

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFICIENCIA SIMBIÓTICA Y CAPACIDAD COMPETITIVA DE
CEPAS DE RIZOBIOS QUE NODULAN SOJA EN SUELOS CON
Y SIN HISTORIA DEL CULTIVO**

por

Paula Florencia LAGURARA CROSSA

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
JUNIO 2018

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dra. María Morel, Ing. Agr. (Dr.) Pilar Irisarri, y Dr. Raúl Platero, el 9 de julio de 2018. Autor/a: Lic. Paula Lagurara.
Director/a Dra. Andrea Rodríguez Blanco.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi hermosa familia, quienes me han amado y apoyado en todo momento. Personas divinas que tuve y tengo la suerte de tener. Y quiero agradecer especialmente a mi madre, con quien me faltan palabras y me sobran sentimientos al momento de expresar lo especial que es para mí.

Quiero agradecer en primera instancia a Andrea, Elena y Margarita por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto. Y especialmente a Andrea, por la confianza depositada, las mil y una dudas evacuadas y la gran paciencia con las correcciones de todo lo que he presentado.

A los compañeros del laboratorio de Micro por los momentos compartidos, y por el ánimo frente a todos esos pucheros como consecuencia de los PCRs!!

También quiero agradecer a las gurisas del laboratorio de Micro en INIA, por la ayuda en los ensayos de plantas, los lindos almuerzos y mates compartidos.

Y finalmente a los compañeros que han accedido a formar el Tribunal, a Pilar por su constante apoyo “tirando para adelante” siempre. A María y Rufo, por realizar el seguimiento de este trabajo, por la paciencia, cariño y buena onda que ponen en los comentarios y consultas (forma parte de ustedes, lo sé), me siento afortunada de haber tenido la oportunidad de continuar teniéndolos presentes!

Agradecer a “las gurisas” del IIBCE, porque desde el 2010 han estado presentes en cada paso, compartiendo lo lindo y los sinsabores de esta carrera, siempre dando buenos consejos y mucho cariño. Muchas gracias!

Un GRACIAS enorme a mis “chikis”, amigas que tuve la suerte de conocer en la facultad, y que con el paso de los años se han convertido en compañeras de ruta, compartiendo todos los momentos buenos y malos que se nos presentan.

No quiero olvidarme de todos los compañeros, vecinos y amigos de “la TEBELPA”, por el aguante en todos los faltazos a las reuniones, por el ánimo que dan y por todos esos mates ricos que compartimos!

MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....	1
1.1. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO.....	1
1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....	2
1.2.1. <u>Leguminosas</u>	3
1.2.2. <u>Rizobios</u>	4
1.2.3. <u>Interacción rizobio-leguminosa: proceso de nodulación</u>	5
1.2.4. <u>Inoculantes rizobianos</u>	8
1.2.5. <u>Factores que afectan la interacción</u>	9
1.2.6. <u>Técnicas para la identificación de cepas de rizobios</u>	10
1.2.7. <u>Cuantificación de la FBN</u>	11
1.3. EL CULTIVO DE SOJA EN URUGUAY.....	13
1.3.1. <u>Inoculación del cultivo de soja en Uruguay</u>	14
1.4. ANTECEDENTES.....	16
1.5. OBJETIVOS.....	17
1.5.1. <u>Objetivo general</u>	17
1.5.2. <u>Objetivos específicos</u>	17
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>.....	18
2.1. CEPAS DE RIZOBIOS UTILIZADAS EN LOS INOCULANTES	
COMERCIALES.....	18
2.2. POBLACIONES DE RIZOBIOS QUE NODULAN SOJA EN SITIOS	
CON Y SIN HISTORIA DEL CULTIVO.....	18
2.2.1. <u>Sitios muestreados</u>	18
2.2.2. <u>Colecta de nódulos</u>	21
2.2.3. <u>Aislamiento de rizobios a partir de nódulos</u>	23

2.2.4. <u>Identificación de los rizobios: rep-PCR</u>	24
2.2.5. <u>Autenticación de cepas de rizobios naturalizadas</u>	25
2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS	
COMERCIALES.....	26
2.3.1. <u>Velocidad de crecimiento</u>	26
2.3.2. <u>Características de la nodulación</u>	27
2.4. ENSAYO BAJO CONDICIONES SEMI-CONTROLADAS:	
INVERNÁCULO.....	29
2.4.1. <u>Características de los suelos</u>	29
2.4.2. <u>Diseño experimental y condiciones de crecimiento de las plantas</u>	30
2.4.3. <u>Determinación de eficiencia simbiótica</u>	31
2.4.4. <u>Identificación de las cepas ocupantes de los nódulos</u>	32
2.4.5. <u>Análisis de datos</u>	32
2.5. ENSAYOS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS: MAGENTAS.....	33
2.5.1. <u>Diseño experimental y condiciones de crecimiento de las plantas</u>	33
2.5.2. <u>Determinación de la eficiencia simbiótica y capacidad competitiva</u>	34
2.5.3. <u>Análisis de datos</u>	34
3. <u>RESULTADOS</u>	36
3.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS COMERCIALES: BOX-PCR.....	36
3.2. POBLACIONES DE RIZOBIOS QUE NODULAN SOJA EN SITIOS	
CON Y SIN HISTORIA DEL CULTIVO.....	37
3.2.1. <u>Aislamiento de rizobios a partir de los nódulos colectados a</u>	
<u>campo</u>	37
3.2.2. <u>Persistencia y capacidad competitiva de las cepas de rizobios</u>	
<u>empleadas en los inoculantes de Uruguay y la región</u>	37
3.2.3. <u>Cepas de rizobios naturalizadas</u>	41
3.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS	
COMERCIALES.....	43
3.3.1. <u>Velocidad de crecimiento</u>	43
3.3.2. <u>Características de la nodulación de las cepas comerciales de <i>B. elkanii</i></u>	
<u>usadas en Uruguay y <i>B. japonicum</i> SEMIA5080</u>	44

3.4. EFICIENCIA SIMBIÓTICA Y CAPACIDAD COMPETITIVA DE CEPAS DE RIZOBIOS COMERCIALES USADAS EN LA REGIÓN:	
ENSAYO EN MACETAS.....	48
3.4.1. <u>Características de los suelos</u>.....	48
3.4.2. <u>Eficiencia simbiótica</u>.....	49
3.4.3. <u>Capacidad competitiva</u>.....	54
3.5. EFICIENCIA SIMBIÓTICA Y CAPACIDAD COMPETITIVA DE CEPAS DE RIZOBIOS COMERCIALES USADAS EN LA REGIÓN:	
ENSAYO EN MAGENTAS.....	58
3.5.1. <u>Primer ensayo</u>.....	58
3.5.2. <u>Segundo ensayo</u>.....	59
4. <u>DISCUSIÓN</u>.....	62
5. <u>CONCLUSIONES</u>.....	70
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	71
7. <u>ANEXOS</u>.....	87
7.1. ANEXO I: Medios de cultivo.....	87
7.2. ANEXO II: Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo.....	90

RESUMEN

La soja (*Glycine max*) es el principal cultivo de grano sembrado en Uruguay, su área de siembra es cada vez más extensa, alcanzando zonas no tradicionalmente agrícolas. En el año 2017 fueron sembradas 1.140.000 hectáreas con un rendimiento promedio de 1940 kg/ha. Es un cultivo inoculado 100 % con inoculantes formulados con dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* (U1301 + U1302), de origen brasilero, recomendadas desde 1984 por el MGAP. Este trabajo tiene como objetivo actualizar la información respecto a la eficiencia y capacidad competitiva de estas cepas y la existencia en los suelos de poblaciones de rizobios naturalizadas. Para ello se realizaron muestreos a campo en diferentes zafras, y zonas del país en suelos con y sin historia del cultivo, así como también ensayos bajo condiciones controladas. En ellos se aplicaron como tratamiento las cepas de rizobios recomendadas en Uruguay y dos cepas de *B. japonicum* (SEMIA5080 y E109) comercializadas en países limítrofes. De los nódulos de plantas de soja de los suelos con historia de cultivo se recuperaron las cepas de *B. elkanii* y la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum*. Esta última fue recuperada en mayor proporción, indicando una alta persistencia y gran capacidad competitiva. La población de rizobios presente en suelos con historia mostró una elevada eficiencia simbiótica. Además, en estos suelos existe una población de rizobios naturalizados que nodulan soja. En cuanto a la competencia entre las cepas, tanto en suelo como en sustrato estéril, la cepa SEMIA5080 presentó una mayor capacidad competitiva, seguida de la cepa U1302 de *B. elkanii* y de la U1301. En sustrato estéril la mezcla U1301 + U1302 y la cepa SEMIA5080 sola o en mezcla con las cepas de *B. elkanii* presentaron una alta eficiencia simbiótica. En suelo estas tres cepas presentaron valores de porcentaje de N derivado de la atmósfera entre el 90 - 100 %. Estos resultados son prometedores para la búsqueda de cepas más eficientes en su simbiosis con soja.

Palabras clave: cepas naturalizadas, fijación biológica de N₂, *Glycine max*, inoculante.

SYMBIOTIC EFFICIENCY AND COMPETITIVE ABILITY OF RHIZOBIUM STRAINS NODULATING SOYBEAN IN SOILS WITH AND WITHOUT HISTORY OF THIS CROP

SUMMARY

Soybean (*Glycine max*) is the main grain crop cultivated in Uruguay, its planting area is increasing, reaching areas not traditionally agricultural. In 2017, 1,140,000 hectares were planted with an average yield of 1940 kg/ha. This crop is 100 % inoculated with two strains of *Bradyrhizobium elkanii* (U1301 + U1302), original from Brazil, recommended since 1984 by the MGAP. The aim of this work is to update the information regarding the efficiency and competitive ability of these strains and the presence of naturalized rhizobia populations in the soils. Field samplings were done at different harvests, and areas of the country in soils with and without crop history, as well as under controlled conditions. Rhizobia strains recommended in Uruguay and two commercial strains of *B. japonicum* (SEMIA5080 and E109), were applied as treatments. The strains U1301 and U1302 of *B. elkanii* and the strain SEMIA5080 of *B. japonicum* were recovered from nodules of soybean in soils with history of cropping. The latter was recovered in greater proportion, indicating a high persistence and competitive capacity. This population of rhizobia present in soils with history of soybean showed a high symbiotic efficiency. In addition, in these soils there is also a population of naturalized rhizobia that nodulate soybean. Regarding the competition between the strains, both in soil and in sterile substrate, the SEMIA5080 strain presented a greater competitive capacity, followed by strain U1302 and U1301. Under gnotobiotic conditions, the mixture U1301 + U1302 and strain SEMIA5080 alone or in mixture with *B. elkanii* strains showed a high symbiotic efficiency. In soil, these three strains showed values of ¹⁵N natural abundance between 90 - 100 %. These results are promising for the search of more efficient rhizobia strains for soybean.

Keywords: native strains, N₂ biological fixation, inoculant, *Glycine max*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más abundantes en la superficie terrestre. En las plantas es el cuarto elemento de mayor concentración luego del carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), siendo un macronutriente esencial ya que forma parte de biomoléculas fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y alcaloides (Taiz y Zeiger, 1998).

La Figura 1 muestra los principales procesos e interacciones entre el N de la atmósfera, el suelo y los seres vivos en lo que se conoce como ciclo biogeoquímico del N. La litosfera dispone de la mayor reserva de dicho nutriente, sin embargo este N mineral se encuentra atrapado en rocas ígneas y tiene una escasa participación en el ciclo del N. Por este motivo, la principal forma disponible de dicho mineral en los ecosistemas es el nitrógeno diatómico (N_2), el cual constituye el 78 % de la atmósfera (Galloway *et al.*, 2004).

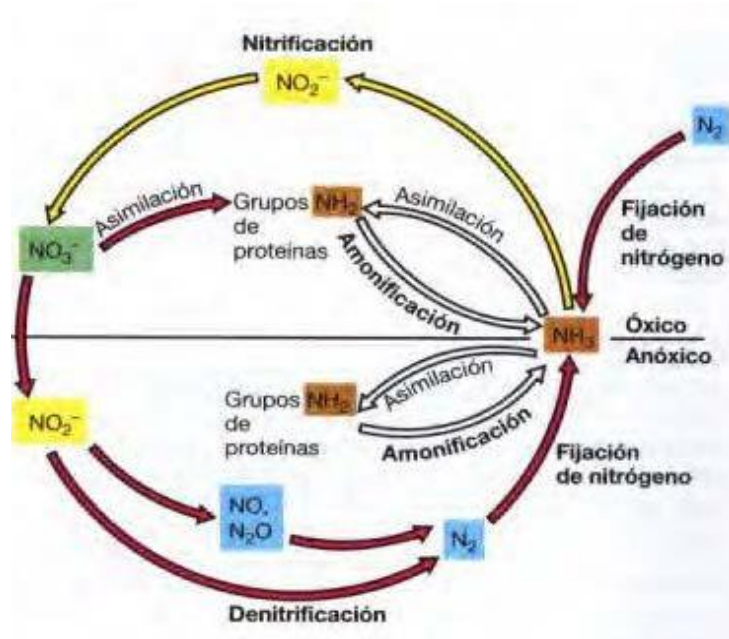


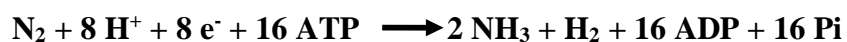
Figura 1. Ciclo del nitrógeno (Tomado de Madigan, Martinko y Parker, 2006).

En el suelo, el N se encuentra en un 2 % bajo formas inorgánicas y el 98 % restante bajo formas orgánicas. Para poder ser absorbido por las plantas, el N se debe encontrar mineralizado, es decir, como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), pero dado que se acumula principalmente bajo formas orgánicas y que es removido por los cultivos en cantidades superiores al resto de los macronutrientes actúa como limitante para el crecimiento vegetal (Frioni, 2006). Es necesaria la intervención de microorganismos para que sea mineralizado y se encuentre disponible para las plantas; este proceso de mineralización lo llevan a cabo algunas especies de bacterias, hongos y arqueas. Por otro lado, el N atmosférico se reduce a amoníaco (NH_3) mediante el proceso denominado fijación de N; el cual puede llevarse a cabo de forma industrial a través de la reacción de Haber-Bosch, o biológica, a través de microorganismos fijadores de nitrógeno, también llamados diazótrofos (Gruber y Galloway, 2008).

1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

Los diazótrofos son un grupo de microorganismos (bacterias y arqueas) ampliamente distribuido en grupos parafiléticos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: bacterias y arqueas, aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, como células individuales o en filamentos, en vida libre y en simbiosis (Liu *et al.*, 2011; Raymond *et al.*, 2004). Todos estos grupos tienen en común que presentan el complejo enzimático nitrogenasa, el cual en ausencia de O_2 es capaz de romper el triple enlace de la molécula de nitrógeno y dar lugar a NH_3 (Rees *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011). El complejo enzimático nitrogenasa consta de dos subunidades, una proteína hierro-molibdeno (FeMo) de 250 kDa codificada por los genes *nifD* y *nifK* y una proteína-hierro (Fe) de 70 kDa formada por dos subunidades idénticas codificadas por el gen *nifH* (Zehr *et al.*, 2003). Esta es la nitrogenasa convencional pero existen casos en los que la ferro-metaloproteína contiene vanadio o hierro en lugar de molibdeno (Arber *et al.*, 1987; Krahn *et al.*, 2002). La expresión de estos genes está regulada principalmente por la presencia de NH_3 y O_2 en el

medio, que puede reprimir la transcripción de los genes (Bolaños *et al.*, 2006). La reacción catalizada por la enzima nitrogenasa es la siguiente:



La agricultura moderna utiliza plantas con potenciales productivos cada vez mayores, demandando una elevada nutrición nitrogenada, la cual puede ser muy superior al aporte de N del suelo. Por lo tanto, en la mayoría de los cultivos es necesario suplementar con fertilizantes nitrogenados. Esto conlleva un considerable incremento en los costos de producción y contaminación ambiental. Sin embargo, existe un grupo de diazótrofos, capaces de interactuar con diversos cultivos y proveerlos de N, a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Raymond *et al.*, 2004). La interacción más estudiada es aquella que ocurre entre los rizobios y las leguminosas.

Los microorganismos benéficos del suelo aumentan la disponibilidad de los nutrientes y como consecuencia, las plantas se ven favorecidas en la toma de nutrientes alcanzando un mayor crecimiento y obteniéndose mejores rendimientos en los cultivos (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2013; Vance, 2001). La FBN presenta diversas ventajas frente a la fertilización nitrogenada tanto a nivel económico, como también ambiental y de salud (Alarcón y Ferrera, 2000). Este proceso reduce los riesgos de contaminación ambiental, ya sea por disminución de las emisiones de gases nitrogenados o lixiviado de los nitratos no absorbidos por la planta a los cursos de agua, que pueden ser peligroso para la salud humana y animal (Jaynes *et al.*, 2001).

1.2.1. Leguminosas

Las leguminosas son una familia compuesta por aproximadamente 19400 especies, que no sólo tienen una alta relevancia para la alimentación mundial, sino que también son esenciales para regenerar los suelos (Beyhaut *et al.*, 2014; Gepts *et al.*, 2005). Esto se debe a que la mayoría de ellas además de absorber N mineral del

suelo, son capaces de asociarse con bacterias que llevan a cabo el proceso de FBN y de esta forma obtener N de la atmósfera (Winter *et al.*, 2004). Por este motivo, representan una fuente de N para los suelos y son frecuentemente utilizadas en rotaciones o en asociación con otros cultivos (Gepts *et al.*, 2005).

Uruguay cuenta con una gran biodiversidad de leguminosas no sólo forrajeras sino nativas, con aproximadamente 290 especies en todo el territorio (Izaguirre, 2005; Rosengurt, 1943). Para preservar este recurso es de suma importancia el estudio de las mismas y de la interacción de estas con los microorganismos del suelo. A su vez, también es importante conocer como los cultivos de leguminosas, con gran incidencia económica a nivel nacional y mundial, se adaptan a las condiciones climáticas y edafológicas del país, ya que estos factores serán cruciales no sólo en la interacción del cultivo con los microorganismos sino que también en el rendimiento del mismo.

1.2.2. Rizobios

Dentro de los diazótrofos, los rizobios son bacterias capaces de formar nódulos en raíces y tallos de leguminosas. Son bacterias Gram negativas, pertenecientes a los grupos de las α y β proteobacterias. Este filo cuenta con más de 500 géneros y más de 2000 especies (Gupta, 2000; Rosenberg *et al.*, 2013). Las α proteobacterias son en su mayoría bacterias aeróbicas de metabolismo oligotrófico y comprenden 13 géneros capaces de nodular leguminosas: *Aminobacter*, *Neorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Methilobacterium* y *Microvirga* (Babu *et al.*, 2014; Delamuta *et al.*, 2017). Por otra parte, en el año 2001 Moulin y colaboradores reportaron bacterias pertenecientes al género *Burkholderia*, estos rizobios nodulan en su mayoría leguminosas del género Mimoso (Chen *et al.*, 2001; Moulin, Muniue, y Dreyfus, 2001). Este género junto con *Cupriavidus* (anteriormente llamada *Ralstonia*), pertenece al grupo de las β proteobacterias, el cual comprende 12 familias con características similares a las α proteobacterias en cuanto a la FBN (Bournaud *et al.*, 2013; Gyaneshwar *et al.*, 2011; Suárez-Moreno *et al.*, 2012).

Los rizobios son capaces de establecer relaciones simbióticas con un alto número de especies de leguminosas. Algunas de estas interacciones presentan un alto grado de especificidad, es decir que un determinado género de rizobio interactúa con una determinada especie de leguminosa pero en otros casos las cepas son promiscuas, capaces de establecer simbiosis con diversas leguminosas. Este es el caso de la cepa NGR234 de *Ensifer sp.*, capaz de nodular a 232 (51 %) de 452 leguminosas probadas (Pueppke y Broughton, 1999). En otros casos, la interacción es altamente específica y ocurre entre una especie de leguminosa y un determinado género de rizobio, como es el caso de *Medicago sp.* y *Ensifer meliloti* (Bailly *et al.*, 2007).

Durante esta interacción los rizobios inducen la formación de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa, llamado nódulo. En él los rizobios llevan a cabo el proceso de FBN. A través de este proceso la planta utiliza el amonio sintetizado por los rizobios y éstos, a su vez, reciben esqueletos carbonados de la planta para sus funciones vitales. Por lo tanto, para que se lleve a cabo la FBN la planta debe invertir mucha energía en el desarrollo de los nódulos y su posterior mantenimiento (Madsen *et al.*, 2010). Es por ello, que el hospedero regula el número total de nódulos que se forman en su sistema radical mediante la monitorización del aporte que aquellos realizan a su nutrición nitrogenada (Mortier, Holsters, y Goormachtig, 2012; Reid, Ferguson, y Gresshoff, 2011).

1.2.3. Interacción rizobio-leguminosa: proceso de nodulación

La comunicación entre los simbioses comienza con la liberación a la rizósfera, por parte de la leguminosa, de metabolitos secundarios contenidos en sus exudados (Jones *et al.*, 2007). La composición de estos exudados es diversa y varía en función del estado fisiológico de la planta, disponibilidad de nutrientes y hasta de los microorganismos presentes. Son principalmente compuestos de naturaleza flavonoide como naringenina, genisteína y daidzeína, que atraen específicamente a los rizobios hacia la región apical (punta) de los pelos radicales (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Una vez que los rizobios reconocen esta señal se activa en ellos la transcripción de los genes de nodulación (*nod*) que darán lugar a la síntesis de lipoquitin-oligosacáridos, comúnmente llamados factores Nod (Gage, 2004; Long, 2001). Tanto los genes simbióticos como los genes de nodulación evolucionaron juntos y en la actualidad se conoce que se ubican agrupados en operones que se localizan en bloques cercanos unos de otros en el cromosoma en islas simbióticas o extracromosoma en los plásmidos simbióticos (Long, 2001). En los géneros *Rhizobium* y *Ensifer* y en algunas cepas del género *Mesorhizobium*, los genes de la nodulación se encuentran codificados en plásmidos simbióticos (Sessitsch *et al.*, 2002). En *Bradyrhizobium* los genes simbióticos son cromosomales y se encuentran agrupados en un fragmento de alrededor de 400 Kpb que podría ser móvil (Göttfert *et al.*, 2001).

La variedad, la naturaleza y la cantidad producida de los factores Nod son características importantes ya que determinan en última instancia la nodulación y el rango de hospedero. No todos los rizobios sintetizan los mismos factores Nod, estas moléculas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales que incluyen la adición de grupos metilo, acetilo, sulfato, ciertos ácidos grasos y también azúcares modificados (Figura 2). Estas adiciones hacen que la estructura de los factores Nod sea específica para cada especie de rizobio, lo cual hace posible a su vez, que se pueda o no establecer la simbiosis con una especie determinada de leguminosa (Cárdenas *et al.*, 1995; Cullimore, Ranjeva, y Bono, 2001; Wang *et al.*, 2012). Además también intervienen en la especificidad de la interacción: exopolisacáridos, lipopolisacáridos, los receptores NFRs de las plantas, β -glucanos cíclicos, proteínas efectoras del sistema de secreción T3SS de bacterias y moléculas relacionados a las respuestas inmunes tanto en la leguminosa como en los simbioses microbianos (Berendsen, Pieterse, y Bakker, 2012; Gust *et al.*, 2012; Nelson y Sadowsky, 2015). Una vez que los factores Nod son reconocidos por la especie hospedera inducen a concentraciones muy bajas (pico y nanomolares) una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta (Figura 3) (Cullimore, Ranjeva, y Bono, 2001).

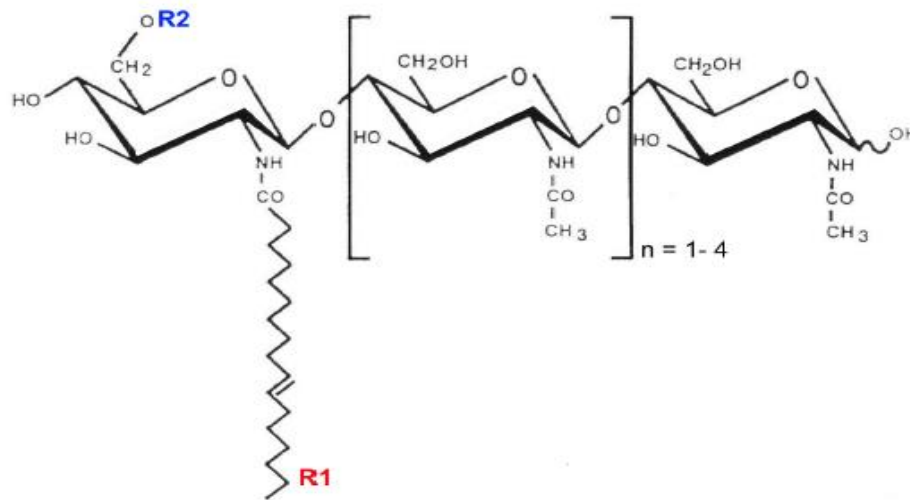


Figura 2. Estructura básica del lipoquitin-oligosacárido. En los sitios marcados con R se incorporan las modificaciones responsables de la especificidad de los factores Nod. Imagen tomada de Monza y Márquez, (2004).

Gracias a estos cambios en los pelos radicales (niveles del influjo y eflujo de ciertos iones como calcio, cloro, potasio y protones; pH intracelular, entre otros) los rizobios se unen a ellos y dan lugar a la formación del hilo de infección. Ésta es una estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical, previniendo de esta manera el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio, y en consecuencia, la respuesta de defensa de la planta. A menudo cada nódulo contiene una única cepa bacteriana, sin embargo, en ocasiones más de una bacteria es atrapada durante la curvatura del pelo radicular (Gage, 2004).

Simultáneamente con la formación de este canal de infección, se produce la activación de la división de las células del córtex de la raíz para formar el primordio nodular. Una vez que el canal de infección alcanza el primordio nodular, las bacterias son liberadas al citoplasma vegetal por un proceso similar a la endocitosis en el que la bacteria queda rodeada por la membrana de la célula vegetal (membrana peribacteroidal).

Finalmente, las células bacterianas comienzan a dividirse y sufren un proceso de diferenciación que las convierten en bacteroides capaces de fijar nitrógeno

atmosférico, y en dicho momento el nódulo pasa a estar maduro. Un conjunto de bacteroides rodeado por una membrana peribacteroidal se denomina simbiosoma (Gage, 2004; Monza y Márquez, 2004).

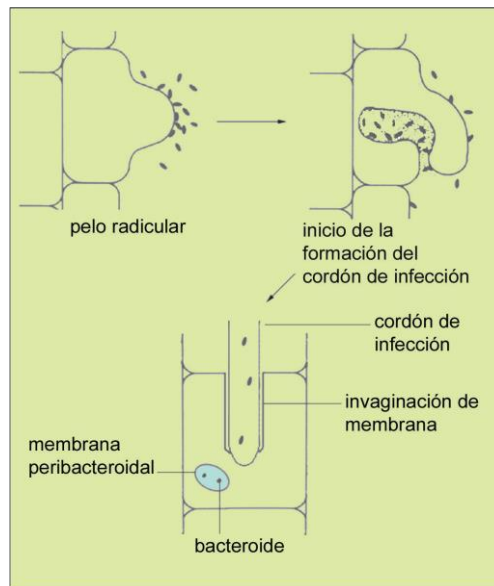


Figura 3. Infección de un pelo radicular, formación del cordón de infección y del simbiosoma. Imagen tomada de Monza y Márquez (2004).

Durante el proceso de formación y funcionamiento del nódulo, la planta incrementa la síntesis de unas proteínas llamadas nodulinas, las cuales están involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Una de ellas es la leg-hemoglobina cuya función es la de mantener bajas las tensiones parciales de oxígeno, lo que crea un ambiente microaeróbico que permite la actividad de la enzima nitrogenasa en el bacteroide (Sainz *et al.*, 2015; Pazdernik *et al.*, 1997).

1.2.4. Inoculantes rizobianos

Los inoculantes son formulaciones específicas a base de microorganismos que promueven el crecimiento vegetal, ya sea porque favorecen la adquisición de nutrientes o bien porque actúan como control biológico de patógenos (Ahmad, Ahmad, y Khan, 2008; Compant *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006). La

formulación y comercialización de inoculantes comenzó en 1930 en Estados Unidos, y continúa en la actualidad abarcando cada vez más cultivos (Datta *et al.*, 2015). Para la formulación de los mismos, uno de los factores más importantes a tener en cuenta es como interaccionan con el cultivo, y si contiene microorganismos diazótrofos entonces, es importante tener en cuenta el grado de especificidad con el hospedero (Martínez-Romero, 2009). Estas formulaciones pueden estar compuestas por un único microorganismo o combinaciones de más de una especie procariota para aprovechar propiedades promotoras del crecimiento vegetal en la rizósfera (Bashan *et al.*, 2014; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Dentro de los inoculantes, los más comercializados son aquellos formulados a base de rizobios ya que varios de los cultivos de mayor relevancia económica a nivel mundial son leguminosas (Beyhaut *et al.*, 2014; Iqbal *et al.*, 2006; FAO, 2016).

1.2.5. Factores que afectan la interacción

La simbiosis se ve inhibida en primera instancia por falta de especificidad entre el hospedero vegetal (flavonoides) y la bacteria (factores Nod) (Martínez-Romero, 2009; Wang *et al.*, 2012). Por otro lado, altas concentraciones de N disponible en el suelo inhiben no sólo la nodulación, sino que también inhibe a la nitrogenasa, ya que la FBN es un proceso costoso a nivel energético y es más eficiente tomar el N que se encuentra en forma soluble (Gan *et al.*, 2004). La FBN también se puede ver afectada por la composición fisicoquímica del suelo (acidez, toxicidad, salinidad y baja fertilidad) y las condiciones climáticas (precipitaciones, temperatura) (de Castro Pires *et al.*, 2018).

La habilidad competitiva es uno de los factores determinantes en el éxito de la inoculación rizobiana. La competencia es un fenómeno complejo que depende de parámetros del suelo y de características genéticas, tanto del rizobio como de la planta huésped (Thies, Bohlool, y Singleton, 1992). Si se tiene en cuenta que los nódulos constituyen un ambiente favorable para los rizobios y por otro lado, que solo

uno de cada mil rizobios de los que colonizan la rizósfera puede penetrar en un nódulo, la competencia es una consecuencia que se genera entre los rizobios individuales por abrirse paso hacia ese ambiente protector. Y por este motivo la presencia de otras poblaciones de rizobios también afectan la simbiosis, ya que se genera una competencia no sólo por la ocupación de los nódulos sino que también por los nutrientes presentes en la rizósfera (Liu *et al.*, 2011). Cuando se introduce un inoculante, las cepas de rizobios que lo componen deben competir por los recursos del medio con las cepas nativas/naturalizadas presentes en los suelos (Abaidoo *et al.*, 2000). En muchos casos estas cepas naturalizadas están mejor adaptadas a las condiciones nutritivas y edafológicas del sitio y por lo tanto son más eficientes a nivel de persistencia en los suelos y competitividad por los nódulos, pero no necesariamente más eficientes a nivel simbiótico (de Almeida Ribeiro *et al.*, 2015). Estas poblaciones de rizobios surgen a través de modificaciones genéticas como recombinación o transferencia horizontal de genes entre especies de rizobios nativas y cepas introducidas a través de los inoculantes (Bailly *et al.*, 2007; Thies, Bohlool, y Singleton, 1992). Por estos motivos, es clave a la hora de desarrollar inoculantes más eficientes, realizar un relevamiento de las poblaciones de rizobios presentes en los suelos.

1.2.6. Técnicas para la identificación de cepas de rizobios

La identificación de rizobios puede realizarse a través de métodos fenotípicos como la resistencia a antibióticos (Alexandre, Laranjo y Olivera, 2006), análisis serológico (Thies, Holmes y Vachot, 2001), y el perfil de proteínas totales (Irisarri *et al.*, 1996). Por otra parte, los métodos genotípicos son más precisos que los fenotípicos para detectar e identificar microorganismos y permiten analizar un alto número de muestras en poco tiempo. El desarrollo de las técnicas moleculares ha aportado herramientas útiles para la identificación de las especies de bacterias que interactúan con las leguminosas (Lopez y Balatti, 2012). Una de ellas es el uso como marcador molecular de los genes 16S ARN y 23S ARN y la secuencia espaciadora (ITS) ARN 16S - ARN 23S (Graham *et al.*, 1991). De manera alternativa, pueden utilizarse otros

genes housekeeping como es el caso de *recA* y *rpoB*, entre otros (Gaunt *et al.*, 2001; Gevers *et al.*, 2005). Una alternativa para obtener información filogenética y taxonómica son los métodos basados en el análisis de perfiles de restricción, en los que el ADN es digerido con enzimas de restricción (Irisarri *et al.*, 1996), y basados en esta técnica el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y el ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis) (Zhang *et al.*, 2016; Grange y Hungria, 2004). En el caso de los rizobios muchas veces es necesario identificar a nivel de cepa. Con ese propósito se emplean técnicas como el rep-PCR que utiliza como cebadores secuencias cortas y repetitivas dispersas en el genoma, que resulta en un perfil de bandas característico de cada cepa en un gel de agarosa (Sawada, Kuykendall, Young, 2003). Los cebadores más utilizados son elementos repetitivos extra génicos palindrómicos (REP), secuencias consenso intergénicas repetidas de enterobacterias (ERIC), y elementos localizados en regiones intergénicas (BOX) (Versalovic *et al.*, 1994). Esta metodología ha mejorado la precisión y rapidez en la identificación de cepas. Dado que cada cepa presenta un perfil característico, las técnicas de rep-PCR son una herramienta útil para conocer la diversidad de cepas capaces de nodular una leguminosa, evaluar el control de calidad de los inoculantes y para conocer la capacidad competitiva por la ocupación de los nódulos de una determinada cepa de rizobio (de Bruijn, 1992; Vinuesa *et al.*, 1988).

1.2.7. Cuantificación de la FBN

Poder determinar la cantidad de N fijado en la agricultura tiene una gran relevancia a nivel mundial, ya que permite no sólo mejorar la producción de leguminosas sino que también brinda conocimiento sobre cómo mejorar la calidad de los suelos. Existen distintas metodologías para cuantificar el N fijado a través de la FBN; algunas menos exactas como determinar diferencias en la acumulación de N total o el rendimiento en materia seca entre plantas fijadoras y no fijadoras (Vincent, 1970). Estas metodologías presentan diversas limitantes, ya que no es correcto considerar sólo el N de la parte aérea, además la asimilación no siempre es equivalente entre la planta fijadora y la control.

Por otra parte, la técnica de reducción del acetileno cuantifica la actividad de la nitrogenasa basándose en la capacidad de la enzima de reducir el acetileno a etileno. Ambos gases pueden ser detectados y cuantificados por cromatografía de gases (Hardy *et al.*, 1968). Esta metodología ha probado ser útil para detectar sistemas de fijación de N pero también tiene limitaciones debido a que mide la actividad de la enzima nitrogenasa de manera puntual y en un corto período de tiempo.

En la actualidad, las técnicas isotópicas que utilizan ^{15}N , único isótopo de nitrógeno estable no radioactivo, se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones globales de la FBN. En la atmósfera la cantidad de ^{15}N es de 0,3663 átomos por 100 del total de N, lo que hace un 99,634 % para el isótopo ^{14}N , y por ello es posible el uso de materiales enriquecidos en ^{15}N en algunos estudios (Hardarson y Danso, 1990). Estas metodologías permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera, y brindan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema leguminosa-rizobio dado. La abundancia de ^{15}N es medida mediante el análisis de una planta de referencia (no fijadora de N_2), la cual es totalmente dependiente del N del suelo para su crecimiento. Dentro de técnicas que utilizan ^{15}N , las más aplicadas son las basadas en la dilución isotópica con ^{15}N y en la abundancia natural de ^{15}N (Unkovich *et al.*, 2008; Valles de la Mora, Cadisch, y Aluja-Schunemann, 2003).

El método de dilución de ^{15}N (DI) permite evaluar cada una de las diferentes fuentes de N en la planta, y es el más usado para medir FBN. Esta técnica requiere la aplicación al suelo de una pequeña dosis de fertilizante enriquecido con ^{15}N previo a la siembra, tanto de las plantas fijadoras como de las de referencia. Si las plantas sólo obtuvieran N del suelo y del fertilizante marcado con ^{15}N , ambas plantas (fijadoras y de referencia) deberían poseer la misma relación de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Sin embargo, la planta fijadora presenta una relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ más baja debido a la incorporación de nitrógeno del aire no marcado, mientras que esto no ocurre en la planta de referencia. Esta metodología supone que: la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de la planta no fijadora es la misma que la del N del suelo; la leguminosa y la planta de referencia exploran el mismo

volumen de suelo de idéntica relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$; ambas plantas deben absorber la misma cantidad relativa del ^{15}N añadido y de N del suelo; y que la dinámica de absorción es la misma (Danso, Hardarson y Zapata, 1993).

La técnica de abundancia natural de ^{15}N (AN) es una variación de la técnica de dilución de isótopos, y se basa en las diferencias existentes entre isótopos que ocurrieron durante la formación del suelo, y por ello muchos suelos presentan una abundancia de ^{15}N ligeramente superior a la atmósfera. Debido a esta diferencia en abundancia de ^{15}N entre el N del suelo y el atmosférico, se ha establecido que las plantas fijadoras de nitrógeno tienen un enriquecimiento más bajo de ^{15}N que las no fijadoras. Estas diferencias se expresan como delta (δ) ^{15}N o partes por mil (‰) relativo a la composición de ^{15}N en el N_2 atmosférico, por definición el valor de $\delta^{15}\text{N}$ del N_2 del aire es igual a cero (Shearer y Kohl, 1988). La separación de los isótopos ^{15}N y ^{14}N se puede hacer mediante espectrometría de emisión o de masas. La ventaja de los espectrómetros de alta precisión es su capacidad de medir diferencias extremadamente pequeñas en abundancia isotópica entre el material experimental y un estándar del nitrógeno. Esta metodología presenta como ventajas que no requiere la adición de ^{15}N , el $\delta^{15}\text{N}$ del N del suelo disponible para las plantas puede ser relativamente constante con la profundidad y tiempo, y la selección de las plantas de referencia puede ser de menor importancia que en estudios con ^{15}N enriquecido. Pero también tiene algunas limitaciones: se requiere un espectrómetro de masas preciso y procedimientos analíticos meticulosos; se necesita medir el factor de discriminación en las leguminosas durante la fijación de N_2 ; la técnica es insensible si el $\delta^{15}\text{N}$ del suelo es cercano al $\delta^{15}\text{N}$ del aire; y la variabilidad en el campo puede ser considerable en algunos casos (Unkovich *et al.*, 2008).

1.3. EL CULTIVO DE SOJA EN URUGUAY

La soja (*Glycine max*) es una especie de leguminosa cuyo grano presenta un alto contenido de proteína y también es rico en aceite, por lo que sus propiedades nutricionales tanto para humanos como para el ganado son de una alta relevancia (Hartman, West, y Herman, 2011; Hymowitz y Shurtleff, 2005). Por otra parte, el

cultivo de soja es muy valioso si se efectúa en el marco de un cultivo por rotación estacional, ya que fija el nitrógeno en los suelos, agotados tras haberse practicado otros cultivos intensivos (Capurro *et al.*, 2010; Ernst, Siri-Prieto, & Cadenazzi, 2009; Porter *et al.*, 1997). Por estos motivos el proceso de expansión agrícola hacia zonas que tradicionalmente no lo eran, se ha dado a nivel mundial y Uruguay no es la excepción. El 6 % de la tierra cultivable en el mundo está dedicado al cultivo de la soja (100 millones de ha.), área que es la cuarta en tamaño después de los cultivos de trigo, arroz y maíz (Hartman, West, y Herman, 2011). En nuestro país, la soja es el principal cultivo de grano, llegando a cubrir un área de 1.140.000 hectáreas en la zafra 2016/2017, con un rendimiento promedio de 1940 kg/ha. (DIEA, 2017). Es un cultivo, altamente dependiente de N, requiere aproximadamente 80 kg N/ha para producir 1 tonelada de grano. Un factor a destacar es que dependiendo de las condiciones del suelo la demanda de N por parte del cultivo puede ser cubierta en su totalidad por la FBN (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011). Por lo tanto, en países como Uruguay que no producen fertilizantes nitrogenados, la inoculación de los cultivos reduce notoriamente los costos del productor (Hungria *et al.*, 2006).

1.3.1. Inoculación del cultivo de soja en Uruguay

Los rizobios que nodulan soja pertenecen a varios géneros diferentes: *Bradyrhizobium* (*B. canariense*, *B. daqingense*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. diazoefficiens*) (Delamuta *et al.*, 2013), *Ensifer* (*E. fredii*, *E. sojae*, *E. xinjiangense*) (Chen, Yan, y Li, 1988), *Mesorhizobium tianshanense* (Chen *et al.*, 1995) y *Rhizobium tropici* (Hungria *et al.*, 2006). La inoculación del cultivo de soja condujo a la introducción en los suelos de cepas exóticas de rizobios cuya dinámica poblacional condujo en muchos casos a su naturalización, esto ha ocurrido tanto en Argentina como en Brasil, donde es difícil encontrar suelos libres de rizobios. Incluso en suelos que nunca fueron inoculados, se han aislado rizobios que se cree fueron llevados por el agua y/o el viento (Lodeiro, 2015).

Las características más relevantes que debe presentar una cepa para conformar un inoculante son: en primer lugar una alta eficiencia a nivel simbiótico, es decir que presenta una buena tasa de fijación de N; debe ser capaz de competir de forma eficiente frente a otros rizobios presentes en el suelo por la ocupación de los nódulos; y por último pero no menos importante, debe tener la capacidad de persistir en los suelos (Brunel *et al.*, 2009; Lodeiro, 2015; Sessitsch *et al.*, 2002).

En Uruguay el cultivo de soja es 100 % inoculado, por este motivo es de suma relevancia el mantener actualizada la información respecto a nuevas cepas de rizobios, formulaciones de inoculantes y técnicas de inoculación (Labandera, 2007). En nuestro país la soja ha sido inoculada desde la década del 70; desde 1984 y hasta la actualidad el Departamento de Microbiología de Suelos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) recomienda una mezcla de dos cepas de *B. elkanii*, U1301 y U1302 (Punschke, 2010), ambas de origen brasilero. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que durante un tiempo y hasta la zafra 2015/2016 en Uruguay se utilizó la mezcla U1301/SEMIA5080 en las formulaciones del inoculante comercial. El MGAP es el organismo encargado de realizar la selección de cepas y el control de calidad de los inoculantes nacionales y los provenientes de países limítrofes. Según la reglamentación actual del MGAP, las formulaciones comerciales de inoculantes contienen ambas cepas a una concentración de al menos 2×10^9 ufc/ml al momento de la elaboración, en inoculantes en soporte líquido o sólido (turba).

Existen diversas formulaciones de inoculantes para soja en la región, todas ellas están basadas en dos especies del género *Bradyrhizobium*, *B. elkanii* y *B. japonicum*. La cepa E109 de *B. japonicum* es una de las más utilizadas en Argentina desde 1970, dado que ha sido la cepa comercial recomendada por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina) (Torres *et al.*, 2015). Por otro lado, en Brasil los inoculantes están formulados por una gran variedad de cepas tanto de *B. elkanii* como de *B. japonicum*. Algunas de las más empleadas son SEMIA587 y SEMIA5019 de *B. elkanii*, y SEMIA5079 y SEMIA5080 de *B. japonicum* (Delamuta *et al.*, 2017; Kober, *et al.*, 2004).

1.4. ANTECEDENTES

El cultivo de soja se ha expandido a nivel mundial en los últimos años y en nuestro país se está cultivando en zonas no tradicionalmente agrícolas. Desde 1984 en Uruguay la soja es inoculada con las cepas de *B. elkanii*, y a pesar de que son cepas que presentan una alta eficiencia y la tecnología de la inoculación de las semillas ha sido exitosa, no hay estudios actuales a nivel nacional. En las últimas décadas, dada la alta demanda del cultivo, ha aumentado la necesidad de generar nuevos cultivares como consecuencia de la inserción del cultivo en nuevas zonas del país y la necesidad de mejores rendimientos. Diversos estudios en la región muestran que es muy probable que en suelos con historia del cultivo de soja que cuentan con décadas de inoculaciones sucesivas, exista una población de rizobios naturalizada. Por estos factores, surge la necesidad de realizar un relevamiento a nivel nacional sobre la persistencia y eficiencia de las cepas comerciales utilizadas, su desempeño en relación a la variedad en que se inoculan y los suelos en donde estas se cultivan. A su vez, también es relevante profundizar en el estudio de las poblaciones de rizobios naturalizadas y que tan eficientes y competitivas son frente a las cepas que conforman los inoculantes.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue determinar la persistencia, capacidad competitiva y eficiencia simbiótica de cepas de rizobios usadas en los inoculantes comerciales para soja en Uruguay en suelos con y sin historia del cultivo.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Determinar la persistencia de las cepas de rizobios usadas en los inoculantes comerciales para soja.
2. Aislar de suelos con y sin historia de cultivo de soja cepas de rizobios naturalizadas capaces de nodular soja.
3. Evaluar la capacidad competitiva de las cepas de los inoculantes usadas en Uruguay entre ellas y frente a cepas usadas en los países limítrofes tanto en sustrato estéril como en suelos con y sin historia del cultivo de soja.
4. Conocer la eficiencia simbiótica de las cepas de rizobios para soja utilizadas en Uruguay y en los países limítrofes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS DE RIZOBIOS USADAS EN LOS INOCULANTES COMERCIALES

Para este estudio se trabajó con cepas de rizobios recomendadas para la formulación de los inoculantes de Uruguay y de los países limítrofes: las cepas U1301 (SEMIA587) y U1302 (SEMIA5019) de *Bradyrhizobium elkanii*, de origen brasilero que conforman el inoculante comercial uruguayo; y dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, U737 (SEMIA5080) y U738 también denominada U742 (E109), usadas en los inoculantes para soja en Brasil y Argentina respectivamente. Esta nomenclatura es la utilizada por el MGAP en la Colección Nacional de Cepas de Rizobios (Punschke, 2010), pero en este trabajo se llamará a estas cepas según la nomenclatura del país donde son empleadas, es decir como U1301, U1302, SEMIA5080 y E109.

2.2. POBLACIONES DE RIZOBIOS QUE NODULAN SOJA EN SITIOS CON Y SIN HISTORIA DEL CULTIVO

2.2.1. Sitios muestreados

Para evaluar la persistencia y capacidad competitiva de las cuatro cepas de rizobios comercializadas en la región para soja, se llevaron a cabo muestreos en distintos predios considerando 3 variables: la zona, la historia de cultivo de soja y la inoculación o no con cepas de rizobios.

Se seleccionaron predios en zonas tradicionalmente agrícolas que se extienden por el litoral platense en los departamentos de Soriano (Dolores e Invernada), San José (Santa Clara) y Colonia (Ombúes de Lavalle); y en zonas no tradicionales para este cultivo como los departamentos de Treinta y Tres (Estación Experimental Paso de la Laguna, INIA), y Cerro Largo (Melo) (Figura 4). Esta distribución de las

plantaciones de soja en el territorio de Uruguay puede observarse en el mapa superior en la Figura 4 (Teledet).

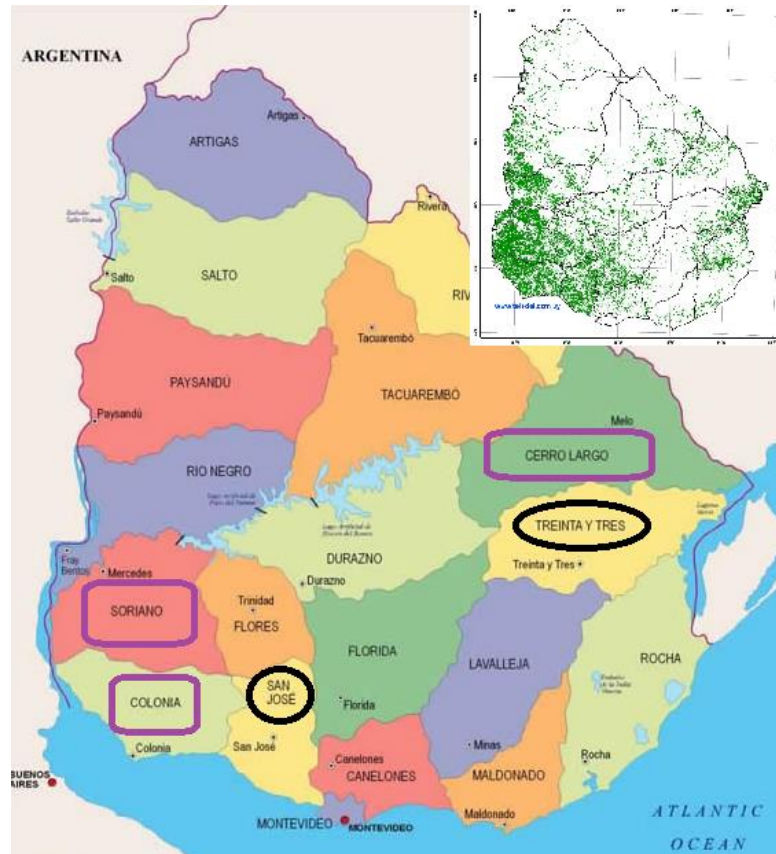


Figura 4. Mapa político de la República Oriental del Uruguay. Rectángulos de color violeta indican los departamentos en los que se realizaron muestreos en sitios con y sin historia del cultivo. Círculos negros indican aquellos departamentos en los cuales los sitios de muestreo fueron siempre con historia previa del cultivo. Arriba a la derecha; mapa con la distribución del cultivo de soja en Uruguay (puntos verdes) (Imagen satelital obtenida del sitio web Teledet).

Por otra parte, los predios seleccionados fueron en algunos casos con historia previa de cultivo de soja; como en los departamentos de Cerro Largo, Colonia (Ombúes de Lavalle), Treinta y Tres (Paso de la Laguna y Santa Clara), y San José (Invernada); y en otros casos nunca habían sido sembrados con soja, como en algunos sitios muestreados en Cerro Largo, Ombúes de Lavalle y Dolores.

Cuadro 1. Sitios de muestreos de plantas de soja, en zonas tradicionalmente agrícolas (TA) y no tradicionalmente agrícolas (NTA), en predios con y sin historia del cultivo y con y sin inoculación con cepas de rizobios comerciales.

ZONA	LUGAR	SUELO	TRATAMIENTO
NTA	Cerro Largo	sin historia	U1301 + SEMIA5080 SEMIA5080 E109 Control c/N Control s/N
NTA	Cerro Largo	con historia	U1301 + SEMIA5080 SEMIA5080 E109 Control c/N Control s/N
TA	Colonia (Ombúes de Lavalle)	sin historia	U1301 + SEMIA5080 SEMIA5080 E109 Control c/N Control s/N
TA	Colonia (Ombúes de Lavalle)	con historia	U1301 + SEMIA5080 SEMIA5080 E109 Control c/N Control s/N
NTA	Treinta y Tres (Paso de la Laguna, INIA)	con historia	U1301 + SEMIA5080
TA	Soriano (Dolores)	sin historia	U1301 + SEMIA5080 Control s/N
TA	San José (Santa Clara)	con historia	SIN INOCULAR
TA	Mercedes (Invernada)	con historia	SIN INOCULAR

A su vez, se muestrearon predios que fueron inoculados durante la zafra y predios sin inocular. En el caso de Cerro Largo y Ombúes de Lavalle, se muestreó un ensayo instalado en la zafra 2012/2013 en el marco de un proyecto previo (“Incremento de la productividad y sustentabilidad del cultivo de soja (*Glycine max* L. Merr): fijación

biológica de nitrógeno en suelos del Uruguay”) donde se trabajó con dos variedades de soja (IGRA645 e IGRA510); 3 tratamientos de inoculación, y dos controles, uno sin fuente externa de nitrógeno y otro con agregado de nitrógeno. Los tratamientos de inoculación se realizaron con las cepas: SEMIA5080, E109 y la mezcla comercial usada en Uruguay en ese momento, U1301/SEMIA5080. La inoculación se realizó a campo, inoculando las semillas con la dosis comercial recomendada. Los inoculantes fueron preparados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias en turba estéril con una concentración de 10^9 rizobios viables por gramo turba. En Paso de la Laguna se muestrearon parcelas durante la zafra 2015/2016 con plantas de soja (Nidera A5909G) inoculadas con la mezcla comercial del momento U1301/SEMIA5080. En Dolores se obtuvieron muestras de plantas de soja (Nidera A5909G) inoculadas con de la mezcla comercial uruguaya utilizada en ese momento, U1301/SEMIA5080 y de plantas sin inocular y sin agregado de nitrógeno. Por otra parte, se tomaron muestras de dos sitios que no fueron inoculados pero que tienen historia previa de cultivo de soja, Invernada y Santa Clara. Esta información se resume en la Cuadro 1.

2.2.2. Colecta de nódulos

De cada planta de soja (estadío V5) se colectaron nódulos de dos zonas de la raíz: la zona superior o primaria (los 3 primeros cm de la raíz principal por debajo de la corona) y la zona distal o secundaria (raíz principal y secundaria por debajo de los 3 cm desde la corona). Se consideraron nódulos primarios aquellos presentes en la zona superior, y secundarios los que se localizan en la zona secundaria. Los nódulos colectados se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ previo a la desinfección y aislamiento de los rizobios. El número de nódulos colectados varió entre los distintos sitios (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de nódulos colectados por sitio y zafra. El total de nódulos está conformado en un 50 % por nódulos primarios y en un 50 % por secundarios.

ZAFRA	SITIO	Nº DE NÓDULOS
2012/2013	Cerro Largo CH	180
	Cerro Largo SH	180
	Ombúes de Lavalle CH	180
	Ombúes de Lavalle SH	180
2015/2016	Paso de la Laguna, INIA	72
	Dolores	30
	Santa Clara	30
	Invernada	30

CH: con historia; SH: sin historia.

Del muestreo realizado en la zafra 2012-2013 se utilizó una colección de nódulos de plantas de soja, almacenados a -20 °C, colectados de los ensayos de campo instalados en los departamentos de Cerro Largo y Ombúes de Lavalle en sitios con y sin historia previa del cultivo. Se partió de un total de tres nódulos primarios y tres secundarios por cada una de las 3 parcelas, por cada una de las 2 variedades de soja y para cada uno de los 5 tratamientos (3 de inoculación y dos controles); lo que totalizó 180 nódulos para cada sitio.

Para la colecta de nódulos de la zafra 2015/2016 se realizó el mismo procedimiento que en la sección anterior. En la Estación Experimental Paso de la Laguna, INIA, se tomaron plantas de 9 parcelas inoculadas, y se reservaron 4 nódulos primarios y 4 secundarios de cada una; es decir un total de 72 nódulos. Para la localidad de Dolores, se muestreó en un predio sin historia previa de cultivo de soja, se cosecharon 7 plantas de cada tratamiento generando una muestra compuesta por tratamiento. Del tratamiento inoculado se colectaron 20 nódulos y del control 10; siendo un total de 30 nódulos analizados. En el caso de las localidades de Invernada y Santa Clara, predios con historia del cultivo de soja pero sin inocular, se tomaron muestras de 3 parcelas y se colectaron 5 nódulos primarios y 5 secundarios de cada una; siendo un total de 30 nódulos colectados en cada sitio.

2.2.3. Aislamiento de rizobios a partir de nódulos

Para el aislamiento de rizobios, los nódulos fueron desinfectados superficialmente para remover la mayor cantidad de contaminantes posible. Los nódulos se mantuvieron un minuto sumergidos en etanol 70 % (v/v), se descartó el etanol, se agregó hipoclorito de sodio al 2 % (v/v), se dejó entre 2 y 4 minutos (dependiendo del tamaño del nódulo), y se descartó la solución. Finalmente, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Con una pinza estéril se tomó un nódulo, se colocó entre dos portaobjetos estériles y se presionó. El líquido que salió del nódulo se estrió en una placa con medio YEM (*Yeast Extract Manitol*), también llamado EMA con agregado de Rojo Congo (Vincent, 1970) (ver Cuadro 1 del Anexo I). El colorante permite diferenciar las colonias de rizobios, que no toman el color rojo, de las de posibles contaminantes. Las placas se incubaron a 28 °C por 5 días. Una vez obtenidas colonias aisladas, se consideraron posibles aislamientos de rizobios aquellas que no incorporan el colorante (Rojo Congo) y presentaron una coloración rosada (Figura 5).

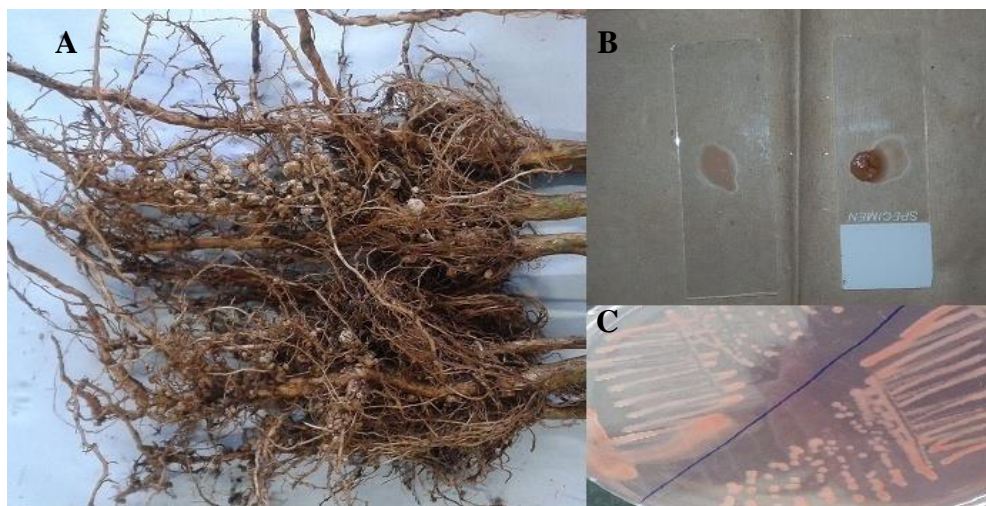


Figura 5. A: raíces de soja con nódulos; B: nódulos aplastados en portaobjetos; y C: placas de EMA con colonias aisladas de rizobios.

Los aislamientos obtenidos se nombraron en el caso de Cerro Largo y Ombúes de Lavalle usando la primera letra del sitio seguida de la historia del suelo, un número indicando el tratamiento aplicado, un número romano indicando el bloque, una letra indicando la ubicación del nódulo (P primario, S secundario) y un número indicando la réplica. En el caso de los demás sitios muestreados se utilizó como nomenclatura la primera letra del sitio seguida de un número indicando el tratamiento aplicado, una letra indicando la ubicación del nódulo y un número indicando la réplica. Cada uno de los aislamientos se repicaron a medio TY (*Tryptone-Yeast Extract*) líquido (ver Cuadro 2 Anexo I) y se incubaron durante 5 días a 28 °C con agitación. El cultivo líquido de cada aislamiento se mezcló con glicerol a una concentración final del 25 % (v/v) para ser almacenado a -20 °C.

2.2.4. Identificación de los rizobios: rep-PCR

Para la obtención del ADN genómico, se utilizaron colonias aisladas de rizobios crecidos en medio EMA sólido. Con un tip estéril se picó cada colonia de interés y se colocó en un tubo con 25 µl de solución de lisis (NaOH 0.05 % - SDS 0.25 %). Luego se incubó a 95 °C por 10 min, y se agregaron 225 µl de agua MiliQ una vez que la solución alcanzó nuevamente temperatura ambiente. Los tubos se invirtieron un par de veces para mezclar el contenido y se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm. Finalmente, se tomó un volumen de 120 µl del sobrenadante, se dividió en dos alícuotas que se conservaron a -20 °C para su posterior uso.

La identidad de las cepas ocupantes de los nódulos se determinó mediante comparación de los perfiles de bandas generadas por la técnica de BOX-PCR usando el primer BOXA1R, de secuencia 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic *et al.*, 1994). La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl compuesto por 1X de Dream Taq buffer-PCR (ThermoScientific, Lituania), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (QIAGEN, Alemania), 0,5 µM de primer BOXA1R (Macrogen, Corea del Sur), 1 U de DreamTaq polimerasa (ThermoScientific), 1 µl de lisado y H₂O bidestilada hasta completar 25 µl.

El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial por 7 min a 94 °C; seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 3 min a 72 °C; y extensión final por 15 min a 72 °C. Los productos de amplificación generados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) con buffer TBE 0.5 X (Tris-Ácido Bórico-EDTA) (ver Cuadro 3 del Anexo I). La electroforesis se llevó a cabo con voltaje constante de aproximadamente 5 V/cm durante 3 horas y media. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb PLUS (ThermoScientific), y el intercalante GoodView (SBS, China). Los geles fueron fotografiados bajo luz UV utilizando una cámara Canon PowerShotG16.

Para el análisis de los perfiles genéticos, a partir de la fotografía tomada del gel, se empleó el software BioNumerics versión 7.6 (AppliedMaths). Se consideraron para el análisis las bandas conservadas en el rango de 300 y 3.000 pb, de buena intensidad y definición. El grado de diversidad genética entre los aislados se realizó mediante el análisis de conglomerados (cluster análisis). La similitud genética fue calculada con el coeficiente de Dice, mientras que la clasificación jerárquica de los aislados fue realizada con el método de agrupamiento UPGMA.

Para evaluar el grado de repetitividad de la técnica, se compararon distintos perfiles de PCR de las 4 cepas de rizobios comerciales evaluadas; éstos fueron generados a partir de ADN de lisados diferentes del mismo aislado y de diferentes amplificaciones. Se llevó a cabo un dendrograma con estos perfiles para evaluar la variabilidad entre ellos.

2.2.5. Autenticación de cepas de rizobios naturalizadas

Aquellos aislamientos cuyo perfil de BOX-PCR fue diferente al de las cepas de referencia se consideraron como posibles cepas nativas o naturalizadas. Para descartar una posible contaminación y autenticar que efectivamente el aislamiento obtenido es capaz de nodular soja se inocularon plantas creciendo en frascos con 150 mL de medio Farhars semi-sólido (ver Tabla 4 del Anexo I). La inoculación se realizó por duplicado con cultivos líquidos de las cepas con 10^7 ufc/mL. Las plantas

se mantuvieron en cámara de crecimiento con condiciones controladas (28 °C de temperatura y 16 hs de luz y 8 de oscuridad como fotoperiodo) durante 15 días. Transcurrido ese tiempo se observó la nodulación y se colectaron los nódulos. De cada planta se obtuvo un aislamiento y se analizó su perfil genético por BOX-PCR para verificar que efectivamente se tratara de una cepa diferente a las empleadas en los inoculantes comerciales.

2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS COMERCIALES

Para caracterizar las cepas de comerciales empleadas en este estudio se evaluó la velocidad de crecimiento y se realizó un ensayo de nodulación en bolsas de crecimiento, en el que se determinó la velocidad de nodulación y la capacidad competitiva de las cepas. Estos análisis fueron llevados a cabo una única vez y por consiguiente no cuentan con análisis estadístico.

2.3.1. Velocidad de crecimiento

Se evaluó la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación de las 4 cepas de referencia utilizadas en este estudio: U1301 (SEMIA587) y U1302 (SEMIA5019) de *Bradyrhizobium elkanii*, que conforman el inoculante comercial uruguayo; y las dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, U737 (SEMIA5080) y U738 también denominada U742 (E109), utilizadas en los inoculantes para soja en Brasil y Argentina respectivamente. Para determinar estos parámetros de crecimiento se crecieron las 4 cepas en medio TY líquido y se registró cada 24 hs la densidad óptica a 660 nm con el fin de conocer el crecimiento y determinar si el cultivo se encontraba en fase exponencial. Para determinar el n° de células por mL de cultivo, se aplicó el método de recuento por gota (Drop-plate counting) (Howieson y Dilworth, 2016). Se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se depositó una gota de 25 µl de las diluciones deseadas en un sector de una placa de Petri con medio EMA. Después de la absorción del inóculo, las placas fueron invertidas y se colocaron en estufa a 28 °C durante 5 días. Las placas se observaron para determinar

el número colonias teniendo en cuenta que el método toma como dilución apropiada para el conteo aquella que presente entre 5-50 ufc. Para determinar las ufc/ml se debe multiplicar el n° de colonias contadas en la gota, por el inverso del volumen de la misma y el de la dilución. Este procedimiento se realizó al menos en tres tiempos distintos del crecimiento del cultivo para obtener una curva de crecimiento en fase exponencial (log ufc/ml vs. tiempo) y así determinar los parámetros velocidad de crecimiento y tiempo de generación.

2.3.2. Características de la nodulación

Se realizó un ensayo de nodulación en el cual se evalúa la velocidad de formación de los nódulos, la ubicación y la capacidad competitiva de las cepas por la ocupación de los mismos (Bhuvaneswari, Turgeon, y Bauer, 1980; Oliveira y Station, 1990). El diseño experimental se basó en 10 tratamientos con inoculación y un control sin inocular, con 4 réplicas cada uno. Los tratamientos consistieron en la inoculación con las cepas de referencia U1301, U1302 y SEMIA5080 en forma individual y en mezclas en iguales proporciones (50:50) de U1301 + U1302, U1301 + SEMIA5080 y U1302 + SEMIA5080; y mezclas de U1301+ SEMIA5080 y U1302 + SEMIA5080 en proporciones de 20:80 e invertido 80:20.

Se utilizaron semillas de soja (Nidera A5909G transgénica) previamente desinfectadas 1 minuto en etanol 95 % (v/v), seguido de hipoclorito de sodio al 2 % (v/v) 3 minutos y 6 lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron pregerminadas en medio EMA semi-sólido (agar 7 g/l) por 72 hs para verificar la eficiencia de la desinfección superficial. Luego de que el largo de la raíz fuera de aproximadamente 2-3 cm, se sembraron (una por unidad experimental) en bolsas de 16.5 cm x 36 cm (SGP, Seed Germination Pouch), previamente esterilizadas en autoclave, que contienen un soporte de papel (Figura 6).

Se agregó 10 ml de medio Farharsü líquido para hidratar el soporte, se cubrió la zona dónde estaba la raíz con papel de aluminio y se colocaron en un cuarto de plantas a 28 °C con un fotoperiodo de 16 hs. de luz y 8 hs. de oscuridad. A las 48 hs. las plantas se inocularon con 1 ml de cultivo con 1×10^7 ufc/ml; este volumen y

concentración se aplicaron tanto para las cepas individuales como para las mezclas. Al momento de la inoculación se realizó una marca en el sitio en donde se ubicaba la punta de la raíz (root tip, RT).



Figura 6. Raíz de soja en bolsa de crecimiento (SGP). Los números indican los nódulos que se formaron y la línea negra la localización del root tip en el momento de la inoculación.

Las plantas se mantuvieron por 19 días, hidratando con medio Farharsüis cada 48 h. Se controló diariamente cada bolsa para detectar y registrar la aparición de los nódulos. Al cabo de tres semanas se cosechó el ensayo, se contaron los nódulos de cada unidad experimental, y se midió la distancia en mm respecto al RT para cada nódulo. Se consideró una medida negativa cuando el nódulo se ubicó por debajo del RT y positiva por encima del mismo, + mm y – mm respectivamente.

Para determinar la capacidad competitiva de las cepas en los tratamientos inoculados con mezcla de cepas se realizó el aislamiento de rizobios de los nódulos obtenidos de

cada bolsa y se identificó la cepa ocupante del nódulo mediante el perfil de BOX-PCR. Se consideraron como variables a analizar la distancia de cada nódulo respecto al RT, el tiempo que tardó en aparecer cada nódulo y la cepa que ocupó cada uno de ellos. El procedimiento para el aislamiento y la amplificación fue el mismo descrito en la sección 2.2.4.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo, 2014). El estudio de las variables analizadas se llevó a cabo aplicando el Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial. Para la comparación de medias se aplicó el test de LSD-Fisher, con un nivel de significancia del 95 %.

2.4. ENSAYOS BAJO CONDICIONES SEMI-CONTROLADAS: INVERNÁCULO

2.4.1. Características de los suelos

Para este ensayo se colectaron suelos con y sin historia de cultivo de soja del predio de INIA Las Brujas, Departamento de Canelones. Las características químicas de los suelos fueron analizadas por el Laboratorio de Suelos de INIA, La Estanzuela.

Para conocer la carga de rizobios capaces de nodular soja se realizó un ensayo de número más probable (NMP) en planta. Se germinaron semillas de soja previamente desinfectadas en placas de agar-agua a 28 °C por 48 hs. Las semillas se sembraron sobre el pliegue de un papel filtro colocado en frascos de vidrio con 400 ml de medio Somasegaran (ver Cuadro 3 del Anexo I) cubiertos con papel de aluminio para evitar la exposición de las raíces a la luz. A las 48 hs de la siembra, las plantas se inocularon por triplicado con 1 ml de diluciones del suelo. En el caso del suelo con historia se trabajó con las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} ; y en el caso del suelo sin historia con 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Las diluciones se realizaron con NaCl al 0.85 %. Se colocaron tres frascos control, por lo que se tuvo un total de 21 frascos. Se mantuvieron en cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas, con una

temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 16/8 hs (luz/oscuridad). A los 20 días después de la inoculación se determinó la nodulación y se usaron las tablas de Fisher y Yates (1963) para estimar el NMP.

2.4.2. Diseño experimental y condiciones de crecimiento de las plantas

El ensayo se instaló en el invernáculo del Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA, Las Brujas (Figura 7), bajo condiciones semi-controladas de temperatura, 28 °C aproximadamente. Al igual que para el ensayo de nodulación, se utilizaron semillas de soja (Nidera A5909G transgénica) previamente desinfectadas un minuto en etanol 95 % (v/v), seguido de hipoclorito de sodio al 2 % (v/v) 3 minutos y 6 lavados con agua destilada estéril. Se sembraron 4 semillas pregerminadas en arena estéril a 28 °C en macetas con 2 Kg de una mezcla de suelo y arena (1:1) con una capa de vermiculita estéril en la superficie para controlar la humedad. A los 4 días de la siembra se raleo a 2 plantas/maceta y se realizó la inoculación. Se evaluaron 2 suelos (con y sin historia), 5 tratamientos con inoculación y 2 controles, cada uno con 6 réplicas. Los tratamientos de inoculación fueron con las cepas E109, SEMIA5080, U1301, U1302, y U1301/U1302 (50:50) (mezcla que conforma el actual inoculante comercial uruguayo). La inoculación se realizó con de 1 mL de cultivo con 1×10^7 ufc/ml por planta (2 ml por maceta), en el caso del tratamiento con la mezcla U1301/U1302 se inoculó con una mezcla de 500 ul de cada una de las cepas. La concentración de células se ajustó midiendo la D.O. a 660 nm y utilizando la curva de crecimiento realizada previamente para cada una de las cepas de referencia (Howieson y Dilworth, 2016). Los controles fueron con y sin agregado de N, en el caso del primero la fuente nitrogenada fue una solución de NH_4NO_3 30 ppm. Como controles no fijadores de nitrógeno para la evaluación de la FBN mediante la técnica de abundancia natural de ^{15}N se sembraron plantas de sorgo dulce (Tupper), maíz (Alazan M103930) y tomate (Repique INIA). Se sembraron dos réplicas por cultivo y se evaluaron también en ambos suelos. Con las semillas de maíz y sorgo se realizaron los mismos pasos que para soja pero con sólo 2 minutos en hipoclorito; las de tomate sólo se enjuagaron con EtOH y se lavaron 6 veces con agua destilada

estéril. Las plantas se regaron con 100 ml de solución nutritiva Somasegaran (ver Cuadro 4 del Anexo I) una vez por semana durante las dos primeras semanas y luego se pasó a dos riegos por semana. Los controles con agregado de N se regaron una vez por semana con 100 ml de solución de NH_4NO_3 30 ppm. El resto del tiempo las plantas se mantuvieron hidratadas con agua.



Figura 7. Ensayo en condiciones semi-controladas en invernáculo INIA, Las Brujas, Canelones. Plantas de soja, maíz, sorgo y tomate.

Se realizaron dos cosechas, la primera a los diez días luego de la inoculación y se tomaron dos réplicas por tratamiento. La segunda cosecha se llevó a cabo a los 40 días, cuando las plantas de soja comenzaban la fase de floración, y se cosecharon las 4 réplicas restantes.

2.4.3. Determinación de eficiencia simbiótica

Para comparar la eficiencia de los diferentes tratamientos de inoculación en cuanto al crecimiento vegetal, para cada unidad experimental se realizaron medidas de peso seco de biomasa aérea (PSPA), radicular (PSR) y nodular (PSN); para ello las muestras fueron mantenidas en estufa a 65 °C hasta peso constante. Además, se realizó el conteo del número de nódulos primarios (n° NP) y secundarios (n° NS).

Por otro lado, para determinar la eficiencia de las cepas en FBN se llevó a cabo la técnica de Abundancia Natural de ^{15}N (AN) (Houngnandan *et al.*, 2008; Unkovich *et al.*, 2008). Se reservó la biomasa aérea seca de todas las unidades experimentales (soja, tomate, maíz y sorgo), a excepción del tratamiento inoculado con la cepa E109 y el control con agregado de N. Las muestras vegetales fueron molidas finamente (2 mm) (Molino Thomas) y una sub-muestra de aproximadamente 0,5 g se colocó en capsulas de aluminio para ser enviadas a analizar a la Universidad Davis en California, mediante el servicio Stable Isotope Facility (SIF).

El porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (% Ndda) para cada tratamiento fue calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$\%Ndda = \frac{\delta^{15}\text{N referencia} - \delta^{15}\text{N leguminosa}}{\delta^{15}\text{N referencia}} \times 100$$

donde $\delta^{15}\text{N}$ referencia y $\delta^{15}\text{N}$ leguminosa corresponden a los valores de $\delta^{15}\text{N}$ (%) para las plantas control (maíz, sorgo y tomate) y las plantas de soja respectivamente.

2.4.4. Identificación de las cepas ocupantes de los nódulos

De cada unidad experimental se colectaron 10 nódulos primarios y 10 secundarios que fueron mantenidos congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el aislamiento de los rizobios. El aislamiento se realizó como se detalla en la sección 2.2.3. Luego de obtenidos los aislamientos se procedió a identificar la cepa ocupante del nódulo mediante el perfil genético a través de la técnica PCR-BOX como se detalla en la sección 2.2.4. El análisis de dichos perfiles se realizó al igual que para los muestreos a campo, con el software Bionumerics de AppliedMath.

2.4.5. Análisis de datos

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo, 2014). En el caso de las variables que presentaron distribución normal se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y para la comparación de medias se aplicó

el test de Tukey, con un nivel de significancia del 95 %. Para aquellas variables cuya distribución no fue normal se utilizó un Modelo Lineal General y Mixto, se aplicó el test de LSD-Fisher también con un nivel de significancia del 95 %.

Por otra parte, el estudio de la ocupación de los nódulos se llevó a cabo aplicando el Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial. Para la comparación de medias se aplicó el test de LSD-Fisher, con un nivel de significancia del 95 %. Se utilizó como variable el número de nódulos ocupados por las cepas E109, SEMIA5080, U1301 y U1302 y como co-variable el total de nódulos analizados en cada caso.

2.5. ENSAYOS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS: MAGENTAS

2.5.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento de las plantas

Para complementar los análisis del ensayo en invernáculo se realizaron dos ensayos bajo condiciones gnotobióticas en sistema Magentas (Figura 8). Se hizo énfasis en el estudio de la eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de las mezclas de las cepas de *B. elkanii* utilizadas en los inoculantes uruguayos para soja, U1301 y U1302, en combinación con la cepa de *B. japonicum* SEMIA5080.



Figura 8. Ensayo en magentas bajo condiciones semi-controladas en invernáculo INIA, Las Brujas, Canelones.

Las tres mezclas evaluadas fueron: la comercializada actualmente en el país, U1301/U1302; la mezcla que se estuvo comercializando hasta el año 2015, U1301/SEMIA5080; y la mezcla U1302/SEMIA5080.

Para ambos ensayos las semillas de soja utilizadas fueron de la misma variedad que para el ensayo de invernáculo y se desinfectaron siguiendo el mismo procedimiento, pero fueron pre-germinadas en placas de agar-agua (7 g/l). Se sembraron dos semillas por magenta, luego a los 5 días fueron raleadas a una planta e inoculadas con 1 ml de cultivo a una concentración de 1×10^7 ufc/ml. Se utilizó como sustrato en ambos casos arena estéril y 200 ml de solución nutritiva Somasegaran (ver Cuadro 4 del Anexo I), que se cambió para cada magenta una vez por semana.

En el primer ensayo se evaluaron 6 tratamientos con inoculación y 2 controles, y se realizaron 6 réplicas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en la inoculación con las cepas E109, SEMIA5080, U1301, U1302, las mezclas U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080. Los controles fueron con y sin agregado de nitrógeno.

En un segundo ensayo, se evaluaron 4 tratamientos con inoculación y un control sin agregado de nitrógeno, y se realizaron 5 réplicas por tratamiento. En este caso, se evaluaron U1301/U1302, U1301/SEMIA5080, U1302/SEMIA5080, SEMIA5080. También se evaluó el efecto de inocular con una dilución 1/10 en NaCl 0.85 % (p/v) del suelo con historia de cultivo de soja utilizado en el ensayo de invernáculo.

2.5.2. Determinación de la eficiencia simbiótica y capacidad competitiva

En el primer ensayo se realizaron dos cosechas, la primera a los 22 días de la inoculación y la segunda a los 35 días de la misma. Mientras que en el segundo ensayo se realizó una única cosecha a los 35 días de la inoculación.

Para ambos ensayos, se evaluaron parámetros de crecimiento del cultivo: peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de nódulos (PSN), biomasa total, número de nódulos primarios (n° NP) y secundarios (n° NS).

Para evaluar la capacidad competitiva de las cepas, en cada cosecha se guardaron a -20 °C 10 nódulos de cada una de las repeticiones de los tratamientos inoculados con mezcla de cepas. La identificación de las cepas ocupantes de los nódulos se realizó mediante PCR-BOX, siguiendo los mismos pasos que en las secciones 2.2.3-4.

2.5.3. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los mismos modelos aplicados para el ensayo de invernáculo (Sección 2.4.5).

3. RESULTADOS

3.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS COMERCIALES: BOX-PCR

Para determinar la identidad de los rizobios aislados de nódulos se comparó el perfil de BOX-PCR obtenido de cada aislamiento con el de las cuatro cepas de referencia utilizadas en este estudio. Previamente, para evaluar la variabilidad de la técnica, se obtuvieron perfiles de BOX-PCR de las 4 cepas de referencia con los que se realizó un dendrograma (Figura 9).

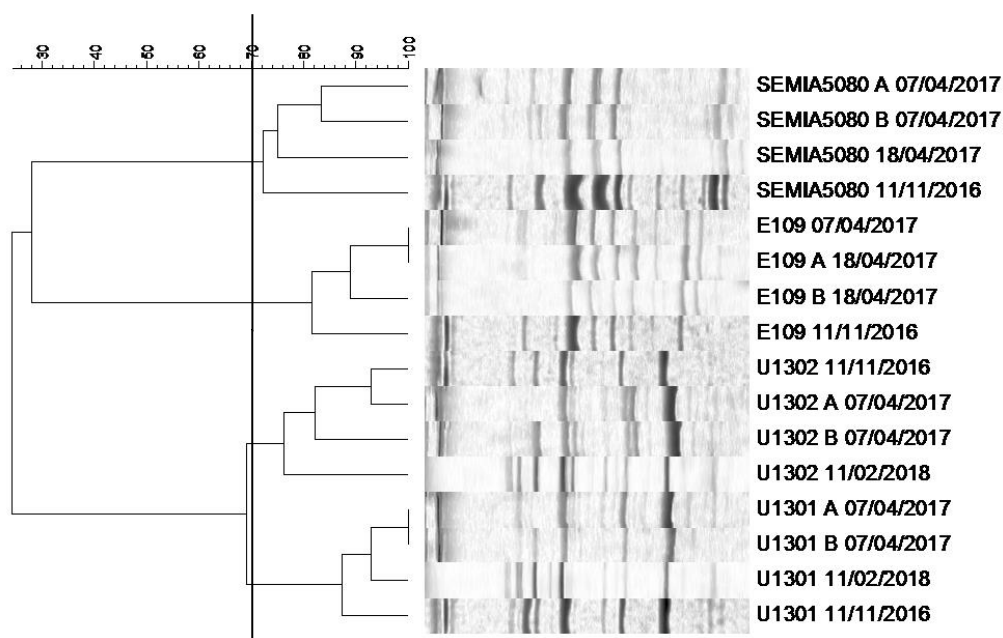


Figura 9. Dendrograma obtenido a partir de perfiles de BOX-PCR de las cepas de *B. japonicum* (SEMIA5080 y E109) y de *B. elkanii* (U1301 y U1302). Las fechas indican diferentes reacciones de PCR y las letras indican diferentes aislados de una misma cepa.

Se obtuvieron perfiles con entre 9 y 14 bandas cada uno, comprendidas en un rango de 400 y 3.000 pb. Puede observarse que existen variaciones en el perfil de BOX-PCR cuando se usaron aislados diferentes de la misma cepa y cuando se hicieron reacciones de PCR en distintas fechas. Teniendo en cuenta esa variabilidad de la metodología, se consideraron iguales los aislados con igual o más de un 70 % de

similitud. Como resultado de éste análisis puede observarse que las cepas se agrupan en dos ramas, una con las cepas de *B. Japonicum* (SEMIA5080 y E109) y otra con las de *B. elkanii* (U1301 y U1302). Las dos cepas de *B. elkanii* presentaron alta similitud entre ellas.

3.2. POBLACIONES DE RIZOBIOS QUE NODULAN SOJA EN SITIOS CON Y SIN HISTORIA DEL CULTIVO

3.2.1. Aislamiento de rizobios a partir de los nódulos colectados a campo

De los 720 nódulos colectados en los muestreos realizados en la zafra 2012/2013 se obtuvieron 310 aislamientos de los cuales 100 provienen del sitio Cerro Largo con historia y 50 del sitio sin historia; 112 de Ombúes de Lavalle con historia y 48 del sitio sin historia. La diferencia entre el número de nódulos colectados y los aislamientos obtenidos podría ser consecuencia de que los nódulos fueron almacenados a -20 °C durante los tres años que transcurrieron entre el fin del proyecto Alianza en el 2013 y el año 2016 cuando comenzó este trabajo de tesis.

De los nódulos colectados en los muestreos realizados en la zafra 2015/2016 se obtuvieron 130 aislamientos de los cuales 34 se obtuvieron de Dolores, 56 de Paso de la Laguna, 17 de Santa Clara y 23 de Invernada.

3.2.2. Persistencia y capacidad competitiva de las cepas de rizobios empleadas en los inoculantes de Uruguay y la región

En los Cuadros 3 y 4 se detalla el número de aislamientos identificados utilizando la técnica PCR-BOX para cada sitio, suelo y tratamiento del muestreo 2012/2013. En los controles sin inocular de ambos sitios con historia se obtuvieron aislamientos de las cepas U1301, U1302 y SEMIA5080. Por otro lado, destaca la cantidad de nódulos ocupados por la cepa SEMIA5080 aun en los tratamientos inoculados con la mezcla U1301/U1302, E109 y controles sin inocular. La cepa E109 sólo fue aislada

de 6 nódulos lo que significa la casi nula capacidad de ocupación de los nódulos por la misma; incluso en el tratamiento que fue inoculado con esta cepa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de aislamientos identificados en sitios con historia de cultivo de soja, para cada uno de los 4 tratamientos y las 2 variedades de soja evaluadas (IGRA510 e IGRA645).

Sitio	Tratamiento	U1301	U1302	E109	SEMIA 5080	Naturalizadas	Total de aisl.	
Cerro Largo	control	4	2	0	12	0	18	
	U1301+U1302	7	0	0	0	1	8	
	Var. IGRA510	E109	2	1	3	11	0	17
	SEMIA5080	2	1	0	9	1	13	
Cerro Largo	control	2	1	0	13	0	16	
	U1301+U1302	0	2	0	1	4	7	
	Var. IGRA645	E109	1	5	0	8	0	14
	SEMIA5080	1	1	0	3	2	7	
Ombúes de Lavalle	control	7	4	0	2	0	13	
	U1301+U1302	5	8	0	7	2	22	
	Var. IGRA510	E109	0	2	2	14	1	19
	SEMIA5080	5	0	0	3	0	8	
Ombúes de Lavalle	control	4	3	0	4	2	13	
	U1301+U1302	3	2	0	8	2	15	
	Var. IGRA645	E109	6	3	1	2	0	12
	SEMIA5080	2	0	0	3	7	12	

Control: plantas de soja sin inocular. Naturalizadas: aislamientos cuyo perfil genético es diferente al de las cuatro cepas de referencia utilizadas.

Por otra parte, se obtuvieron un total de 23 aislamientos que presentaron un perfil genético distinto al de las cuatro cepas de referencia evaluadas en este estudio (Cuadro 3); por lo que en principio se trata de posibles cepas naturalizadas.

Del análisis de los perfiles genéticos de los aislamientos obtenidos de nódulos colectados en la zafra 2012/2013 en suelo sin historia se observa que no se

recuperaron rizobios de las plantas controles (Cuadro 4). Por otro lado, los resultados muestran que no necesariamente es la cepa con la que se inoculó la que se recupera de los nódulos.

Cuadro 4. Número de aislamientos identificados en sitios sin historia de cultivo de soja, para cada uno de los 4 tratamientos y las 2 variedades de soja evaluadas (IGRA510 e IGRA645).

Sitio	Tratamiento	U1301	U1302	E109	Semia5080	Naturalizadas	Total de aisl.
Cerro Largo Var. IGRA510	control	0	0	0	0	0	0
	U1301+U1302	7	0	0	0	1	8
	E109	0	1	3	0	0	4
	SEMIA5080	2	1	0	7		11
Cerro Largo Var. IGRA645	control	0	0	0	0	0	0
	U1301+U1302	7	1	0	1	1	10
	E109	3	2	4	2	0	11
	SEMIA5080	4	0	0	2	3	9
Ombúes de Lavalle Var. IGRA510	control	0	0	0	0	0	0
	U1301+U1302	0	4	0	2	2	8
	E109	0	0	0	0	1	1
	SEMIA5080	3	0	0	2	0	5
Ombúes de Lavalle Var. IGRA645	control	0	0	0	0	0	0
	U1301+U1302	5	3	0	5	2	15
	E109	0	0	1	4	5	10
	SEMIA5080	1	1	0	7	0	9

Control: predio sin inocular. Naturalizadas: aislamientos cuyo perfil genético es diferente al de las cuatro cepas de referencia utilizadas.

En casi todos los casos de los tratamientos de inoculación con E109 y la mezcla U1301/U1302 se obtuvieron aislamientos de igual perfil que la cepa SEMIA5080, así como también de las cepas U1301 y U1302 cuando se inoculó con SEMIA5080. Esto pudo ser consecuencia de contaminación al momento de la siembra, o por el relieve del terreno que haya ocurrido contaminación entre parcelas debido al flujo de agua

de lluvia. Al igual que en los suelos con historia se obtuvieron 15 aislamientos que en principio presentaron un perfil genético distinto al de las cuatro cepas de referencia evaluadas en este estudio (Cuadro 4).

Los resultados de la identificación de los aislamientos obtenidos de nódulos del muestreo 2015/2016 muestran que si bien las cepas que conforman el inoculante comercial uruguayo (U1301 y U1302) pueden estar presentes o no, la cepa SEMIA5080 se recuperó en todos los sitios (Figura 10).

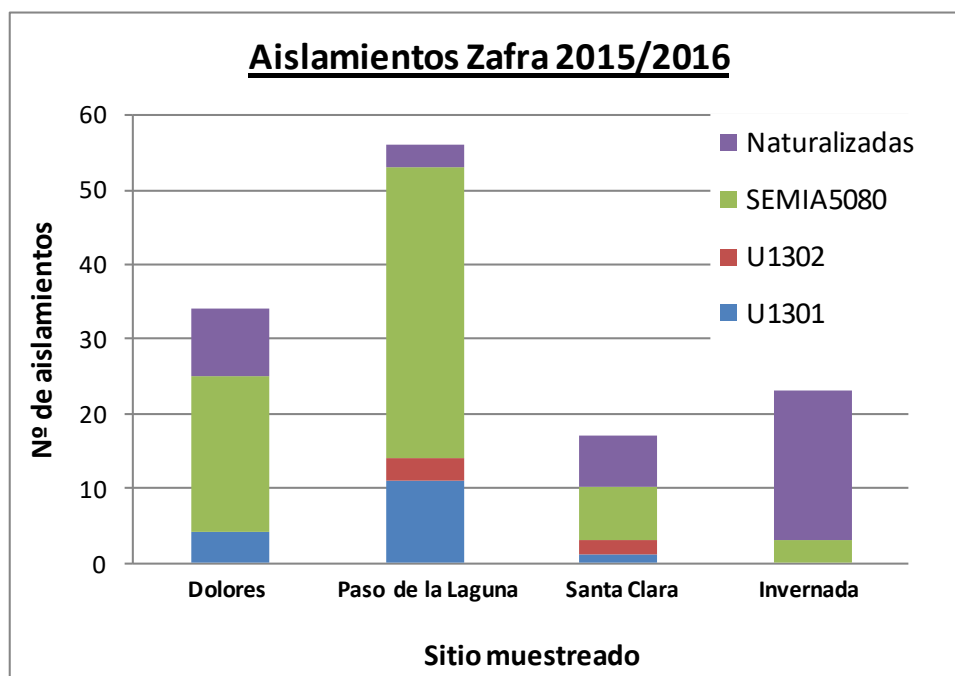


Figura 10. Aislamientos identificados a partir de los muestreos realizados en 2016 en los sitios: Dolores, Paso de la Laguna, Santa Clara e Invernada.

En el caso de Dolores se obtuvieron 34 aislamientos, de los cuales la mayor proporción presentó igual perfil que la cepa SEMIA5080, y una muy baja proporción con igual perfil al de la cepa U1301. De los 56 aislamientos obtenidos en Paso de la Laguna, la mayoría fueron identificados como SEMIA 5080 y un porcentaje bajo fue identificado como U1301 y U1302 (Figura 10). Por otra parte, de los 40 aislamientos obtenidos en las localidades de Santa Clara e Invernada (con historia y sin inocular

respectivamente), una gran proporción de nódulos fue ocupado por la cepa SEMIA 5080, y casi no se obtuvieron aislamientos con perfiles iguales al de las cepas U1301 y U1302 (Figura 10). En los 4 sitios se aislaron rizobios con perfiles distintos a las cepas empleadas en la inoculación (Figura 10). En total se identificaron 39 aislamientos como cepas naturalizadas.

3.2.3. Cepas de rizobios naturalizadas

En este trabajo se obtuvieron 78 aislamientos cuyo perfil fue diferente al de las 4 cepas de rizobios comerciales utilizadas. Un total de 44 aislamientos fueron autenticados utilizando el procedimiento detallado en la sección 2.2.5 y se confirmó que efectivamente eran capaces de nodular soja y presentaron perfiles distintos al de las cepas de referencia. Entre estos 44 aislamientos se identificaron 9 perfiles genéticos distintos (Cuadro 5), lo que corresponde a 9 cepas de rizobios naturalizadas. Considerando iguales aquellos aislados cuyos perfiles tuvieron una similitud de bandas igual o mayor al 70 %, se determinó que varios de ellos son iguales entre sí. En la localidad de Dolores todos los aislamientos presentaron el mismo perfil, y lo mismo ocurrió en Santa Clara (Cuadro 5).

Cuadro 5. Grupos de aislamientos con perfil genético diferente al de las cepas de referencia.

PERFIL	AISLAMIENTOS	SITIO	SUELO
I	CCIVS3	Cerro Largo	con historia
II	CC10IS3, CC8IVS2		
III	OS8IVP1, OS8IS2	Ombúes de Lavalle	con y sin historia
IV	OS9IIP2, OC8IIS2		
V	S3P3, S3P4, S3P5, S4P1, S4P3, S4P5, S4P6, S4P7, S4S3	Dolores	sin historia
VI	iIP1, iIP2, iIP4, iIP5, iIS1, iIS2, iIS3, iIS5, iIIP1, iIIP2, iIIP3, iIIP5, iIIS2, iIIS3, iIIS5, iIIIS1, iIIIS2, iIIIS5	Invernada	con historia
VII	iIIP3, iIIP4		
VIII	SJIP4, SJIP5, SJIS1, SJIIP2, SJIIS1, SJIIP3, SJIIS2	Santa Clara	con historia
IX	T2P2	Treinta y Tres	con historia

Cabe destacar que en Invernada 20 de los 23 aislamientos fueron cepas naturalizadas que se diferenciaron en 2 perfiles. En los sitios de Ombúes de Lavalle y Cerro Largo se identificaron 4 perfiles distintos.

Con el objetivo de evaluar la similitud entre los perfiles de las cepas naturalizadas y las cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii* utilizadas como referencia, se generó un dendrograma (Figura 11). Se diferencian dos ramas, una con aquellas cepas cuyo perfil se asemeja al de las cepas de *B. elkanii* y otra con las cepas que comparten mayor similitud con las cepas de *B. japonicum*.

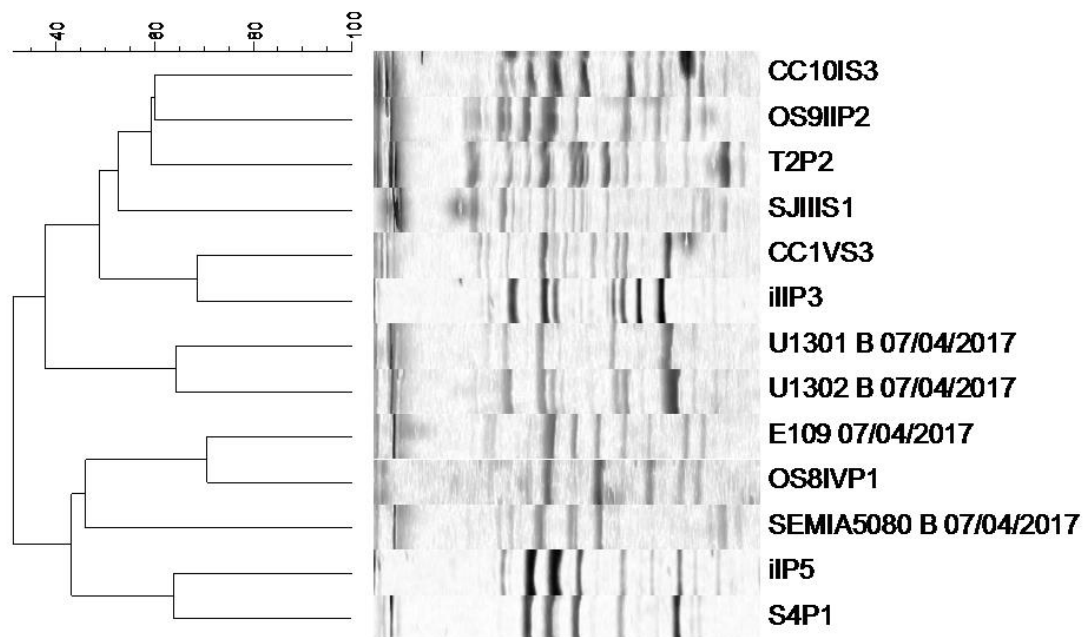


Figura 11. Dendrograma construido con los perfiles de BOX-PCR de 9 de las cepas naturalizadas junto con las 4 cepas de referencia (SEMIA5080, E109, U1301 y U1302). Se consideraron iguales cuando la semejanza entre perfiles fue igual o mayor al 70 %.

Las cepas S4P1, iIP5 y OS8IVP1 se agrupan en la misma rama que las cepas E109 y SEMIA 5080; siendo el perfil de la cepa OS8IVP1 de Ombúes de Lavalle muy similar al de la cepa E109. Mientras que las otras 6 cepas se agrupan con las cepas de

referencia de *B. elkanii*, y entre ellos pueden diferenciarse 4 grupos: uno con las cepas U1301 y U1302; otro conformado por CC1VS3 y iIIP3; el tercer grupo con las cepas OC10IS3, OS9IIP2 y T2P2; y separado del resto el SJIIS1.

Los restantes 34 aislamientos de cepas naturalizadas, se estudiarán en profundidad en un trabajo posterior durante el tercer año del proyecto en el que se enmarca el presente estudio.

3.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS COMERCIALES

3.3.1. Velocidad de crecimiento

Para conocer la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación de las cepas comerciales utilizadas en este trabajo se llevaron a cabo curvas de crecimiento del log UFC/ml vs. tiempo (hs.). En la Cuadro 6 se observan los valores de la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación para cada una de las cuatro cepas. La cepa SEMIA5080 de *B. japonicum* presentó el menor tiempo de generación, y mayor velocidad de crecimiento que las demás cepas. Por otra parte, las cepas de *B. elkanii*, U1301 y U1302 utilizadas en el inoculante comercial nacional, presentaron mayor velocidad de crecimiento que la cepa E109 de *B. japonicum* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Velocidad de crecimiento (vc) y tiempo de generación (tg) para las cuatro cepas de rizobios comerciales evaluadas.

Cepa	vc (Generaciones/hs)	Tg (hs)
U1301 (<i>B. elkanii</i>)	0,0862	11,60
U1302 (<i>B. elkanii</i>)	0,0919	10,88
SEMIA5080 (<i>B. japonicum</i>)	0,1113	8,981
E109 (<i>B. japonicum</i>)	0,0713	14,03

3.3.2. Características de la nodulación de las cepas comerciales de *B. elkanii* usadas en Uruguay y *B. japonicum* SEMIA5080

La velocidad de nodulación de cada cepa se correlaciona con una buena capacidad competitiva, por este motivo se realizó un ensayo en bolsas de crecimiento (Figura 12), en el cual se evaluaron las cepas U1301, U1302 y SEMIA5080 en forma individual y mezcladas en distintas proporciones.

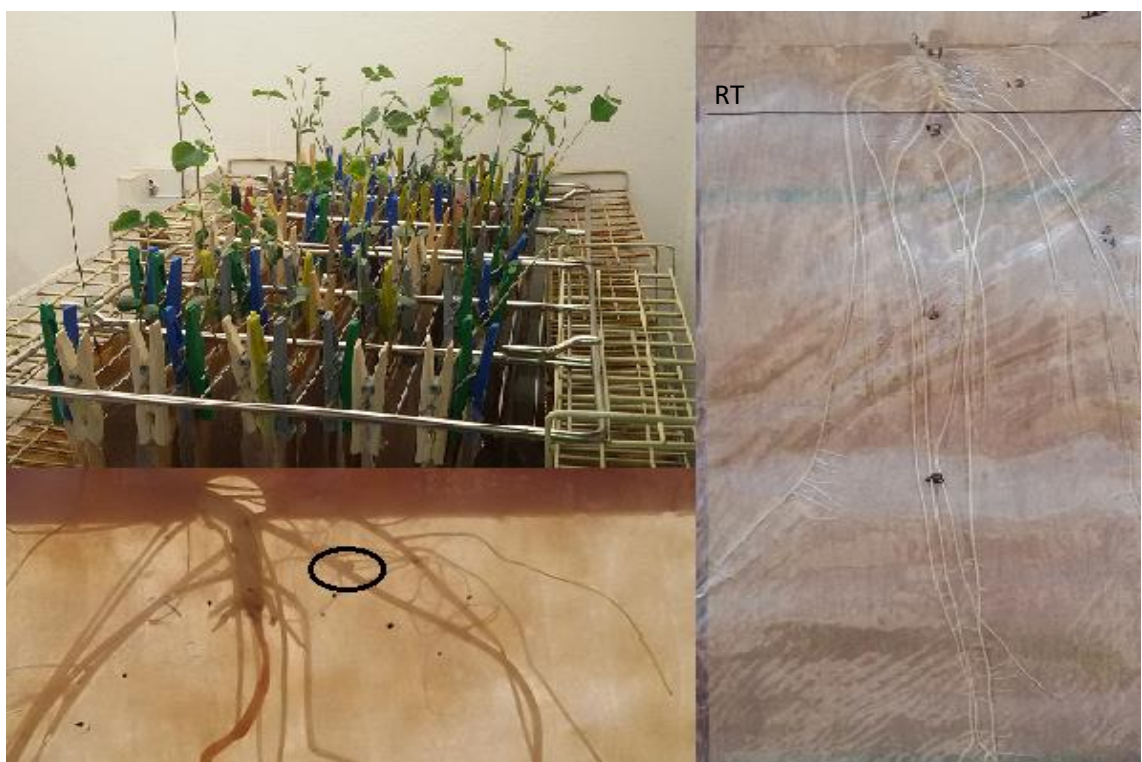


Figura 12. Ensayo de nodulación en bolsas de crecimiento. Arriba a la izq.: disposición del ensayo. Abajo a la izq.: nódulo en corona de la raíz, encima del roottip (RT). Derecha: raíz con marca del RT y nódulos desarrollados.

La Cuadro 7 muestra el tiempo de aparición del primer y tercer nódulo ya que para el segundo nódulo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. El primer nódulo se formó entre 8 y 13 días luego de la inoculación, con diferencias significativas entre los distintos tratamientos. El tratamiento inoculado con la cepa U1301 y la mezcla U1301+SEMIA5080 (20:80) fueron los que

presentaron el mayor tiempo de aparición. Mientras que los tratamientos inoculados con las cepas U1302, SEMIA5080, y las mezclas U1301/U1302 (50:50), U1301+SEMIA5080 (80:20) y U1302+SEMIA5080 (80:20); fueron los que presentaron menor tiempo de aparición del primer nódulo. El resto de los tratamientos no difieren significativamente entre ellos y presentan un tiempo de aparición del primer nódulo intermedio.

Cuadro 7. Tiempo en días que tardan en aparecer el primer y tercer nódulo en plantas de soja inoculadas con cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302 y *B. japonicum* SEMIA5080.

Tratamiento	Tiempo de aparición (días)			
	1º nódulo		3º nódulo	
U1301	13	a	14	a
U1302	8	e	10	ab
SEMIA5080	9	cde	11	ab
U1301+U1302	8	e	9	ab
U1301+SEMIA5080 50:50	11	bc	12	ab
U1301+SEMIA5080 20:80	11	ab	13	a
U1301+SEMIA5080 80:20	9	de	7	b
U1302+SEMIA5080 50:50	11	bcd	SD	-
U1302+SEMIA5080 20:80	11	bc	SD	-
U1302+SEMIA5080 80:20	10	bcde	10	ab

SD: sin dato, no presentó tercer nódulo. Los valores representan la media de 4 repeticiones. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD, $p < 0.05$).

En cuanto el tercer nódulo, el menor tiempo de aparición se dio en el tratamiento inoculado con la mezcla U1301+SEMIA5080 (80:20), la cual difirió significativamente del tratamiento con la cepa U1301 y la mezcla U1301+SEMIA5080 (20:80), el resto de los tratamientos no difirieron entre sí.

Otro parámetro analizado fue el número de nódulos ubicados por encima del RT para cada tratamiento. Como se planteó en la metodología aquellas cepas que presenten una buena capacidad de nodulación, formarán nódulos en la zona de la raíz cercana a

la superficie y por lo tanto por encima del RT. Puede observarse en la Cuadro 8 que los tratamientos se diferenciaron significativamente y formaron tres grupos; uno conformado por las cepa U1301 y las mezclas U1301+SEMIA5080 (80:20), U1302+SEMIA5080 (50:50 y 20:80) con el menor promedio de nódulos por encima del RT. En otro grupo está el tratamiento con la mezcla U1302+SEMIA5080 (80:20), el cual presentó el mayor promedio de número de nódulos por encima del RT. El resto de los tratamientos conforman el tercer grupo y presentan promedios de número de nódulos intermedios entre los otros dos grupos.

Cuadro 8. Número de nódulos ubicados por encima del root tip (RT) en los diez tratamientos evaluados.

Tratamiento	nº de nódulos	
U1301	1	a
U1302	3	b
SEMIA5080	4	b
U1301+U1302	3	b
U1301+SEMIA5080 50:50	4	b
U1301+SEMIA5080 20:80	4	b
U1301+SEMIA5080 80:20	2	a
U1302+SEMIA5080 50:50	1	a
U1302+SEMIA5080 20:80	2	a
U1302+SEMIA5080 80:20	6	c

Los valores representan la media de 4 repeticiones. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD, $p < 0.05$).

Si se tiene en cuenta los resultados obtenidos en éste análisis y en el del tiempo de aparición de los primeros nódulos, podemos resaltar que la mezcla U1302+SEMIA5080 (80:20) tiene menor tiempo de aparición del primer nódulo y además es la que presenta el mayor número de nódulos por encima del RT. Por su parte, el tratamiento inoculado con la cepa U1301 presenta el mayor tiempo de aparición del primer nódulo y además es el que presenta el menor número de nódulos por encima del RT.

De los 10 tratamientos, se colectaron 156 nódulos, de los cuales, el 61 % se ubicó por encima del RT (Figura 13). De los 47 nódulos colectados ocupados por la cepa U1301, el 60 % se ubicó por encima del RT (Figura 13A). De los 43 nódulos ocupados por la cepa U1302, el 49 % de los mismos se ubicó por encima del RT (Figura 13B) y de los 66 nódulos ocupados por la cepa SEMIA5080 el 70 % se ubica por encima del RT (Figura 13C).

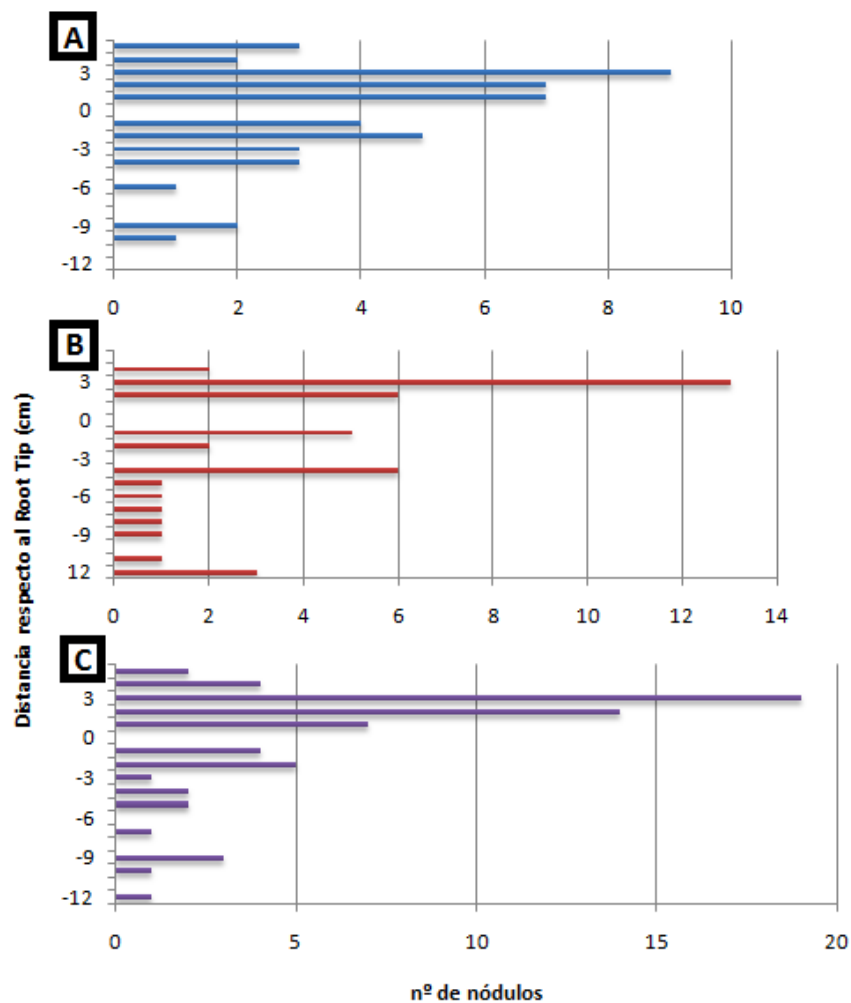


Figura 13. Distribución de los nódulos en la raíz para cada cepa evaluada. El 0 en el eje de las y representa la ubicación del root tip al momento de la inoculación. A: cepa U1301; B: cepa U1302; C: cepa SEMIA5080.

Estos resultados indican que las tres cepas son eficientes en la colonización de la raíz ya que los nódulos se ubican en la corona de la misma (encima del RT).

Para este ensayo también fueron evaluadas la distancia promedio de cada nódulo de cada tratamiento respecto al RT, y la ocupación de los nódulos dentro de cada tratamiento mezcla y no se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos casos (dato no mostrado). Cabe resaltar que se contó sólo con cuatro réplicas por tratamiento.

3.4. EFICIENCIA SIMBIÓTICA Y CAPACIDAD COMPETITIVA DE CEPAS DE RIZOBIOS COMERCIALES USADAS EN LA REGIÓN: ENSAYO EN MACETAS

3.4.1. Características de los suelos

Al analizar el NMP de rizobios de los suelos con y sin historia se obtuvo que el suelo con historia de cultivo de soja presentó al menos 1000 veces más rizobios por gramos de suelo, que el suelo sin historia (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número Más Probable (NMP) de rizobios en los suelos con historia de soja (CH) y sin historia de soja (SH).

	Rizobios/g. suelo
CH	1,5x10 ⁴
SH	3,6

Los datos fisicoquímicos de los suelos se muestran en la Cuadro 10. El suelo CH presentó un pH cercano a la neutralidad (6,2) y una alta concentración de calcio y potasio. Mientras que el suelo SH presentó un pH levemente más ácido (5,9), y un mayor porcentaje de carbono orgánico que el suelo CH y lo mismo ocurrió con la concentración de fósforo inorgánico. Estos valores de fósforo pueden ser debido a que en dicho suelo se vierten efluentes de tambo. En cuanto al porcentaje de nitrógeno, el suelo SH (0,34 %) tuvo un valor mayor al del suelo CH (0,26 %).

Cuadro 10. Características fisicoquímicas de los suelos empleados en el ensayo de maceta en invernáculo. CH: con historia de soja, SH: sin historia de soja.

Suelo	pH (H ₂ O)	N %	C.Org %	Bray I µg P/g	Ca meq/100g	K meq/100g
CH	6,2	0,26	2,87	70,2	24,9	0,89
SH	5,9	0,34	3,84	87,6	4,0	0,12

3.4.2. Eficiencia simbiótica

En el suelo CH, el control sininocular y sin N fue el tratamiento que presentó mayor PSPA, PSR y biomasa total, y difirió significativamente del resto de los tratamientos (Cuadro 11). Estos resultados permiten afirmar que el suelo CH cuenta con una población de rizobios consecuencia de anteriores inoculaciones y/o de cepas naturalizadas que favorece de forma significativa el crecimiento vegetal. Los datos obtenidos para el PSN mostraron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con la cepa U1301 (menor media) respecto al tratamiento inoculado con la cepa E109 y el control s/N. Los tratamientos inoculados con las cepas U1302 y E109 presentaron mayor n° NP que el resto de los tratamientos. Para el n° NS no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados del control c/N no se muestran ya que no difieren significativamente del control s/N, en ninguna de las variables analizadas (dato no mostrado); lo que indica que la cantidad de N agregado no fue suficiente para promover el desarrollo vegetal.

Cuadro 11. Peso seco de biomasa aérea (PSPA), radicular (PSR), nodular (PSN) y número de nódulos primarios (n° NP), secundarios (n° NS) y biomasa total de plantas de soja de suelo CH inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum*, y control sin inocular, cosechadas a los 40 días.

Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)*	PSN (grs)**	n° NP**	n° NS**	Biomasa tot. (grs)*
U1301	7,70 a	1,90 a	0,54 c	45 b	286 a	10,1 a
U1302	7,70 a	1,80 a	0,63 bc	69 a	300 a	10,2 a
U1301+U1302	7,80 a	1,60 a	0,64 abc	48 b	274 a	10,3 a
SEMIA5080	7,80 a	2,00 a	0,62 bc	35 b	294 a	10,3 a
E109	8,10 a	2,10 a	0,74 ab	71 a	312 a	11,0 a
Control s/N	12,00 b	2,70 b	0,82 a	39 b	380 a	15,3 b

Los valores representan la media en gramos por maceta (c/u con dos plantas). Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (*Modelo Factorial Simple – Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$; **Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

En el suelo SH las plantas presentaron una nodulación menor y un mayor contraste entre los tratamientos aplicados (Cuadro12), debido a que la población de rizobios presentes en dicho suelo es casi nula (resultados de NMP, Cuadro 9). Los tratamientos inoculados con las cepas SEMIA5080, U1301, U1302, y la mezcla U1301/U1302 presentaron mayor n° NS, n° NP y PSN y difirieron significativamente del tratamiento inoculado con la cepa E109 y el control s/N, que presentaron una nodulación nula o muy baja. En cambio, para el parámetro PSR, los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii* en forma individual o la mezcla U1301/U1302 presentaron mayores valores que los tratamientos inoculados con las cepas de *B. japonicum* SEMIA5080 y E109; sólo el tratamiento inoculado con la mezcla U1301/U1302 difirió significativamente del control. Por otra parte, para los parámetros PSPA y biomasa total no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. La biomasa obtenida del tratamiento del control c/N no se muestran ya que no difieren significativamente del control s/N, para las variables de biomasa y la nodulación fue nula (dato no mostrado).

Cuadro 12. Peso seco de biomasa aérea (PSPA), radicular (PSR), nodular (PSN) y número de nódulos primarios (n° NP), secundarios (n° NS) y biomasa total de plantas de soja en suelo SH inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum*, y control sin inocular, cosechadas a los 40 días.

Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)*	PSN (grs)**	n° NP**	n° NS**	Biomasa tot. (grs)*
U1301	6,80 a	2,30 bc	0,56 a	126 a	203 a	9,70 a
U1302	6,10 a	2,30 bc	0,48 a	85 a	162 a	8,90 a
U1301+U1302	6,90 a	2,50 c	0,58 a	135 a	194 a	10,0 a
SEMIA5080	6,30 a	1,60 a	0,50 a	83 a	195 a	8,40 a
E109	3,60 a	1,50 a	- -	3 b	6 b	5,10 a
Control s/N	4,70 a	1,80 ab	- -	0 b	4 b	6,50 a

Los valores representan la media en gramos por maceta (c/u con dos plantas). Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (*Modelo Factorial Simple – Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$; **Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

Las diferencias entre los suelos con y sin historia se vieron reflejadas no sólo en la biomasa aérea y radicular de las plantas sino también en la coloración foliar de las mismas. Los ejemplares de los controles s/N en el suelo sin historia presentaron un verde-amarillento que respalda la falta de nitrógeno por no estar inoculado y por lo tanto no realizar la FBN (Figura 14). Estas diferencias en el efecto de los suelos en la coloración y tamaño se observan también en los tratamientos inoculados (Figura 15).



Figura 14. Plantas de soja bajo tratamiento control sin agregado de nitrógeno. Las 4 de la izquierda son en suelo con historia de cultivo de soja y las 4 de la derecha sin historia.



Figura 15. Plantas de soja bajo tratamiento de inoculación con la cepa U1301. Las 4 de la izquierda son en suelo con historia de cultivo de soja y las 4 de la derecha sin historia.

La cantidad de N derivado de la atmósfera para cada tratamiento fue estimada empleando el método de abundancia natural de ^{15}N . Aplicando cualquiera de los tres cultivos no fijadores (tomate, sorgo y maíz) usados como planta de referencia, o bien

el promedio de los mismos se llega a los mismos resultados tras el análisis estadístico. En la Figura 16, puede observarse que el N fijado en las plantas crecidas en suelo con historia es mayor que en las crecidas en suelo sin historia, para todos los tratamientos analizados. En el suelo con historia no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; mientras que en el suelo sin historia el control sin agregado de N y el tratamiento inoculado con la cepa E109 presentaron menores valores de % Ndda que el resto de los tratamientos.

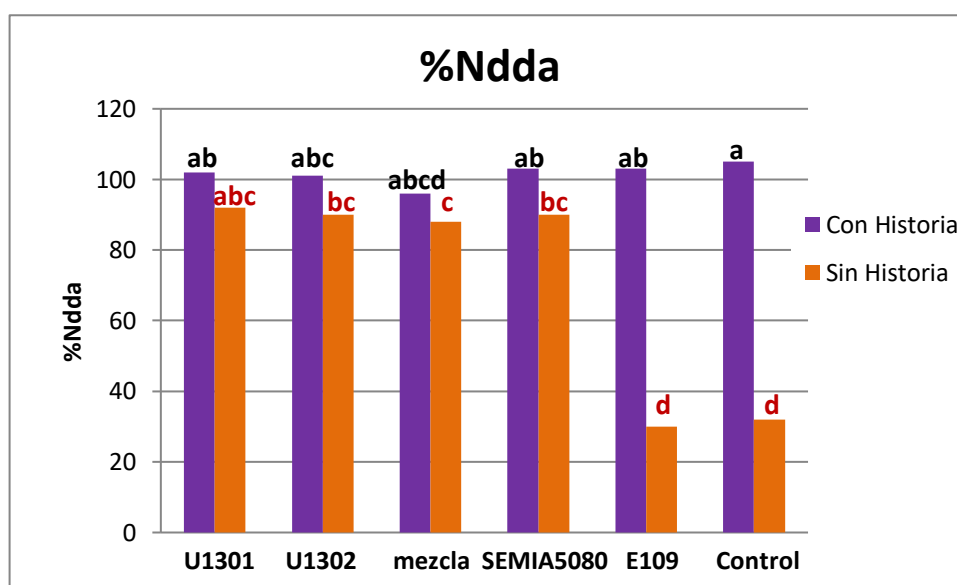


Figura 16. Porcentaje de N derivado de la atmósfera (% Ndda) presente en plantas de soja inoculadas con las cepas U1301, U1302, SEMIA5080, E109, mezcla U1301/U1302 y un control sin agregado de nitrógeno creciendo en macetas con suelo con historia y sin historia de soja, cosechadas a los 40 días. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Estos resultados demuestran que el suelo con historia presenta una población de rizobios con un alto nivel de eficiencia simbiótica, esto se ve reflejado tanto en los valores de biomasa como en los de N atmosférico fijado. Por otra parte, los análisis de biomasa y de abundancia natural de ^{15}N en los suelos sin historia reflejan el efecto de la inoculación en un suelo con escasa presencia de rizobios. Bajo estas

condiciones de crecimiento de las plantas de soja, destaca la eficiencia de las cepas de *B. elkanii* y de la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum*, las cuales aportan mediante la FBN casi el 100 % del N presente en la planta. En cuanto a la inoculación con la cepa E109, fue la menos eficiente en la FBN, aportando menos del 40 % del N presente en planta (Figura 16), lo que se explica por la baja nodulación que presentaron las plantas.

3.4.3. Capacidad competitiva

Para evaluar la capacidad competitiva entre las cepas de referencia usadas en la inoculación y la población de rizobios del suelo que persiste de inoculaciones anteriores, se identificaron las cepas ocupantes de los nódulos. Asimismo, se buscó conocer si las cepas se diferencian en la ocupación de los nódulos en suelo con historia previa de cultivo de soja, y también conocer si hay alguna relación entre la cepa inoculada y la ubicación del nódulo en la raíz (primarios/secundarios), es decir conocer que tan competente es en la colonización de la misma. Al analizar el efecto de la cepa, la ubicación del nódulo y la interacción entre ambos se obtuvo que sólo la cepa inoculada afectó de forma significativa a la variable. En ambas cosechas se observaron diferencias significativas en la ocupación de nódulos entre la cepa SEMIA5080 (mayor media) y el resto de los tratamientos. Al inocular con esta cepa, la misma ocupó una gran proporción de los nódulos en ambas cosechas (Cuadro 13).

Por otra parte, también se observaron diferencias significativas en el porcentaje de nódulos ocupados por la mezcla 1301/1302 (41 %) del ocupado por la cepa E109, ésta se recuperó en tan sólo el 13 % de éstos en la primera cosecha y en un 9 % en la segunda. En cuanto a la ocupación de los nódulos por las cepas de *B. elkanii* que componen la mezcla del inoculante comercial uruguayo no difieren significativamente entre sí en la primera cosecha. En cambio, en la segunda cosecha la cepa U1302 ocupó una mayor cantidad de nódulos que la U1301 (Cuadro 13).

Cuadro 13. Ocupación de nódulos en suelo con historia de cultivo de soja para ambas cosechas del ensayo en invernáculo, para los tratamientos de inoculación con las cepas de U1301, U1302, SEMIA5080, E109 y la mezcla U1301/U1302.

Tratamiento	1º COSECHA	2º COSECHA
	% de nódulos ocupados por la cepa inoculada	% de nódulos ocupados por la cepa inoculada
U1301	34 bc	22 c
U1302	27 bc	52 b
U1301/U1302	41 b	41 b
SEMIA5080	85 a	82 a
E109	13 c	9 c

*1º cosecha a los 10 días, n=3. ** 2º cosecha a los 40 días, n=3. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Por otra parte, para conocer que cepa fue más competitiva en ocupar los nódulos primarios al inocular con la mezcla de las cepas U1301 y U1302, se evaluó el efecto de la cepa y la ubicación y del suelo. Existe efecto de la interacción cepa*suelo en la ocupación de nódulos para el tratamiento de inoculación con la mezcla U1301/U1302 en ambas cosechas. En suelo SH la cepa U1302 fue recuperada en mayor proporción que la cepa U1301. Mientras que en suelo CH, no se observan diferencias significativas entre ambas cepas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Ocupación de nódulos primarios por las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 al inocular con la mezcla de ambas en suelos con (CH) y sin historia (SH) de cultivo de soja.

Tratamiento	1º COSECHA	2º COSECHA
	% de nódulos ocupados por la cepa inoculada	% de nódulos ocupados por la cepa inoculada
U1301 SH	29 b	29 b
U1302 SH	72 a	72 a
U1301 CH	22 b	16 b
U1302 CH	19 b	24 b

*1º cosecha a los 10 días, n=3. ** 2º cosecha a los 40 días, n=3. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas entre cepas en cada suelo (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Dado que en este estudio se observó que varios de los aislamientos de nódulos recuperados en suelos CH e inoculados con la mezcla U1301/U1302 corresponden a la cepa SEMIA5080 se evaluó la ocupación de los nódulos por la cepa SEMIA5080 cuando se inocula con la mezcla de cepas de *B. elkanii* U1301/U1302 en suelo CH. La cepa SEMIA5080 ocupó la mayoría de los nódulos colectados en ambas cosechas, y difirió significativamente de las cepas U1301 y U1302 (Cuadro 15).

Cuadro 15. Ocupación de nódulos por las cepas de *B. elkanii* y SEMIA5080 de *B. japonicum* cuando se inocula con la mezcla U1301/U1302 en suelo CH en ambas cosechas.

Tratamiento	1º COSECHA	2º COSECHA
	% de nódulos ocupados por la cepa	% de nódulos ocupados por la cepa
SEMIA5080	59 a	57 a
U1301	22 b	24 b
U1302	19 b	14 b

*1º cosecha a los 10 días, n=3. ** 2º cosecha a los 40 días, n=3. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas entre cepas en cada suelo (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Estos resultados indican la presencia y capacidad competitiva de esta cepa en los suelos con historia del cultivo de soja. A su vez, en la segunda cosecha se observó también interacción significativa entre la cepa inoculada y la ubicación de los nódulos. La cepa SEMIA5080 ocupó la mayoría de los nódulos secundarios (71 %) y difirió significativamente de las cepas de *B. elkanii*. En cuanto a la ocupación de los nódulos primarios no se observaron diferencias significativas entre las tres cepas (datos no mostrados).

Para conocer la capacidad competitiva de las cepas de inoculantes remanentes de anteriores siembras, se analizó la ocupación de los nódulos del tratamiento control en suelo CH (Cuadro 16). Se observan diferencias significativas entre la ocupación de los nódulos en la primera cosecha; la cepa SEMIA5080 ocupó la mayoría de los nódulos en comparación con las cepas U1301 y U1302. En la segunda cosecha continúan existiendo diferencias significativas entre la cepa SEMIA5080 (69 %) y las otras, pero la ocupación de los nódulos por la cepa U1302 es mayor y difiere significativamente de la U1301. Estos resultados muestran que en el suelo CH están presentes las cepas SEMIA5080, U1301 y U1302 pero que la cepa SEMIA5080 es más competitiva que las cepas de *B. elkanii* en la ocupación de los nódulos.

Cuadro 16. Ocupación de nódulos por las cepas de *B. elkanii* y SEMIA5080 de *B. japonicum* en el tratamiento control en suelo CH en ambas cosechas.

Tratamiento	1º COSECHA	2º COSECHA
	% de nódulos ocupados por la cepa	% de nódulos ocupados por la cepa
SEMIA5080	81 a	69 a
U1301	9 b	7 b
U1302	9 b	24 c

*1º cosecha a los 10 días, n=3. ** 2º cosecha a los 40 días, n=3. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas entre cepas en cada suelo (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Cabe destacar que en el caso de los porcentajes de ocupación de los nódulos, no siempre se alcanza el 100 % debido a la existencia de aislamientos cuyo perfil genético difiere del de las cepas de referencia, los cuales se estudiarán en detalle en el tercer año del proyecto y no en este trabajo.

3.5. EFICIENCIA SIMBIÓTICA Y CAPACIDAD COMPETITIVA DE CEPAS DE RIZOBIOS COMERCIALES USADAS EN LA REGIÓN: ENSAYO EN MAGENTAS

3.5.1. Primer ensayo

En el primer ensayo se realizaron dos cosechas. Para la primera no se observó diferencias entre los tratamientos inoculados mientras que en la segunda se observó efecto del tratamiento sobre los cuatro parámetros analizados (Cuadro 17). En el caso del PSPA y la biomasa total los tratamientos inoculados con la cepa SEMIA5080, E109, U1302 y las mezclas U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080 no difieren entre ellos y presentaron medias significativamente mayores a las del tratamiento inoculado con la cepa U1301 y el control s/N. En cuanto al parámetro PSN, el tratamiento inoculado con la cepa U1301 difirió significativamente de todos los tratamientos, menos del inoculado con la cepa E109. Todos los tratamientos inoculados presentaron diferencias significativas respecto al control. En el caso del PSR, el tratamiento inoculado con la cepa U1301 presentó la menor media y difirió significativamente de todos los demás tratamientos inoculados con excepción de la mezcla U1301/U1302 y la cepa E109. De estos resultados se destaca la capacidad de las cepas U1302 y SEMIA5080 solas o en combinación con la cepa U1301, de promover el crecimiento vegetal y generar una mayor biomasa aérea.

Para evaluar la competencia entre cepas se analizó la ocupación de los nódulos en los tratamientos inoculados con las mezclas U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080. Para la primera cosecha no se observó efecto de la cepa sobre la ocupación de los nódulos en ninguna de las dos mezclas evaluadas. En cambio, en la segunda cosecha se

observaron diferencias significativas en el tratamiento inoculado con la mezcla U1301/SEMIA5080, en el cual la cepa SEMIA5080 fue recuperada en el 87 % de los nódulos analizados (datos no mostrados).

Cuadro 17. Peso seco de parte aérea (PSPA), radicular (PSR), nodular (PSN) y biomasa total de plantas de soja inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum*, y un control s/N y sin inocular.

	Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)**	PSN (grs)*	Biomasa tot. (grs)*
1º COSECHA	U1301	0,80 a	0,30 c	0,10 a	1,20 a
	U1302	1,00 a	0,30 bc	0,12 a	1,50 a
	U1301+U1302	1,00 a	0,40 bc	0,10 a	1,50 a
	U1301+SEMIA5080	1,00 a	0,50 bc	0,11 a	1,60 a
	SEMIA5080	1,10 a	0,50 ab	0,10 a	1,70 a
	E109	1,00 a	0,30 bc	0,10 a	1,40 a
	Control s/N	0,70 a	0,80 a	SD -	1,50 a
2º COSECHA	U1301	1,68 a	0,22 a	0,10 b	2,00 a
	U1302	2,69 b	0,36 bc	0,19 a	3,20 b
	U1301+U1302	2,67 b	0,34 abc	0,16 a	3,20 b
	U1301+SEMIA5080	2,98 b	0,43 c	0,16 a	3,00 b
	SEMIA5080	2,91 b	0,36 bc	0,16 a	3,40 b
	E109	2,65 b	0,29 ab	0,15 ab	3,10 b
	Control s/N	1,59 a	0,39 bc	0,02 c	2,00 a

1º cosecha a los 22 días, n=3. 2º cosecha a los 35 días, n=3. Los valores representan la media en gramos por planta. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: *datos analizados mediante Modelo Factorial Simple – Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$; **datos analizados mediante Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$). SD: no hubo nódulos para peso seco, sólo para aislamientos. s/N: control sin agregado de nitrógeno.

3.5.2. Segundo ensayo

En el segundo ensayo de magentas, se realizó una única cosecha, y se evaluó la mezcla U1302/SEMIA5080 además de las evaluadas en el ensayo anterior. Puede observarse en Cuadro 18 que existe efecto de los tratamientos sobre todos los parámetros evaluados. En el PSPA, se observan diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y el control s/N. A su vez las plantas inoculadas con las

mezclas U1301/U1302 y U1302/SEMIA5080 presentaron menor PSPA que las plantas inoculadas con la cepa SEMIA5080. Para los parámetros PSN, PSR y biomasa total, los tratamientos inoculados no presentaron diferencias significativas entre ellos pero sí con respecto al control s/N. A partir de estos resultados obtenidos de biomasa total se observa que tanto la cepa SEMIA5080 como las tres mezclas evaluadas destacan en su promoción del crecimiento vegetal.

Cuadro 18. Peso seco de parte aérea (PSPA), nodular (PSN), radicular (PSR) y biomasa total de plantas de soja inoculadas con cepas de *B. elkanii*, *B. japonicum* y control s/N y sin inocular.

Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)*	PSN (grs)**	Biomasa tot. (grs)*
Control s/N	1,10 a	0,46 a	0 b	1,50 a
SEMIA5080	2,90 c	0,88 b	0,30 a	4,10 b
U1301+U1302	1,90 b	0,96 b	0,37 a	3,20 b
U1301+SEMIA5080	2,30 bc	0,96 b	0,37 a	3,60 b
U1302+SEMIA5080	2,20 b	1,0 b	0,32 a	3,60 b

Los valores representan la media en gramos por planta. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: *datos analizados mediante Modelo Factorial Simple – Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$; **datos analizados mediante Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

Se evaluó la capacidad competitiva de las cepas en los tratamientos inoculados con las mezclas U1301/U1302, U1301/SEMIA5080 y U1302/SEMIA5080 (Cuadro 19). En el caso de la mezcla comercial uruguaya, U1301/U1302, la cepa U1302 fue recuperada en mayor % de nódulos. En el caso de la mezcla U1301/SEMIA5080, se recupera de la mayoría de los nódulos la cepa SEMIA5080. No se obtuvieron diferencias significativas entre cepas en el caso de la mezcla U1302/SEMIA5080 (43 % y 57 % respectivamente).

Cuadro 19. Ocupación de nódulos por las cepas de *B. elkanii* y SEMIA5080 de *B. japonicum* en los tratamientos inoculados con las mezclas U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080.

% de nódulos ocupados por la cepa inoculada		
Tratamiento	Mezcla U1301/U1302	Mezcla U1301/SEMIA5080
SEMIA5080	-	66 a
U1301	36 b	34 b
U1302	64 a	-

Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD-Fisher, $p < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

Desde la década del 70, en Uruguay se producen inoculantes de rizobios para soja con cepas recomendadas por el Departamento de Microbiología de Suelos, del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), organismo encargado de realizar la selección de cepas y el control de calidad de los inoculantes nacionales y los provenientes de países limítrofes. Desde 1984 hasta el presente, las cepas U1301 y U1302 de *B. elkanii* se utilizan para las formulaciones del inoculante comercial nacional (M. Mayans, comunicación personal). La información sobre la fijación de nitrógeno en el cultivo de soja es escasa, no está actualizada y no hay reportes de cepas de rizobios nativas eficientes que nodulen soja. Las cepas nativas-naturalizadas constituyen la base en la búsqueda de cepas para nuevos inoculantes; por lo tanto el primer paso es establecer la diversidad genética de estas cepas (Lindström, Willems, y Altier, 2010). Muchas veces esta población nativa es más abundante, más competitiva o con una mejor capacidad de adaptarse a las condiciones del suelo que las cepas usadas en la inoculación, pero no necesariamente más eficiente en la fijación de nitrógeno y por consiguiente causan un descenso en el rendimiento del cultivo (de Almeida Ribeiro *et al.*, 2015). Por este motivo, uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar las poblaciones de rizobios que nodulen soja en los suelos de Uruguay y detectar la presencia de cepas naturalizadas, relevamiento que no se realiza hace ya varias décadas. En este estudio, se obtuvieron 78 aislamientos con perfiles genéticos distintos a las 4 cepas de referencia utilizadas para la inoculación de las plantas en los sitios y ensayos muestreados. Mediante la técnica de PCR-BOX se analizó la similitud de 44 de estos aislamientos entre ellos y con las cepas de referencia y se obtuvieron 9 perfiles distintos a los de las cepas comerciales evaluadas. Para diferenciar los aislamientos se tomó el 70 % como corte de similitud; este mismo valor también fue sugerido en otros trabajos que utilizan técnicas de rep-PCR para el estudio de la diversidad en rizobios (Delamuta *et al.*, 2017). Estos resultados permiten afirmar que existe una población de rizobios nativos/naturalizados en los suelos del país capaz de persistir y competir por la ocupación de los nódulos.

Diversos trabajos han mencionado que en suelos con historia de cultivo de soja la diversidad de rizobios es mayor a la que podría esperarse, en algunos suelos se han encontrado poblaciones de rizobios naturalizados de entre 10^5 y 10^6 rizobios por gramo de suelo (Melchiorre *et al.*, 2010; Hungria *et al.*, 2006). Si se consideran los valores obtenidos en el ensayo de NMP para los suelos con historia, dichas proporciones son bastante elevadas. En algunos sitios de Brasil luego de 18 años de inoculación se observaron cepas con perfiles genéticos distintos a las cepas de los inoculantes (Loureiro *et al.*, 2007). Estudios realizados en la región demuestran que las poblaciones nativas pueden llegar a ser eficientes a nivel competitivo y simbiótico (Salvucci *et al.*, 2012; Urzúa, 2005). Esto puede deberse a que aunque un determinado genotipo inicialmente se encuentre en una baja concentración, podría aumentar si consigue invadir de manera eficiente los nódulos de la leguminosa. Esta adaptación podría ocurrir por medio de transferencia horizontal de material genético, lo cual permitiría la dispersión de la capacidad competitiva de la mano de una alta diversidad genotípica (Barcellos *et al.*, 2007; Delamuta *et al.*, 2017). Un estudio llevado a cabo en la zona de Cerrado, Brasil, mostró que en comparación con las cepas comerciales de *B. japonicum* y *B. elkanii* con las que se venía inoculando por una década, las cepas naturalizadas presentaban diferencias en sus propiedades morfológicas, serológicas, fisiológicas, genéticas y simbióticas; y eran competitivas en la ocupación de los nódulos de soja (Mendes, Hungria, y Vargas, 2004; Nishi *et al.*, 1996). Estudios posteriores mostraron que los cambios observados en las cepas naturalizadas son consecuencia de la transferencia horizontal de genes, y que el genoma de las cepas naturalizadas era una mezcla del genoma de *B. japonicum* comercial y del genoma de otra cepa no conocida (Barcellos *et al.*, 2007). La eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas naturalizadas puede ser consecuencia de este intercambio genético. Algunas de las cepas naturalizadas aisladas en el presente trabajo presentaron elevada homología en su perfil de BOX-PCR con las cepas de *B. elkanii* y con la cepa de *B. japonicum* con las que se ha inoculado la soja en Uruguay. Estos resultados reafirman la necesidad de un estudio constante sobre las poblaciones de rizobios de los suelos uruguayos en los que se planta no sólo soja, sino leguminosas en general.

Este trabajo permitió aislar de los suelos de Uruguay cepas de rizobios naturalizadas que nodulan soja. Cabe destacar que, de los 23 aislamientos obtenidos del sitio con historia Invernada, 20 tuvieron perfiles diferentes a los de las cepas comerciales, y a su vez 18 fueron iguales entre sí. Estos resultados indican que en este sitio no sólo existe una población de rizobios nativos, sino que además hay una cepa naturalizada con buena capacidad competitiva.

Por otra parte, al momento de seleccionar una cepa para la formulación de un nuevo inoculante es importante no sólo la eficiencia con la que fija el nitrógeno atmosférico sino también la habilidad de permanecer en los suelos y colonizar la raíz de forma más efectiva que el resto de los rizobios presentes en los suelos (Zahran, 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, de los nódulos de las plantas de soja crecidas en suelos con historia del cultivo, se recuperó una alta proporción de la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum* tanto en los controles sin inocular como en los tratamientos inoculados con la mezcla comercial uruguaya U1301/U1302. La presencia de la cepa SEMIA5080 en los suelos uruguayos con historia de soja se debe a que ésta fue introducida en los suelos ya que se estuvo comercializando como inoculante uruguayo en conjunto con la cepa U1301 de *B. elkanii*. En el año 2015 el MGAP detectó una discrepancia en el perfil de BOX-PCR de la cepa U1302. Dado que el perfil genético detectado presentó elevada homología con la cepa de referencia SEMIA5080 podría suponerse que existió una contaminación del cultivo del inoculante original (U1301/U1302) con esta cepa. A partir de dicho año el MGAP solicitó repiques nuevos de las cepas U1301 y U1302 a la colección de origen, Fepagro (Brasil) y se retomó la fabricación del inoculante comercial uruguayo original.

La supervivencia y persistencia de las cepas de rizobio dependen de diversos factores tanto de la cepa como del suelo y del ambiente. En el caso de las condiciones ambientales y edafológicas, la persistencia se ve afectada por el pH, salinidad, temperatura, toxicidad y deficiencia de nutrientes, también las prácticas agrícolas son importantes (Zahran, 2009; Sadowsky, 2005; Brockwell, Pilka, y Holliday, 1991). Se ha observado que es vital en la supervivencia el contenido de arcilla, porcentaje de

carbono y humedad que presente en el suelo (Zengeni y Giller, 2007). En el caso de las características intrínsecas de la cepa, la formación de biopelículas ha demostrado ser esencial para su persistencia en los suelos por largos periodos de tiempo (Hirsch, 2010), y la misma está ligada a la producción de exopolisacáridos. La síntesis de estas macromoléculas ha demostrado ser esencial no sólo para la persistencia en los suelos sino también para la colonización de las raíces y posterior formación de nódulos (Leigh y Coplin, 1992). Los resultados obtenidos pueden deberse no sólo a la capacidad de la cepa SEMIA5080 de adaptarse a las condiciones edafológicas y climáticas del país, sino también a sus características fisiológicas ya que se observó en esta cepa una mayor producción de exopolisacáridos evidenciada por la apariencia mucosa de la colonia. Esta característica puede explicar en parte la capacidad de esta cepa de sobrevivir en el suelo y colonizar las raíces de soja. Por otro lado, la cepa SEMIA5080, presentó menor tiempo de generación y mayor velocidad de crecimiento que las otras tres cepas evaluadas (sin análisis estadístico), lo que podría conferirle ventajas en la proliferación en el suelo, competencia saprofítica y colonización de la rizósfera (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Dado que tanto las características fisiológicas de la cepa, como la presencia de poblaciones de rizobios naturalizadas y las condiciones ambientales afectan la capacidad de una cepa de nodular (Ji *et al.*, 2017), en este estudio se evaluó la capacidad competitiva de las cepas utilizadas para la formulación de los inoculantes en el país. En los suelos con historia, la cepa SEMIA5080 fue recuperada en la mayoría de los nódulos, tanto en los controles como cuando el tratamiento de inoculación fue con la mezcla U1301/U1302, lo que indica una mayor capacidad competitiva por parte de esta cepa de *B. japonicum* (van Rensburg y Strijdom, 1985). Estos resultados se observaron también en los suelos sin historia y en los ensayos en magentas. El orden de las tres cepas en la proporción en que ocupan los nódulos es: SEMIA5080 > U1302 > U1301. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la cepa SEMIA5080 es capaz de persistir en los suelos luego de la inoculación y que posee una mejor capacidad competitiva, en relación a las cepas de *B. elkanii* bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados concuerdan con diversos estudios realizados

en Brasil que demuestran que esta cepa junto con otras de *B. japonicum* presentan una alta capacidad competitiva por la ocupación de los nódulos y por ello es utilizada en las formulaciones comerciales de este país (Kober *et al.*, 2004; Hungría *et al.*, 1998). La elevada capacidad competitiva de la cepa SEMIA5080 ha sido reportada en diversos trabajos en Brasil y Canadá (Thilakarathna y Raizada, 2017; Hungría *et al.*, 1998; Hungría *et al.*, 2008). Se ha observado que la presencia de dos flagelos en cepas de *B. japonicum* influye en gran medida en la competencia por la ocupación de los nódulos (Althabegoiti *et al.*, 2008; Althabegoiti *et al.*, 2011), no han sido reportados en las cepas de *B. elkanii*.

En cuanto a la capacidad competitiva entre las dos cepas de *B. elkanii* que componen los inoculantes para soja en Uruguay, la cepa U1302 fue más competitiva que la cepa U1301 en la ocupación de los nódulos tanto en sustrato estéril como en suelo. Por otra parte, al analizar el nº de nódulos formados por encima del RT, factor que se relaciona con la capacidad competitiva de la cepa (Oliveira y Station, 1990), se observó que la cepa U1301 fue la que presentó menor nº de nódulos. Además, la cepa U1301 presentó una nodulación tardía respecto a las otras dos cepas evaluadas, lo que podría estar explicando su menor capacidad competitiva. Por otro lado, los resultados obtenidos para tiempo de generación y velocidad de crecimiento (sin análisis estadístico) mostraron que entre las dos cepas de *B. elkanii* la U1301 fue más lenta que la U1302; característica que también podría influir en la colonización y capacidad competitiva.

Por otro lado, en este estudio la cepa E109 de *B. japonicum*, comercializada para soja en Argentina, casi no fue recuperada aun cuando se la inoculó en suelos sin historia, lo que indicaría que si bien nuestras condiciones edafoclimáticas son similares a algunas zonas de Argentina, esta cepa no se adaptó a las condiciones de los suelos muestreados ya que es recomendada como buena a nivel competitivo en los suelos de la pampa Argentina (Salvucci *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2015)

Como se mencionó anteriormente la eficiencia con la que una cepa de rizobios es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con una leguminosa es clave para su selección como inoculante. Esta característica no solo está dada por la

fisiología y genética de la cepa, su interacción con el cultivo pero también por las condiciones edafológicas y climáticas (Cuadrado, Rubio y Santos, 2009; Weaver y Wright, 1987). Para evaluar la eficiencia simbiótica de las 4 cepas comerciales utilizadas en este trabajo se llevó a cabo un ensayo en macetas con suelo con y sin historia de soja y dos en magentas con sustrato estéril bajo condiciones controladas. La producción de materia seca de la parte aérea y la determinación del contenido de nitrógeno fijado en plantas inoculadas y no inoculadas en un medio libre de nitrógeno, es la forma más sencilla y directa para evaluar la eficiencia en la simbiosis (Houngnandan *et al.*, 2008). En cuanto a la biomasa total en los suelos con historia, ningún tratamiento con inoculación presentó mejores resultados que el tratamiento control sin inocular y sin agregado de nitrógeno, pudiendo ser esto consecuencia de la persistencia, eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de la población de rizobios presente en dicho suelo, en el cual los nódulos fueron ocupados en mayor proporción por la cepa SEMIA5080.

En el suelo sin historia tanto los tratamientos con inoculación como el control no se diferencias significativamente en cuanto a PSPA y biomasa total. Al comparar estos resultados con el suelo con historia, destaca nuevamente la importancia de la población de rizobios que permanece en los suelos luego de sucesivas zafas de soja. Los resultados de biomasa obtenidos en el ensayo en macetas fueron reafirmados por los porcentajes de nitrógeno derivado de la atmósfera. En los que se observó que en el suelo con historia no hay diferencias entre los tratamientos inoculados y el control con valores cercanos al 100 % de nitrógeno fijado. Estos valores son realmente elevados y prometedores, otros estudios han encontrado entre un 50-60 % de %N_{da} (Houngnandan *et al.*, 2008; Herridge y Holland, 1992). Estos resultados estarían indicando que el suelo con historia de sucesivas inoculaciones es un inoculante en sí. Estos resultados podrían cuestionar la necesidad de inocular todos los años en suelos que cuentan con sucesivas zafas de soja, pero debido al bajo costo de la inoculación y que no se puede asegurar que estos resultados se repitan siempre bajo todas las condiciones del cultivo (variedad, clima, suelo), lo recomendable es inocular cada zafa. Los resultados obtenidos concuerdan con trabajos llevados a cabo en Francia y Polonia que reportan cepas de *B. japonicum* con una alta estabilidad en los suelos,

por períodos de hasta 10 años que mantienen su capacidad de fijar nitrógeno en forma efectiva (Narozna *et al.*, 2015; Obaton *et al.*, 2002).

En cuanto a los resultados obtenidos para la cepa E109, esta mostró ser eficiente en cuanto a valores de PSPA y biomasa total en los ensayos con sustrato estéril (magentas), pero estos resultados no se reflejan cuando se la inocula en suelo. Si bien es una cepa recomendada para los suelos de la Pampa Argentina (Cassán *et al.*, 2009; Lindström, Willems, y Altier, 2010), en los suelos evaluados de nuestro país no se adaptó ya que la nodulación fue escasa.

Dado que en el país se inocula con una mezcla de dos cepas en este estudio se evaluaron las posibles combinaciones de las dos cepas de *B. elkanii* y la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum*. Se hizo énfasis en la evaluación de las mezclas ya que cada cepa puede presentar diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y/o resistencia frente a patógenos (Boiero *et al.*, 2007; Molina-Romero *et al.*, 2015; Zimmer *et al.*, 2016). Pero también utilizar mezclas de cepas puede ocasionar una disminución en el rendimiento del cultivo como consecuencia de la competencia entre ellas por la ocupación de los nódulos (Thompson, 1980).

Los resultados obtenidos son congruentes con los de los análisis anteriores, cuando se inocula con las cepas U1302 de *B. elkanii* y la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum* de forma individual o en combinación con una de las dos cepas de *B. elkanii* se obtiene una mayor eficiencia simbiótica (biomasa total). Estudios llevados a cabo en Brasil, país de origen de las cepas U1301, U1302 y SEMIA5080 afirman que si bien las tres cepas son eficientes en el establecimiento de la simbiosis con soja, SEMIA5080 presenta mejores resultados (Barbosa *et al.*, 2017; Chibeba *et al.*, 2017; Hungria *et al.*, 1998). En este estudio, bajo las condiciones evaluadas se obtuvo que esta cepa no sólo persiste en los suelos sino que además presenta una alta capacidad competitiva y eficiencia en su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con soja. A su vez, los resultados obtenidos para los ensayos en magentas muestran que la cepa SEMIA5080 es tan eficiente a nivel simbiótico cuando se la inocula en mezcla con las cepas de *B. elkanii* como si se la inocula en forma individual. Si bien es necesario llevar a cabo más ensayos con dicha cepa, estos resultados sugieren que podría formularse un inoculante sólo con esta cepa, y esto

presenta diversas ventajas no sólo a nivel de producción del inoculante sino también a nivel económico si se considera que puede existir competencia entre cepas y disminución del rendimiento del cultivo, como se mencionó anteriormente.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados para conocer la eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de las 4 cepas comerciales de rizobios evaluadas indican que la cepa SEMIA5080 es promisorio para ser utilizada como inoculante, ya sea en forma individual o en combinación con una de las dos cepas de *B. elkanii*. Es necesario continuar realizando evaluaciones de esta cepa tanto en condiciones controladas como en ensayos a campo bajo diversas condiciones edafoclimáticas.

5. CONCLUSIONES

De los nódulos de plantas de soja de los suelos con historia de cultivo se recuperaron las cepas U1301 y U1302 de *B. elkanii* y la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum*. Esta población de rizobios presente en suelos con historia del cultivo de soja demostró elevada eficiencia simbiótica. La cepa SEMIA5080 fue recuperada en mayor proporción, indicando una alta persistencia y gran capacidad competitiva, aun cuando se inoculan las plantas de soja con las cepas U1301 y U1302.

En los suelos con historia del cultivo de soja existe una población de rizobios naturalizados que nodulan soja, siendo este un material genético promisorio para la selección de nuevas cepas.

En cuanto a la competencia entre las cepas, tanto en suelo como en sustrato estéril, la cepa SEMIA5080 presentó una mayor capacidad competitiva, seguida de la cepa U1302 de *B. elkanii* y luego de la U1301.

Bajo condiciones controladas y en suelo la mezcla U1301/U1302 y la cepa SEMIA5080 sola o en mezcla con las cepas de *B. elkanii* presentaron una alta eficiencia simbiótica. Las plantas inoculadas con estas cepas obtienen casi el 100 % del nitrógeno a través de la FBN.

Si bien es necesario continuar el estudio con ensayos a campo de la cepa SEMIA5080 sola y en combinación con las cepas de *B. elkanii*, a partir de los resultados obtenidos en este estudio podría proponerse a futuro un inoculante para soja formulado sólo con esta cepa.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abaidoo, R. C., Keyser, H. H., Singleton, P. W., y Borthakur, D. (2000). Bradyrhizobium spp. (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 225–234.
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181.
- Alarcón, A., y Ferrera, R. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica En México*, 26(2), 191–203.
- Alexandre, A., Laranjo, M., Oliveira, S. (2006). Natural populations of Chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *Microbial Ecology*, 51, 128-136.
- Alhabegoiti, M. J., Covelli, J. M., Pérez-Giménez, J., Quelas, J. I., Mongiardini, E. J., López, M. F., y Lodeiro, A. R. (2011). Analysis of the role of the two flagella of *Bradyrhizobium japonicum* in competition for nodulation of soybean. *FEMS Microbiology Letters*, 319(2), 133–139.
- Alhabegoiti, M. J., López-García, S. L., Piccinetti, C., Mongiardini, E. J., Pérez-Giménez, J., Quelas, J. I., y Lodeiro, A. R. (2008). Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS Microbiology Letters*, 282(1), 115–123.
- Babu, K. V., Devi, L. S., Veeraiah, V., y Anand, K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(1), 8–15.
- Bailly, X., Olivieri, I., Brunel, B., Cleyet-Marel, J. C., y Béna, G. (2007). Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of Medicago species. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5223–5236.

- Barbosa, L. de P., Costa, P. F., Ribeiro, P. R. A., Rufini, M., Guimarães, A. A., y Moreira, F. M. de S. (2017). Symbiotic efficiency and genotypic characterization of variants of *Bradyrhizobium spp.* In commercial inoculants for soybeans. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 41, 1–15.
- Barcellos, F. G., Menna, P., Batista, J. S. D. S., y Hungria, M. (2007). Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2635–2643.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., y Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., y Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486.
- Beyhaut, E., Larson, D. L., Allan, D. L., y Graham, P. H. (2014). Legumes in prairie restoration: Evidence for wide cross-nodulation and improved inoculant delivery. *Plant and Soil*, 377(1–2), 245–258.
- Bhuvanewari, T. V, Turgeon, B. G., y Bauer, W. D. (1980). Early Events in the Infection of Soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*: I. LOCALIZATION OF INFECTIBLE ROOT CELLS. *Plant Physiology*, 66(709), 1027–1031.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., y Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 874–880.
- Bolaños, L., Martín, M., Rivilla, R., y Bonilla, I. (2006). Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant and Soil*, 280, 135–142.
- Bournaud, C., de Faria, S. M., dos Santos, J. M. F., Tisseyre, P., Silva, M., Chaintreuil, C., y Moulin, L. (2013). Burkholderia Species Are the Most

- Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). *PLoS ONE*, 8(5), 1-13.
- Brockwell J., Pilka A., y Holliday R. A. (1991). Soil pH is the major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 31(2): 211 - 219.
- de Bruijn, F. J. (1992). Use of Repetitive (REP and ERIC) sequences and the PCR to fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2180-2187.
- Brunel, B., Boeufgras, J. M., Bernillon, D., y Bardin, R. (2009). Phenotypic Drift in *Bradyrhizobium japonicum* Populations after Introduction into Soils as Established by Numerical Analysis. *Springer*, 74(3), 644–652.
- Capurro J., Surjack J. Andriani J., Dickie M. J. y González M. C. (2010). Evaluación de distintas especies de cultivos de cobertura en secuencias soja-soja en el área sur de la provincia de Santa Fe. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur (IPNI)* 47, 13-15.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P., y Thomas-Oates, J. E. (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Molecular Biology*, 29(3), 453–464.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., y Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28–35.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., y Li, Y. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 153–159.

- Chen, W. X., Yan, G. H., y Li, J. L. (1988). Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium gen. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(4), 392–397.
- Chibeba, A. M., Kyei-Boahen, S., Guimarães, M. de F., Nogueira, M. A., y Hungria, M. (2017). Feasibility of transference of inoculation-related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 261, 230–240.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Cle, C., y Barka, E. a. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959.
- Cuadrado, B., Rubio, G., y Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 38(1), 78–104.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y Bono, J. J. (2001). Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, 6(1), 24–30.
- Danso, S. K. A, Hardarson, G., y Zapata, F. (1993). Misconceptions and practical problems in the use of ¹⁵N soil enrichment techniques for estimating N₂ fixation. *Plant and Soil*, 152(1), 25 - 52.
- Datta, A., Singh, R. K., Kumar, S., y Kumar, S. (2015). An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium “*Rhizobium*”: a review. *Annals of Plant Sciences*, 933–942.
- de Almeida Ribeiro, P. R., dos Santos, J. V., Martins da Costa, E., Lebbe, L., Silva Assis, E., Oliveira Louzada, M., y de Souza Moreira, F. M. (2015). Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 212, 85–93.

- de Castro Pires, R., dos Reis Junior, F. B., Zilli, J. E., Fischer, D., Hofmann, A., James, E. K., y Simon, M. F. (2018). Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of Mimosa in central Brazil. *Plant and Soil*, 423(1–2), 411–428.
- Delamuta, J. R. M., Menna, P., Ribeiro, R. A., y Hungria, M. (2017). Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(5), 254–265.
- Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., y Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(9), 3342–3351.
- DIEA (Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias). 2017. Anuario Estadístico Agropecuario 2017 [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Consultado 20 abril 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. (2014). InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>
- Ernst, O., Siri-Prieto, G. y Cadenazzi, M. (2009). Influence of Crop-Pasture Rotation and Tillage System on Yields of Wheat, Soybean, Barley, Sorghum and Sunflower in Uruguay. *Journal of Agricultural Machinery Science*. 5(3), 253-262.
- FAO 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/statistics/es/>
- Fisher, R. A. y Yates, F. (1963). Statistical tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Oliver and Boyd, London, England.

- Frioni L. (2006). Microbiología básica, ambiental y agrícola. Universidad de la República Montevideo, Facultad de Agronomía, 191-210.
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., y Vo, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153–226.
- Gan, Y., Stulen, I., van Keulen, H., y Kuiper, P. J. C. (2004). Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean. *Plant Soil*, 258(1), 281 – 292.
- Gaunt M. W. , Turner S. L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S. A., y Young J. P. W. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 51, 2037 – 2048.
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., y Young, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiology*, 137(4), 1228–35.
- Gevers D., Cohan F. M., Lawrence J. G., Spratt B. G., Coenye T., Feil E. J., Stackebrandt E., Van de Peer Y. V., Vandamme P., Thompson F. L., y Swings J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 733-739.
- Göttfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H., y Hennecke, H. (2001). Potential Symbiosis-Specific Genes Uncovered by Sequencing a 410-Kilobase DNA Region of the *Bradyrhizobium japonicum* Chromosome. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1405–1412.
- Graham, P., Sadowsky, M., Keyser, H., Barnett, Y., Bradley, R., Cooper, J., De Ley, D., Jarvis, B., Roslycky, E., Strijdom, B., y Young, J. (1991). Proposed minimal

- standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 582 – 587.
- Grange, L., y Hungria, M. (2004). Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9): 1389-1398.
- Gruber, N., y Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293–6.
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 367–402.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M., y Nürnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: Modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*, 17(8), 495–502.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W.-M., Elliott, G. N., Bontemps, C., y James, E. K. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(11), 1276–88.
- Hardarson, G., y Danso, S. K. A. (1990). Use of ¹⁵N methodology to assess biological nitrogen fixation. En G. Hardarson (Ed.). *Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships* (pp. 129 – 160). Vienna, International Atomic Energy Agency.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., y Burns, R. C. (1968). The C₂H₂-C₂H₄ assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43, 1185 - 1207.
- Hartman, G. L., West, E. D., y Herman, T. K. (2011). Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5–17.
- Herridge, D. F, y Holland, J. F. (1992). Production of summer crops in northern New South Wales¹. Effects of tillage and double cropping on growth, grain and N yields of six crops. *Aust J Agric Res*, 43, 105–122

- Hirsch, A. M. (2010). How rhizobia survive in the absence of a legume host, a stressful world indeed. Seckbach, J., Grube, Martin (Eds.), *Symbioses and Stress* (pp. 375-391). Springer Netherlands.
- Houngnandan, P., Yemadje, R. G. H., Oikeh, S. O., Djidohokpin, C. F., Boeckx, P., y Van Cleemput, O. (2008). Improved estimation of biological nitrogen fixation of soybean cultivars (*Glycine max* L. Merr) using ¹⁵N natural abundance technique. *Biology and Fertility of Soils*, 45(2), 175–183.
- Howieson, J. G., y Dilworth, M. J. (2016). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.
- Hungría, M., Chueire, L. M., Menna, P., y Villamil, E. (2008). Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. *Embrapa*, 1-12.
- Hungria, M., Franchini, J. C., Campo, R. J., Crispino, C. C., Moraes, J. Z., Sibaldelli, R. N. R., y Arihara, J. (2006). Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(4), 927–939.
- Hungria, M., Boddey, L. H., Santos, M. A., y Vargas, M. A. T. (1998). Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 27(4), 393–399.
- Hymowitz, T., y Shurtleff, W. R. (2005). Debunking soybean myths and legends in the historical and popular literature. *Crop Science*, 45(2), 473–476.
- Iqbal, A., Khalil, I. a., Ateeq, N., y Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335.
- Irisarri, P., Milnitsky, F., Monza, J., y Bedmar, E. J. (1996). Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and Soil*, 180(1), 39-47.
- Izaguirre, P. (2005). URUGUAY Y SUS RECURSOS FITOGENETICOS EN LEGUMINOSAS. *Agrociencia*, 9, 77–83.
- Jaynes, D. B., Colvin, T. S., Karlen, D. L., Cambardella, C. A., y Meek, D. W. (2001). Nitrate Loss in Subsurface Drainage as Affected by Nitrogen Fertilizer Rate. *Journal of Environment Quality*, 30(4), 1305.

- Ji, Z. J., Yan, H., Cui, Q. G., Wang, E. T., Chen, W. F., y Chen, W. X. (2017). Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 114–119.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., y Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews, Microbiology*, 5(8), 619–33.
- Kober, M. de V., Sá, E. L. S. de, Freire, J. R. J., y Giongo, A. (2004). Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. *Ciência Rural*, 34(5), 1459–1464.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., y Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1244–51.
- Labandera, C. (2007). Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. *Agrociencia*, 9(1-2), 299-303.
- Leigh, J., y Coplin, D. (1992). Exopolysaccharides in plant–bacterial interactions. *Annu Rev Microbiol* 46, 307–346.
- Lindström, K. M. M., Willems, A., y Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Res. Microbiol.*, 161(6), 453-463.
- Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J. a., Watson, C. a., Yanyan, L., Lianhai, W., y Christine, A. W. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes . *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 155–172.
- Lloret, L., y Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 43 – 60.
- Lodeiro, A. R. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium spp.* *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 261–273.
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiology*, 125(1), 69–72.

- Lopez, S.M.Y. y Balatti, P.A., 2012. Closely Related Strains Of Bradyrhizobium Contained In Commercial Inoculates Of Soybean Are Identified By A Set Of PCR Reactions. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 1–8.
- Loureiro, M. D. F., Kaschuk, G., Alberton, O., y Hungria, M. (2007). Soybean [Glycine max (L.) Merr] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), 665–674.
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2006). *Brock Biology of Micoorganisms*. 10ª ed, Madrid. Pearson Prentice Hall.
- Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., y Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume Lotus japonicus. *Nature Communications*, 1(1), 1-10.
- Martínez-Romero, E. (2009). Controversies in Science: Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA AND CELL BIOLOGY*, 28(8), 361–370.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., y Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in Microbiology*, 17(10), 458–466.
- Melchiorre, M., Luca, M. J., Gonzalez Anta, G., Suarez, P., Lopez, C., Lascano, R. y Racca, R. (2010). Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 81–89.
- Mendes, I. C., Hungria, M., y Vargas, M. A. T. (2004). Establishment of Bradyrhizobium japonicum and B. elkanii strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 28–35.
- Molina-Romero, D., Morales-García, Y. E., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez-Andrade, O., Santiago-Saenz, Y., Muñoz-Rojas, J., y Castañeda- Lucio, M. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico Mecanismos de fitoestimulación por

- rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 17 (2), 24–34.
- Monza, J., y Márquez, A. (2004). *El metabolismo del nitrógeno en plantas*. Almuzara.
- Mortier, V., Holsters, M., y Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 245–258.
- Moulin, L., Muniue, A., y Dreyfus, B. (2001). Nodulation d legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411, 948–950.
- Narozna, D., Pudelko, K., Króliczak, J., Golinska, B., Sugawara, M., Madrzak, C. J., y Sadowsky, M. J. (2015). Survival and competitiveness of Bradyrhizobium japonicum strains 20 years after introduction into field locations in Poland. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5552–5559.
- Nelson, M. S., y Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6(491), 1-11.
- Nishi, C. Y. M., Boddey, L. H., Vargas, M. A. T., y Hungria, M. (1996). Morphological, physiological and genetic characterization of two new Bradyrhizobium strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. *Symbiosis*, 20(2), 147–162.
- Obaton, M., Bouniols, A., Piva, G., y Vadez, V. (2002). Are Bradyrhizobium japonicum stable during a long stay in soil? *Plant and Soil*, 245(2), 315–326.
- Oliveira, T., y Station, A. E. (1990). Speed of nodulation and competitive ability among strains of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli. *Archives of Microbiology*, 153(4), 311–315.
- Pazdernik, D. L., Vance, C. P., Sadowsky, M. J., Graham, P. H., y Orf, J. H. (1997). A host-controlled, serogroup-specific, ineffective nodulation system in the Bradyrhizobium-soybean (*Glycine max*) symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(8), 994–1001.
- Porter, P. M., Lauer, J. G., Lueschen, W. E., Ford, J. H., Hoverstad, T. R., Oplinger, E. S. y Crookston, R. K. (1997). Environment affects the corn and soybean rotation effect. *Agronomy Journal*. 89 (3), 441-448.

- Pueppke, S. G., y Broughton, W. J. (1999). Rhizobium sp. Strain NGR234 and R. fredii USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4), 293–318.
- Punschke, K. (2010). Colección Nacional de cepas de Rhizobium spp. Departamento de Microbiología de Suelos Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., y Blankenship, R. E. (2004). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541–554.
- Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., y Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1829), 971–984.
- Reid, D. E., Ferguson, B. J., y Gresshoff, P. M. (2011). Inoculation- and Nitrate-Induced CLE Peptides of Soybean Control NARK-Dependent Nodule Formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 606–618.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Margaret Oliver, I., Albareda Contreras, M., y Ruiz-Sainz, J. E. (2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 173–190.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., y Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1–2), 15–21.
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Thompson, F., Lory, S., y Stackebrandt, E. (2013). The prokaryotes: Prokaryotic biology and symbiotic associations. *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*, 1–607.
- Rosengurtt, B. (1943). Estudios sobre praderas naturales del Uruguay. (3ª Ed.) La estructura y el pastoreo de las praderas de la región de Palleros. *Flora de Palleros* (pp. 279). Barreiro y Ramos S.A. Montevideo, Uruguay.
- Sadowsky, M. J. (2005). Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. En: Werner D, Newton WE (Eds.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. *Netherlands Springer*, 89–112.

- Sainz, M., Calvo-Begueria, L., Pérez-Rontomé, C., Wienkoop, S., Abián, J., Staudinger, C., y Becana, M. (2015). Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *Plant Journal*, 81(5), 723–735.
- Salvucci, R. D., Aulicino, M., Hungria, M., y Balatti, P. A. (2012). Nodulation Capacity of Argentinean Soybean (*Glycine max* L. Merr) Cultivars Inoculated with Commercial Strains of Bradyrhizobium japonicum. *American Journal of Plant Sciences*, 03(1), 130–140.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., y Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49, 155-179.
- Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., y Martínez-Romero, E. (2002). Advances in Rhizobium research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323–378.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., de Vos, W. M., y Wilson, K. J. (1998). Use of marker genes in competition studies of Rhizobium. *Plant and Soil*, 204, 35–45.
- Shearer, G., y Kohl, D. H. (1988). Natural ¹⁵N abundance as a method of estimating the contribution of biologically fixed nitrogen to N₂-fixing systems: Potential for non-legumes. *Plant and Soil*, 110(2), 317–327.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1994). *Handbook of Rhizobia*. New York, Springer-Verlag.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., y Venturi, V. (2012). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Microbial Ecology*, 63(2), 249–266.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (1998). *Plant physiology*. Sunderland, USA, Sinauer.
- Teledet. Cultivo de soja en Uruguay: zafra 2015-2016. Mapa temático Landsat aplicando método experimental RICN (Reducción de Impacto de Cobertura Nubosa). Retrieved from <http://www.teledet.com.uy/espanol/mapa-satelital-soja-uruguay-zafra-2015-2016.htm>

- Thies, J., Holmes, E., Vachot, A. (2001). Application of molecular techniques to studies in Rhizobium ecology: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 299-319.
- Thies, J. E., Bohlool, B. Ben, y Singleton, P. W. (1992). Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 493–500.
- Thilakarathna, M. S., y Raizada, M. N. (2017). A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 105, 177–196.
- Thompson, J. A. (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. F. J. Bergersen (Ed.), *Production and quality control of legume inoculants* (pp. 489-533). UK: John Wiley and Sons.
- Torres, D., Revale, S., Obando, M., Maroniche, G., Paris, G., Peticari, A., y Cassán, F. (2015). Genome Sequence of Bradyrhizobium japonicum E109, One of the Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina. *Genome Announcements*, 3(1), 1-2.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., y Chalk, P. (2008). Measuring Plant-Associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*, 132–188.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 32(2), 133–150.
- Valles de la Mora, B., Cadisch, G., y Aluja-Schunemann, A. (2003). Comparison of isotope methodologies to assess N₂ fixation and its fate in plants and soil. *Agrociencia*, 37, 117–128.
- van Rensburg, H., y Strijdom, B. W. (1985). Effectiveness of {IRhizobium} Strains Used in Inoculants after their Introduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 127–131.

- Vance, C. P. (2001). Update on the State of Nitrogen and Phosphorus Nutrition Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology*, 127, 390–397.
- Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F. J. de, y Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5, 25-40.
- Vincent, J. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., Bruijn, F. J., y Werner, D. (1988). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic wood legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of gene encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extra. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2096-2104.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., y Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334–342.
- Weaver, R. W., y Wright, S. F. (1987). Variability in Effectiveness of Rhizobia during Culture and in Nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2972–2974.
- Winter, P., Staginnus, C., Huettel, B., Jungmann, R., Pfaff, T., Benko-Iseppon, A. M., y Kahl, G. (2004). *Symbiotic Nitrogen Fixation: Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture*. Oxford y IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Yang, Z. Y., Dean, D., y Seefeldt, L. C. (2011). Molybdenum nitrogenase catalyzes the reduction and coupling of CO to form hydrocarbons. *The Journal of Biological Chemistry*, 286. 19417-19421.
- Zahran, H. H. (2009). *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., y Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 5(7), 539–554.

- Zengeni, R., y Giller, K. E. (2007). Effectiveness of indigenous soyabean rhizobial isolates to fix nitrogen under field conditions of Zimbabwe. *Symbiosis*, 43, 129–135.
- Zhang, J. J., Jing, X. Y., de Lajudie, P., Ma, C., He, P. X., Singh, R. P., y Wang, E. T. (2016). Association of white clover (*Trifolium repens* L.) with rhizobia of *sv. trifolii* belonging to three genomic species in alkaline soils in North and East China. *Plant and Soil*, 407(1-2), 417-427.
- Zimmer, S., Messmer, M., Haase, T., Piepho, H. P., Mindermann, A., Schulz, H., y Heß, J. (2016). Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. *European Journal of Agronomy*, 72, 38–46.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I: Medios de cultivo

Cuadro 1. Medio de cultivo YMA (Vincent, 1970) con agregado de Rojo Congo.

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
Agua	990 ml
Sol. De Rojo Congo (1/400, p/v)	10 ml
Agar	18 g
pH	6,8 - 7

Cuadro 2. Medio de cultivo TY (Tryptone-YeastExtract)

Compuesto	Cantidad
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	0,87 g
Agua	1000 ml

Cuadro 3. Buffer de corrida TBE 5X

Compuesto	Cantidad
Tris base	54 g
Ác. Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M	20 ml
Agua	980 ml
pH	8

Cuadro 4. Medio de cultivo para plantas Farhareüs

Compuesto	Cantidad
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	15 g/l
FeCitrato	0,5 g/l
CaCl ₂	10 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	12 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
pH	7,5
Agar	7 g/l

Se agregan 10 ml de las siguientes soluciones y 1 ml de solución de micronutrientes, que se detalla a continuación:

Compuesto	Cantidad
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,012 g
H ₃ BO ₃	0,140 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,150 g
Agua	100 ml

Cuadro 5. Solución nutritiva Somasegaran para Soja

Compuesto	Cantidad (g/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	294,1
K ₂ HPO ₄	136,1
FeEDTA	4,47
FeCitrato	6,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3
K ₂ SO ₄	87
MnSO ₄ .H ₂ O	0,338
H ₃ BO ₃	0,247
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,288
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,056
NaMoO ₄ .7H ₂ O	0,048

Se agregan 100 ml de cada solución stock presente en la tabla, en 8.8 l de agua destilada y se ajusta el pH a 6.6-6.8. De esta solución se utilizan 500 ml en 9.5 l de agua destilada.

7.2. ANEXO II: Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de *Bradyrhizobium elkanii* y *B. japonicum* usadas en los inoculantes para soja

Lagurara Paula¹, Rodríguez Natalia¹, Beyhaut Elena², Montañez Adriana³, Sicardi Margarita³, Rodríguez-Blanco Andrea¹

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Microbiología. Departamento de Biología Vegetal. Garzón 810, 12900 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: andrearb@fagro.edu.uy

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Microbiología de suelos. Departamento de Bioproducción. Ruta 48 Km. 10, 90.200 Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay. Correo electrónico: ebeyhaut@inia.org.uy

³Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Microbiología de suelos. Centro de Investigaciones Nucleares. Mataojo 2055, 12900 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: sicardi@vera.com.uy

Resumen

Uruguay posee una larga trayectoria de inoculación de soja con cepas de rizobios altamente eficientes en Fijación Biológica de N₂. Evaluaciones previas realizadas a campo demostraron que en suelos con historia de cultivo de soja existe una población constituida por las cepas SEMIA5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, U1301 y U1302 de *B. elkanii*, así como cepas naturalizadas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia simbiótica y la capacidad competitiva de las cepas de *B. elkanii* recomendadas para la formulación de los inoculantes uruguayos y la cepa SEMIA5080. Se realizaron ensayos con sustrato estéril (magentas) y con suelo con y sin historia de soja. Los tratamientos de inoculación incluyeron inoculaciones simples y mezclas de las tres cepas en distintas proporciones. Se determinó la identidad de las cepas ocupantes de nódulos (BOX-PCR) y eficiencia simbiótica. Tanto en suelo como en sustrato estéril la cepa SEMIA5080 presentó mayor capacidad competitiva que las cepas de *B. elkanii*. A su vez, la cepa U1302 superó a la cepa U1301 en el porcentaje de nódulos ocupados. La cepa U1301 resultó ser menos eficiente a nivel simbiótico cuando se la inocula en forma individual; mientras que la cepa SEMIA5080 resultó ser tan eficiente a nivel simbiótico cuando se la inocula en forma individual o en mezcla con las cepas de *B. elkanii*. La cepa SEMIA5080 de *B. japonicum* mostró ser eficiente, persistente y competitiva lo que sugiere que podría formularse un inoculante sólo con esta cepa. Estos resultados deben ser comprobados en diferentes condiciones agronómicas.

Palabras clave: fijación biológica de N₂, *Glycine max*, inoculante, BOX-PCR

Nota: artículo para ser enviado a la revista **Agrociencia Uruguay**

Summary

Symbiotic efficiency and competitive capacity of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* strains used in soybean inoculants

Uruguay has a long history of soybean inoculation with highly efficient strains in Biological Fixation of N₂, recommended in 1984. Previous evaluations carried out in the field showed that in soils with a history of soybean cultivation there is a rhizobial population constituted by strains SEMIA5080 of *Bradyrhizobium japonicum*, U1301 and U1302 of *B. elkanii*, as well as

naturalized strains. The objective of this work was to evaluate the symbiotic efficiency and competitive capacity of the SEMIA5080 strain and the *B. elkanii* strains that make up the formulations of the Uruguayan inoculants. Tests were carried out with sterile substrate (magentas) and in soils with and without soybean history. The inoculation treatments included simple inoculations and mixtures of the three strains in different proportions. The identity of the nodule-occupying strains (BOX-PCR) and symbiotic efficiency were determined. In both soil and in sterile substrate the strain SEMIA5080 presented greater competitive capacity than the strains of *B. elkanii*. In turn, the strain U1302 outperformed the strain U1301 in the percentage of occupied nodules. Strain U1301 was found to be less efficient at symbiotic level when inoculated individually; whereas the strain SEMIA5080 was efficient at the symbiotic level when it was inoculated individually or mixed with the strains of *B. elkanii*. The *B. japonicum* strain, SEMIA5080 showed to be efficient, persistent and competitive, which suggests that an inoculant could be formulated only with this strain. These results must be checked in different agronomic conditions.

Key words: N₂ biological fixation, *Glycine max*, inoculant, BOX-PCR

Introducción

La soja es el principal cultivo de grano de Uruguay, llegando a cubrir un área de 1.140.000 hectáreas en la zafra 2016/2017, con un rendimiento promedio de 1.94 ton/há (DIEA, 2017). Es un cultivo, altamente dependiente de nitrógeno, requiere aproximadamente 80 kg N/ha para producir 1 tonelada de grano. Dependiendo de las condiciones del suelo la demanda de nitrógeno por parte del cultivo puede ser cubierta en su totalidad por la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011), ya que esta leguminosa establece simbiosis con rizobios.

Las características más relevantes que debe presentar una cepa para conformar un inoculante son: en primer lugar una alta eficiencia a nivel simbiótico, es decir que presente una buena tasa de fijación de nitrógeno y debe tener la capacidad de persistir en los suelos (Brunel *et al.*, 2009; Lodeiro, 2015). A su vez, cuando se introduce un inoculante, las cepas de rizobios que lo componen deben competir por los recursos del medio con las cepas nativas/naturalizadas presentes en los suelos (Abaidoo *et al.*, 2000), es por ello que conocer

la eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de las poblaciones presentes en los suelos es de suma importancia. La técnica de rep-PCR es una de las herramientas que se puede aplicar para identificar las cepas de rizobios que ocupan los nódulos. Esto permite estudiar la diversidad de cepas que nodulan una leguminosa así como evaluar la capacidad competitiva de las cepas de los inoculantes comerciales, conocer si persisten en los suelos y también si existen cepas naturalizadas capaces de nodular de forma eficiente el cultivo de soja (Thilakarathna y Raizada, 2017). Por otra parte, como herramienta para cuantificar el nitrógeno atmosférico fijado y determinar la eficiencia simbiótica de las cepas se utiliza el método isotópico de abundancia natural de ^{15}N (AN) (Shearer y Kohl, 1988; Unkovich *et al.*, 2008).

Existen diversas formulaciones de inoculantes para soja en la región, todas ellas están basadas en dos especies del género *Bradyrhizobium*, *B. elkanii* y *B. japonicum*. En nuestro país la soja ha sido inoculada desde la década del 70, desde 1984 el Departamento de Microbiología de Suelos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) recomienda una mezcla de dos cepas de *B. elkanii*, U1301 y U1302 (Punschke, 2010), ambas de origen brasilero. Debe tenerse en cuenta que durante un tiempo y hasta la zafra 2015/2016 en Uruguay se utilizó la mezcla U1301/SEMIA5080 en las formulaciones del inoculante comercial. En Uruguay el cultivo de soja es 100 % inoculado y hace unas décadas su siembra se ha extendido hacia zonas del país cuyos suelos no son tradicionalmente agrícolas, como consecuencia de la alta demanda mundial. Por este motivo es de suma relevancia el mantener actualizada la información respecto a nuevas cepas de rizobios, formulaciones de inoculantes y técnicas de inoculación (Labandera, 2007).

El uso de fertilizantes nitrogenados, además de ser costoso implica riesgos a nivel medioambiental y de salud (Alarcón y Ferrera, 2000). Por lo tanto, la inversión en investigación sobre nuevas y más eficientes formulaciones de inoculantes es de suma importancia. Por estos motivos, este trabajo tiene como objetivo realizar un relevamiento de la eficiencia y capacidad competitiva de las cepas que componen el inoculante comercial nacional y compararlas con cepas utilizadas en la región.

Materiales y métodos

Cepas de rizobios

Se trabajó con cepas de rizobios recomendadas para la formulación de los inoculantes de Uruguay y de los países limítrofes: las cepas U1301 (SEMIA587) y U1302 (SEMIA5019) de *Bradyrhizobium elkanii*, de origen brasilero que conforman el inoculante comercial uruguayo; y dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, U737 (SEMIA5080) y U738 también denominada U742 (E109), usadas en los inoculantes para soja en Brasil y Argentina respectivamente. Repiques de estas cepas, obtenidos de sus países de origen, fueron crecidos por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA, Las Brujas, quien se encarga del mantenimiento de la colección de cepas de rizobios usadas en los inoculantes de Uruguay. Las cepas fueron cultivadas en medio sólido YEM (Yeast Extract Manitol), también llamado EMA con agregado de Rojo Congo (Vincent, 1970), y se pasaron a medio TY (Tryptone-Yeast Extract) líquido, para luego ser conservadas en glicerol (25 % v/v) a -20 °C.

Ensayo en Invernáculo

Características de los suelos

Se colectaron suelos con y sin historia de cultivo de soja del predio de INIA Las Brujas, Departamento de Canelones. Se consideró un suelo con 3 años de cultivo de soja como con historia, y sin historia uno en el cual no se sembró dicho cultivo. Las características fisicoquímicas de los suelos (pH, C. org., Ca, N, P, K) fueron analizadas por el Laboratorio de Suelos INIA, La Estanzuela. Para conocer la carga de rizobios capaces de nodular soja se realizó un ensayo de número más probable (NMP) en planta. Se utilizaron semillas de soja (Nidera A5909G transgénica) desinfectadas un minuto en etanol 95 % (v/v), seguido de hipoclorito de sodio 2 % (p/v) 3 minutos y 6 lavados con agua destilada estéril. Luego fueron germinadas en placas de agar-agua a 28 °C por 48 hs y se sembraron sobre el pliegue de un papel filtro colocado en frascos de vidrio con 400 ml de medio Somasegaran (Somasegaran, 1994), cubiertos con papel de aluminio para evitar la exposición de las raíces a la luz. A las 48 hs. de la siembra, las plantas se inocularon por triplicado con 1 ml de diluciones del suelo. En el caso del suelo con historia se utilizaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} ; y en el suelo sin historia 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Las diluciones se realizaron con NaCl al 0.85 %. Se colocaron tres frascos control. Se mantuvieron en cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas

(temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 16/8 hs luz/oscuridad). A los 20 días de la inoculación se determinó la nodulación y se usaron las tablas de Fisher y Yates (1963) para estimar el NMP.

Condiciones de crecimiento de las plantas y diseño experimental

Se sembraron 4 semillas de soja (Nidera A5909G transgénica) previamente desinfectadas (igual procedimiento que en el ensayo anterior) y pregerminadas en arena estéril a 28 °C, en macetas con 2 Kg de una mezcla de suelo y arena (1:1) con una capa de vermiculita estéril en la superficie para controlar la humedad. A los 4 días de la siembra se raleo a 2 plantas/maceta y se realizó la inoculación. Se evaluaron 2 suelos (con y sin historia de cultivo de soja), 5 tratamientos con inoculación y 2 controles, cada uno con 6 réplicas. Los tratamientos de inoculación fueron con las cepas E109, SEMIA5080, U1301, U1302, y U1301/U1302 (50:50) (mezcla que conforma el inoculante comercial uruguayo). La inoculación se realizó con de 1 mL de cultivo con 1×10^7 ufc/ml por planta, en el caso del tratamiento con la mezcla U1301/U1302 se inoculó con una mezcla de 500 µl de cada una de las cepas. La concentración de células se ajustó midiendo la D.O. a 660 nm y utilizando la curva de crecimiento realizada previamente para cada una de las cepas utilizadas (Howieson y Dilworth, 2016). Los controles fueron con y sin agregado de nitrógeno, en el caso del primero la fuente nitrogenada fue una solución de NH_4NO_3 30 ppm.

Para evaluar la Abundancia natural de ^{15}N , se utilizaron cultivos no fijadores de nitrógeno, siendo estos sorgo dulce (Tupper), maíz (Alazan M103930) y tomate (Repique INIA), en este caso se realizaron dos réplicas por cultivo y se evaluaron también en ambos suelos. Para las semillas de maíz y sorgo se realizaron los mismos pasos que para soja pero con sólo 2 minutos en hipoclorito; las de tomate sólo se enjuagaron con EtOH y se lavaron 6 veces con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron en el invernáculo del Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA Las Brujas, bajo condiciones semi-controladas de temperatura, 28 °C aproximadamente. Las plantas se regaron una vez cada 7 días con 100 ml de solución nutritiva Somasegaran las dos primeras semanas y luego se pasó a dos riegos por semana. Los controles con agregado de nitrógeno se regaron una vez por semana con 100 ml de solución de NH_4NO_3 30 ppm. El resto del tiempo las plantas se mantuvieron hidratadas con agua. Se realizaron dos cosechas, la primera a los diez días luego de la

inoculación y se tomaron dos réplicas por tratamiento. La segunda cosecha se llevó a cabo a los 40 días, cuando las plantas de soja comenzaban la fase de floración, y se cosecharon las 4 réplicas restantes.

Eficiencia simbiótica

Para comparar la eficiencia de los diferentes tratamientos de inoculación, para cada unidad experimental se realizaron medidas de peso seco de biomasa aérea, radicular y nodular; para ello las muestras fueron mantenidas en estufa a 65 °C hasta peso constante. Además, se realizó el conteo del número de nódulos primarios y secundarios. Se consideraron nódulos primarios aquellos ubicados en los 3 primeros cm de la raíz principal por encima de la corona, y secundarios aquellos ubicados en la raíz principal y secundaria por debajo de los 3 cm desde la corona. Por otro lado, para determinar la eficiencia de las cepas en la fijación biológica de nitrógeno se llevó a cabo la técnica de Abundancia Natural de ¹⁵N (AN) (Houngnandan *et al.*, 2008; Unkovich *et al.*, 2008). Se reservó la biomasa aérea seca de todas las unidades experimentales (soja, tomate, maíz y sorgo). Las muestras vegetales fueron molidas finamente (2 mm) (Molino Thomas) y una sub-muestra de aproximadamente 0.5 g se colocó en capsulas de aluminio para ser enviadas a analizar a la Universidad Davis en California, mediante el servicio Stable Isotope Facility (SIF).

Identificación de las cepas ocupantes de los nódulos

De cada unidad experimental se colectaron 10 nódulos primarios y 10 secundarios que fueron mantenidos a -20°C hasta el aislamiento de los rizobios. Para el aislamiento de rizobios los nódulos fueron desinfectados superficialmente (un minuto en etanol 70 % (v/v), seguido de entre 2 y 4 minutos (dependiendo del tamaño del nódulo) en hipoclorito de sodio al 2 % (2 g/l), y 5 lavados con agua destilada estéril). Con una pinza estéril se tomó un nódulo, se colocó entre dos portaobjetos estériles y se presionó. El líquido que salió del nódulo se estrió en una placa con medio EMA. Las placas se incubaron a 28°C por 5 días.

Para la obtención del ADN genómico, se utilizaron colonias aisladas de rizobios crecidos en medio EMA sólido. Con un tip estéril se picó cada colonia de interés y se colocó en 25 µl de solución de lisis (NaOH 0.05 %-SDS 0,25 %). Luego se incubó a 95 °C por 10 min, y se

agregaron 225 µl de agua MiliQ. Finalmente se centrifugaron por 5 min a 4830 g y se reservó el sobrenadante a -20 °C.

La identidad de las cepas ocupantes de los nódulos se determinó mediante comparación de los perfiles de bandas generadas por la técnica de rep-PCR usando el primer BOXA1R (Versalovic *et al.*, 1994). La reacción de PCR se realizó con 1X de DreamTaq buffer-PCR (ThermoScientific, Lituania), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (QIAGEN, Alemania), 0,5 µM de primer BOXA1R (Macrogen, Corea del Sur), 1 U de DreamTaq polimerasa (ThermoScientific), 1 µl de lisado y H₂O bidestilada hasta completar 25 µl. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial por 7 min a 94 °C; seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 3 min a 72 °C; y extensión final por 15 min a 72 °C. Los productos de amplificación generados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) con buffer TBE 0,5 X (Tris-Ácido Bórico-EDTA). La electroforesis se llevó a cabo con voltaje constante de aproximadamente 5 V/cm durante 3 horas y media. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb PLUS (ThermoScientific), y el intercalante GoodView (SBS, China), y se revelaron los geles bajo luz UV. Para el análisis de los perfiles genéticos, a partir de la fotografía tomada del gel, se empleó el software BioNumerics versión 7.6 (AppliedMaths). Se consideraron para el análisis las bandas conservadas en el rango de 300 y 3.000 pb, de buena intensidad y definición. El grado de diversidad genética entre los aislados se realizó mediante el análisis de conglomerados (cluster analysis). La similitud genética fue calculada con el coeficiente de Dice, mientras que la clasificación jerárquica de los aislados fue realizada con el método de agrupamiento UPGMA.

Ensayo en cámara de crecimiento-Magentas

Condiciones de crecimiento de las plantas y diseño experimental

Se realizaron dos ensayos bajo condiciones gnotobióticas (en sistema Magentas). Para ambos ensayos las semillas de soja utilizadas fueron de la misma variedad que para el ensayo de invernáculo y se esterilizaron siguiendo el mismo procedimiento, pero fueron pre-germinadas en placas de agar-agua (7 g/l). Como sustrato se utilizó en ambos casos arena estéril y solución nutritiva Somasegaran, la cual se cambió para cada magenta una vez por semana. Se sembraron dos semillas por magenta, luego a los 5 días fueron raleadas a una planta e inoculadas con 1 ml de cultivo con 1×10^7 ufc/ml. En el primer ensayo la inoculación

se realizó con las cepas E109, SEMIA5080, U1301, U1302, las mezclas U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080 y 2 controles (con y sin agregado de nitrógeno), 6 réplicas por tratamiento. En un segundo ensayo, se evaluó la inoculación con la cepa SEMIA5080 y las mezclas U1301/U1302, U1301/SEMIA5080, U1302/SEMIA5080, y un control sin agregado de nitrógeno, y 5 réplicas por tratamiento.

Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva

En el primer ensayo se realizaron dos cosechas, la primera a los 22 días de la inoculación y la segunda a los 35 días de la misma. Mientras que en el segundo ensayo se realizó una única cosecha a los 35 días de la inoculación. Para ambos ensayos, al igual que en el ensayo en invernáculo, se evaluaron parámetros de crecimiento del cultivo: peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de nódulos (PSN), biomasa total, número de nódulos primarios (nº NP) y secundarios (nº NS).

Para evaluar la capacidad competitiva de las cepas, en cada cosecha se guardaron a -20 °C 10 nódulos de cada una de las repeticiones de los tratamientos inoculados con mezcla de cepas. La identidad de las cepas ocupantes de los nódulos se realizó mediante PCR-BOX, siguiendo los mismos pasos que en el análisis de nódulos del ensayo en Invernáculo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo, 2014). En el caso de las variables que presentaron distribución normal se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y para la comparación de medias se aplicó el test de LSD-Fisher, con un nivel de significancia del 95 %. Para aquellas variables cuya distribución no fue normal se aplicó el Modelo Lineal Generalizado y Mixto y para la comparación de medias el test de LSD-Fisher, con un nivel de significancia del 95 %. Por otra parte, el estudio de la ocupación de los nódulos se llevó a cabo aplicando el Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial y para la comparación de medias el test de LSD-Fisher, con un nivel de significancia del 95 %. Se utilizó como variable el número de nódulos ocupados por las cepas E109, SEMIA5080, U1301 y U1302 y como co-variable el total de nódulos analizados en cada caso.

Resultados

Ensayo en Macetas

El suelo con historia de cultivo de soja presentó al menos 1000 veces más rizobios por gramo de suelo que el suelo sin historia (Cuadro 1). Del análisis fisicoquímico se obtuvo que el pH de ambos suelos es ácido, las cantidades de N y C. Org. son similares, mientras que el suelo SH presenta un alto contenido de Ca y P (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características fisicoquímicas y Número Más Probable (NMP) de rizobios en los suelos con historia de soja (CH) y sin historia de soja (SH) empleados en el ensayo de maceta en invernáculo.

	pH	N	C.Org	Bray I	Ca	K	NMP
Suelo	(H ₂ O)	%	%	µg P/g	meq/100g	meq/100g	rizobios/g suelo
CH	6,2	0,3	2,87	70,2	24,9	0,89	1.5 x 10 ⁴
SH	5,9	0,3	3,84	87,6	4	0,12	3.6

Los parámetros de eficiencia simbiótica en la segunda cosecha, mostraron que en el suelo CH, el control s/inocular y s/N fue el tratamiento que presentó mayor PSPA, PSR y biomasa total, y difirió significativamente del resto de los tratamientos (Cuadro 2). Los datos obtenidos para el PSN mostraron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con la cepa U1301 (menor media) respecto al tratamiento inoculado con la cepa E109 y el control s/N. Los tratamientos inoculados con las cepas U1302 y E109 presentaron mayor n° NP que el resto de los tratamientos. Para el n° NS no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 2). Los resultados del control c/N no difieren significativamente del control s/N, en ninguna de las variables analizadas (dato no mostrado); lo que indica que la cantidad de N agregado no fue suficiente para promover el desarrollo vegetal.

Cuadro 2. Peso seco de parte aérea (PSPA), radicular (PSR), nodular (PSN) y número de nódulos primarios (n° NP), secundarios (n° NS) y biomasa total de plantas de soja crecidas en suelo con historia e inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum*, y control sin inocular, cosechadas a los 45 días.

Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)*	PSN (grs) **	n° NP **	n° NS **	Biomasa tot. (grs)*						
U1301	7,70	a	1,90	a	0,54	c	45	b	286	a	10,1	a
U1302	7,70	a	1,80	a	0,63	bc	69	a	300	a	10,2	a
U1301+U1302	7,80	a	1,60	a	0,64	abc	48	b	274	a	10,3	a
SEMIA5080	7,80	a	2,00	a	0,62	bc	35	b	294	a	10,3	a
E109	8,10	a	2,10	a	0,74	ab	71	a	312	a	11,0	a
Control s/N	12,00	b	2,70	b	0,82	a	39	b	380	a	15,3	b

Los valores representan la media por maceta (c/u con dos plantas). Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (*Modelo Factorial Simple – Test de LSD-Fisher, $p < 0.05$; **Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0.05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

En el suelo SH las plantas presentaron menor crecimiento y un menor contraste entre los tratamientos aplicados en relación al suelo CH (Cuadro 3). Los tratamientos inoculados con las cepas SEMIA5080, U1301, U1302, y la mezcla U1301/U1302 presentaron mayor n° NS, n° NP y PSN y difirieron significativamente del tratamiento inoculado con la cepa E109 y el control s/N. Debido a que la población de rizobios presentes en dicho suelo es casi nula (resultados de NMP, Cuadro 1) el control presentó una nodulación nula o muy baja. En cambio, para el parámetro PSR, los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii* en forma individual o la mezcla U1301/U1302 presentaron mayores valores que los tratamientos inoculados con las cepas de *B. japonicum* SEMIA5080 y E109; sólo el tratamiento inoculado con la mezcla U1301/U1302 difirió significativamente del control. Por otra parte, para los parámetros PSPA y biomasa total no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. La biomasa obtenida del tratamiento control c/N no difieren significativamente del control s/N, y la nodulación fue nula (dato no mostrado).

Cuadro 3. Peso seco de biomasa aérea (PSPA), radicular (PSR), nodular (PSN) y número de nódulos primarios (n° NP), secundarios (n° NS) y biomasa total de plantas de soja en suelo SH inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum*, y control sin inocular, cosechadas a los 45 días.

Tratamiento	PSPA (grs)*		PSR (grs)*		PSN (grs)**		n° NP**		n° NS**		Biomasa tot (grs)*	
U1301	6,80	a	2,30	bc	0,56	a	126	a	203	a	9,70	a
U1302	6,10	a	2,30	bc	0,48	a	85	a	162	a	8,90	a
U1301+U1302	6,90	a	2,50	c	0,58	a	135	a	194	a	10,0	a
SEMIA5080	6,30	a	1,60	a	0,50	a	83	a	195	a	8,40	a
E109	3,60	a	1,50	a	-	-	3	b	6	b	5,10	a
Control s/N	4,70	a	1,80	ab	-	-	0	b	4	b	6,50	a

Los valores representan la media por maceta (c/u con dos plantas). Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (*Modelo Factorial Simple – Test de LSD-Fisher, $p < 0.05$; **Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0.05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

En la Figura 1, puede observarse que el nitrógeno fijado en las plantas crecidas en suelo con historia es mayor que en las crecidas en el suelo sin historia, para todos los tratamientos analizados. En el suelo con historia no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; mientras que en el suelo sin historia se diferencian significativamente el control sin agregado de nitrógeno y el tratamiento inoculado con la cepa E109 respecto al resto de los tratamientos, siendo estos dos los de menor media.

Bajo estas condiciones de crecimiento de las plantas de soja, destaca la eficiencia de la inoculación con las cepas de *B. elkanii* y la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum*, las cuales aportan casi el 100 % del nitrógeno presente en la planta. En cuanto a la inoculación con la cepa E109, fue la menos eficiente en la fijación del nitrógeno atmosférico, aportando menos del 40 % del nitrógeno presente en planta, explicada por la escasa nodulación que presentaron las plantas.

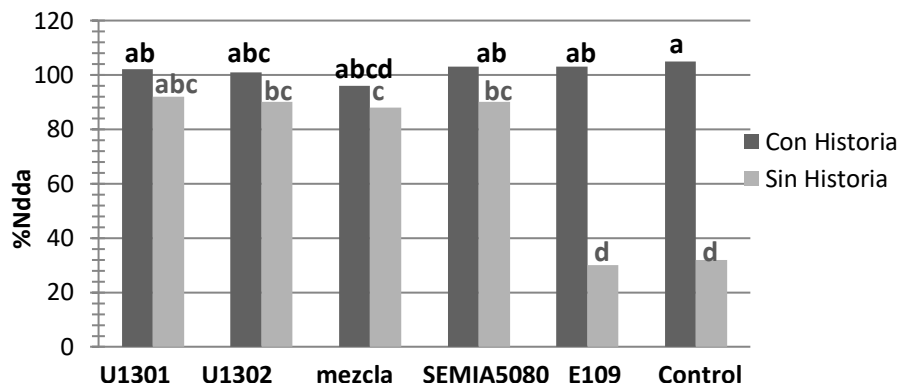


Figura 1. Porcentaje de ^{15}N derivado de la atmósfera (% Ndda) presente en plantas de soja inoculadas con las cepas U1301, U1302, SEMIA5080, E109, mezcla U1301/U1302 y control sin agregado de nitrógeno creciendo en macetas con suelo con historia y sin historia de soja. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Test de LSD-Fisher, $p < 0.05$).

Al evaluar la capacidad competitiva por la ocupación de los nódulos entre las cepas de referencia y la población de rizobios del suelo, se analizó si el porcentaje de ocupación de los nódulos varía con el tratamiento, según la ubicación del nódulo y si hay interacción entre ambos. Se obtuvo que sólo la cepa inoculada afecta de forma significativa a la variable. Al inocular con cepa SEMIA5080, la misma ocupó una gran proporción de los nódulos en ambas cosechas (Cuadro 4).

En cuanto a los resultados obtenidos en la primera cosecha, se observó que las cepas de *B. elkanii* que componen la mezcla del inoculante comercial uruguayo no difieren significativamente entre sí. En cambio, en la segunda cosecha la cepa U1302 ocupó una cantidad de nódulos significativamente mayor que la U1301 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ocupación de nódulos en suelo con historia de cultivo de soja para ambas cosechas del ensayo en invernáculo, para los tratamientos de inoculación con las cepas de U1301, U1302, SEMIA5080, E109 y la mezcla U1301/U1302.

	1° COSECHA	2° COSECHA
Tratamiento	% de nódulos ocupados por la cepa inoculada	% de nódulos ocupados por la cepa inoculada
U1301	34 bc	22 c
U1302	27 bc	52 b
U1301/U1302	41 b	41 b
SEMIA5080	85 a	82 a
E109	13 c	9 c

*1° cosecha a los 22 días, n=3. ** 2° cosecha a los 35 días, n=3. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, Test de LSD-Fisher, $p < 0.05$).

Por otra parte, al analizar la capacidad competitiva de las cepas en ocupar los nódulos al inocular con una mezcla de las cepas 1301 y 1302, se obtuvo que existe efecto de la interacción cepa*suelo en la ocupación de nódulos en ambas cosechas. En suelo SH la cepa U1302 fue recuperada en el 72 % de los nódulos, mientras que la cepa U1301 tan sólo en el 29 % (Figura 2A). En el suelo CH, no se observan diferencias significativas entre ambas cepas (Figura 2B). Dado que los suelos con historia presentan otras cepas además de 1301 y 1302, se evaluó la ocupación de los nódulos por la cepa SEMIA5080 cuando se inocula con la mezcla U1301/U1302. La cepa SEMIA5080 ocupó más del 50 % de los nódulos colectados en ambas cosechas. Por otra parte, al analizar la ocupación de los nódulos del tratamiento control en el suelo CH, se obtuvo que más del 65 % de los mismos fueron ocupados por la cepa SEMIA5080 en ambas cosechas (Figura 2C). Los nódulos ocupados por las cepas de *B. elkanii* fueron menos del 10 % en ambas cosechas (Figura 2).

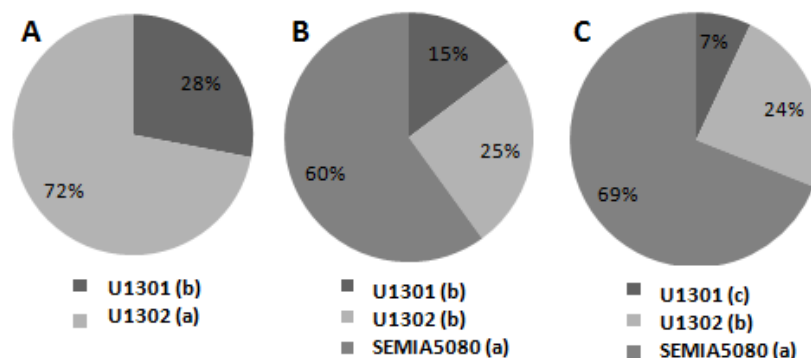


Figura 2. Porcentaje de nódulos ocupados por las cepas U1301, U1302 y SEMIA5080. A: Suelo sin historia inoculado con la mezcla U1301/U1302; B: Suelo con historia inoculado con la mezcla U1301/U1302; C: suelo con historia sin inocular. Las diferentes letras en cada gráfica indican diferencias significativas entre cepas (Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), distribución binomial, LSD-Fisher, $p < 0.05$).

Ensayos en magentas

En el primer ensayo de magentas se observaron diferencias significativas entre los tratamientos sólo en la segunda cosecha (Cuadro 5). En el caso del PSPA los tratamientos inoculados con la cepa SEMIA5080, E109, U1302 y las mezclas U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080 no difieren entre ellos. Sin embargo, presentaron medias significativamente mayores a las del tratamiento inoculado con la cepa U1301 y el control s/N. En cuanto al parámetro PSN, el tratamiento inoculado con la cepa U1301 presentó el menor valor de media y difirió significativamente de todos los tratamientos, menos el inoculado con la cepa E109. Todos los tratamientos inoculados presentaron diferencias significativas respecto al control.

Cuadro 5. Peso seco de parte aérea (PSPA), radicular (PSR), nodular (PSN) y biomasa total de plantas de soja inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum*, y un control s/N y sin inocular, segunda cosecha.

Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)**	PSN (grs)*	Biomasa tot. (grs)*
U1301	1,68	b	0,22	a
U1302	2,69	a	0,36	bc
U1301+U1302	2,67	a	0,34	abc
U1301+SEMIA5080	2,98	a	0,43	c
SEMIA5080	2,91	a	0,36	bc
E109	2,65	a	0,29	ab
Control s/N	1,59	b	0,39	bc

Los valores representan la media en gramos por planta para tres réplicas. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: *datos analizados mediante Modelo Factorial Simple –Fisher, $p < 0.05$; **datos analizados mediante Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Fisher, $p < 0.05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

En el caso del PSR, el tratamiento de inoculación con la cepa U1301 presentó la menor media y difiere significativamente de todos los demás tratamientos inoculados con excepción de la mezcla U1301/U1302 y la cepa E109. Destaca la capacidad de las cepas U1302 y SEMIA5080 solas o en combinación con la cepa U1301, de promover el crecimiento vegetal y generar una mayor biomasa aérea.

Para evaluar la capacidad competitiva se analizó la ocupación de los nódulos en las mezclas de cepas de referencia U1301/U1302 y U1301/SEMIA5080. Para la primera cosecha no se observaron diferencias significativas entre las cepas en la ocupación de los nódulos en ninguna de las dos mezclas evaluadas. En cambio, en la segunda cosecha se observó que para el tratamiento inoculado con la mezcla U1301/SEMIA5080, la cepa SEMIA5080 fue recuperada en el 87 % de los nódulos analizados.

En el segundo ensayo de magentas, se realizó una única cosecha, y se evaluó la mezcla U1302/SEMIA5080 además de las evaluadas en el ensayo anterior (Cuadro 6). En el PSPA, se observan diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y el control s/N. A su vez las plantas inoculadas con las mezclas U1301/U1302 y U1302/SEMIA5080 presentaron menor PSPA que las plantas inoculadas con la cepa SEMIA5080. Para los parámetros PSN,

PSR y biomasa total, los tratamientos inoculados no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con respecto al control s/N. A partir de estos resultados obtenidos de biomasa total se observa que tanto la cepa SEMIA5080 como las tres mezclas evaluadas destacan en su promoción del crecimiento vegetal.

Cuadro 6. Peso seco de parte aérea (PSPA), nodular (PSN), radicular (PSR) y biomasa total de plantas de soja inoculadas con cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum* y control s/N y sin inocular.

Tratamiento	PSPA (grs)*	PSR (grs)**	PSN (grs)*	Biomasa tot. (grs)*
Control s/N	1,06	a	0,5	1,54
SEMIA5080	2,88	c	0,9	4,05
U1301+U1302	1,88	b	1,0	3,22
U1301+SEMIA5080	2,29	bc	1,0	3,62
U1302+SEMIA5080	2,24	b	1,0	3,60

Los valores representan la media en gramos por planta. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: *datos analizados mediante Modelo Factorial Simple, Fisher, $p < 0.05$; **datos analizados mediante Modelo Lineal Generalizado y Mixto, Fisher, $p < 0.05$). s/N: control sin agregado de nitrógeno.

Se evaluó la capacidad competitiva de las cepas, en este caso sólo en las mezclas de cepas de referencia U1301/U1302, U1301/SEMIA5080 y U1302/SEMIA5080. En el caso de la mezcla comercial uruguaya U1301/U1302, la cepa U1302 fue recuperada en el mayor % de los nódulos. En el caso de la mezcla U1301/SEMIA5080, se recupera de la mayoría de los nódulos la cepa SEMIA5080 (66 %). En el caso de la mezcla U1302/SEMIA5080, no se obtuvieron diferencias significativas.

Discusión

Desde 1984 hasta el presente, las cepas U1301 y U1302 de *B. elkanii* se utilizan para las formulaciones del inoculante comercial nacional (M. Mayans, comunicación personal). La información sobre el desempeño de estas cepas en el país no está actualizada. Dado que tanto las características fisiológicas de la cepa, como la presencia de poblaciones de rizobios naturalizadas y las condiciones ambientales afectan la capacidad de una cepa de nodular (Ji

et al., 2017), es necesario realizar relevamientos de las poblaciones de rizobios presentes en los suelos. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, de los nódulos de las plantas de soja crecidas en suelos con historia del cultivo, se recuperó una alta proporción de la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum* tanto en los controles sin inocular como en los tratamientos inoculados con la mezcla comercial uruguayo U1301/U1302. La presencia de la cepa SEMIA5080 en los suelos uruguayos con historia de soja se debe a que ésta fue introducida en los suelos ya que se estuvo comercializando como inoculante uruguayo en conjunto con la cepa U1301 de *B. elkanii*. En el año 2015 el MGAP detectó una discrepancia en el perfil de BOX-PCR de la cepa U1302. Dado que el perfil genético detectado presentó elevada homología con la cepa de referencia SEMIA5080 podría suponerse que existió una contaminación del cultivo del inoculante original (U1301/U1302) con esta cepa. A partir de dicho año se retomó la fabricación del inoculante comercial uruguayo original. Los resultados obtenidos pueden deberse no sólo a la capacidad de la cepa SEMIA5080 de adaptarse a las condiciones edafológicas y climáticas del país, sino también a sus características fisiológicas. En este trabajo se observó que esta cepa presenta una mayor producción de exopolisacáridos evidenciada por la apariencia mucosa de la colonia (dato no mostrado). Esta característica puede explicar en parte la capacidad de esta cepa de sobrevivir en el suelo y colonizar las raíces de soja (Hirsch *et al.*, 2001; Leigh y Coplin, 1992).

Al evaluar la capacidad competitiva entre las cepas, tanto en suelo como en sustrato estéril, se determinó que el orden de las tres cepas en la proporción en que ocupan los nódulos es: SEMIA5080 > U1302 > U1301. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la cepa SEMIA5080 es capaz de persistir en los suelos luego de la inoculación y que posee una mejor capacidad competitiva, en relación a las cepas de *B. elkanii* bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados concuerdan con diversos estudios realizados en Brasil y Canadá que demuestran que esta cepa junto con otras de *B. japonicum* presentan una alta capacidad competitiva por la ocupación de los nódulos y por ello es utilizada en las formulaciones comerciales de estos países (Thilakarathna y Raizada, 2017; Hungría *et al.*, 2008; Kober *et al.*, 2004; Hungría *et al.*, 1998). Se ha observado que la presencia de dos flagelos en cepas de *B. japonicum* influye en gran medida en la competencia por la ocupación de los nódulos (Althabegoiti y López-García, 2008; Althabegoiti *et al.*, 2011), estas estructuras no han sido reportados en las cepas de *B. elkanii*. En cuanto a la capacidad competitiva entre las dos

cepas de *B. elkanii*, la cepa U1302 fue más competitiva que la cepa U1301 en la ocupación de los nódulos tanto en sustrato estéril como en suelo. Por otro lado, en este estudio la cepa E109 de *B. japonicum*, comercializada para soja en Argentina, casi no fue recuperada aun cuando se la inoculó en suelos sin historia, lo que indicaría que esta cepa no se adaptó a las condiciones de los suelos muestreados (alto contenido de fósforo y carbono orgánico) ya que es recomendada como buena a nivel competitivo en los suelos de la pampa Argentina (Salvucci *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2015).

Para evaluar la eficiencia simbiótica se analizaron los valores de biomasa y % Ndda. En el suelo CH, ningún tratamiento con inoculación presentó mejores resultados que el tratamiento control sin inocular y sin agregado de nitrógeno, pudiendo ser esto consecuencia de la persistencia, eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de la población de rizobios presente en dicho suelo, en el cual los nódulos fueron ocupados en mayor proporción por la cepa SEMIA5080. En el suelo CH no se observaron diferencias entre los valores de % Ndda entre los tratamientos inoculados y el control con valores cercanos al 100 % de nitrógeno fijado, en otros estudios han encontrado entre un 50-60 % de %Ndda (Houngnandan *et al.*, 2008; Herridge, y Holland, 1992). Si el cultivo de soja requiere un promedio de 80 kg de nitrógeno por tonelada de grano y se estima que el 50 % es cubierto por la FBN, entonces los valores obtenidos en los suelos CH son realmente elevados y cubren lo que el cultivo necesita de este nutriente. Por otra parte, estos resultados no sólo son prometedores a nivel económico, ya que el costo de la fertilización nitrogenada es elevado, sino que también la FBN evita efectos negativos por exceso de nitratos en los suelos, en la biodiversidad y en la calidad de las aguas superficiales y profundas (Jaynes *et al.*, 2001; Alarcón y Ferrera, 2000). A su vez, estos resultados podrían cuestionar la necesidad de inocular todos los años en suelos que cuentan con sucesivas zafra de soja, pero debido al bajo costo de la inoculación y que no se puede asegurar que estos resultados se repitan siempre bajo todas las condiciones del cultivo (variedad, clima, suelo), lo recomendable es inocular cada zafra. En el suelo SH no se observaron diferencias significativas en cuanto a PSPA y biomasa total entre los tratamientos con inoculación y el control. Sin embargo, los valores de % Ndda, mostraron que en el control y el tratamiento inoculado con la cepa E109 menos del 40 % del nitrógeno deriva de la FBN, mientras que en el resto de los tratamientos más del 80 % deriva de la FBN. Estos resultados son concordantes con la falta de poblaciones de rizobios nativas en

estos suelos y refleja la eficiencia de las cepas con las que se inocula, algo que no ocurre con la cepa E109.

Dado que en el país se inocula con una mezcla de dos cepas, en este estudio se evaluaron las posibles combinaciones de las dos cepas de *B. elkanii* y la cepa SEMIA5080 de *B. japonicum*. De estas tres cepas la U1301 de *B. elkanii* resultó ser menos eficiente a nivel simbiótico y presentó una menor capacidad competitiva, mientras que la cepa U1302 presentó un mejor desempeño. Por otro lado, la cepa SEMIA5080 resultó ser más competitiva que las cepas de *B. elkanii*, y los resultados obtenidos para los ensayos en magentas muestran que es tan eficiente a nivel simbiótico cuando se la inocula en mezcla con las cepas de *B. elkanii* como si se la inocula en forma individual. Estos resultados sugieren que podría formularse un inoculante sólo con esta cepa, y esto presenta diversas ventajas no sólo a nivel de producción del inoculante sino también a nivel económico si se considera que puede existir competencia entre cepas y disminución del rendimiento del cultivo, como se mencionó anteriormente.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Las Brujas, en especial a los integrantes del laboratorio de Microbiología de Suelos por apoyo en la realización de los ensayos en invernáculo. Este trabajo fue financiado por ANII (Fondo María Viñas y beca de Maestría).

Bibliografía

- Abaidoo, R. C., Keyser, H. H., Singleton, P. W., y Borthakur, D. (2000). *Bradyrhizobium spp.* (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 225–234.
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181.
- Alarcón, A., & Ferrera, R. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica En México*, 26(2), 191–203.
- Arber, J. M., Dobson, B. R., Eady, R. R., Stevens, P., Hasnain, S. S., Garner, C. D., y Smith,

- B. E. (1987). Vanadium K-edge X-ray absorption spectrum of the VFe protein of the vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Nature*, 325, 372.
- Babu, K. V., Devi, L. S., Veeraiah, V., y Anand, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium gen. nov.* *Systematic and Applied Microbiology*, 8–15.
- Bailly, X., Olivieri, I., Brunel, B., Cleyet-Marel, J. C., & Béna, G. (2007). Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5223–5236.
- Barbosa, L. de P., Costa, P. F., Ribeiro, P. R. A., Rufini, M., Guimarães, A. A., y Moreira, F. M. de S. (2017). Symbiotic efficiency and genotypic characterization of variants of *Bradyrhizobium spp.* In commercial inoculants for soybeans. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 41, 1–15.
- Barcellos, F. G., Menna, P., Batista, J. S. D. S., y Hungria, M. (2007). Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2635–2643.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., y Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., y Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486.
- Beyhaut, E., Larson, D. L., Allan, D. L., y Graham, P. H. (2014). Legumes in prairie restoration: Evidence for wide cross-nodulation and improved inoculant delivery. *Plant and Soil*, 377(1–2), 245–258.
- Bhuvaneshwari, T. V., Turgeon, B. G., y Bauer, W. D. (1980). Early Events in the Infection of Soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*: I. LOCALIZATION OF INFECTIBLE ROOT CELLS. *Plant Physiology*, 66(709), 1027–1031.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., y Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 874–880.
- Bolaños, L., Martín, M., Rivilla, R., y Bonilla, I. (2006). Nitrogenase inhibition in nodules from

- pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant and Soil*, 280(1–2), 135–142.
- Bournaud, C., de Faria, S. M., dos Santos, J. M. F., Tisseyre, P., Silva, M., Chaintreuil, C., y Moulin, L. (2013). Burkholderia Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). *PLoS ONE*, 8(5).
- Bruijn, F. J. De. (1992). Use of Repetitive (REP and ERIC) sequences and the PCR to fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* July 1992 Pag. 2180-2187, (July), 2180–2187.
- Brunel, B., Boeufgras, J. M., Bernillon, D., y Bardin, R. (2009). Phenotypic Drift in *Bradyrhizobium japonicum* Populations after Introduction into Soils as Established by Numerical Analysis. *Springer*, 74(3), 644–652.
- Capurro, J., Surjack, J., Andriani, J., Dickie, M. J., y Gonzalez, M. C. (2010). Evaluación de distintas especies de cobertura en secuencias soja-soja en el área sur de la provincia de Santa Fe . *Informaciones Agronómicas*, (1), 3–6.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P., y Thomas-Oates, J. E. (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Molecular Biology*, 29(3), 453–464.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., y Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28–35.
- Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., y Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1729–1735.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., y Li, Y. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 153–159.
- Chen, W. X., Yan, G. H., y Li, J. L. (1988). Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing

- Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(4), 392–397.
- Chibeba, A. M., Kyei-Boahen, S., Guimarães, M. de F., Nogueira, M. A., y Hungria, M. (2017). Feasibility of transference of inoculation-related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 261(August 2016), 230–240.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Cle, C., y Barka, E. a. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959.
- Cuadrado, B., Rubio, G., y Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 38(1), 78–104.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y Bono, J. J. (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, 6(1), 24–30.
- Datta, A., Singh, R. K., Kumar, S., y Kumar, S. (2015). An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium “ *Rhizobium* ”: a review. *Annals of Plant Sciences*, 933–942.
- de Almeida Ribeiro, P. R., dos Santos, J. V., Martins da Costa, E., Lebbe, L., Silva Assis, E., Oliveira Louzada, M., y de Souza Moreira, F. M. (2015). Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 212, 85–93.
- de Castro Pires, R., dos Reis Junior, F. B., Zilli, J. E., Fischer, D., Hofmann, A., James, E. K., y Simon, M. F. (2018). Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of Mimosa in central Brazil. *Plant and Soil*, 423(1–2), 411–428.
- Delamuta, J. R. M., Menna, P., Ribeiro, R. A., y Hungria, M. (2017). Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(5), 254–265.
- Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., y Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group la strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART9), 3342–3351.
- Ernst, O., Siri-Prieto, G., y Cadenazzi, M. (2009). Influence of Crop-Pasture Rotation and Tillage System on Yields of Wheat, Soybean, Barley, Sorghum and Sunflower in Uruguay. *Journal of Agricultural Machinery Science*, 53(3), 253–262.
- Frioni, L. (2006). *Microbiología. Básica, ambiental y agrícola* (Universida).
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic , Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes Infection and Invasion of Roots by Symbiotic , Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes, 68(2).
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., y Vo, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153–226.
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., y Young, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiology*, 137(4), 1228–35.
- Göttfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H., y Hennecke, H. (2001). Potential Symbiosis-Specific Genes Uncovered by Sequencing a 410-Kilobase DNA Region of the Bradyrhizobium japonicum Chromosome. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1405–1412.
- Gruber, N., y Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293–6.
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 367–402.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M., y Nürnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: Modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*, 17(8), 495–502.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W.-M., Elliott, G. N., Bontemps, C., y James, E. K. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(11), 1276–88.
- Hartman, G. L., West, E. D., y Herman, T. K. (2011). Crops that feed the World 2. Soybean—

- worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5–17.
- Hirsch, A. M., Lum, M. R., Downie, J. A., Fred, E. W., y Baldwin, I. L. (2001). What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology*, 127(12), 1484–1492.
- Houngnandan, P., Yemadje, R. G. H., Oikeh, S. O., Djidohokpin, C. F., Boeckx, P., y Van Cleemput, O. (2008). Improved estimation of biological nitrogen fixation of soybean cultivars (*Glycine max* L. Merril) using ¹⁵N natural abundance technique. *Biology and Fertility of Soils*, 45(2), 175–183.
- Howieson, J. G., y Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia, 314.
- Hungria, M., Boddey, L. H., Santos, M. A., y Vargas, M. A. T. (1998). Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 27(4), 393–399.
- Hungria, M., Chueire, L. M., Menna, P., y Villamil, E. (2008). *Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR*. Embrapa.
- Hungria, M., Franchini, J. C., Campo, R. J., Crispino, C. C., Moraes, J. Z., Sibaldelli, R. N. R., y Arihara, J. (2006). Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(4), 927–939.
- Hymowitz, T., y Shurtleff, W. R. (2005). Debunking soybean myths and legends in the historical and popular literature. *Crop Science*, 45(2), 473–476.
- Iqbal, A., Khalil, I. a., Ateeq, N., y Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335.
- Izaguirre, P. (2005). URUGUAY Y SUS RECURSOS FITOGENETICOS EN LEGUMINOSAS. *Agrociencia*, IX, 77–83.
- Jaynes, D. B., Colvin, T. S., Karlen, D. L., Cambardella, C. A., y Meek, D. W. (2001). Nitrate Loss in Subsurface Drainage as Affected by Nitrogen Fertilizer Rate. *Journal of Environment Quality*, 30(4), 1305.
- Ji, Z. J., Yan, H., Cui, Q. G., Wang, E. T., Chen, W. F., y Chen, W. X. (2017). Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 114–119.

- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., y Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(8), 619–33.
- Judd, A. K., Schneider, M., Sadowsky, M. J., y De Bruijn, F. J. (1993). Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1702–1708.
- Kober, M. de V., Sá, E. L. S. de, Freire, J. R. J., y Giongo, A. (2004). Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. *Ciência Rural*, 34(5), 1459–1464.
- Krahn, E., Weiss, B. J. R., Kröckel, M., Groppe, J., Henkel, G., Cramer, S. P., y Müller, A. (2002). The Fe-only nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: Identification of the cofactor, an unusual, high-nuclearity iron-sulfur cluster, by Fe K-edge EXAFS and 57Fe Mössbauer spectroscopy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7(1–2), 37–45.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., y Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1244–51.
- Lee, A., y Wong, E. (2009). Optimization and the robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using Trout Lake *E. coli* isolates. *J. Exp. Microbiol. Immunol*, 13(April), 104–113.
- Lindström, K. M. M., Willems, A., y Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Res. Microbiol.*, 161(6), 453–463.
- Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J. a., Watson, C. a., Yanyan, L., Lianhai, W., y Christine, A. W. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes . A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 155–172.
- Lloret, L., y Martínez-romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 43–60.
- Lodeiro, A. R. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 261–273.
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiology*, 125(1), 69–72.

- Loureiro, M. D. F., Kaschuk, G., Alberton, O., y Hungria, M. (2007). Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), 665–674.
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(May), 541–556.
- Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., y Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 1(1).
- Martínez-Romero, E. (2009). Controversies in Science: Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA AND CELL BIOLOGY*, 28(8), 361–370.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., y Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10), 458–466.
- Mendes, I. C., Hungria, M., y Vargas, M. A. T. (2004). Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 28–35.
- Molina-Romero, D., Morales-García, Y. E., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez-Andrade, O., Santiago-Saenz, Y., Muñoz-Rojas, J., & Castañeda- Lucio, M. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 17 (2)(February 2016), 24–34.
- Monza, J., y Márquez, A. (2004). *El metabolismo del nitrógeno en plantas*. (Almuzara, Ed.).
- Mortier, V., Holsters, M., y Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 245–258.
- Moulin, L., Muniue, A., y Dreyfus, B. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411, 948–950.
- Narozna, D., Pudelko, K., Króliczak, J., Golinska, B., Sugawara, M., Madrzak, C. J., y Sadowsky, M. J. (2015). Survival and competitiveness of *Bradyrhizobium japonicum* strains 20 years after introduction into field locations in Poland. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5552–5559.

- Nelson, M. S., y Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6(July), 491.
- Nishi, C. Y. M., Boddey, L. H., Vargas, M. A. T., y Hungria, M. (1996). Morphological, physiological and genetic characterization of two new Bradyrhizobium strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. *Symbiosis*, 20(2), 147–162.
- Obaton, M., Bouniols, A., Piva, G., y Vadez, V. (2002). Are Bradyrhizobium japonicum stable during a long stay in soil? *Plant and Soil*, 245(2), 315–326.
- Oliveira, L. A., y Graham, P. H. (1990). Speed of nodulation and competitive ability among strains of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli. *Archives of Microbiology*, 153, 311–315.
- Pazdernik, D. L., Vance, C. P., Sadowsky, M. J., Graham, P. H., y Orf, J. H. (1997). A host-controlled, serogroup-specific, ineffective nodulation system in the Bradyrhizobium-soybean (*Glycine max*) symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(8), 994–1001.
- Porter, P. M., Lauer, J. G., Lueschen, W. E., Ford, J. H., Hoverstad, T. R., Oplinger, E. S., y Crookston, R. K. (1997). Environment affects the corn and soybean rotation effect. *Agronomy Journal*, 89(3), 441–448.
- Pueppke, S. G., y Broughton, W. J. (1999). *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4), 293–318.
- Punschke, K. (2010). Colección Nacional de cepas de Rhizobium spp. Departamento de Microbiología de Suelos Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., y Blankenship, R. E. (2004). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541–554.
- Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., y Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1829), 971–984.
- Reid, D. E., FergusoReid, D. E., Ferguson, B. J., y Gresshoff, P. M. (2011). Inoculation- and

- Nitrate-Induced CLE Peptides of Soybean Control NARK-Dependent Nodule Formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 606–618.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Margaret Oliver, I., Albareda Contreras, M., y Ruiz-Sainz, J. E. (2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 173–190.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., y Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1–2), 15–21.
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Thompson, F., Lory, S., y Stackebrandt, E. (2013). The prokaryotes: Prokaryotic biology and symbiotic associations. *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*, 1–607.
- Salvucci, R. D., Aulicino, M., Hungria, M., y Balatti, P. A. (2012). Nodulation Capacity of Argentinean Soybean (*Glycine max* L. Merr) Cultivars Inoculated with Commercial Strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *American Journal of Plant Sciences*, 03(1), 130–140.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., y Young, J. M. (2003, June). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology*. Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., y Martínez-Romero, E. (2002). Advances in Rhizobium research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323–378.
- Shearer, G., y Kohl, D. H. (1988). Natural¹⁵N abundance as a method of estimating the contribution of biologically fixed nitrogen to N₂-fixing systems: Potential for non-legumes. *Plant and Soil*, 110(2), 317–327.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., y Venturi, V. (2012). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Microbial Ecology*, 63(2), 249–266.
- teledet.com. (n.d.). Retrieved from <http://www.teledet.com.uy/espanol/mapa-satelital-soja-uruguay-zafra-2015-2016.htm>
- Thies, J. E., Bohlool, B. Ben, y Singleton, P. W. (1992). Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 493–500.

- Thilakarathna, M. S., y Raizada, M. N. (2017). A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 105, 177–196.
- Thompson, J. A. (1980). *Production and quality control of legume inoculants*. (F. J. Bergersen, Ed.). UK: John Wiley and Sons.
- Torres, D., Revale, S., Obando, M., Maroniche, G., Paris, G., Peticari, A., y Cassán, F. (2015). Genome Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, One of the Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina. *Genome Announcements*, 3(1), 1566–14.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., y Chalk, P. (2008). Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *Measuring Plant-Associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems*, 132–188.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 32(2), 133–150.
- Valles de la Mora, B., Cadisch, G., y Aluja-Schunemann, A. (2003). Comparison of isotope methodologies to assess N₂ fixation and its fate in plants and soil. *Agrociencia*, 37, 117–128.
- van Rensburg, H., y Strijdom, B. W. (1985). Effectiveness of {IRhizobium} Strains Used in Inoculants after Their Introduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 127–131.
- Vance, C. P. (2001). Update on the State of Nitrogen and Phosphorus Nutrition Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition . Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiology*, 127, 390–397.
- Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F. J. de, y Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*.
- Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., Bruijn, F. J., y Werner, D. (1988). Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic wood legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of gene encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extra. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 096-2104.

- Wang, D., Yang, S., Tang, F., y Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334–342.
- Weaver, R. W., y Wright, S. F. (1987). Variability in Effectiveness of Rhizobia during Culture and in Nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2972–4.
- Winter, P., Staginnus, C., Huettel, B., Jungmann, R., Pfaff, T., Benko-Iseppon, A. M., y Kahl, G. (2004). *Symbiotic Nitrogen Fixation: Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture. Architecture and maps of the chickpea genome: a basis for understanding plant-Rhizobium interactions.*
- Zahran, H. H. (2009). Microbial Strategies for Crop Improvement, 227–254.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., y Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure a cross-system comparison.pdf, 5(7), 539–554.
- Zengeni, R., y Giller, K. E. (2007). Effectiveness of indigenous soyabean rhizobial isolates to fix nitrogen under field conditions of Zimbabwe. *Symbiosis*, 43(June 2014), 129–135.
- Zimmer, S., Messmer, M., Haase, T., Piepho, H. P., Mindermann, A., Schulz, H., y Heß, J. (2016). Effects of soybean variety and Bradyrhizobium strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. *European Journal of Agronomy*, 72, 38–46.