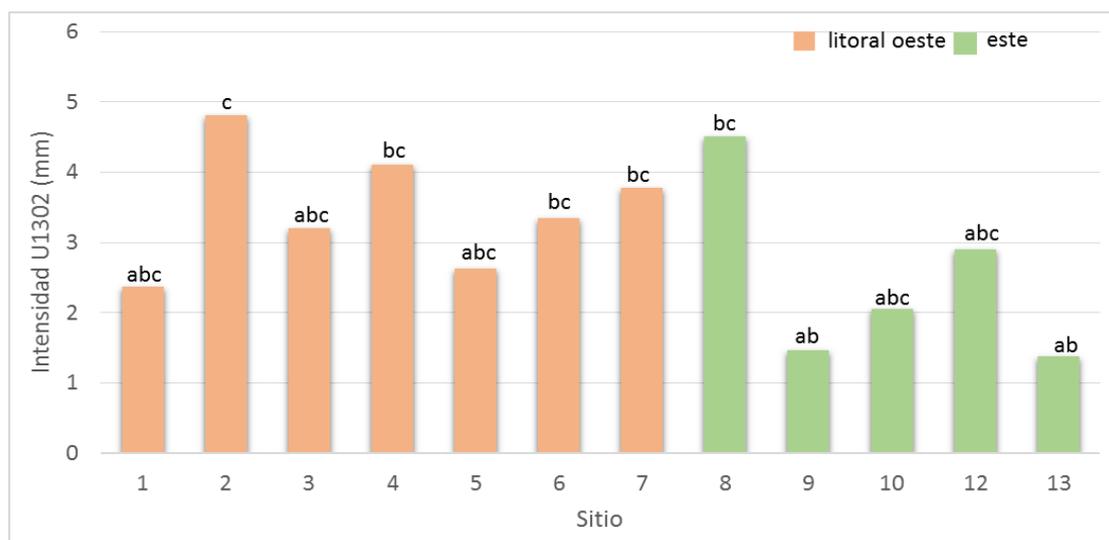
Los valores registrados en la intensidad de inhibición (tamaño de las zonas de inhibición) sobre las tres cepas de *Bradyrhizobium* fueron similares entre sí. La intensidad de inhibición sobre la cepa U1302 varió significativamente entre los suelos muestreados ( $\chi^2 = 35,33$  p-valor=0,0004, figura 21), mientras que para la cepas U1301 y E109 se registraron valores de  $\chi^2 = 19,21$  y  $15,81$  y un p-valor=0,0837 y 0,1999, respectivamente (figura 22).

El rango de los valores de la intensidad de inhibición para la cepa U1301 fue de 5,0 a 0,7 mm, mientras que para la cepa U1302 fue de 4,8 a 1,4 mm y para la cepa E109 de 4,7 a 1 mm.

La intensidad de inhibición de las tres cepas U1301, U1302 y E109 estuvo correlacionada significativamente, con un rango de valores de r de 0,51 a 0,59 y una probabilidad con un p-valor < 0,02.



**Figura 21.** Intensidad de inhibición de *B. elkanii* U1301 (mm) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ).



**Figura 22.** Intensidad de inhibición de la cepa U1302 (mm) en los suelos de los 13 sitios. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según test de MDS ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ).

En la tabla 10, son presentados los resultados de los contrastes en la intensidad de inhibición de las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302. En los suelos de los sitios del litoral oeste se registraron intensidades de inhibición significativamente mayores que los del este, para las cepas U1301 y U1302 ( $p$ -valor=0,0005 y 0,0001, respectivamente). Hubo diferencias entre los suelos del litoral oeste y este sin historia en la intensidad de

inhibición de U1301 (p-valor=0,0001) y U1302 (p-valor=0,0009). Los valores de registrados en ambas cepas fueron mayores en suelos del litoral oeste que en los del este.

**Tabla 10.** Resultados de los contrastes de la intensidad de inhibición de las cepas U1301 y U1302 entre sitios. Valores de p-valor  $\leq 0.05$  indican diferencias significativas.

Contraste	intensidad de inhibición U1301		intensidad de inhibición U1302	
	$\chi^2$	p-valor	$\chi^2$	p-valor
litoral oeste vs. este	12,08	0,0005	14,94	0,0001
c/historia vs. s/historia	5,33	0,0209	1,16	0,2815
litoral oeste: c/historia vs. s/historia	0,01	0,9049	0,1	0,7504
este: c/historia vs. s/historia	9,53	0,002	2,26	0,1331
c/historia: litoral oeste vs. este	0,61	0,4333	3,93	0,0474
s/historia: litoral oeste vs. este	14,46	0,0001	11,13	0,0009

#### 4.6 Relación entre las variables bióticas y abióticas de los suelos

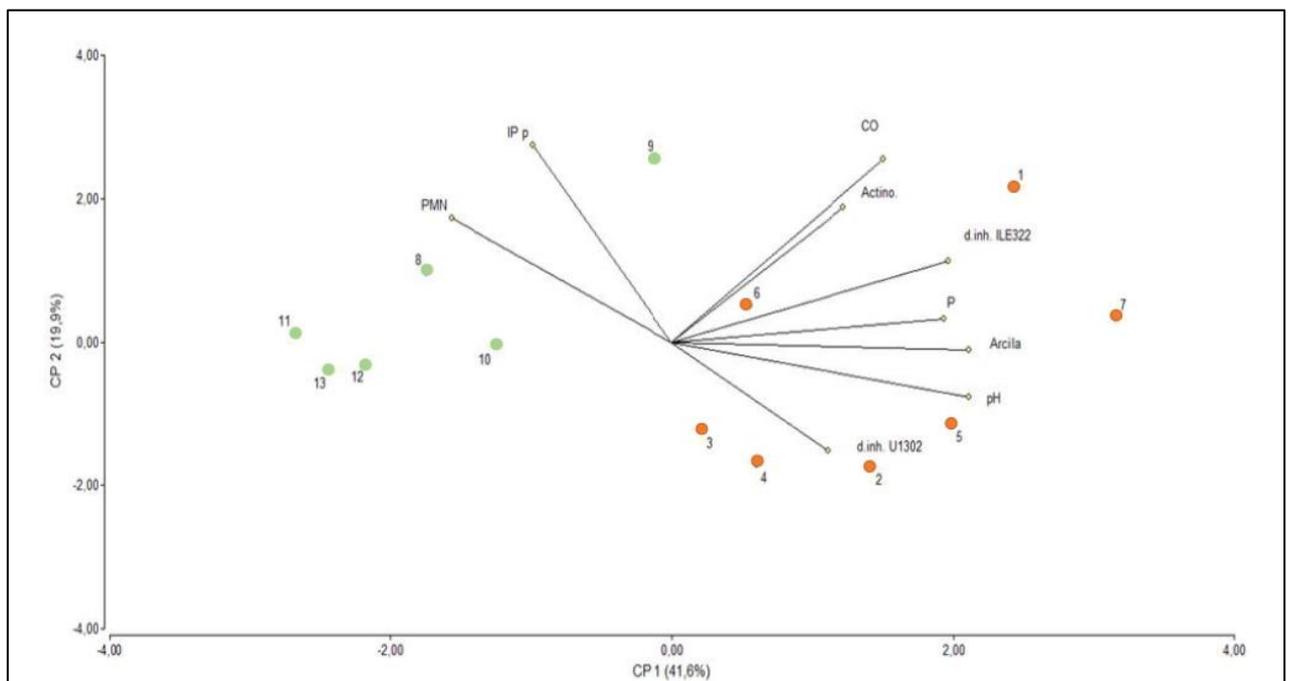
En la tabla 11 se presentan los resultados de la correlación y su probabilidad de significancia entre algunas variables fisicoquímicas y biológicas que estuvieron significativamente correlacionadas entre sí ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 11.** Tabla de correlaciones entre las variables fisicoquímicas analizadas. Los resultados se presentan como una matriz donde el número de filas es igual al número de columnas e igual al número de variables seleccionadas. Los elementos de la diagonal principal marcada en color celeste son todos iguales a 1 ya que representan la correlación de una variable con si misma; por debajo de la diagonal principal se encuentra el coeficiente de correlación y entre paréntesis se encuentra la probabilidad de significancia de dicha correlación (p-valor).Ca, Calcio; Mg, magnesio; CIC capacidad de intercambio catiónico; Bases T, bases titulables; pH; N, nitrógeno; CO., carbono orgánico; P (resinas), fósforo; PMN, potencial de mineralización de nitrógeno; arcilla; IP papel, índice de patogenicidad en papel; d.inh. ILB322, densidad de inhibidores ILB322; d.inh. IB315, densidad de inhibidores ILB315; den.inh. U1302, densidad inhibidores U1302; BT, bacterias totales; actino., actinobacterias.

	Ca	Mg	CIC	Bases T.	pH	N	CO	P (Resinas)	PMN	Arcilla	IP p	d.inh. ILB322	d.inh. ILB315	d.inh. U1302	BT	Actino.
Ca	1,00															
Mg		1,00														
CIC	0,99 (6,1E-04)		1,00													
Bases T.	0,99 (6,1E-04)		0,99 (6,1E-04)	1,00												
pH	0,80 (0,01)		0,76 (0,01)	0,77 (0,01)	1,00											
N		0,61 (0,03)			-0,48 (0,10)	1,00										
CO	0,63 (0,03)	0,57 (0,05)	0,63 (0,03)	0,62 (0,03)		0,68 (0,01)	1,00									
P (Resinas)	0,62 (0,02)		0,58 (0,05)	0,62 (0,03)				1,00								
PMN	-0,50 (0,08)		-0,50 (0,08)	-0,54 (0,06)	-0,54 (0,06)			-0,55 (0,05)	1,00							
Arcilla	0,90 (3,4E-4)		0,90 (2,2E-05)	0,90 (2,9E-09)	0,62 (0,02)		0,56 (0,05)			1,00						
IP P					-0,60 (0,04)						1,00					
d.inh. ILB322	0,73 (0,01)		0,70 (0,02)	0,73 (0,01)			0,89 (2,0E-03)	0,51 (0,09)		0,57 (0,04)		1,00				
d.inh. ILB315		0,45 (0,08)	0,47 (0,10)	0,50 (0,09)		0,57 (0,04)	0,66 (0,01)				0,64 (0,02)	0,64 (0,02)	1,00			
d.inh. U1302	0,57 (0,04)		0,64 (0,02)	0,59 (0,03)				0,57 (0,05)		0,55 (0,05)			1,00			
BT	0,64 (0,03)		0,63 (0,03)	0,63 (0,03)	0,58 (0,05)		0,66 (0,02)			0,71 (0,01)		0,52 (0,07)		1,00		
Actino.	0,62 (0,03)		0,59 (0,04)	0,60 (0,04)	0,53 (0,07)		0,75 (0,01)			0,65 (0,02)		0,62 (0,03)		0,98 (8,7E-04)	1,00	

A partir de los resultados obtenidos y para realizar el análisis de componentes principales (ACP) fueron seleccionadas 9 variables fisicoquímicas y biológicas [pH; carbono orgánico; P (resinas); PMN; % arcilla; IP (papel); densidad de inhibidores ILB322; densidad de inhibidores U1302; actinobacterias]. Los criterios de selección fueron para las variables biológicas las que presentaron correlación significativa con variables fisicoquímicas y estuvieron asociadas a diferentes procesos (inhibición de patógenos: d.inh. ILB322; inhibición de rizobios: d. inh. U1302; densidad de microorganismos: actinobacterias), y para las variables físicas y químicas que estuvieran correlacionadas significativamente entre sí y/o con variables biológicas y que sean indicadoras de distintas condiciones del suelo (arcilla; CO; PMN; pH)

Los resultados del ACP indican que los dos primeros ejes, explican el 61,5 % de la variabilidad de los datos (figura 23).



**Figura 23.** Análisis de componentes principales (ACP). Componentes 1 y 2 del análisis de las variables fisicoquímicas y biológicas analizadas sobre los 13 sitios. Los puntos naranjas representan los sitios del litoral oeste y los verdes a los del este.

En el eje 1 las variables responsables de la ordenación de los sitios (suelos), fueron arcilla, pH y PMN, mientras que en el eje 2 fueron el IP p y d. inh. U1302. En el eje 1 los suelos de los sitios quedaron ordenados de acuerdo a la región de la cual provenían, hacia la izquierda del gráfico se ubicaron los suelos de los sitios del este que se caracterizaron por registrar mayores valores de PMN y de IP p que los suelos del litoral, mientras que a la derecha se ordenaron los suelos de los sitios del litoral que se caracterizaron por tener mayor contenido de P, arcilla, CO, un pH más alto, y registraron mayores densidad de actinobacterias y de inhibidores de U1302 y de *P. irregulare* (ILB322). En el anexo C se muestran las salidas del ACP.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Índice de patogenicidad en suelo (IP)

Con ambos métodos (macetas y papel) la variabilidad registrada en el IP entre sitios fue semejante. En futuros estudios se recomienda utilizar la metodología en papel dado que es menos laboriosa se utiliza menor cantidad de suelo y requiere menor tiempo de incubación, lo cual permite obtener resultados con mayor rapidez.

En general, los suelos de sitios del litoral oeste presentaron menores índices de patogenicidad que los del este. Altier y Zerbino (2012) establecieron que la intensidad de uso del suelo tenía efectos en el IP. En sistemas de agricultura continua los valores de IP fueron más altos que en sistemas de rotaciones cultivo-pasturas, mientras que los sistemas con pasturas estuvieron asociados a valores altos de densidad poblacional microbiana. Estas autoras encontraron que de los grupos bacterianos, las actinobacterias fueron las más sensibles a la intensidad de uso del suelo.

Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con los obtenidos por estos autores en que los suelos con IP bajos se caracterizan por tener altas densidades bacterianas.

Son necesarios futuros estudios de IP en otras regiones del país que permitan determinar la patogenicidad de diferentes suelos y su asociación con el uso y manejo del sistema de producción.

### 5.2 Densidad de bacterias totales y actinobacterias

El tipo de suelo, fundamentalmente la textura fue un factor determinante en los resultados obtenidos, para las variables analizadas (densidad de bacterias totales y actinobacterias e inhibidores) hubo diferencias entre los suelos de las regiones consideradas. El segundo factor considerado, historia del cultivo de soja, tuvo diferentes efectos según las variables consideradas y las regiones.

La densidad de bacterias totales y de actinobacterias se correlacionaron positivamente con otras propiedades biológicas y fisicoquímicas de los suelos como la densidad de

inhibidores de *P. irregulare* (ILB322), contenido de arcilla, carbono orgánico, Ca, CIC, bases titulables y pH. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados anteriormente donde observaron correlaciones significativas entre algunos parámetros fisicoquímicos asociados a nutrientes del suelo y poblaciones de hongos y bacterias (Lauber et al., 2008). Ritz et al. (2009) visualizaron la importancia de la biota del suelo por su relación con los procesos fisicoquímicos que ocurren en el mismo.

Diversos estudios demostraron que cambios en la densidad, estructura y actividad de las comunidades microbianas como consecuencia de factores de manejo del suelo, con la historia de cultivo (Buckley y Schmidt, 2003; Pérez et al., 2007), el empleo de técnicas de laboreo convencional o mínimo laboreo (Kirk et al., 2004) y por la concentración de los nutrientes exudados por las raíces de las plantas (Wamberg et al., 2003).

### **5.3 Densidad e intensidad de inhibidores para *Pythium* spp.**

Los resultados de densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) entre los 13 sitios se ajustan al marco teórico propuesto por Kinkel et al. (2011), ya que los suelos del litoral oeste, con más densidad de bacterias totales, actinobacterias e inhibidores, también fueron los menos patogénicos (bajo IP).

En los suelos del litoral oeste, la historia de cultivo de soja estableció diferencias significativas, lo que indica la influencia de las características de los suelos y el manejo en la densidad de las comunidades bacterianas, más aún, en las características fenotípicas de sus integrantes y de la totalidad de la comunidad. Vaz (2013), estableció que la capacidad de supresión de patógenos por parte de los *Streptomyces* del suelo está significativamente influenciada por la historia del cultivo y el manejo de las chacras. La densidad de inhibidores de *P. paroecandrum* (ILB315) fue similar en ambas regiones, esto podría sugerir que la densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) es un indicador de supresividad más sensible que la densidad de inhibidores de *P. paroecandrum* (ILB315).

Con respecto a la intensidad de inhibición no hubo diferencias frente a *P. irregulare* (ILB322) pero sí hubo diferencias significativas frente a *P. paroecandrum* (ILB315), con mayor intensidad de inhibición del patógeno en el litoral oeste que en el este. Este

resultado puede ser atribuido a que son especies distintas, el aislado de *P. paroecandrum* (ILB315) fue de suelo del litoral oeste, mientras que *P. irregulare* (ILB322) pertenece a la colección de INIA-Las Brujas, y sugiere que puede existir una alta influencia de los aislados patógenos sobre la producción de antibióticos por *Streptomycetes*. Estos datos pueden reflejar lo propuesto por algunos investigadores (Davelos et al., 2004; Vaz y Kinkel 2014) que tanto los inhibidores de patógenos que producen una amplia gama de antibióticos como las propiedades de señalización de las comunidades son responsables de las prácticas de manejo de los cultivos.

Los resultados de este trabajo pueden ser mejorados y detectar mayor significancia estadística, si se incrementara el número de situaciones muestreadas.

La densidad de inhibidores de *P. irregulare* (ILB322) y *P. paroecandrum* (ILB315) estuvo altamente correlacionada con propiedades edáficas. Esto podría significar como determinadas características de los suelos como CO, P, pH y densidad de actinobacterias, influyen en la densidad de comunidades de bacterias inhibidoras de patógenos. Estos resultados son semejante a otros estudios como el de Schlatter et al. (2009) donde se determinó una mayor densidad de bacterias inhibidoras en suelos ricos en nutrientes.

De acuerdo a los resultados obtenidos y algunos antecedentes (Kernaghan et al., 2009; Schroeder et al., 2013) acerca de la relevancia de *P. irregulare* (ILB322) como patógeno causante de damping-off en diversos cultivos, en futuros trabajos para determinar un índice de supresividad del suelo para *Pythium* se debería utilizar esta especie.

#### **5.4 Densidad e intensidad de inhibidores para *Bradyrhizobium* spp.**

A partir de los resultados obtenidos se pudo inferir que las diferencias en la densidad de inhibidores de U1301 y U1302 entre sitios está influenciada por las características de los suelos muestreados del litoral oeste y este. La historia del cultivo de soja tuvo efectos mayores en los suelos del litoral oeste que en los del este. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los inhibidores de *Pythium*, siendo los suelos del litoral oeste los que presentaron mayores densidades de inhibidores. Wiggins y Kinkel (2004) realizaron un estudio similar al de este trabajo, en el que mostraron el efecto antagonista de las

comunidades de *Streptomyces* frente a diferentes patógenos (*V. dahliae* y *S. scabies*, *F. oxysporum* y *R. solani*) de la papa.

En los suelos del litoral oeste registraron mayores intensidades de inhibición hacia las cepas U1301 y U1302 con respecto los del este. La historia de cultivo también influyó sobre las diferencias, observándose una mayor intensidad de inhibidores de las cepas U1301 y U1302 en los sitios del litoral y este con historia de soja. Estos resultados muestran el efecto antagonista de las actinobacterias sobre algunas cepas de *Bradyrhizobium*. Sin embargo, existen estudios que demostraron que algunos organismos del género *Streptomyces*, además de actuar como biocontroladores de patógenos, son capaces de promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* en la asimilación del hierro para la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (Tokala et al.,2002). De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer que hay una tendencia a que los suelos con mayor número de inhibidores también presenten una mayor intensidad de inhibición, lo cual concuerda lo determinado por Vaz (2013). Es necesario realizar más estudios sobre la diversidad de las comunidades de actinobacterias y su efecto sobre las cepas de *Bradyrhizobium* que se utilizan en los cultivos.

### 5.5 Relación entre las variables bióticas y abióticas de los suelos

A través del ACP fue posible conocer la relación entre las variables biológicas y fisicoquímicas. En el componente 1 la ordenación de los sitios fue debida a una propiedad química (P), una física (arcilla) y una biológica (d. inh. ILB322 *P. irregulare*), mientras que en componente 2 fueron dos propiedades biológicas (IP p y d. inh. U1302). Los resultados obtenidos indican que los suelos con mayor fertilidad (mayor contenido de CO, P y arcilla) y actividad microbiana (mayor densidad de actinobacterias y d. inh. ILB322 *P. irregulare*) presentan una patogenicidad del suelo menor (< IP p). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vaz (2013) quien registró mayores densidades bacterianas y de actinobacterias en suelos con alto contenido de arcilla y nutrientes.

El PMN estuvo asociado negativamente con las variables indicadoras de fertilidad. Una explicación posible de este resultado es la técnica utilizada para cuantificar el N mineralizado. El PMN brinda información sobre la capacidad de la biota microbiana de transformar (mineralizar) el nitrógeno de compuestos orgánicos en formas disponible para las plantas (Cornell Framework Manual, 2016). La misma no discrimina entre la actividad bacteriana o fúngica y quizás los hongos tengan un rol importante en esta medida.

La adición de nuevas medidas al análisis, a partir de datos que se recaben de muestreos posteriores podría brindar información más precisa acerca de la relación entre propiedades bióticas y abióticas de los suelos.

## 6. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

Los suelos presentaron distintos valores de IP y se observó una alta correlación positiva entre los métodos de IP papel y macetas, lo cual permite seleccionar el método del papel, debido a que presenta más ventajas que el de macetas para subsecuentes experiencias.

Los resultados de este trabajo contribuyeron al conocimiento de cómo las densidades de bacterias, actinobacterias, e inhibidores de *P. irregulare*, *P. paroecandrum* y de *B. elkanii* U1301 y U1302 varían entre suelos de distintas regiones del país y con la historia de cultivo de soja.

Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre variables físicas, químicas y biológicas, lo cual indica su potencial como factor indicador de salud del suelo. Esto sugiere que dichas variables podrían utilizarse para el diseño del índice de salud del suelo.

Se validó la hipótesis planteada, ya que se determinó que existe una asociación entre factores bióticos y abióticos de los suelos y las comunidades microbianas que participan de la supresión de enfermedades de implantación en soja.

El desarrollo de herramientas que ayuden a un manejo que contribuya a la sustentabilidad de las actividades agrícolas y conservación de los suelos, es posible.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, E., Carrasco, M., León, O., Silva, P., Castillo, G., Ahumada, I., Borie, G., González, S. 2005. Informe de criterios de calidad de suelo agrícola. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. Recuperado de: <http://www.sag.gob.cl>
- Altier, N. A., Thies, J.A. 1995. Identification of Resistance to Pythium Seedling Diseases in Alfalfa Using a Culture Plate Method. *Plant Disease*. 79: 341:346.
- Altier, N., Bajsa, N., Azziz, G., Quagliotto, L., Zerbino, S., Morón, A., Arias, A. 2006. Biodiversidad del suelo bajo diferentes sistemas de producción. Editorial EMBRAPA, Pelotas, Brasil. Documentos, 166. Desafíos e oportunidades do bioma campos frente a expansao e intensificacao agrícola / XXI Reuniao do Grupo Técnico em Forrageiras do Cone Sul. Grupo Campos. 150 p.
- Altier, N. y Zerbino, S. 2012. Indicadores biológicos para evaluar los agroecosistemas. Comunidades microbianas- índice de patogenicidad del suelo- Ejemplo para secuencias con leguminosas forrajeras. Serie de Actividades de Difusión no. 674: 83-89.
- Acuña, I. 2002. La sarna común de la papa. Boletín Informativo No. 37. INIA, Chile. Recuperado de: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR28343.pdf>
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amezaga, I., Garbisu, C. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Rev. Environ. Health* 18: 65-73.
- Astier, C.M., Mass-Moreno, M., Etchevers, B.J. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelo en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia* 36: 605-620.
- Bernard, P. 2009. *Pythium burgundicum* sp. nov. isolated from soil samples taken in French vineyards. *FEMS Microbiol Lett* 301 (2009) 109–114.
- Behaut, E. y Sicardi, M. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en soja: compatibilidad entre curasemillas y rizobios. Actividades de Difusión, INIA-Treinta y Tres, No. 713.
- Blum, A., Narbondo, I., Oyhançabal G. Sancho, D. 2008. Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. La nueva colonización. Montevideo: Rapal-Uruguay.
- Boyd, E., Peters, J.W. 2013. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Front Microbiol* 4:201.
- Broders, K.D., Lipps, P.E., Paul, P.A., Dorrance, A.E. 2007. Characterization of *Pythium* spp. associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Dis.* 91: 727-735.
- Buckley, D. H., Schmidt, T. M, 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agroecosystems. *Environmental Microbiology*. 5: 441-452
- Chaveli, P., Font, L., Calero, B.J., López, P., Francisco, A.M., Caballero, R.D., Valenciano, M. 2006. Evaluación de algunos indicadores microbiológicos en dos suelos arroceros de la provincia de Camagüey, Cuba. *ITEA*, Vol. 102 (1), 3-12.
- Chilvers, M., Jacobs, J., Rojas, A. 2012. Multiple *Pythium* species associated with soybean and corn seedling disease in Michigan. Michigan State University Extension, Department of Plant Pathology. Recuperado de:

[http://msue.anr.msu.edu/news/multiple\\_pythium\\_species\\_associated\\_with\\_soybean\\_and\\_corn\\_seedling\\_disease](http://msue.anr.msu.edu/news/multiple_pythium_species_associated_with_soybean_and_corn_seedling_disease)

Dalal, R.C. 1998. Soil microbial biomass: what do the number really mean? *Aust. J. Exp. Agric.* 38: 649-665.

Davelos, A. L., Xiao, K., Flor, J. M., & Kinkel, L. L. (2004b). Genetic and phenotypic traits of streptomycetes used to characterize antibiotic activities of field-collected microbes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 89, 79 -89.

DIEA-MGAP. Anuario estadístico 2014/2015. Recuperado de: <http://www.mgap.gub.uy/>

Distéfano, S., Gadban, L. C., Lenzi, L., G. 2015. Sugerencias de manejo de enfermedades en cultivo de soja para campañas con pronóstico de año Niño. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Recuperado de: <http://inta.gob.ar/>

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo C.W. 2008. *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Doran, J.W., Parkin, T.B. 1994. Defining soil quality for a sustainable environment. Soil Science Society of America, Inc. Special Publication No. 35. Madison, Wisconsin, USA. 244 p.

Duraipandiyar, V., Sasi, A. H., Islam, V. I. H., Valanarasu, M., Ignacimuthu, S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J. Med. Mycol.*, 20: 15-20.

England, L., Lee H., Trevors, J. 1993. Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.*, 25 (5): 525-531.

FAO. 2011. Ahorrar para crecer. Guía para los responsables de las políticas de intensificación sostenible de la producción agrícola en pequeña escala. Recuperado de: <http://www.fao.org/ag/save-and-grow/es/index.html>

FAO. 1996. Ecología y enseñanza rural: Nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. Estudio FAO: Montes No. 131, pp. 187. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/006/W1309S/W1309S00.HTM>

Formento, A.N. 2013. Muerte de semillas y plántulas de soja en "pre y posemergencia" en área agrícola Núcleo de Entre Ríos. Informe INTA-Paraná.

Formento, A. N. 2011. Enfermedades causadas por hongos del suelo (*Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*). En: Muñoz, R., Sillon, M. (Eds.) Las enfermedades de la soja y su importancia en los países del Mercosur. Editorial Hemisferio del Sur, Buenos Aires, Argentina, pp 64-68.

Gally, T., Pantuso, F., González, B. 2000. Evaluation of physiological and sanitary quality of soybean seed. *Phytopathology* 90:527.

García, Y., Ramírez, W., Sánchez, S. 2012. Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. *Pastos y Forrajes*, Vol. 35, No. 2, abril-junio, 125-138.

Hassink, J. 1994. Effect of soil texture on the size of the microbial biomass and on the amount of C and N mineralized per unit of microbial biomass in Dutch grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(11): 1573-1581.

Hymowitz, T., Shurtleff, W.R. 2005. Debunking soybean myths and legends in the historical and popular literature. *Crop Sci.* 45:473-476.

Hettelingh, J.P.; Sloopweg, J.; Posch, M. (Eds). 2008. Critical load, dynamic modeling and impact assessment in Europe: CCE Status Report. Los Países Bajos, Netherlands Environmental Assessment Agency.

Herr, L. J. 1959. A method of assaying soils for numbers of actinomycetes antagonistic to fungal pathogens. *Phytopathology* 49:270-273.

Hills, J.L., Jones, C.H., Cutler, C. 1908. Soil deterioration and soil humus. Burlington: University of Vermont, College of Agriculture. Vermont Agricultural Experiment Station Bulletin 135, pp. 142–177.

Hymowitz, T., Singh, R. J. 1987. Taxonomy and Speciation. Soybean Monograph, Soybeans: Improvement, Production and Uses: 23-48.

Intana W., Chamswang C. 2007. Control of Chinese-kale damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* by antifungal metabolites of *Trichoderma viridens*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29, 919–927.

Iglesias, M.T. 2008. Estudio del carbono de la biomasa microbiana en suelos alterados. *LAZAROA* 29: 117-123.

Ingham, E., Moldenke, A., Edwards, C. 2000. *Soil Biology Primer*. SWCS, Ankeny, IA. Recuperado de: <https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/biology/>

Kapp, C., Storey, S. G., Malan, A. P. 2013. Options for Soil Health Measurement in Vineyards and Deciduous Fruit Orchards, with Special Reference to Nematodes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), 272–280.

Karlen, D.L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., Schuman, G. E. 1997. Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society of America J.* 61:4-10.

Kennedy, A.C., Papendick. R.I. 1995. Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation.* 50(3):243-248.

Kernaghan, G., Reeleder, R. D., Hoke, S. M. T. 2008. Quantification of *Pythium* populations in ginseng soils by culture dependent and real-time PCR methods. *Appl. Soil Ecol.* 40:447-455.

Killham, K. 1994. *Soil ecology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Kinkel, L. L., Bakker, M. G., Schlatter, D. C. (2011). A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual review of phytopathology*, 49, 47-67.

Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods.* 58: 169–188.

Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2407-2415.

Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P., Rossi, J-P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European journal of soil biology*, v.42, p.3-15.

Masera, O. R, Astier, M., López Ridaura, S. 1999. Sustentabilidad y Manejo de Recursos Naturales: el marco de evaluación MESMIS. GIRA. Mundi-Prensa e Instituto de Ecología-UNAM, México.109 p.

Magdoff, F., H. Van. 2009. *Building Soils for Better Crops. Sustainable Soil Management*. 3rd. Ed. SARE-USDA, 294 p.

Moebius-Clune, B.N., Moebius-Clune, D. J., Gugino, B.K., Idowu, O.J., Schindelbeck, R.R., Ristow, A.J., van Es, H.M., Thies, J.E., Shayler, H. A., McBride, M. B., Wolfe, D.W., Abawi G.S. 2016. Comprehensive Assessment of Soil Health – The Cornell Framework Manual, Edition 3.1, Cornell University, Geneva, NY. Recuperado de: <http://www.css.cornell.edu/extension/soil-health/manual.pdf>

Mohammadi, O. 1992. Mycostop biofungicide - present status. In: Tjamos, E. S., Papavizas, G. C., Cook, R. J. (Eds.), Biological Control of Plant Diseases. New York, Plenum Press, pp 207-210.

New England Vegetable Management Guide 2016- 2017. University of Massachusetts Extension Bookstore. Recuperado de: <https://nevegetable.org/about-guide/ordering-and-downloads>

OPYPA –MGAP. Anuario 2016. Recuperado de:  
[http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario\\_opypa\\_2016\\_en\\_baja.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_opypa_2016_en_baja.pdf)

O' Sullivan, D. J., O' Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant pathogens. Microbiol. Rev. 56:662-672.

Pankhurst, C., Doube, B., Gupta, V. (1997). Biological indicators of soil health. Crop Protection. Vol. 17, pp. 368–369. Wallingford: CAB International. doi: 10.1016/S0261-2194(98)00024-6.

Parkinson, D., Coleman, D. 1991. Microbial communities, activity and biomass. Agriculture, Ecosystems and Environment 34:3-33.

Pérez, C., L. De La Fuente, A. Arias y N. Altier. 2001. Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus*. Agrociencias. 5: 41-47.

Perez, C., Dill-Macky, R., Kinkel, L. L. 2007. Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. Plant and Soil, 302(1-2), 53-69.

Pérez, C., Hoffman, E., Arbeletche, P. 2011. En: Muñoz, R., Sillon, M. (Eds.) Las enfermedades de la soja y su importancia en los países del Mercosur. Editorial Hemisferio del Sur, Buenos Aires, Argentina, pp 291-305.

Pérez, C.A., De Lucca, F., Villar, H.A., Pereyra, S., Vero, S., Ernst, O., Altier, N. 2011. Variabilidad inter e intra-específica en la capacidad antagonista de cepas nativas de *Trichoderma* spp. ante *Pyrenophora tritici-repentis* y *Cochliobolus sativus*. III Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico. Piriápolis, Uruguay.

Perticari, A., Arias, N., Baigorri, H., De Battista, J.J., Montecchia, M., Pacheco Basrco, J.C., Simonella, A., Toresani, S., Ventimiglia, L., Vicente, R. 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. En: El libro de la soja. Buenos Aires. Servicios y Marketing Agropecuario, pp.69-76.

Powlson, D.S., Prookes, P.C., Christensen, B.T. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. Soil Biology and Biochemistry, Volume 19, Issue 2, 1987, Pages 159-164.

Racca, R.W., Collino, D.J. 2005. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. Congreso Mundo Soja. Buenos Aires. p. 111-120.

Ramos Zapata, J. A. 2008. Microorganismos del suelo. En: Bautista Zúñiga, F., Delfín González, H., Palacio Prieto, J. L. (Eds). Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. Mexico, D.C, pp 185-210. Recuperado en: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/429.pdf#page=186>

Ritz, K., Black, H.I.J., Campbell, C.D., Harris, J.A., Claire Wood, C. 2009 Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecol Indicators* 9: 1212-1221.

Ramírez, M. 2004. Indicadores de estado: factores biológicos que limitan la calidad agrícola de los suelos. En: Primer Taller Nacional sobre indicadores de calidad de suelo. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Palmira, Colombia.

Rodríguez-Navarro D. N., Margaret Oliver I., Albareda Contreras M., Ruiz-Sainz J. E. (2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy Sustainable Dev.* 31 173–190.

Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S., Kinkel, L. 2009. Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. *Microbial ecology*, 57(3), 413-20.

Schneemann, I., Nagel, K., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J., & Imho\_, J. F. (2010). Comprehensive investigation of marine Actinobacteria associated with the sponge *Halichondria panicea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3702-14.

Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2008). Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(1), 11-9.

Schroeder, K.L., Martin, F. N., Arthur W.A.M. de Cock, André Lévesque, C., Christoffel F.J. Spies, Okubara, P. A., Paulitz, T. C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: Evolving taxonomy, new tools, and challenges *Plant Disease* 97 (1), 4-20.

Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., Rajnisz, A., 2012. Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.* 7(3): 373–390.

Sparling, G.P. 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* 30(2) 195 – 207.

SQI-Soil Quality Institute. 1996. Indicators for Soil Quality Evaluation. USDA Natural Resources Conservation Service. Prepared by the National Soil Survey Center in cooperation with The Soil Quality Institute, NRCS, USDA, and the National Soil Tilth Laboratory, Agricultural Research Service. USA.

Stewart. S., Rodríguez. M., 2013. Manual de identificación de enfermedades de soja. Publicación INIA. Boletín de divulgación N° 104.

Strunk, C., Byamukama, E., 2015. Be On The Lookout for Seedling Diseases. IGROW, SDSU Extension. Recuperado de: <http://igrow.org/agronomy/corn/be-on-the-lookout-for-seedling-diseases/>

Sultana, V., Ghulam, N, B., Ambreem, Jehan Ara, Rajput Tariq, Ehteshamul-Haque, S. 2011. Comparative efficacy of a red alga *Solieria robusta*, chemical fertilizers and pesticides in managing the root diseases and growth of soybean. *Pak. J. Bot.*, 43(1): 1-6.

Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., Zuberer, D. A., (2005). Principles and applications of soil microbiology. Upper Saddle River, New Jersey. Pearson Prentice Hall.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. 2007. Introducción a la Microbiología. 9ª edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.

Tokala, R.K, Strap, J.L., Jung, C.M., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L.A, Bailey, J.F., Morra, M.J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol*, 68: 2161–2171.

---

USDA. 2016. United State Department of Agriculture. Soil Health. Recuperado de: <https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/>

Valan Arasu, M., Duraipandiyan, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S. 2008. Antimicrobial activity of *Streptomyces sp.* ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J. Mycol. Med.*, 18: pp. 147–153.

Van Elsas, J.D., Smalla, K., 1997. Methods for sampling soil microbes. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C, pp. 383–391.

Vaz, J. P., Kinkel, L.L. 2014. Nutrient overlap, genetic relatedness and spatial origin influence interaction-mediated shifts in inhibitory phenotype among *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Ecol.*, pp. 1–12.

Vaz, J. P. 2013. Ecology of interspecies signaling among *Streptomyces* and its relationship to pathogen suppression. A dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota. In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

Wagg, C, Bender, S.F., Widmer, F. van der Heijden, M.G.A. 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 111, 5266–5270

Warkentin, B. P. 2001. The tillage effect in sustaining soil functions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164: 345-350.

Wamberg, C., Christensen, S.; Jakobsen, I., Muller, A. K., Sorosen, S. J. 2003. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil biology and biochemistry* 35: 1349–1357.

Whalen, J.K., Sampedro, L. 2009. *Soil Ecology & Management*. UK, Cambridge University Press. CAB International.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. (Eds.). Academic Press, Inc., New York. pp. 315 -322.

Wiggins, B. E., Kinkel, L. L. 2005. Green manures and crop sequences influence potato diseases and pathogen inhibitory activity of indigenous streptomycetes. *Phytopathology*, 95(2), 178-85.

Wurst, S., De Deyn, G. B., Orwin, K. 2012. Soil Biodiversity and Functions. In: *Soil Ecology and Ecosystem Services* - edited by Wall, D.H., Bardgett, R.D., Behan-Pelletier, V., Herrick, J.E., Jones, T.H., Ritz, K., Six, J., Strong, D.R. & van der Putten, W.H. *Eur J Soil Sci*, 64: 546. doi:10.1111/ejss.12039.

Yekkour, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Errakhi, R., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2012. Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Letters in Applied Microbiology* 55, 427–435.

Zoog, G.P., Zack, D.R., Ringelberg, D.B., MacDonald, N.W., Pregitzer, K.S., White, D.C. 1997. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61: 475-481. 123

## 8. ANEXO

### A. Medios de Cultivos y soluciones

<b>Starch Casein Agar (SCA)</b>	
Almidón	10 g
Caseína	0,3 g
CaCO <sub>3</sub>	0,02 g
Agar	15 g
Solución A*	100 ml
Solución B*	100 ml
H <sub>2</sub> O c.s.p	800 ml

#### \*Solución A

KNO<sub>3</sub> 20 g

NaCl 20 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 g

H<sub>2</sub>O c.s.p 1L

#### \*Solución B

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,02 g

H<sub>2</sub>O c.s.p 1L

<b>Medio TY</b>	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.3 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O c.s.p	1000 ml

<b>Buffer TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA)</b>	
Tris	108 g
ácido bórico	55 g
EDTA 0,5 M	40 ml
pH	8

\*EDTA 0,5 M: 186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O en 700 ml de H<sub>2</sub>O destilada

## B. Análisis fisicoquímicos

En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados de los análisis físicos y químicos realizados sobre las muestras de suelos de los 13 sitios.

**Tabla 12.** Propiedades físicas de los suelos de los 13 sitios. Textura del suelo; en % de arena, % limo, % arena total; potencial de retención del agua (Pot.Ret. H<sub>2</sub>O) y densidad del suelo.

Sitio	Textura			Pot. Ret. H <sub>2</sub> O (m <sup>3</sup> agua/m <sup>3</sup> suelo)	Densidad del suelo (g/cm <sup>3</sup> )
	% arcilla	% limo	% arena		
1	22,54	45,12	32,34	0,14	1,12
2	23,11	40,65	36,24	0,13	1,19
3	9,0	44,71	46,29	0,15	1,26
4	6,13	63,04	30,38	0,15	1,25
5	18,86	42,69	38,45	0,13	1,18
6	15,25	56,77	27,98	0,17	1,25
7	16,50	53,43	30,07	0,17	1,37
8	6,13	71,57	22,29	0,24	1,18
9	6,13	69,09	24,78	0,16	1,14
10	7,74	60,03	32,23	0,27	0,97
11	6,12	49,77	44,11	0,13	0,91
12	2,03	43,15	54,82	0,16	1,09
13	6,12	47,42	46,46	0,11	1,15

**Tabla 13.** Análisis químicos de los suelos de los 13 sitios. Ca, Calcio; Mg, magnesio; K, potasio; Na, sodio; A.tit., acidez titulable; CIC, capacidad de intercambio catiónico; Bases T, bases titulables, % sat, porcentaje de saturación; pH; N, nitrógeno; CO, carbono orgánico; P (Bray I, resinas, cítrico), fósforo según los 3 métodos indicados; PMN, potencial de mineralización de nitrógeno.

SITIO	Ca	Mg	K	Na	A.Tit.	CIC	Bases T.	%Sat	pH	N	CO	Bray I	Resinas	Cítrico	PMN
	meq/100g	Bases	(H2O)	%	%	µg P/g	µg P/g	µg P/g	mg/kg						
1	24.9	2.1	0.44	0.24	5.2	32.9	27.7	84.3	5.8	0.27	3.37	7.9	7.6	8.5	69
2	18.7	2.1	0.40	0.34	6.2	27.8	21.6	77.6	5.5	0.21	2.43	6.2	1.7	12.4	22
3	9.7	1.4	0.23	0.24	4.4	16.0	11.6	72.5	5.4	0.16	1.90	7.0	4.6	18.8	6
4	15.3	1.3	0.62	0.13	4.2	21.6	17.4	80.6	5.8	0.17	2.10	7.7	6.1	18.8	24
5	27.1	2.3	0.38	0.29	3.4	33.5	30.1	89.8	6.2	0.19	2.51	5.1	4.6	17.6	34
6	15.3	1.6	0.69	0.32	4.0	21.9	17.9	81.6	6.0	0.18	2.32	1.5	<1	2.1	47
7	17.8	1.2	0.65	0.20	3.2	23.0	19.8	86.3	6.2	0.17	2.23	3.8	6.1	2.1	15
8	5.1	2.1	0.29	0.35	6.5	14.3	7.8	54.7	5.0	0.25	2.52	7.0	<1	9.8	90
9	6.2	3.3	0.30	0.87	5.7	16.4	10.6	65.0	5.2	0.31	3.34	11.3	4.6	16.3	43
10	6.0	2.5	0.47	0.56	5.7	15.3	9.5	62.4	5.3	0.28	2.95	7.4	<1	11.1	48
11	4.4	2.0	0.43	0.35	5.0	12.1	7.2	59.2	5.3	0.26	2.46	5.2	1.7	3.4	81
12	4.6	1.9	0.22	0.33	5.5	12.6	7.1	56.1	5.2	0.23	2.29	1.0	1.7	2.1	74
13	4.6	1.7	0.20	0.24	5.0	11.7	6.7	57.5	5.2	0.16	1.81	5.1	<1	5.9	80

## C. Salidas de ACP

### Análisis de componentes principales

Datos estandarizados

Casos leídos 14

Casos omitidos 0

### Variables de clasificación

sitio

#### Autovalores

Lambda	Valor	Proporción	Prop	Acum
1	3,74	0,42		0,42
2	1,79	0,20		0,61
3	1,08	0,12		0,73
4	0,99	0,11		0,84
5	0,84	0,09		0,94
6	0,29	0,03		0,97
7	0,24	0,03		1,00
8	0,02	2,7E-03		1,00
9	0,02	1,9E-03		1,00

#### Autovectores

Variables	e1	e2
Arcilla	0,42	-0,02
d.inh. ILB322	0,39	0,23
d.inh. U1302	0,22	-0,30
IP p	-0,20	0,55
Actino.	0,24	0,38
pH	0,42	-0,15
P	0,39	0,06
PMN	-0,31	0,35
CO	0,30	0,51

## 9. ABREVIATURAS

**ACP** Análisis de componentes principales

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ADNg** Ácido desoxirribonucleico genómico

**ANNI** Agencia Nacional de Investigación e Innovación

**ARNr** Ácido Ribonucleico ribosomal

**DIEA** Dirección de Estadísticas Agropecuarias

**dNTPs** Desoxinucleótidostrifosfato

**FBN** Fijación Biológica de Nitrógeno

**FSN** Fijación Simbiótica de Nitrógeno

**INIA** Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

**IP** índice de patogenicidad

**ITS** Internal transcribed spacer

**MGAP** Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca

**NBCI** National Center for Biotechnology Information

**O. D** Optical density

**OPYPA** Oficina de Programación y Políticas Agropecuarias

**pb** Pares de bases

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDA** Potato Dextrose Agar

**PM** Peso molecular

**PMN** Potencial de mineralización del nitrógeno

**RCF** Relative Centrifugal Force

**r.p.m** revoluciones por minuto

**SCA** Starch Casein Agar

**UFC** Unidades formadoras de colonias

**USDA** United States Department Agriculture

**UV** ultravioleta