

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

REPELENTES DE AVES APLICADOS A LA SEMILLA
PARA PLÁNTULAS DE SOJA

Penetración hacia los cotiledones, efectos sobre la
germinación y compatibilidad con inoculantes

por

Lourdes Mercedes OLIVERA AGUIAR

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

Junio 2014

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (MSc) Carlos Rossi, Lic.
(PhD) Sonia Canavelli, y Lic. (Dra) Andrea Rodríguez, el (31) de (Julio) de (2014).
Autora Lic. Lourdes Olivera, Directora Lic. (PhD) Ethel Rodríguez.

Dedicado a mis abuelos...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi Directora de Tesis Ethel Rodríguez por su constante ayuda y ser mi guía en todo este trabajo y en mi formación profesional. A mi Director Académico Carlos Bentancourt, por su apoyo, paciencia y ayuda en todo este proceso. Al comité asesor: Sergio Ceretta por su orientación y ser el impulsor de mi tema de tesis; Elena Beyhaut por toda su ayuda en este nuevo tema para mí, su paciencia y apoyo constante; y a Beatriz Scatoni por su orientación y colaboración con la realización de esta tesis. Al Laboratorio de Microbiología de suelos de INIA Las Brujas por abrirme sus puertas para realizar parte de los experimentos. A Claudia, Mariana, Natalia M. y Natalia S. por su gran paciencia y ayuda en esta rama de la biología que fue nueva para mí, por hacerme amena y divertida mi estadía en el laboratorio y siempre estar ahí para lo que necesitara. Agradezco a los Laboratorios Biológicos de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) por permitirme realizar parte de los experimentos, en especial a Enrique Verdier que siempre está allí para darme su tiempo y ayuda incondicional. A José Fernández, Luis Díaz y Ana Etchever, por facilitarme infraestructura, así como materiales para los experimentos y apoyarme en este proceso. Al Laboratorio de Residuos de Plaguicidas también en la DGSSAA por la realización de los análisis y en especial a Susana Franchi por dedicarme su tiempo y paciencia en ayudarme a interpretar los resultados. Quiero agradecer al Ing. Agr. Pablo González por su ayuda en el análisis de los datos y asesoramiento estadístico. Agradezco a la ANII por beneficiarme con una beca de posgrado que ayudó a la realización de esta tesis.

Quiero agradecer toda a mi familia, en especial a mis padres, que siempre me apoyan incondicionalmente y me ayudan a seguir adelante en todo aquello que me proponga. A mis amigas del alma que siempre están apoyándome y ayudándome en todo. Y a Mauri, mi compañero de vida que siempre está para impulsarme, contenerme y ayudarme en mi realización como profesional y como persona.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. LAS AVES PLAGA Y SU IMPACTO EN LA AGRICULTURA	1
1.2. EL CASO DEL CULTIVO DE SOJA	3
1.2.1. <u>Daño por aves</u>	3
1.2.2. <u>Utilización de inoculantes rizobianos</u>	4
1.3. ESTRATEGIAS DE MANEJO PARA DISMINUIR LOS DAÑOS PROVOCADOS POR AVES	7
1.4. LOS REPELENTES QUÍMICOS	8
1.4.1 <u>Repelentes químicos aplicados a semillas</u>	12
1.5. OBJETIVOS	14
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
2.1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y PERMANENCIA DE LOS REPELENTES EN LOS COTILEDONES	17
2.2. EFECTO DE LOS REPELENTES QUÍMICOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA	19
2.3. EFECTO DE LOS REPELENTES QUÍMICOS SOBRE EL INOCULANTE	20
2.3.1. <u>Inhibición sobre discos de papel</u>	20
2.3.1.1. Curva de crecimiento cepas U-1301 y U-1302 y cálculo de carga bacteriana	20
2.3.1.2. Prueba de toxicidad en placa por difusión a partir de discos de papel	22
2.3.2. <u>Recuento de rizobios viables sobre la cubierta de semillas tratadas</u>	23
2.3.2.1. Análisis estadísticos	24

2.3.3. <u>Efectos sobre la nodulación y fijación biológica de</u>	
<u>nitrógeno</u>	25
2.3.3.1. Variables a medir	27
2.3.3.2. Análisis estadísticos	28
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	29
3.1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y PERMANENCIA DE LOS	
REPELENTES EN LOS COTILEDONES	29
3.2. EFECTO DE LOS REPELENTES QUÍMICOS SOBRE LA	
GERMINACIÓN DE LA SEMILLA	31
3.3. EFECTO DE LOS REPELENTES SOBRE EL INOCULANTE	33
3.3.1. <u>Inhibición sobre discos de papel</u>	33
3.3.1.1. Curva de crecimiento cepas U-1301 y U-1302 y	
cálculo de carga bacteriana	33
3.3.1.2. Prueba de toxicidad sobre discos de papel	34
3.3.2. <u>Recuento de rizobios viables sobre la cubierta de semillas</u>	
<u>tratadas</u>	36
3.3.3. <u>Efectos sobre la nodulación y fijación biológica de</u>	
<u>nitrógeno</u>	39
3.3.3.1. Cámara de crecimiento	39
3.3.3.2. Invernáculo	44
3.4 CONSIDERACIONES FINALES	53
4. <u>CONCLUSIONES</u>	59
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	60
6. <u>ANEXOS</u>	69
6.1. MEDIO AGAR M-79. EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL ..	69
6.2. MEDIO LÍQUIDO TY	69
6.3. ARTÍCULO CIENTÍFICO. Repelentes de aves aplicados a la semilla	
para plántulas de soja: compatibilidad con el inoculante y residualidad en	
cotiledones	70

RESUMEN

Existen especies de palomas que causan pérdidas económicas en soja, por consumo total o parcial de cotiledones en emergencia del cultivo. Los repelentes químicos son una alternativa no letal para disminuir daños. Debido al corto período de vulnerabilidad de la planta y heterogeneidad en la emergencia, sería más eficiente su aplicación en semilla que en plántula. La semilla de soja, cuenta con el agregado de bacterias (rizobios) que, mediante fijación biológica de nitrógeno, proporcionan el nutriente más requerido por el cultivo. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar el alcance y permanencia de los repelentes en cotiledones y evaluar sus efectos sobre la germinación, sobrevivencia, y capacidad de nodular de los rizobios. Los repelentes evaluados fueron Draza® (methiocarb50%), Avipel® (antraquinona50%) y Rayén® (metil antranilato30%). Además, se compararon sus efectos con los de dos productos usados corrientemente como curasemilla (imidacloprid y Carbendazim+Thiram+Metalaxil). Para determinar la permanencia de los químicos, se midieron residuos en cotiledones provenientes de semillas tratadas con antraquinona o metil antranilato, utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC). En todos los casos, se trataron semillas con el correspondiente producto o repelente y el inoculante (líquido o turba) en forma secuencial. Para medir el efecto de los químicos sobre la emergencia, se evaluó el porcentaje de plántulas normales. Para estudiar el efecto sobre los rizobios, se realizaron pruebas de toxicidad en discos de papel, se midió la cantidad de rizobios viables en semillas, los parámetros de nodulación y peso seco de la parte aérea a los 2 y 7 días luego de tratadas. Se observó residualidad del repelente en cotiledones solo para antraquinona. La emergencia no se vió afectada en ningún caso. Con metil antranilato y C+T+M se obtuvo inhibición total de rizobios sobre discos de papel. La sobrevivencia de rizobios disminuyó con todos los productos, excepto metil antranilato. La capacidad de nodular de rizobios y el peso de la parte aérea no se vió disminuida con el metil antranilato. Para lograr un uso eficiente de estos repelentes, sería necesario aumentar la cantidad de metil antranilato que llega a los cotiledones y disminuir la toxicidad sobre rizobios de antraquinona y metiocarb.

Palabras claves: daño, plántula, *Glycine max*, rizobios

Bird Repellent Applied In Soybean Seed. Penetration to cotyledons, effects on germination and inoculants

There are species of pigeons cause economic losses in soybeans, for full or partial consumption cotyledons crop emergence. Chemical repellents are nonlethal alternative for reducing damage. Due to the short period of vulnerability of the plant and the heterogeneity in the emergency, application would be more efficient in seedling seed. The soybean has the added bacteria (rhizobia) that, through biological nitrogen fixation, provided the nutrient most needed by the crop. The aims of this work were to study the scope and permanence of repellents in cotyledons and their effects on germination, survival and ability to nodular of rhizobia. The evaluated repellents were Draza® (methiocarb50%), Avipel® (antraquinona50%) and Rayén® (methyl antranilato30%). Moreover, their effects were compared with two commonly used as curasemilla products (imidacloprid and Carbendazim + Thiram + Metalaxyl). To determine the persistence of chemical residues, were measured in cotyledons from seeds treated with anthraquinone or methyl anthranilate, using a high performance liquid chromatograph (HPLC). In all cases, seeds were treated with the corresponding product or repellent and the inoculum (liquid or peat) sequentially. To measure the effect of chemicals on the emergency, the percentage of normal seedlings was evaluated. To study the effect on rhizobia, toxicity tests were made on discs of paper, the number of viable rhizobia in seeds was measured, nodulation parameters and dry weight of the aerial part at 2 and 7 days after treated. Residual repellent cotyledons was observed only for anthraquinone. The emergence was not affected in any case. With methyl anthranilate and C + T + M total inhibition of rhizobia paper discs was obtained. The survival of rhizobia decreased with all products tested, except methyl anthranilate. The rhizobia's nodular capacity and aerial parts of the plant is not diminished by the methyl anthranilate. For efficient use of repellents, would require increasing the amount of methyl anthranilate reaching cotyledons and decrease toxicity and methiocarb anthraquinone rhizobia.

Keywords: damage, seedling, *Glycine max*, rhizobia

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS AVES PLAGA Y SU IMPACTO EN LA AGRICULTURA

En Uruguay se desarrollan distintas actividades agropecuarias, cultivos extensivos de cereales y oleaginosas, cultivos intensivos hortícolas y frutícolas, ganadería y forestación, a lo cual se agrega la presencia de parches de montes naturales (DIEA -Dirección de Estadísticas Agropecuarias- 2011). Esto ocasiona en nuestro territorio un paisaje constituido por parcelas de diversos cultivos y pequeñas áreas con vegetación espontánea o montes naturales (parches de vegetación), lo que constituye un paisaje denominado “en mosaico” (Bucher 1998). El mismo facilita la disponibilidad de alimentos con distribución variable en el espacio y en el tiempo, sobre todo de granos y raciones para animales, que son aprovechados por varias especies de aves silvestres. Además, los parches de monte suministran hábitat adecuados para refugio y nidificación de estas especies (Rodríguez *et al.* 2011).

Tanto nuestro país como la región, han sufrido cambios en los sistemas de producción agrícola así como un aumento del área forestada (DIEA 2011). Los sistemas productivos se han vuelto más intensivos, con un aumento del área agrícola para la producción de granos (forrajero y de exportación) que varió de 653.000 ha en la temporada 2003-04 a 1.441.000 ha en la pasada temporada (DIEA 2011). En este sentido, a partir del año 2000, nuestro país no fue ajeno al impacto sojero de la región, que trajo aparejado el impulso de la intensificación agrícola. Esto promovió la instalación de grandes emprendimientos agrícolas que deslambrazaron establecimientos instalando sistemas agrícolas continuos y relegando la ganadería a las zonas no cultivables (Díaz 2006). Los cambios en los sistemas de producción han aumentado la cantidad de alimento disponible para las aves, tanto sea por los cultivos como por los granos que se dejan en el suelo luego de la cosecha.

Otro de los emprendimientos que contribuyó en este sentido fue el uso creciente de ganado en confinamiento, el cual proporciona cantidades significativas de alimento durante todo el año por la disponibilidad constante de ración que se usa

para el engorde de ganado (Ferrés 1994). Este método de producción fue implementado en nuestro país en la década del 50', pero fue a partir la década del 90' que adquirió una mayor escala, localizándose fundamentalmente en el litoral oeste (departamentos de Paysandú, Rio Negro, Soriano), así como San José, Canelones, Lavalleja y Treinta y Tres (Ferrés 1994). En el año 2001, los precios de los cultivos de oleaginosas y cereales aumentaron, lo cual fue un factor muy importante para provocar la expansión de la agricultura extensiva en el país y así al aumento del área sembrada. El crecimiento de estos rubros, así como el de la forestación, creó un incremento en la demanda por compra de tierras, provocando en los últimos años un efecto de incremento en los precios de éstas. Estos factores han afectado mayormente a los productores de carne, parte de los cuales han vendido o utilizados sus tierras para otras actividades. Esto ha obligado a los productores a buscar otras alternativas y hacer uso de la tecnología para contrarrestar los efectos de los altos costos de la compra y renta de la tierra. Paralelamente, la demanda de los mercados por una carne de alta calidad y que tenga buena trazabilidad, ha hecho que la carne proveniente de engorde a corral sea más demandada y exportada a nivel nacional (Arias y Rucks 2012).

Los cambios en el uso del suelo y la disponibilidad de recursos antes descritos (para las aves silvestres) han provocado un aumento en los daños producidos por especies nativas que están biológicamente pre-adaptadas a utilizar los cultivos como fuentes de alimento (Contreras *et al.* 2003). Tal es el caso de las especies de aves granívoras, y el aumento de los daños que las aves provocan a los cultivos de cereales y oleaginosas (Rodríguez *et al.* 2011). Las aves causan importantes pérdidas económicas a la agricultura tanto en Uruguay como en diversas partes del mundo (Contreras *et al.* 2003; Centeno 1999; Rodríguez 1994; Tracey y Saunders 2010). Por sus hábitos alimenticios, atacan fundamentalmente a cultivos de cereales y oleaginosos (De Grazio 1985; Rodríguez 1998). El daño que producen ocurre durante la emergencia y la maduración de los cultivos de grano. Este daño fue estimado por la FAO, para nuestro país, en 6 millones de dólares anuales en el año 1980 (Rodríguez 1998). Probablemente, las cifras hoy en día deben ser aún mayores,

tanto por la expansión del área agrícola que está experimentando el país (y el precio actual), así como por las prácticas agrícolas anteriormente mencionadas que favorecen esta situación.

1.2. EL CASO DEL CULTIVO DE SOJA

1.2.1. Daño por aves

La soja es una leguminosa que cumple actualmente un papel primordial en la producción nacional, debido a los múltiples usos que tiene: exportación de granos, proteínas vegetales para la elaboración de ración animal, aceites y producción de biodiesel. Asimismo, ha experimentado una expansión explosiva en la última década, siendo ahora un cultivo fundamental a nivel nacional que ha alcanzado en el 2011 las 862 mil hectáreas sembradas y ha significado casi la mitad de los ingresos totales del área agrícola en el 2010 (Blum 2007; DIEA 2011).

Los daños por aves en el cultivo de soja en el momento de la emergencia de la plántula están registrados en nuestro país desde comienzos de la década del 70 (Calvi *et al.* 1976). Los mismos son producidos por tres especies de aves: la paloma torcaza (*Zenaida auriculata*), la paloma de ala manchada (*Patagioenas maculosa*) y la paloma grande de monte (*Patagioenas picazuro*) (Calvi *et al.* 1976; Canavelli 2010; Rodríguez *et al.* 2011). Estas especies consumen los cotiledones de la plántula en el momento de la emergencia debido a su alto contenido proteico. Pueden dañar parcialmente la planta, comiendo parte de los mismos, en cuyo caso la plántula podría sobrevivir con los nutrientes restantes. O pueden realizar un daño total si consumen ambos cotiledones y/o cortan totalmente la parte apical. En este último caso, causarían la muerte de la planta (Rodríguez *et al.* 2011).

Desde el 2007, los daños de palomas a la soja en el momento de la emergencia percibidos por asesores y productores se han ido incrementando tanto en Uruguay como en la región (Rodríguez E., com. pers.). Aunque no se cuenta al momento con estimaciones precisas de daños para nuestro territorio, la Mesa Tecnológica de Oleaginosos estimó que las pérdidas para el año 2011 fueron de algo más de un millón de dólares sobre un área de referencia de 100.000 ha de soja

sembrada en octubre y principios de noviembre. Estas hectáreas se debieron re-sembrar, lo que acarreó costos adicionales en semillas, maquinaria, mano de obra y tiempo. Cabe mencionar que, al tener que re-sembrar un área dañada en cultivos extensivos, se altera el cronograma de siembra, obteniéndose cultivos con diferente estadio fenológico e incluso sembrado fuera del momento óptimo. Por lo tanto, esta re-siembra produce problemas en la implantación y correcto desarrollo del cultivo, así como costos adicionales a la siembra, que redundarían en pérdidas económicas adicionales a las provocadas por las aves (Ceretta S., com.pers.).

El mayor incremento de los daños producidos se ha dado, fundamentalmente, por palomas torcazas. Este es debido a su alta densidad poblacional, la cual se ha visto favorecida en los últimos años por la expansión agrícola que experimenta nuestro país (Calvo 2006) y por las prácticas de manejo de los cultivos anteriormente mencionadas. Asimismo, las palomas (especialmente las torcazas) tienen una estrategia reproductiva que consiste en una alta producción de pichones a lo largo de todo el año y están adaptadas a explotar este tipo de recursos alimenticios (Bucher 1986; Bucher y Orueta 1977).

1.2.2. Utilización de inoculantes rizobianos

En la actualidad, previo a la siembra, las semillas pueden ser tratadas con fungicidas y/o insecticidas, y posteriormente ser inoculadas con rizobios. Estos últimos son bacterias promotoras del crecimiento vegetal, que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno del aire y convertirlo en una forma que las leguminosas puedan aprovecharlo para su desarrollo. Este proceso tiene lugar en los nódulos que se forman en la raíz de la planta, por medio de una interacción simbiótica con la bacteria (Bernal *et al.* 2002). En nuestros suelos no existen rizobios nativos capaces de nodular la soja y en consecuencia no pueden utilizar el nitrógeno de la atmósfera. La adaptabilidad de este cultivo a diversas condiciones de suelo y clima se debe, en parte, al aporte de nitrógeno proveniente de la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2). Por interacción metabólica, los rizobios reducen el N_2 a amonio (NH_4) el cual es

asimilado en proteínas y otros compuestos nitrogenados en los tejidos de la planta. La fotosíntesis provee de carbohidratos a las raíces y nódulos donde los rizobios los utilizan como fuente de energía para proveer ATP a la nitrogenasa, enzima responsable del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN, Mayz-Figueroa 2004). Los rizobios para soja se clasifican en: de crecimiento lento, *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense*, y de crecimiento rápido, *Sinorhizobium fredii* y *S. xinjiangense*. En Uruguay, las cepas de *Bradyrhizobium elkanii* nominadas U-1302 (SEMIA 5019) y U-1301 (SEMIA 587) son las recomendadas en los inoculantes comerciales para soja (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2009).

El objetivo central de la inoculación de leguminosas es proveer el máximo número de rizobios adecuados en la rizósfera en el momento en que se inicia la nodulación. En general, cuando el número de rizobios viables inoculados por semilla aumenta, la nodulación, la fijación de nitrógeno y el rendimiento, aumentan (Lupwayi *et al.* 2000; Catroux *et al.* 2001).

Los inoculantes en Uruguay están formulados en dos soportes diferentes: los inoculantes líquidos, fabricados a base de caldo de cultivo, que poseen una consistencia acuosa y son los más comunes para nuestro país; y los inoculantes formulados en soporte turba, los que son señalados como los más eficientes (Labandera 2003). Todos ellos deben estar libres de contaminantes y con una carga bacteriana mínima exigida por la normativa vigente. Estas bacterias son muy sensibles y su muerte subsiguientemente a la inoculación puede ocurrir rápidamente. La mortalidad puede deberse a la desecación (Salema *et al.* 1982), al contacto con fertilizantes ácidos (Kremer y Peterson 1983), a la toxicidad de la cubierta de la semilla (Materon y Weaver, 1984), la incompatibilidad con plaguicidas aplicados como curasemillas (Skipper *et al.* 1980) y a ambientes edáficos desfavorables como pueden ser altas temperaturas o soportes muy secos (Kremer y Peterson 1983). La ventaja de los inoculantes turba radica en una mayor protección a los rizobios frente a factores adversos del suelo, lo que resulta en una mayor sobrevivencia de los

mismos. Por el contrario, en los inoculantes en soporte líquido, la sobrevivencia sería menor (Labandera 2003).

El bajo número de rizobios viables sobre la semilla es frecuentemente un obstáculo a la expresión de la respuesta agronómica del uso de inoculantes (Brockwell y Bottomley 1995). El uso de fungicidas y otros compuestos aplicados a las semillas (en nuestro caso repelentes) está ampliamente aceptado para mejorar la emergencia y proteger a los cultivos de especies dañinas pre y post emergencia (Mubeen *et al.* 2006). Cuando estos productos son usados conjuntamente con inoculantes microbianos, pueden causarles efectos negativos de intensidad variable, dependiendo de la molécula en cuestión (Ayasina y Oso 2006). Sin embargo, en la información científica publicada, los resultados son a menudo contradictorios sobre los efectos producidos, incluso referidos a los mismos ingredientes activos. Varios factores pueden explicar la mencionada contradicción. Por un lado, las diferencias en la metodología de evaluación, la cual incluye las dosis utilizadas, el tiempo de contacto compuesto-rizobio, el pH del medio, y el ambiente en el que se realizan las evaluaciones (humedad y temperatura). Por otro lado, las contradicciones podrían deberse a la falta de información precisa sobre otros componentes incluidos en la formulación comercial de los fungicidas y otros compuestos aplicados a las semillas, que en ocasiones son más tóxicos que el propio principio activo. Campo y Hungria (2000) afirman que la mayoría de los fungicidas usados como curasemillas reducen la nodulación y la fijación de nitrógeno, recomendando ajustar todos los demás aspectos a los efectos de minimizar el uso de los mismos. Por lo anterior, resulta evidente la necesidad de disponer de metodologías estandarizadas para evaluar efectos deletéreos que puedan tener los productos aplicados a las semillas de leguminosas sobre los rizobios presentes en el inoculante.

1.3. ESTRATEGIAS DE MANEJO PARA DISMINUIR LOS DAÑOS PRODUCIDOS POR AVES

En el pasado, los métodos de manejo para prevenir el daño de las aves se centraban en la destrucción de las especies problema (Rodríguez 1994). Resolver el conflicto de los daños mediante este método ha sido costoso y con éxito poco frecuente (Murton *et al.* 1974, Bucher 1986, Feare 1989; Bruggers y Zaccagnini 1994). En algunas ocasiones, según la biología de la especie blanco, la mortalidad natural y artificial no se suman, sino que se compensan y no se logra una disminución de la población (Bucher 1986). Por lo tanto, para el caso de palomas, es posible eliminar grandes números de individuos, sin que esto signifique una reducción en la cantidad de palomas que estará presente el año siguiente y menos aún, en el daño que estas producen. La mortandad realizada de forma artificial elimina un excedente que igualmente iba a perderse (Bucher 1998). Asimismo, el control letal mediante productos químicos origina riesgos al resto de la fauna y el ambiente debido a que, generalmente, no se controla solamente a la especie blanco sino que el control acarrea la muerte de otras especies de aves, así como de predadores que se alimentan de los individuos envenenados. Asimismo, el control letal mediante métodos químicos produce un impacto a nivel ambiental debido a su alta persistencia en el ambiente (Bruggers 1998)¹.

Debido a las limitaciones y problemas asociados al control letal, la estrategia de manejo se ha reorientado en los últimos tiempos, desde la reducción de la población de aves, hacia la prevención y protección de los cultivos. Actualmente, se están estudiando y desarrollando en el plano internacional, regional y nacional técnicas para disminuir el daño de aves basadas en este enfoque. Las técnicas pueden ser de prevención (por ejemplo agronómicas) o de protección (repelencia). Estas últimas buscan agregar elementos externos que sirvan para evitar que las aves utilicen el cultivo para alimentarse. Los repelentes pueden ser acústicos, visuales o

¹ En Uruguay el control letal utilizando cebos tóxicos está prohibido por ley (Decreto 164 del 21 de mayo de 1996).

químicos (Bishop *et al.* 2003). Los químicos son sustancias que se colocan (pulverizado o aplicado a la semilla) sobre los cultivos causando aversión debido a su sabor, olor, color o efecto fisiológico y hace que los mismos sean poco atractivos para las aves (Mason y Clark 1997).

1.4. LOS REPELENTES QUÍMICOS

En función de su mecanismo de acción, los repelentes químicos se clasifican en repelentes primarios y secundarios. Los primarios consisten en un compuesto irritante o de sabor desagradable que produce una respuesta de evasión en las aves en su primera exposición al repelente (Clark 1998). En este caso, el animal reacciona específicamente a las cualidades sensoriales del químico, no hay efectos fisiológicos adversos. Los sentidos del olfato, gusto, tacto y la vista intervienen en hacer de un alimento, un producto poco apetecible. Asimismo, las aves pueden rechazar un alimento debido al cambio en su apariencia (repelentes de color), el cual está probablemente relacionado con la evasión inducida por un cambio en el aspecto del alimento (Rodríguez 1998). Los repelentes secundarios están basados en la premisa de que cualidades sensoriales (visual, gustativa, olfativa o táctil) del repelente químico representan para el animal un aviso de efectos fisiológicos adversos, por lo que subsecuentemente aprende a evitar el alimento tratado (es decir, se genera una aversión condicionada). Para que éstos repelentes sean efectivos, las aves deben consumir una cantidad suficiente para causar efectos tóxicos, lo que significa que parte del alimento tratado deberá ser sacrificado en el proceso de entrenamiento para crear la aversión condicionada. Puede lograrse un efecto de repelencia en aves que no alcancen a consumir el alimento tratado, a partir del mecanismo de facilitación social, el cual consiste en que aves no afectadas respondan a las motivaciones de las aves afectadas en el área tratada (por ejemplo, aves inmovilizadas, aves con vocalizaciones de alarma, etc.). La respuesta de aversión condicionada tiende a ser específica a los alimentos tratados y al lugar donde se encuentran. Si el alimento

tratado es sustituido por uno no tratado, las aves podrían detectar la ausencia del químico y volver a comerlo (Rodríguez 1998).

Los repelentes primarios y secundarios han sido muy estudiados en Estados Unidos en los últimos 30 años. La mayoría de los trabajos con repelentes primarios han estado enfocados en el metil antranilato, un aditivo utilizado en alimentos humanos que mostró muy buenos resultados en la mayoría de las especies estudiadas (Mason *et al.* 1989; Curnmings *et al.* 1992). Entre los repelentes secundarios, se destacan el metiocarb y la antraquinona por los numerosos estudios realizados sobre su eficiencia. La antraquinona se identificó como repelente de aves a principios de 1940 (Werner *et al.* 2011) y los trabajos llevados a cabo han demostrado reducir el consumo en *Agelaius phoeniceus* de arroz, mijo, sorgo y maíz cuando se aplica esta sustancia (Wright 1962; Avery *et al.* 1997; Dolbeer *et al.* 1998; Avery *et al.* 2001; Cummings *et al.* 2002). En nuestra región, también se han realizado investigaciones con antraquinona y metil antranilato. En Argentina, se está probando el uso de ambos en girasol en maduración con promisorios resultados (Addy Orduna *et al.* 2010; Addy Orduna y Canavelli 2010).

En Uruguay, existen actualmente tres repelentes registrados para proteger los cultivos del daño de aves: Avipel® (antraquinona 50 %) registrado para arroz, Rayén® (metil antranilato 30 %) para girasol y sorgo; y Draza® (metiocarb 50%) registrado para soja, sorgo, y vid, entre otros cultivos. Este último producto posee varios usos, entre los que se incluye su aplicación a la semilla para proteger las plántulas de soja en el momento de la emergencia. Desde el año 2009, se está probando la antraquinona como repelente para proteger la soja durante la emergencia del cultivo. Estos trabajos se han realizado en el marco de proyectos FPTA (Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria)-INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria)-DGSSAA (Dirección General de Servicios Agrícolas)-COPAGRAN (Cooperativa Agraria Nacional) y acuerdos con empresas registrantes. Dicha molécula está registrada en Uruguay desde 1998. La información disponible sugiere que este es un repelente primario y secundario debido a que posee un efecto tanto visual como post ingesta. Hasta el momento, se ha investigado la eficiencia de

este repelente mediante aplicación foliar para cultivos de girasol, sorgo y trigo (Rodríguez *et al.* 2011; Olivera y Rodríguez en prensa). Con el advenimiento del problema de las palomas en soja, se realizaron experimentos para probar la eficiencia de la antraquinona formulada (Avipel®) para proteger el cultivo de soja en estadio VE (Fehr *et al.* 1971, Figura 1), mediante aplicación foliar a las plántulas. Con estos estudios se obtuvieron buenos resultados a nivel de eficacia, pero se registraron dificultades sobre el momento de la aplicación, debido a que ésta debe llevarse a cabo cuando la plántula tiene solamente los cotiledones emergidos. Este período es muy corto (2 a 3 días) y, durante ese período, la emergencia es heterogénea (las semillas no germinan todas simultáneamente, sino que es un procesos gradual). Esto dificulta mucho la decisión del momento correcto para la aplicación, debido a que, si se aplica cuando las plántulas comienzan a emerger, existirá un alto porcentaje de plántulas que no contará con la protección del repelente. Sin embargo, si se aplica ya avanzada la emergencia, es decir con gran número de plántulas germinadas, es probable que el daño que presente el cultivo resulte muy alto. Asimismo, se ha observado que la soja sembrada en octubre (soja de primera) es la más susceptible al daño de aves. Esta se realiza con condiciones de temperatura que enlentecen el nacimiento de las plántulas, haciendo el período de emergencia del cultivo sea más extendido en el tiempo y por lo tanto más propenso al daño. Estas condiciones dificultan aún más la decisión de cuando realizar la aplicación del repelente, de manera que proteja un alto porcentaje de plántula, sin comprometer las ya emergidas. Además, bajo estas circunstancias, se desaprovecha mucho producto, debido a que una proporción importante cae al suelo. Por lo tanto, la estrategia de aplicación foliar sería una limitante para la adopción de este repelente a escala comercial y debería adoptarse otra técnica de aplicación, como tratar la semilla con el repelente previo a la siembra.



Figura 1. Estadío VE de soja según la clasificación de Fehr *et al.* (1971). Se destacan los cotiledones aún cerrados y el primordio de la hoja verdadera

El metil antranilato también se está evaluando como repelente para proteger plántulas de soja en el marco de uno de los proyectos FPTA INIA-DGSSAA-COPAGRAN. Se trata de un repelente que se ha registrado recientemente en nuestro país y ha sido evaluado asperjando sobre los cotiledones ya emergidos, obteniéndose muy buenos resultados. Actualmente, en Argentina, se está estudiando un repelente utilizado como terapico de semillas que tiñe las mismas de un color que causaría aversión para las aves, potenciando así el poder repelente del producto. Las aves, luego de probar semillas tratadas, asocian el color con el sabor y olor repulsivo del repelente no comiendo aquellas teñidas (Wemún S. A. 2010). El repelente se adhiere a los tegumentos externos de las semillas permitiendo que el activo se mantenga inalterable y con repelencia efectiva, mientras los tegumentos estén presentes. En el caso de la soja, los cotiledones emergen vestidos con parte de los tegumentos externos que llevan adherido el repelente, protegiendo la plántula hasta hoja verdadera (Wemún S.A. 2010). La asociación del efecto repelente con un color aversivo ya fue evaluada por Rodríguez (1994) en girasol con buenos resultados, por lo que se esperarían promisorios resultados en este caso también.

1.4.1. Repelentes químicos aplicados a semillas

Uno de los aspectos que compromete la eficiencia de los repelentes es el momento de su aplicación. Para el caso de la soja, la corta duración del período de vulnerabilidad de la planta, la heterogeneidad en la germinación de las semillas, y la cantidad de producto que se desaprovecha compromete la eficacia del producto si es aplicado en cultivos extensivos luego de la emergencia. Por lo tanto, se esperaría que los repelentes sean más efectivos si son aplicados a la semilla, como los fungicidas, insecticidas y rizobios. De esta forma, al emerger la plántula ya posee la protección contra las aves.

El uso de repelentes químicos ofrece una medida de protección efectiva contra el daño provocado por aves en cultivos en emergencia y maduración. Se ha ensayado con éxito con aplicación de forma foliar en soja para proteger las plántulas del daño a los cotiledones, provocado principalmente por palomas torcazas (Olivera y Rodriguez en prensa). Sin embargo, a pesar de que resultan efectivos tienen una serie de inconvenientes que se vinculan, como son, la oportunidad de aplicación y el desaprovechamiento de producto. Para evitar los inconvenientes antes mencionados en el cultivo de soja, se propone la aplicación de los repelentes químicos en la semilla, para lo cual se deben estudiar tres aspectos. En primer lugar, se debe evaluar si los ingredientes activos que resultan efectivos en aplicación foliar, pueden alcanzar y permanecer en los cotiledones cuando son aplicados a la semilla. Esto implica que el efecto repelente se mantendrá en la plántula hasta la aparición de la hoja verdadera (período de vulnerabilidad del cultivo). El metiocarb es un producto sistémico, por lo que se mantendría el efecto repelente en la plántula hasta la aparición de la hoja verdadera, pero no se conoce si esto puede darse también con la antraquinona y el metil antranilato. En segundo lugar, se debe conocer si los repelentes no traen perjuicio a la germinación de la semilla. Por último, se debe evaluar si existe algún efecto de estos repelentes en los otros productos que se le aplican a las semillas antes de su siembra, entre ellos el inoculante. No se han encontrado en la región trabajos que muestren la viabilidad del uso de repelentes aplicados a las semillas, que incluyan el punto de vista microbiológico para evaluar la compatibilidad con los

rizobios. Sí, se han recabado antecedentes de este tipo de estudio en insecticidas y fungicidas utilizados como curasemilla en nuestro país. Es de gran utilidad comparar si los repelentes trabajados son más o menos tóxicos para los rizobios que los productos ampliamente utilizados a nivel comercial.

1.5. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la factibilidad del uso de repelentes químicos aplicados a la semilla para prevenir los daños de aves en el cultivo de soja. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Conocer la capacidad de la antraquinona y el metil antranilato para alcanzar y permanecer en los cotiledones en cantidades suficientes para actuar como repelentes, luego de emergida la plántula.
- 2- Evaluar los efectos de la antraquinona, el metil antranilato, y el metiocarb sobre la germinación de la semilla.
- 3- Evaluar los efectos de la antraquinona, el metil antranilato, y el metiocarb sobre la sobrevivencia y capacidad de nodular de los rizobios del inoculante y comparar los efectos sobre los mismos parámetros en un fungicida y un insecticida ampliamente usados como curasemillas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los productos químicos se utilizaron en este estudio en su formulación comercial: Draza® (metiocarb 50%); Rayén® (metil antranilato 30%), Avipel® (antraquinona 50%), Gavilán® (imidacloprid 60%); y Envion+® (carbendazim 25.% + thiram 10% + metalaxil 5 % , Cuadro 1). Para el caso de los productos registrados (imidacloprid, C+T+M, y metiocarb), se utilizó la dosis recomendada en la etiqueta, que se denominó "dosis base". Para los repelentes químicos no registrados para su uso en soja (metil antranilato y antraquinona), se utilizó una dosis establecida en función de la bibliografía, la cual, también fue considerada como dosis base (Avery *et al.* 1998; Werner *et al.* 2011; Addy Orduna *et al.* 2010, Cuadro 1).

Cuadro 1 ingredientes activos con sus respectivos nombres comerciales. Se muestra la dosis base utilizada en estos experimentos. En **negrita** se resaltan los repelentes químicos para aves.

Ingrediente activo	Nombre comercial	% Ingrediente activo en formulado comercial	Dosis base/100 kg de semillas
Metiocarb	Draza®	50	500 g
metil antranilato	Rayén®	30	1000 ml
Antraquinona	Avipel®	50	1000 ml
carbendazim+thiram+metalaxil	Envion+®	25 carbendazim, 10 thiram y 5 metalaxil	500 ml
Imidacloprid	Gavilán®	60	200 ml

Las semillas de soja utilizadas fueron de la línea Experimental LEO 1823-07 GM 5.7, brindadas por la Estación experimental INIA La Estanzuela. Los inoculantes utilizados fueron de cepas *Bradyrhizobium elkanii* denominadas U-1302 (SEMIA 5019) y U-1301 (SEMIA 587), ambas recomendadas en los inoculantes

comerciales para soja (MGAP 2009). En todos los casos, el tratamiento con los químicos y los inoculantes se realizó aplicando primero el producto químico y luego el inoculante (Montero y Sagardoy 2006), en una máquina pulverizadora para semillas experimental con tambor rotativo Rotogard® R150 (Norogard, Suecia, Figura 2).



Figura 2. Máquina pulverizadora para semillas experimental con tambor rotativo Rotogard® R150 (Norogard, Suecia).

Se utilizaron dos formulaciones de inoculantes comerciales con diferentes soportes (en soporte líquido y en turba). Cada tratamiento fue utilizado con inoculante en soporte líquido e inoculante en soporte turba, generando así dos tratamientos por producto. Para los experimentos se utilizaron macetas plásticas de 1 L en las que se colocó una mezcla de cinco partes de arena y una de turba. Tanto las macetas como los soportes (arena y turba) fueron previamente esterilizados. Todos los trabajos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Estación Experimental INIA Las Brujas y en el Laboratorio Biológico de la Dirección General de Servicios Agrícolas (MGAP).

2.1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y PERMANENCIA DE LOS REPELENTES EN LOS COTILEDONES

El objetivo de esta etapa experimental fue conocer si los dos productos químicos que se están probando actualmente como repelentes para aves (antraquinona y metil antranilato), poseen la capacidad de alcanzar los cotiledones y permanecer allí una vez emergidos hasta que comience a aparecer la hoja verdadera. En el caso de existir residuos remanentes de los químicos en las semillas, deberían ser coincidentes con las concentraciones que ya han mostrado efectos repelentes. El producto Draza® no fue incorporado en esta etapa debido a que ya está registrado en Uruguay como repelente para aves en soja en el momento de la emergencia. Sí se evaluó, en otra etapa experimental, su interferencia con el inoculante, debido a que no se encontró información al respecto (ver más abajo).

Las semillas de soja fueron tratadas primeramente con uno de los repelentes químicos y luego con inoculante en soporte líquido. En esta etapa se empleó Rayén® y una formulación en polvo de Avipel® (antraquinona 95%) ambos a una dosis base del 1% (p/p). Se trataron 500 g de semillas con cada repelente y otros 500 g de semillas únicamente fueron inoculadas y considerados control del experimento. Se sembraron 16 macetas por tratamiento, con 10 semillas cada una (para obtener el material vegetal suficiente para los análisis de residuos) y tres repeticiones por tratamiento (es decir, 48 macetas de 10 semillas c/u por tratamiento).

El modelo estadístico utilizado fue:

$$y_i = \mu + \tau_i + \varepsilon_i$$

Siendo y_i : variable aleatoria observada (en este caso, residuo de repelente químico presente en cotiledones de semillas de soja, expresado en ppm)

μ : media general conceptual (en este caso, media de ppm registrada en cotiledones)

τ_i : efecto del i -ésimo tratamiento

ε_i : error experimental

Las macetas fueron colocadas en una cámara de incubación con temperatura y humedad controlada Hotpack (Hieco Company) por 10 días aproximadamente (Figura 3).



Figura 3. Cámara de incubación Hotpack (Hieco Company) donde fueron colocadas las plantas para el experimento.

Al momento de la siembra, se guardaron 200 g de semillas por tratamiento en freezer a -20°C , para la prueba de HPLC. Luego de emergidas las plántulas y aparecer indicios de la hoja verdadera, se procedió al corte de los cotiledones (sin incluir restos de cobertura de la semilla). Éstos, junto con las semillas, fueron almacenados en freezer a -20°C hasta el posterior análisis en el Laboratorio de residuos de Plaguicidas de la DGSSAA (MGAP), para evaluar la cantidad de partes por millón (ppm) de ingrediente activo presente en los cotiledones al momento de cortarlos. Los residuos fueron analizados utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC, por su sigla en inglés) con la técnica de Multiresiduos de Mini Luke (Luke *et al.* 1981) con un límite de cuantificación de 0,05 ppm.

2.2 EFECTO DE LOS REPELENTES QUÍMICOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA

El efecto de los repelentes en la germinación de las semillas se midió cuantificando la cantidad de plántulas normales emergidas. Para ello, las siembras (2) se realizaron a los 2 y a los 7 días luego de tratadas las semillas para evaluar el efecto del tiempo de contacto producto-semilla. Se sembraron 4 semillas por maceta y éstas fueron colocadas en cámara a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ y 12:12 horas luz:oscuridad (L:O). El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con seis repeticiones por tratamiento.

El valor germinativo de las semillas se evaluó a los 5 y 8 días de sembradas. Para ello, se contabilizó el número de plántulas normales con una altura entre 4 y 6 cm (Gamba, 2008).

El modelo estadístico utilizado fue:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \rho_j + \varepsilon_{ij}$$

Siendo y_{ij} : la variable aleatoria observada (número de plántulas normales)

μ : media general conceptual (en este caso, media de plántulas normales)

τ_i : efecto del i ésimo tratamiento

ρ_j : efecto del j ésimo bloque

ε_{ij} : error experimental

Los resultados se expresaron como porcentaje de emergencia, estimado como la proporción de plántulas normales que emergen en función del total de semillas sembradas. Para el análisis estadístico se trabajó con el número de plántulas y se evaluó si los datos cumplían con los supuestos de normalidad requeridos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para conocer si los tratamientos utilizados disminuían el valor germinativo de las semillas, y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se trabajó con una confianza del 95% para todos los casos ($\alpha \leq 0,05$). Se utilizó el paquete estadístico R versión 2.15.2.

2.3. EFECTO DE LOS REPELENTES QUÍMICOS SOBRE EL INOCULANTE

Para conocer el efecto de los productos sobre los rizobios se realizaron pruebas de inhibición sobre discos de papel, recuentos de rizobios viables sobre la cubierta de las semillas tratadas, así como número y masa seca de nódulos en raíces y peso seco de parte aérea en plantas.

2.3.1. Inhibición sobre discos de papel

Previo a realizar las pruebas de toxicidad que se detallarán a continuación, es imprescindible construir, para ambas cepas de rizobios utilizadas, la curva de crecimiento de éstas bacterias en función del tiempo, y la carga bacteriana del caldo de cultivo con que se está trabajando.

2.3.1.1. Curva de crecimiento de cepas U-1301-U-1302 y cálculo del número de células viables

Para construir la curva de crecimiento se utilizó el método de conteo en placa por microgota de Miles and Misra (Somasegaran y Hoben 1994). Para ello, se inoculó 0,1 µl de una colonia crecida en placa de agar M79 (ver detalle de composición en Anexo 6.1) en 100 ml de medio líquido TY estéril (ver detalle de composición en Anexo 6.2). Dicha inoculación se realizó colocando 1 µl de las colonias con ansa estéril estandarizada en un tubo épendorf con 1 ml de medio de cultivo TY. Este fue agitado en un vortex y posteriormente se extrajo del tubo épendorf 0,1 ml del caldo y se agregó al frasco de cultivo con 100 ml de medio líquido TY.

Durante siete días, se realizaron dos mediciones diarias de la carga bacteriana en unidades formadoras de colonias (ufc/ml) presente en el caldo de cultivo, tomándose el día de la inoculación como t_0 . Cada día se extraía 1 ml del caldo y se realizaban diluciones seriadas 1/10. En dos placas con medio M-79, se colocaban dos gotas de 25 µl cada una por dilución, por placa, totalizando así 6 gotas por placa de

las tres diluciones más altas (Figura 4). Dichas placas fueron colocadas invertidas en cámara incubadora a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$.



Figura 4. Placa de Petri con medio M79 en la que se muestran las 6 microgotas proveniente de las diluciones del caldo de cultivo.

A los siete días, se contabilizó la cantidad de colonias por microgota y luego se realizó el cálculo de la carga bacteriana del caldo de cultivo original. El mismo se expresa por ml como:

$$\text{Número de células viables/ml} = (\text{Número colonias en microgota} * \text{factor dilución}) / 0,025 \text{ (Somasegaran y Hoben 1994)}$$

Posteriormente, para construir la curva de crecimiento, se utilizó el logaritmo en base diez de ese valor en el eje de las ordenadas (Y) y el tiempo en el eje de las abscisas (X).

2.3.1.2. Prueba de toxicidad en placa por difusión a partir de discos de papel

Las pruebas de toxicidad se realizaron utilizando una adaptación de la metodología de Martensson (1992). Para ello, se prepararon placas de petri de 9 cm de diámetro con medio de agar M-79 (ver detalle de composición en Anexo 6.1) tibio y a cada una se le agregaron 100 μ l de un caldo de cultivo en fase de crecimiento exponencial, con una carga bacteriana de 10^6 (previamente definida por la curva de crecimiento logarítmica). Cuando el medio solidificó, se colocaron 3 discos de papel de filtro estéril de 1 cm de diámetro equidistantes entre sí. Cada disco fue impregnado con 10 μ l de producto, lo cual equivaldría a la cantidad teórica de caldo necesario para tratar siete semillas de soja (Figura 5).

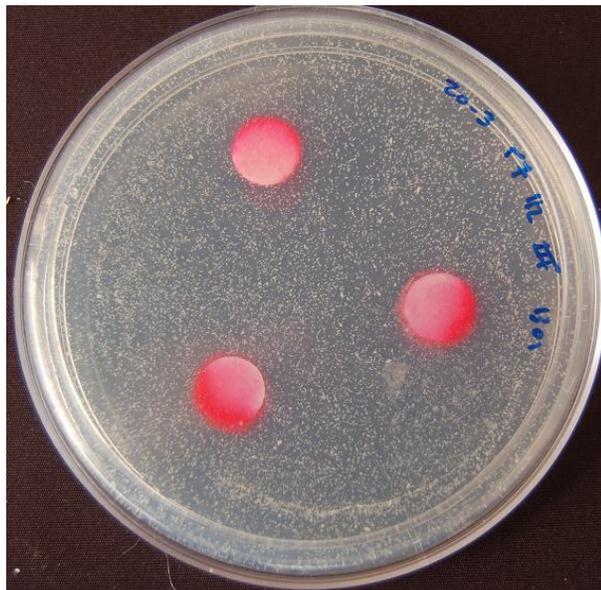


Figura 5. Placa de petri sembrada con la cepa U-1301. Se observan los discos de papel de 1 cm de diámetro impregnados con uno de los productos evaluados.

Las placas de Petri fueron colocadas invertidas en una cámara de crecimiento a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por siete días. La placa fue considerada como la unidad experimental y se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento y un control (agua destilada estéril sobre los discos de papel). Fueron probadas tres dosis de cada producto: la dosis base (ver Cuadro 1) y dos dosis más bajas ($3/4$ y $1/2$ de la dosis base).

El diseño experimental fue totalmente al azar con cuatro repeticiones. Luego de siete días de incubación, se midió el diámetro del halo de inhibición de cada disco y los mismos se promediaron por placa y por dosis.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$y_i = \mu + \tau_i + \varepsilon_i$$

Siendo y_i : la variable aleatoria observada (halo de inhibición en cm)

μ : media general conceptual (en este caso, halo de inhibición en cm)

τ_i : efecto del i ésimo tratamiento

ε_i : error experimental

2.3.2. Recuento de rizobios viables sobre la cubierta de semillas tratadas

La sobrevivencia de los rizobios se determinó sobre la cubierta de las semillas tratadas con los repelentes químicos, a los 2 y 7 días luego de ser tratadas e inoculadas con los respectivos productos y almacenadas a temperatura ambiente.

Los recuentos de rizobios viables sobre las semillas se realizaron por el método de recuento en placas con medio M-79 con rojo Congo (Somasegaran y Hoben 1994). Se contaron 90 semillas de cada tratamiento y se colocaron en frascos con 90 ml de solución salina estéril añadida con 360 μ l de solución dispersante de Tween 80 (2.5% p/v). Cada frasco fue agitado durante 15 minutos en agitador de golpes. Posteriormente, se extrajo 1 ml del frasco (el cual contendría la carga bacteriana de una semilla) y se realizaron diluciones seriadas hasta completar la dilución 10^{-4} . En la elaboración de las placas se fundió medio M-79 con rojo Congo, a cada matraz de 300 ml de medio se le agregaron 100 μ l de Vancomicina (1mg.l^{-1}) y posteriormente el mismo fue distribuido en placas de Petri. A cada placa se le agregaron 100 μ l de las diluciones más altas, luego fueron extendidos sobre la superficie de la placa con espátula de Drygalski. Las placas se colocaron invertidas en cámara decrecimiento a $28^\circ\text{C} \pm 2$ por siete días. Se realizaron tres repeticiones de la dilución 10^{-3} y dos repeticiones de las otras dos diluciones (10^{-2} y 10^{-4}) para

verificar proporcionalidad de la carga bacteriana entre diluciones. Dentro de la estufa, las placas se distribuyeron completamente al azar. Finalizado el período de incubación, se contabilizaron aquellas diluciones que presentaron entre 25 y 250 colonias (Sutton 2011) verificando la proporcionalidad entre diluciones y promediando los resultados (Figura 6).

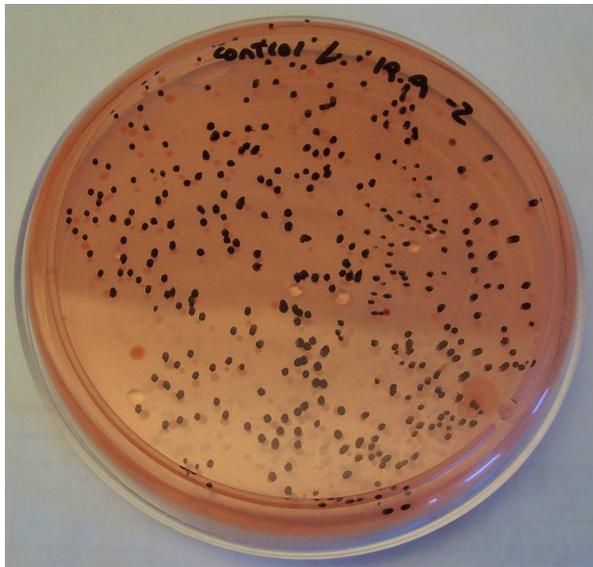


Figura 6. Placa con medio agar M-79 con rojo congo. Se marcaron con puntos negros las colonias de rizobios provenientes de los recuentos sobre la cubierta de la semilla.

Posteriormente, se realizó el cálculo de la carga bacteriana presente en cada semilla. El mismo se expresa por semilla y se realizó como:

$$\text{Número de células vivas} = (\text{Número colonias en placa} * \text{inverso factor dilución}) / 0,1$$

2.3.2.1. Análisis estadísticos

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$y_i = \mu + \tau_i + \varepsilon_i$$

Siendo y_i : la variable aleatoria observada (número de colonia por placa)

μ : media general conceptual (en este caso, número de colonia por placa)

τ_i : efecto del *i*ésimo tratamiento

ε_i : error experimental

Los resultados se expresaron como número de rizobios viables por semilla, estimados como: número de ufc que fueron efectivamente contados en las placas de Petri (según el rango de Sutton 2011), correspondientes a la cubierta de una semilla. Los promedios y desvíos estándar de número de rizobios viables por semilla se estimaron por tratamiento (estadística descriptiva) y se utilizó un ANOVA para realizar la comparación entre tratamientos y la interacción tratamiento por tiempo. En los casos en que se detectaron diferencias significativas se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se trabajó con una confianza del 95 % para todos los casos ($\alpha \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico R versión 2.15.2.

2.3.3. Efectos sobre la nodulación y la Fijación Biológica de Nitrógeno

Para evaluar el efecto del tiempo de contacto entre los productos y los rizobios, en la nodulación, se realizó una siembra en macetas a los 2 días posteriores al tratamiento de las semillas y otra segunda a los 7 días del tratamiento. Estas siembras fueron iguales entre sí, con la misma cantidad de tratamientos y repeticiones. Los experimentos se llevaron a cabo en los meses de setiembre y octubre de 2012, instalándose uno en cámara de crecimiento y otro en invernáculo. Se sembraron cuatro semillas por maceta que, luego de emergida la hoja verdadera, las plantas fueron raleadas a dos. En el primer caso, las macetas fueron colocadas en una sala con temperatura y luz controladas a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ y 12:12 horas L:O (Figura 7).



Figura 7. Cámara de luces donde se realizaron los experimentos de macetas. Se distribuían dos estantes para cada una de las siembras.

En el segundo caso, las macetas se colocaron en invernáculo para evaluar los parámetros de nodulación y parte aérea de la planta con condiciones de luz y fotoperiodo natural. El diseño del experimento fue en bloques al azar y se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento (Figura 8).



Figura 8. Invernáculo donde se realizaron los experimentos con macetas.

2.3.3.1. Variables a medir

Número y masa seca de nódulos: Al inicio de la fase reproductiva (R_1 ; Fehr *et al.* 1971), se evaluaron las plantas. Para ello, se extrajeron las plantas de las macetas y se procedió al lavado de raíces y determinación de los parámetros de nodulación que se detallarán a continuación. El número de nódulos por maceta se contabilizó (Figura 9) y éstos fueron colocados en cajas de Petri y llevados a estufa a temperatura constante 60°C por 7 días. Al momento de extraer los nódulos, se discriminaron los que se ubicaban en la raíz primaria de los localizados en las secundarias (Montero y Sagardoy 2006). Finalizado el período de secado, los nódulos presentes en cada maceta fueron pesados en balanza de precisión (0,0001 g).



Figura 9. Raíz con nodulación en raíces primarias y secundarias. Los nódulos fueron contados y pesados.

Peso parte aérea: Al momento de procesar las plantas, inicio de la fase reproductiva (R_1 ; Fehr *et al.* 1971), se cortó la parte aérea de las mismas, y se colocó en sobres de papel, y se llevó a estufa a 60°C por 7 días. Culminado este período, el contenido de cada sobre fue pesado en balanza de precisión (0,0001 g) para el caso

de cámara de crecimiento; y para invernáculo se utilizó balanza con 0,01 g de precisión.

2.3.3.2. Análisis estadísticos

El modelo de análisis estadístico para ambos casos fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \theta_j + \rho_k + \tau_i * \theta_j + \varepsilon_{ij}$$

Siendo y_{ij} : la variable aleatoria observada (número de nódulos, peso seco de nódulos o peso seco de la parte aérea)

μ : media general conceptual (en este caso, número de nódulos, peso seco de nódulos o peso seco de la parte aérea)

τ_i : efecto del i ésimo tratamiento

θ_j : efecto del j ésimo tiempo

ρ_k : efecto del k ésimo bloque

$\tau_i * \theta_j$: interacción tratamiento por tiempo

ε_{ijk} : error experimental

Primeramente, se utilizó estadística descriptiva para estimar promedios y desvío estándar de las variables analizadas. Posteriormente, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) del número de nódulos, peso seco de los mismos, y peso seco de la parte aérea, por maceta, a los 2 días y a los 7 días. Asimismo, en el ANOVA se evaluó si existe una interacción de los tratamientos en el tiempo. En los casos en que se detectaron diferencias significativas, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se trabajó con una confianza del 95 % para todos los casos ($\alpha \leq 0,05$). Se realizó un Análisis de correlación de Pearson entre el peso seco de la parte aérea y los parámetros de nodulación, ya que es una medida indirecta de la FBN realizada por la planta ($\alpha \leq 0,05$). Los análisis estadísticos en esta etapa se realizaron con el paquete estadístico R versión 2.15.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y PERMANENCIA DE LOS REPELENTE EN LOS COTILEDONES

En las semillas tratadas con metil antranilato se registraron 1818,8 ppm de residuo de este repelente y $4,5 \pm 1,1$ ppm de residuos en los cotiledones emergidos de las semillas tratadas. En tanto, las semillas tratadas con antraquinona contuvieron 370,1 ppm de residuos de este repelente, y en los cotiledones emergidos de las semillas tratadas se registraron $199,8 \pm 25,2$ ppm. De este modo, las ppm de antraquinona que permanecen en los cotiledones son aproximadamente la mitad o superior que las detectadas en las semillas, mientras que las de metil antranilato son prácticamente despreciables.

Los residuos obtenidos en los cotiledones emergidos superan los valores de residuos registrados en experimentos anteriores en los que se aplicó antraquinona de forma foliar sobre los cotiledones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de las ppm de antraquinona obtenidas en cotiledones pulverizados posteriormente a la emergencia, en los ensayos realizados en el marco del proyecto INIA-DGSSASA y en el acuerdo INIA-ARKION.

Experimento	ppm de antraquinona obtenidas en cotiledones (Dosis 4,0 L/Ha)
Aviario con palomas en cautiverio (Proyecto INIA-DGSSAA FPTA 284)	27,7
Semi-cautiverio (Convenio INIA-ARKION)	35,1
Campo (Proyecto INIA-DGSSAA FPTA 284)	40,8

Cabe destacar que para las aplicaciones foliares (Cuadro 2), con máquina pulverizadora, el formulado utilizado contenía 50% de ingrediente activo, en comparación con el utilizado en este estudio, que contiene 95% de antraquinona. De modo que la permanencia de la antraquinona en los cotiledones sería mayor cuando el repelente se usa como curasemilla, en comparación con aplicaciones foliares. Estas comparaciones no pudieron realizarse con el metil antranilato debido a que no se contaba con la técnica analítica para detectar residuos de metil antranilato en material vegetal y por lo tanto no se pudieron analizar las muestras de los experimentos realizados con aplicaciones foliares.

La diferencia de valores en residuos de antraquinona y metil antranilato entre semillas tratadas (mayores valores de residuos) y cotiledones de semillas tratadas (menores valores de residuos), estaría potencialmente explicada por la absorción del ingrediente activo por parte de la semilla. La semilla de soja es muy higroscópica, por lo que tiende a absorber agua muy fácilmente. De acuerdo a Bewley y Black (1978), la semilla posee un hilum (cicatriz visible sobre la semilla de soja) y al final de éste se encuentra el micrópilo por el cual entra la mayor parte del agua. Por lo tanto, se piensa que el ingrediente activo debe entrar a la semilla disuelto en el agua que absorbe la misma. Por ende, cuanto más soluble sea el compuesto, mejores probabilidades tendrá de ser absorbido. En nuestro caso, la antraquinona es un polvo mojable, que luego de preparado el caldo toma una consistencia líquida. En cambio, el metil antranilato tiene una consistencia viscosa, lo cual podría enlentecer el flujo del mismo dentro de la semilla. Será necesario realizar estudios de absorción de estos químicos en las semillas para dilucidar este aspecto pues, si bien en este estudio, no se encontró evidencia de que existiese alguna incompatibilidad con el tamaño de la molécula o diferencias de cargas que impidan el ingreso de metil antranilato a la semilla de soja, el estudio no fue diseñado específicamente para esta evaluación, y consecuentemente, quedan dudas al respecto. Asimismo, asumiendo que este aspecto sea limitante para la absorción de los repelentes químicos en las semillas, sería necesario evaluar distintos solventes para el caso del metil antranilato, que permitan

el mejor flujo del producto y faciliten la permanencia del ingrediente activo en los cotiledones.

El metiocarb no fue sometido a estas pruebas de residuos en cotiledones debido a que es un producto sistémico y se encuentra registrado como repelente aplicado a la semilla para aves en soja. Sin embargo, no se halló bibliografía que realizara este tipo de evaluaciones de la presencia y permanencia de los químicos en los cotiledones, ni de interacción con el inoculante. A fin de comprender de manera más cabal la eficacia de este químico como repelente para aves en soja en emergencia, se recomendaría estudiar en el futuro la residualidad de este producto en la plántula.

3.2 EFECTO DE LOS REPELENTES QUÍMICOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA

Los repelentes químicos no tendrían efectos en el valor germinativo de las semillas, que se expresen en una disminución de las plántulas de soja emergidas luego de la siembra de semillas tratadas con dichos químicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentajes de plántulas de soja emergidas en macetas sembradas 2 y 7 días luego de tratadas las semillas. Las evaluaciones se realizaron 5 y 8 días después de la siembra. Se utilizaron 6 repeticiones para todos los tratamientos (se muestra el total de las repeticiones). Comparaciones dentro de cada columna (Tukey 95% de confianza).

Tratamiento	% Plántulas emergidas			
	Siembra 2 días		Siembra 7 días	
	5 días	8 días	5 días	8 días
Sin inocular	79,2 a	79,2 b	91,7 a	91,7 a
Control Liq	100 a	100 a	100 a	100 a
Control Turba	100 a	100 a	95,8 a	95,8 a
Metiocarb Liq	95,8 a	95,8 ab	100 a	100 a
Metiocarb Turba	87,5 a	100 a	95,8 a	95,8 a
Metil antranilato Liq	100 a	100 a	95,8 a	95,8 a
Metil antranilato Turba	100 a	100 a	95,8 a	95,8 a
Antraquinona Liq	100 a	100 a	100 a	100 a
Antraquinona Turba	91,7 a	91,7 a	100 a	100 a
C+T+M Liq	100 a	100 a	100 a	100 a
C+T+M Turba	87,5 a	91,7 a	87,5 a	91,7 a
Imidacloprid Liq	87,5 a	95,8 ab	100 a	100 a
Imidacloprid Turba	83,3 a	91,7 ab	100 a	100 a

Los porcentajes de plántulas emergidas en macetas sembradas siete días después que las semillas fueran tratadas con los repelentes químicos no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3). Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de plántulas emergidas de semillas de soja sin inocular ni tratar con ningún químico (Cuadro 3). No obstante eso, estas diferencias se observaron sólo en la evaluación a los 8 días de la siembra, no a los 5 días de la misma (Cuadro 3). Asimismo, el imidacloprid en soporte turba y líquido, así como el metiocarb en este último soporte mostraron diferencias marginalmente significativas en el número de plántulas emergidas con el control (Cuadro 3).

Lamentablemente, los antecedentes bibliográficos dirigidos a evaluar la fitotoxicidad de agroquímicos sobre la semilla son sumamente escasos, a excepción

de algunos estudios realizados en productos puntuales (Gamba 2008; González 2012), por lo que, las comparaciones con estudios previos no son factibles. Puesto que esta evaluación no se realizó en un laboratorio certificado para este tipo de análisis ni bajo la normativa de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA). Por tanto, sería recomendable evaluar el efecto de los repelentes en la germinación según estas condiciones, de manera de poder hacer pruebas estandarizadas y comparables con otros trabajos.

3.3. EFECTO DE LOS REPELENTES SOBRE EL INOCULANTE

3.3.1. Inhibición sobre discos de papel

3.3.1.1. Curva de crecimiento cepas U-1301 y U-1302

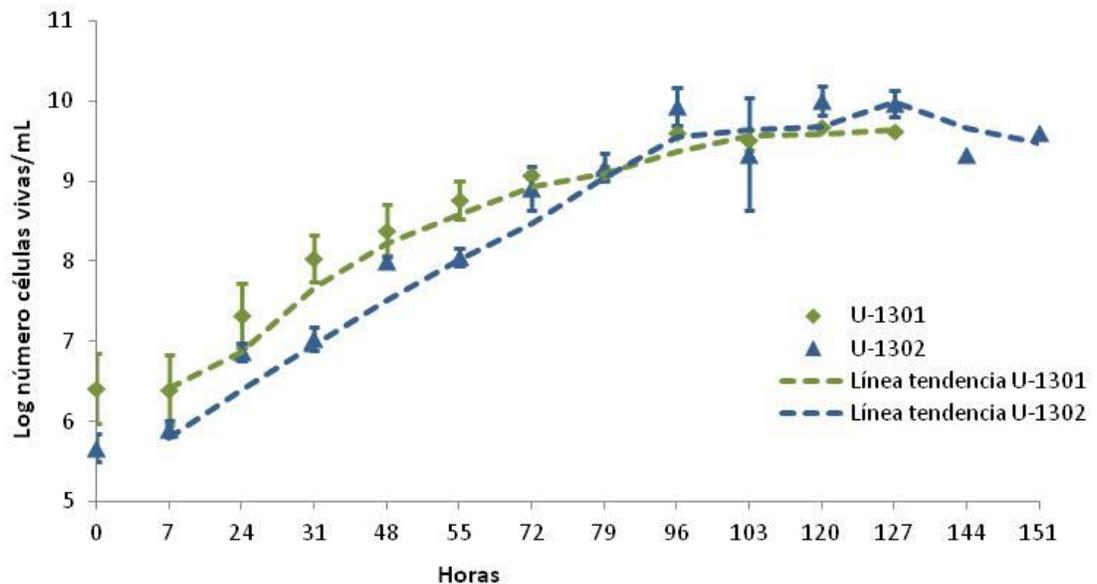


Figura 10. Logaritmo del número de células vivas en medio de cultivo líquido (ufc) por ml en función del tiempo para ambas cepas. Los puntos marcan los valores promedios registrados con sus respectivos desvíos estándar. Para la cepa U-1301, los promedios se basan en 2 repeticiones y para la cepa U-1302 en 3 repeticiones. La línea punteada verde indica la línea de tendencia para la cepa U-1301 y la línea punteada azul, la línea de tendencia para la cepa U-1302. Frascos por triplicado.

Ambas cepas (U-1301 y U-1302) son de crecimiento lento, presentando su fase exponencial entre las 7 y las 79 horas para la cepa U-1301 y entre las 7 y 96 horas de ser sembrada para la U-1302 (Figura 10). Al culminar esta fase, la población de células vivas de ambas cepas se mantendría constante ó podrían observarse algunos descensos, como se aprecia en la curva de la cepa U-1302, la cual pudo analizarse por un período más prolongado de tiempo. En el caso de la cepa U-1301, hay una repetición menos que para la cepa U-1302, debido a que se contaminó el caldo de cultivo en las primeras etapas de la curva.

3.1.1.2. Prueba de toxicidad sobre discos de papel

El metiocarb mostró solo inhibición en el crecimiento de bacterias de la cepa U-1301 en la dosis base, no presentando inhibición para la cepa U-1302 (Cuadro 4). Con el metil antranilato, en tanto, se observó inhibición total para las tres dosis probadas en ambas cepas (Cuadro 4). Finalmente, la antraquinona no mostró halos de inhibición (es decir, el crecimiento fue continuo sobre la placa). Para los productos utilizados de forma comparativa, el fungicida C+T+M, presentó una importante inhibición aunque no total para la cepa U-1301 y total para la U-1302, mientras que con el insecticida imidacloprid no se observaron halos de inhibición.

Cuadro 4. Análisis de toxicidad en placa por difusión en discos de papel para ambas cepas (U-1301 y U-1302) para los tres repelentes evaluados (resaltados en **negrita**), el insecticida y el fungicida. Se observan los resultados de los halos en cm para las tres dosis. $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{2}$ son fracciones de las dosis base. S In: sin inhibición; IT: inhibición total; BP: crecimiento solo en el borde de la placa. Para todos los tratamientos se utilizaron 4 repeticiones.

		Halo inhibición (cm) por dosis y producto				
		Metiocarb	Metil antranilato	Antraquinona	C+T+M	Imidacloprid
Cepa U-1301	Dosis base	1,08	IT	S In	BP	S In
	$\frac{3}{4}$	S In	IT	S In	BP	S In
	$\frac{1}{2}$	S In	IT	S In	BP	S In
Cepa U-1302	Dosis base	S In	IT	S In	IT	S In
	$\frac{3}{4}$	S In	IT	S In	IT	S In
	$\frac{1}{2}$	S In	IT	S In	IT	S In

De modo que, en resumen, sólo con excepción del metiocarb y el fungicida, ambas cepas utilizadas respondieron de forma similar a la aplicación de los compuestos. Esto es importante debido a que los inoculantes comerciales están formulados con estas dos cepas, y diferencias en los resultados de inhibición generarían conflictos en el uso comercial de estos productos.

El metiocarb y la antraquinona no serían tóxicos sobre los rizobios a este nivel de estudio, pero sí el metil antranilato, que presentó inhibición total para ambas cepas. Entre los compuesto usados comparativamente, el imidacloprid no sería tóxico, pero sí el C+T+M. Este fungicida está compuesto por carbendazim, thiram y metalaxil, y la toxicidad podría deberse, potencialmente, al thiram (Tu 1980).

Cabe destacar que la prueba de toxicidad en placa por difusión a partir de discos de papel no puede dar una medida real de toxicidad para los rizobios, pues el tamaño de la zona de inhibición en el medio de cultivo sólido no depende solamente

de la sensibilidad del microorganismo, sino también de la concentración del producto químico siendo evaluado y su facilidad de difusión a través del agar (Johnen y Drew 1977 en Mohamed Ahmed *et al.* 2007). Esto es debido a que, en algunos trabajos, esta etapa es una primera instancia para probar varias dosis de un producto, varios productos (Tu 1982) o varias cepas de una especie (Prévost *et al.* 1990), y poder descartar aquellas que por los objetivos no son de interés. En este estudio, esta prueba se utilizó como una primera aproximación de las toxicidades de los productos evaluados para las cepas seleccionadas.

3.3.2. Recuento de rizobios viables sobre la cubierta de semillas tratadas

De los tratamientos estudiados, solo con el metil antranilato utilizado con inoculante en soporte turba, se observó una sobrevivencia de los rizobios sobre la cubierta (Figura 11). En las semillas tratadas con metiocarb y con antraquinona no se obtuvieron rizobios viables en el orden 10^4 o superior, en los dos tiempos estudiados (2 y 7 días después del tratamiento), sea que los rizobios estuvieran en soporte turba ó en líquido (Figura 11). Lo mismo sucedió para el insecticida imidacloprid y el fungicida C + T + M (Figura 11).

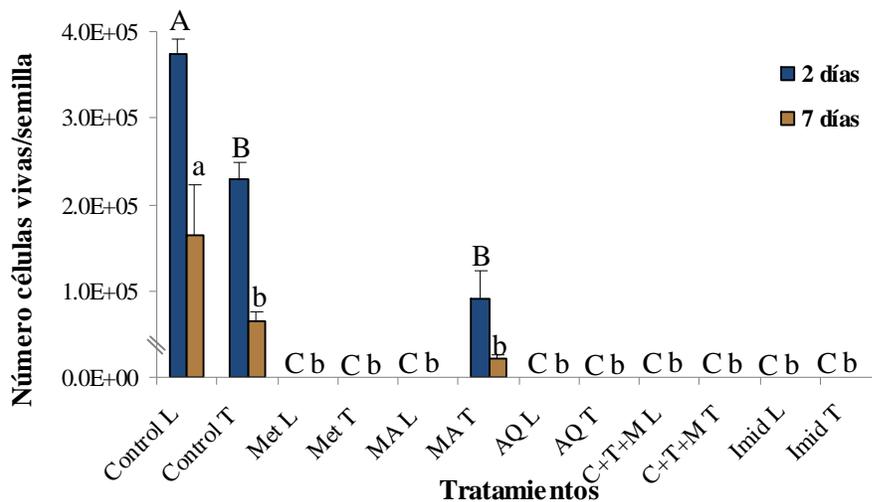


Figura 11. Recuentos de rizobios viables por semilla a tiempo 2 y 7 días posterior a la aplicación de los productos con sus respectivos errores estándar. Control L y Control T: Control con inoculante

líquido y control con inoculante turba respectivamente. C+ T+M= fungicida en ambos soportes del inoculante; Imi= imidacloprid en ambos soportes del inoculante; MA= metil antranilato también en ambos soportes del inoculante; AQ= antraquinona y Met= metiocarb, ambos en los dos soportes del inoculante. Para todos los tratamientos 3 repeticiones. Las letras indican comparaciones estadísticas dentro de la misma siembra (Tukey 95% de confianza). Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los 2 días y minúsculas de la siembra a los 7 días.

Se observó una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$; $f = 92,4$) y en la interacción tratamiento por tiempo ($p < 0,05$; $f = 6,6$). Al realizar la prueba de Tukey para cada tiempo por separado, se obtuvo que la sobrevivencia de rizobios registrada para el metil antranilato en soporte turba no fue significativamente menor a la del control (en dicho soporte) para ambas siembras realizadas (2 días: $p > 0,05$; $dif = 2,1$; 7 días ($p > 0,05$; $dif = 4,3$). Para el soporte líquido en cambio, la sobrevivencia de rizobios registrada para el repelente mencionado fue significativamente menor que el control en ambas siembras (Figura 11). En síntesis, la recuperación de rizobios viables en las semillas tratadas disminuyó con el tiempo y fue variada entre productos, como encontraron también Revellin *et al.* (1993).

La carga bacteriana recuperada en las semillas, cuantificada como la cantidad de ufc (unidades formadoras de colonias) presente por semilla fue del orden de 10^5 a los 2 días luego de inoculadas las semillas (Figura 11). Dicho orden es alcanzado por el control y es mantenido incluso hasta los 7 días posteriores al tratamiento para el soporte líquido, disminuyendo al orden de 10^4 para la turba (Figura 11). Para los tratamientos en los que no se registró sobrevivencia, se asume que los valores de ufc sobre la semilla fueron menores a 10^4 y por lo tanto no fue registrado en los recuentos en placas. La cantidad de rizobios en las semillas de soja que sería suficiente para alcanzar los máximos registros de nodulación en las raíces estarían en el orden de 10^5 rizobios (Weaver y Frederick 1972) ó 10^6 (Obaton y Rollier, 1970). Éste último orden puede ser alcanzado inmediatamente luego de inoculadas las semillas (tiempo cero) y al cabo de 24 hs la carga bacteriana por semilla podría disminuir al orden de 10^5 (Revellin *et al.* 1993). En el presente estudio, no se evaluó el número de células vivas a tiempo cero pero, según lo encontrado por Revellin *et al.* (1993), podría

asumirse que dicha carga bacteriana sería del orden de 10^6 , dado que se encontraron valores de 10^5 en los recuentos realizados luego de 2 días posteriores a la inoculación. Según las prácticas comerciales actuales en Uruguay, las semillas de soja son tratadas con los productos químicos recomendados y, posteriormente, inoculadas con bacterias (rizobios) en grandes cantidades, para luego ser distribuidas a los distintos productores. Según este esquema de producción actual, sumado al tiempo en que la semilla se encuentra en el campo sin emerger (por falta de humedad por ejemplo), es prácticamente imposible que la semilla presente la carga bacteriana que plantea Revellin *et al.* (1993) a tiempo cero (10^6) en el momento de la emergencia de la plántula. Como mencionamos en la introducción, estas bacterias son muy sensibles y su muerte subsiguiente a la inoculación puede ocurrir rápidamente. Las razones pueden ser desecación (Salema *et al.* 1982), toxicidad de la cubierta de la semilla (Materon y Weaver, 1984), incompatibilidad con pesticidas aplicados como curasemillas (Skipper *et al.* 1980) o ambientes edáficos desfavorables (altas temperaturas o soportes muy secos) (Kremer y Peterson, 1983). Por consiguiente, se podría asumir que valores de 10^5 como los encontrados en este estudio hasta los 7 días de espera, serán más cercanos a los efectivamente encontrados en las semillas al momento de su emergencia en los cultivos de soja comerciales.

En función de los resultados de este estudio, la combinación de inoculante en soporte turba y el metil antranilato funcionaría como "protector" bacteriano, ayudando a la sobrevivencia de los rizobios en las semillas de soja tratadas. Por el contrario, con los inoculantes en soporte líquido, la sobrevivencia de los rizobios en semillas tratadas con el metil antranilato sería menor. Sin embargo, es de resaltar que este efecto conjunto con la turba no se registró con los otros repelentes probados ni con los otros fitosanitarios. Por lo tanto, restaría investigar si es el ingrediente activo en combinación con la turba lo que causa este efecto o alguno de los compuestos de su formulación son los que están involucrados en esta interacción.

3.3.3. Efectos sobre la nodulación y la Fijación Biológica de Nitrógeno

3.3.3.1. Cámara de crecimiento

Entre los repelentes químicos, el metil antranilato no presentó diferencias significativas en el número promedio de nódulos obtenidos respecto al control en ninguno de los soportes utilizados ni en el correr del tiempo (Figura 12). El metiocarb muestra una disminución significativa del número de nódulos para ambos soportes (turba y líquido) en la siembra de 7 días (no así en la de 2 días), en relación al control (Figura 12). En relación a la antraquinona, en soporte turba no se observa que difiera estadísticamente del control para ninguna de ambas siembras, aunque con el soporte líquido sí disminuye estadísticamente para 2 y 7 días (Figura 12). Finalmente, al analizar los productos analizados de forma comparativa, con el imidacloprid en líquido para la siembra más tardía disminuye el número de nódulos estadísticamente en relación al control, no así para los otros casos. Para el fungicida C+T+M, el número de nódulos disminuyó estadísticamente en ambos soportes para la siembra de 7 días (Figura 12).

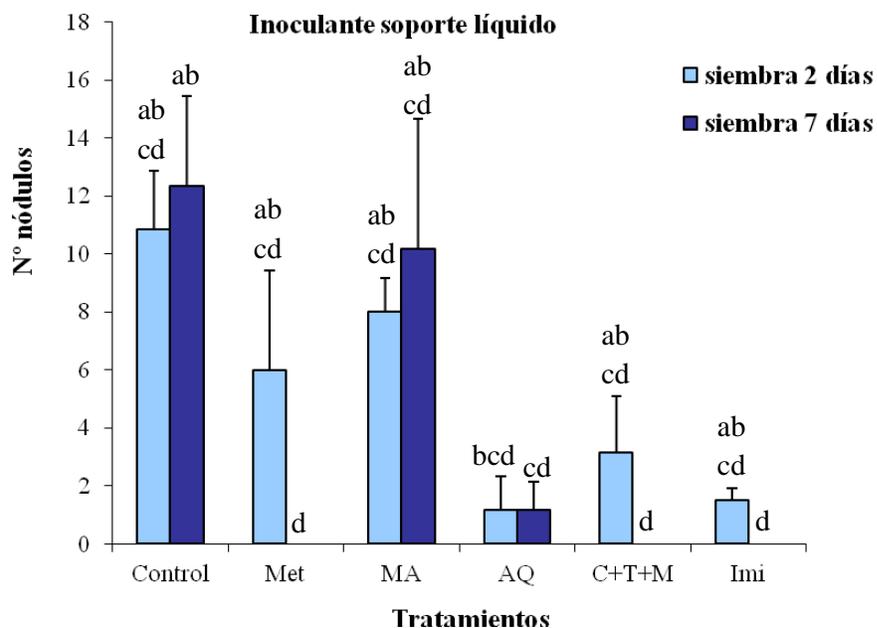
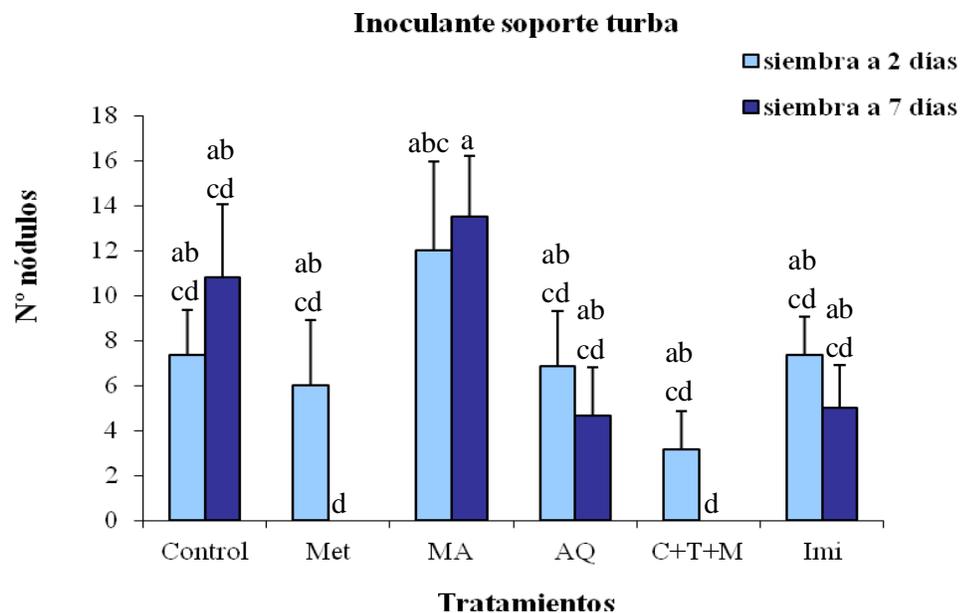
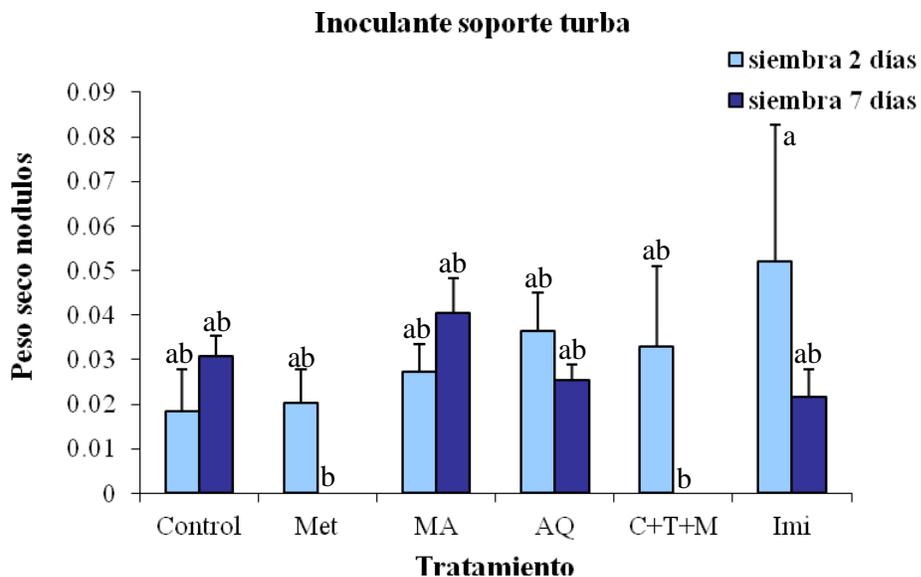


Figura 12. Número promedio de nódulos por maceta obtenidos en plantas de soja sembradas a los 2 y 7 días luego de tratadas las semillas. Se muestran cada uno de los tratamientos (6 repeticiones), con sus respectivos errores estándar. Arriba los tratamientos realizados con inoculante soporte turba y abajo con inoculantes soporte líquido. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona;

C+T+M: fungicida compuesto; Imi: imidacloprid. Las letras indican comparaciones estadísticas (Tukey 95% de confianza).

El metil antranilato no presentó diferencias estadísticamente significativas con el control en el peso seco de los nódulos (en mg), en ninguna de las situaciones (siembra a 2 días o a 7 días, Figura 13). En relación al metiocarb, no se observan diferencias significativas con el control en la siembra de 2 días pero si en la de 7 días para ambos sustratos (Figura 13). Cuando la antraquinona fue utilizada con soporte turba, no se observaron diferencias significativas con el control, a diferencia del soporte líquido con el cual sí se registran dichas diferencias. Finalmente, para el caso del fungicida (C+M+T) e insecticida (imidacloprid), se observó una disminución significativa en relación al control para el imidacloprid en soporte líquido en la siembra de 7 días. El C+T+M utilizado con ambos soportes también presentó una disminución en dicha siembra (Figura 13).



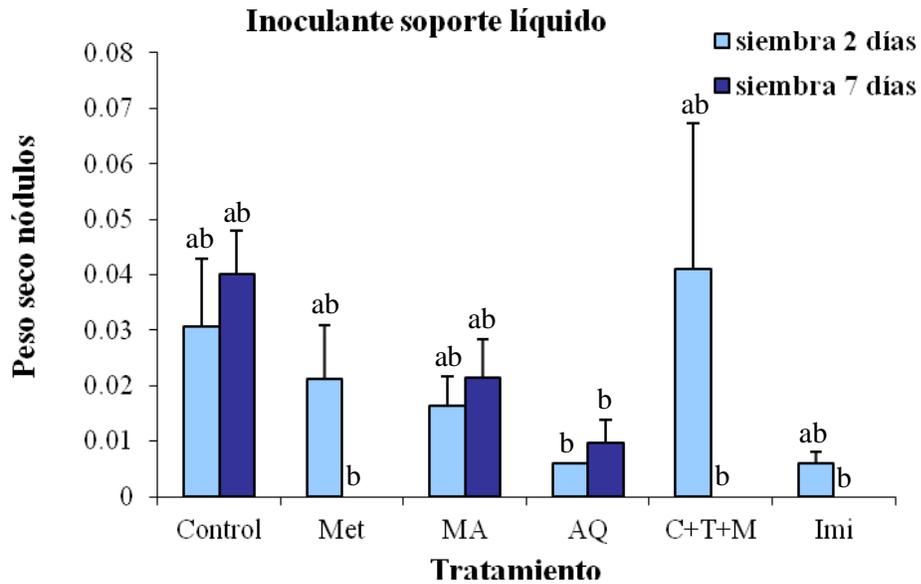


Figura 13. Peso seco promedio de nódulos por maceta obtenidos en plantas de soja sembradas a los 2 y 7 días luego de tratadas las semillas. Se muestran cada uno de los tratamientos (6 repeticiones), con sus respectivos errores estándar. Arriba los tratamientos realizados con inoculante soporte turba y abajo los utilizados con inoculantes soporte líquido. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona; C+T+M: fungicida compuesto; Imi: imidacloprid. Las letras indican comparaciones estadísticas (Tukey 95% de confianza).

La variable de peso seco de la parte aérea resultó ser muy homogénea entre los tratamientos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p > 0,05$; $F = 0,99$), pero sí entre bloques ($p < 0,05$, $F = 2,70$)

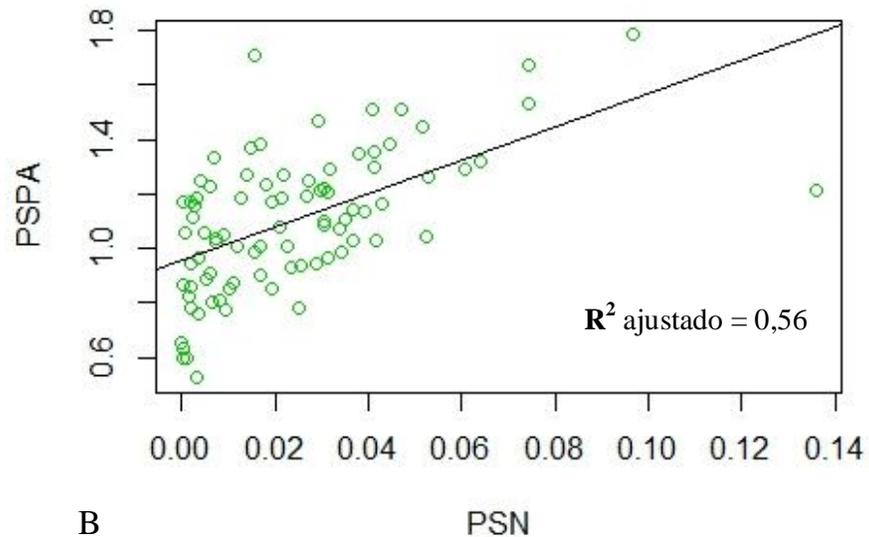
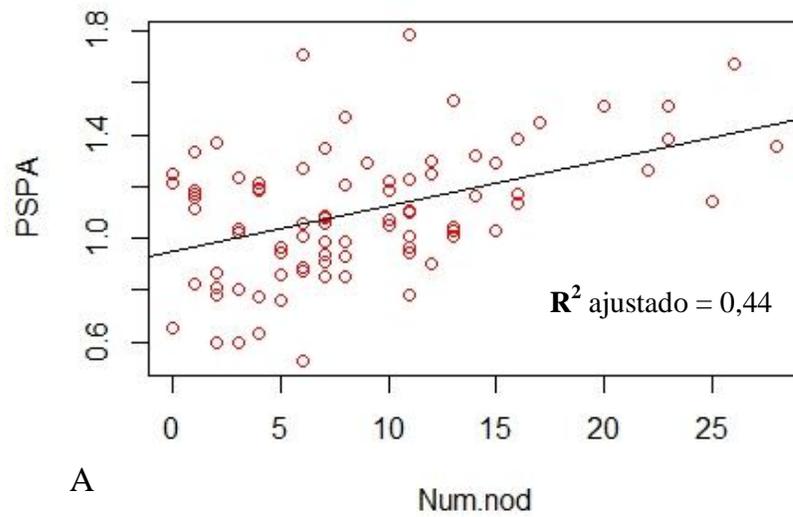


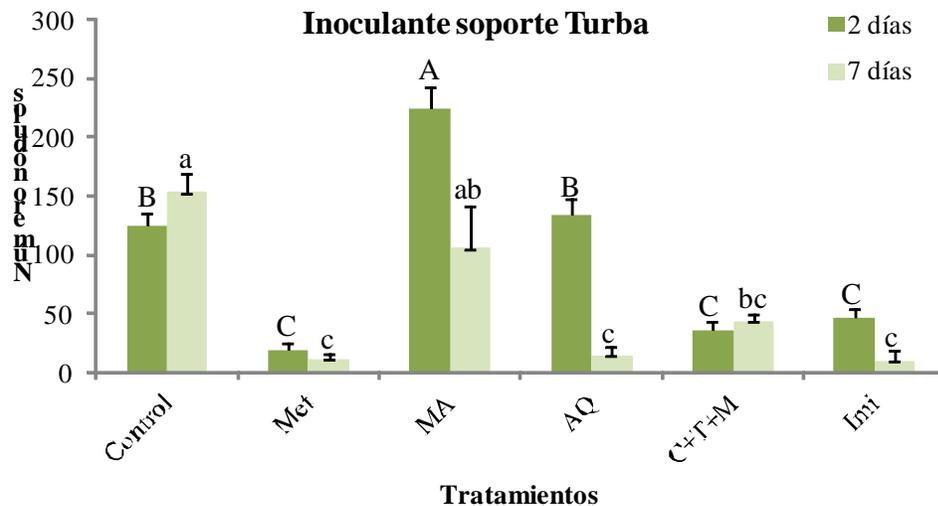
Figura 14. Correlaciones entre el Peso seco de la parte aérea (PSPA) con número de nódulos (A) y peso seco de nódulos (B).

Aparentemente, no existiría una correspondencia entre los parámetros de nodulación (número de nódulos y peso seco de nódulo) con el peso seco de la parte aérea, pues los valores de correlación son sumamente bajos, y podrían simplemente deberse al azar (Figura 14). La correlación sería ligeramente mayor con el peso seco de los nódulos, lo cual sería esperable ya que los nódulos más pequeños poseen

restricciones bioquímicas las cuales ocasionan una menor multiplicación de los bacteroides y por lo tanto menor FBN (Khokhar 1990). Sin embargo, se han reportado discrepancias en la relación masa de nódulos-efectividad de la simbiosis, en algunas especies, entre ellas la soja (Zaroug y Munns 1980). La variable peso seco de la parte aérea nos debería dar una estimación de la efectividad de la planta en realizar la FBN, gracias a la simbiosis con los rizobios. Dicha correlación no se ve reflejada en los resultados de este experimento. Esto podría ser debido a las condiciones sub-óptimas de la cámara de crecimiento, las cuales eran por ejemplo, la luz artificial que causó plantas etioladas y con pocas hojas, así como la limitada disponibilidad de espacio para las plantas en altura. Por esta razón, se recomendaría repetir esta evaluación en condiciones similares a las naturales (algo imposible de realizar en este estudio, debido a las limitantes de tiempo).

3.3.3.2. Invernáculo

En invernáculo, los mayores valores de nódulos se observan con el metil antranilato en la siembra realizada a los 2 días y con inoculante en soporte turba (Figura 15). Para la siembra realizada a los 7 días del mismo soporte, los mayores valores corresponden al control. Para el inoculante en soporte líquido, los mayores valores para ambos momentos de siembras corresponden al control (Figura 15).



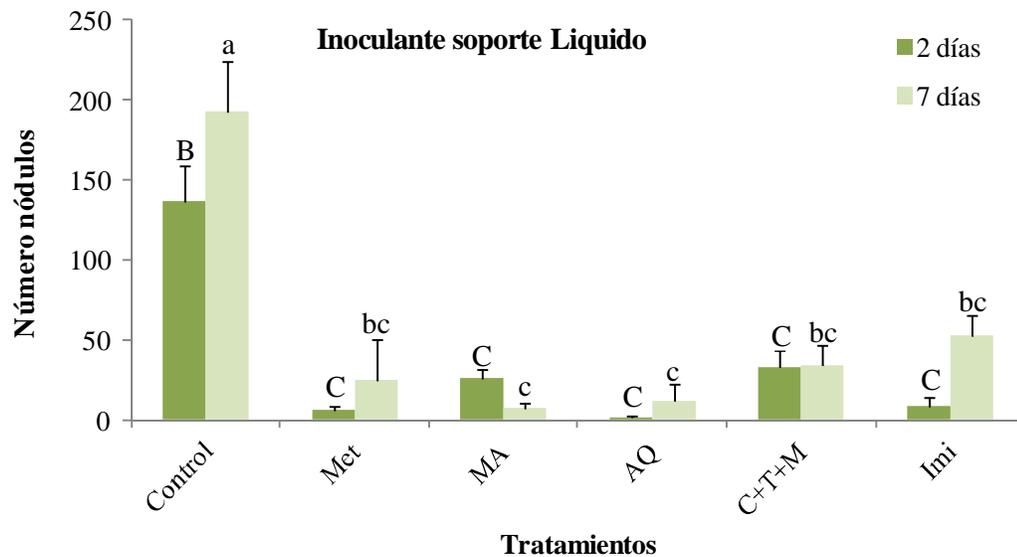


Figura 15. Número promedio de nódulos por maceta obtenidos en plantas de soja sembradas a los 2 y 7 días luego de tratadas las semillas. Se muestran cada uno de los tratamientos (4 repeticiones), con sus respectivos errores estándar. Arriba los tratamientos realizados con inoculante soporte turba y abajo los utilizados con inoculantes soporte líquido. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona; C+T+M: fungicida compuesto; Imi: imidacloprid. Las letras indican comparaciones estadísticas dentro de la misma siembra (Tukey 95% de confianza). Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los 2 días y minúsculas de la siembra a los 7 días.

Existieron diferencias estadísticamente significativas en el número promedio de nódulos entre los tratamientos ($F=33,2$; $p<0,05$), así como en la interacción tratamiento por tiempo ($F=7,2$; $p<0,05$). Debido a que esta interacción resultó significativa, se analizó cada siembra por separado, ya que esto implica que los distintos productos variaron su comportamiento relativo en el tiempo. Por ejemplo, con metiocarb, el número de nódulos se mantuvo prácticamente incambiado entre ambos tiempos, mientras que con metil antranilato varió significativamente (Figura 15).

El tratamiento que tiene significativamente el mayor número de nódulos es el del metil antranilato en soporte turba, seguido por los controles y la antraquinona también utilizada con soporte turba y, por último, todos los demás tratamientos (Figura 15).

En relación al peso seco de nódulos, al igual que con la variable anterior (número de nódulos), los mayores valores con inoculante en soporte turba se dan para el metil antranilato en la siembra realizada a los 2 días (Figura 16). Para la siembra realizada a los 7 días del mismo soporte, los mayores valores corresponden al control (Figura 16). Finalmente, para el inoculante en soporte líquido, los mayores valores para ambos momentos de siembras corresponden al control (Figura 16).

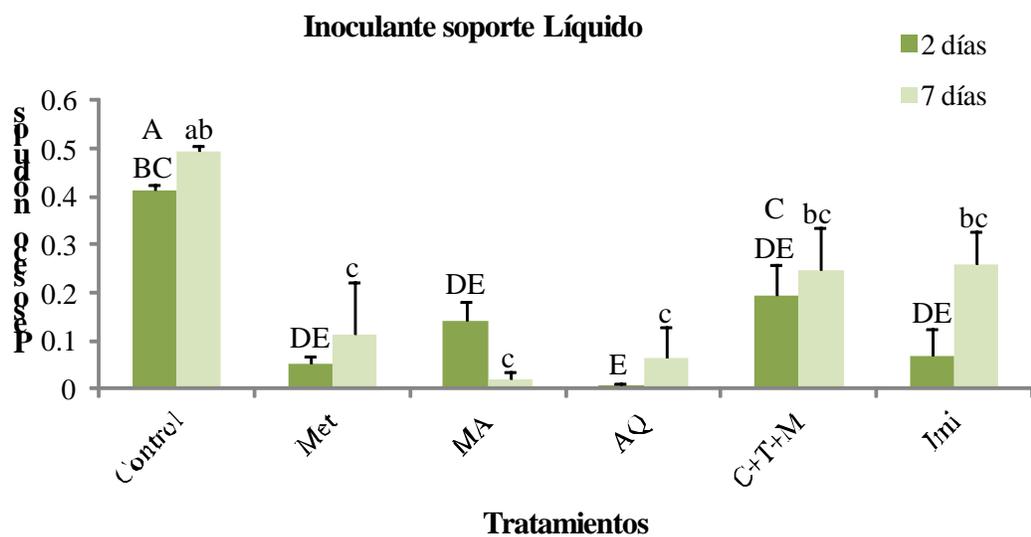
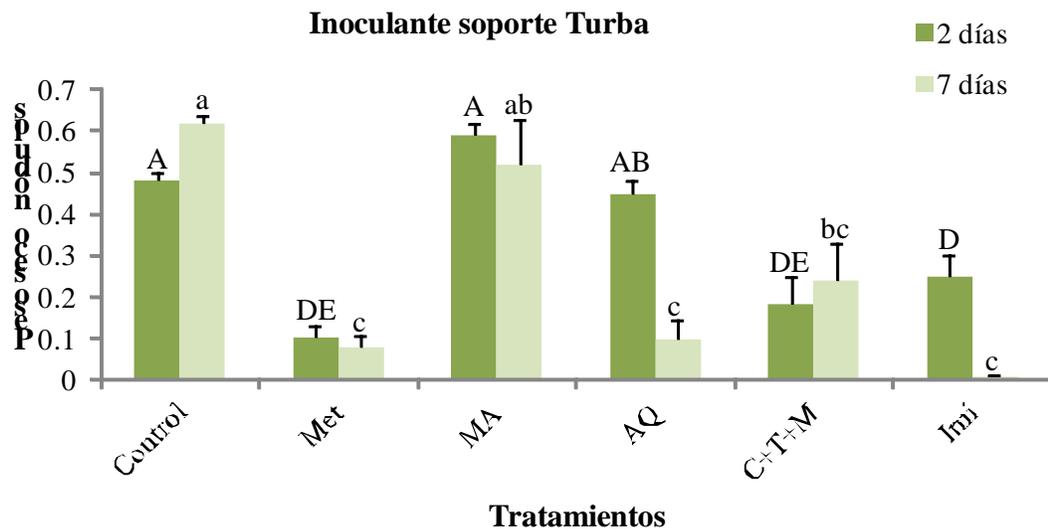


Figura 16. Peso seco promedio de nódulos por maceta obtenidos en plantas de soja sembradas a los 2 y 7 días luego de tratadas las semillas. Se muestran cada uno de los tratamientos (4 repeticiones), con sus respectivos errores estándar. Arriba los tratamientos realizados con inoculante soporte turba y abajo los utilizados con inoculantes soporte líquido. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona; C+T+M: fungicida compuesto; Imi: imidacloprid. Las letras indican comparaciones

estadísticas dentro de la misma siembra (Tukey 95% de confianza). Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los 2 días y minúsculas de la siembra a los 7 días.

Al hacer el análisis estadístico se registraron diferencias entre los distintos tratamientos y los controles del experimento ($F=20,4$; $p<0,05$), así como en la interacción tratamiento por tiempo ($F=4,0$; $p<0,05$). Debido a que esta interacción resultó significativa, se analizó cada siembra por separado (Figura 16).

Al igual que para número de nódulos, el metil antranilato y el control, ambos en turba tienen los valores más altos, no difiriendo entre ellos (Figura 16). En ambas variables, la antraquinona en soporte turba tiene valores que no difieren del control a los 2 días y desciende notablemente a los 7 días (Figura 16). En relación al metiocarb, en todos los casos se encuentra en valores muy bajos y alejados estadísticamente de los controles (Figura 16).

Finalmente, los controles son los que presentan los valores más altos de peso seco de la parte aérea, para ambos soportes y ambos tiempos (Figura 17). En el soporte líquido, la diferencia entre los controles y los productos es más pronunciada que para la turba (Figura 17).

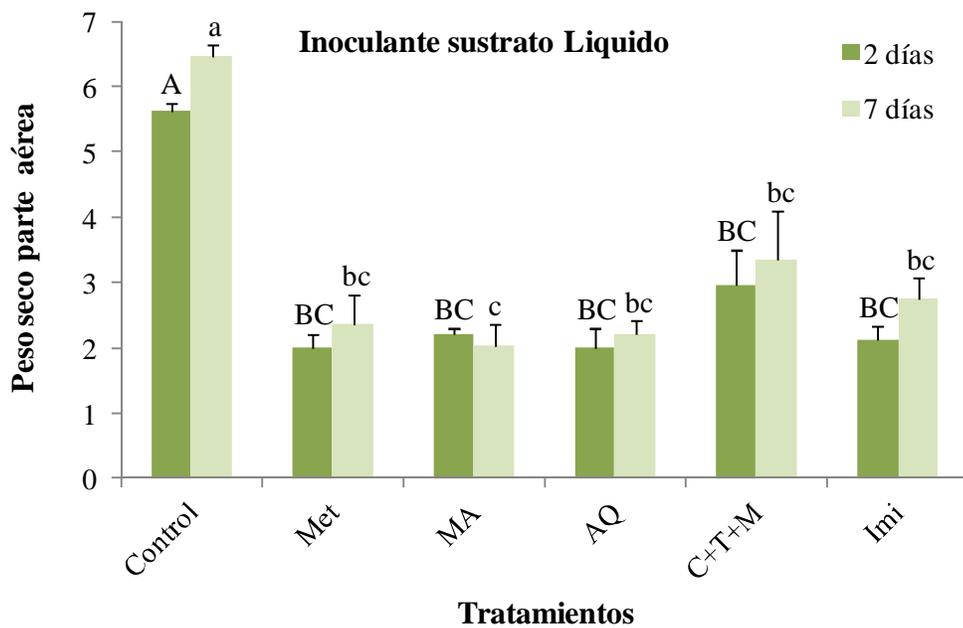
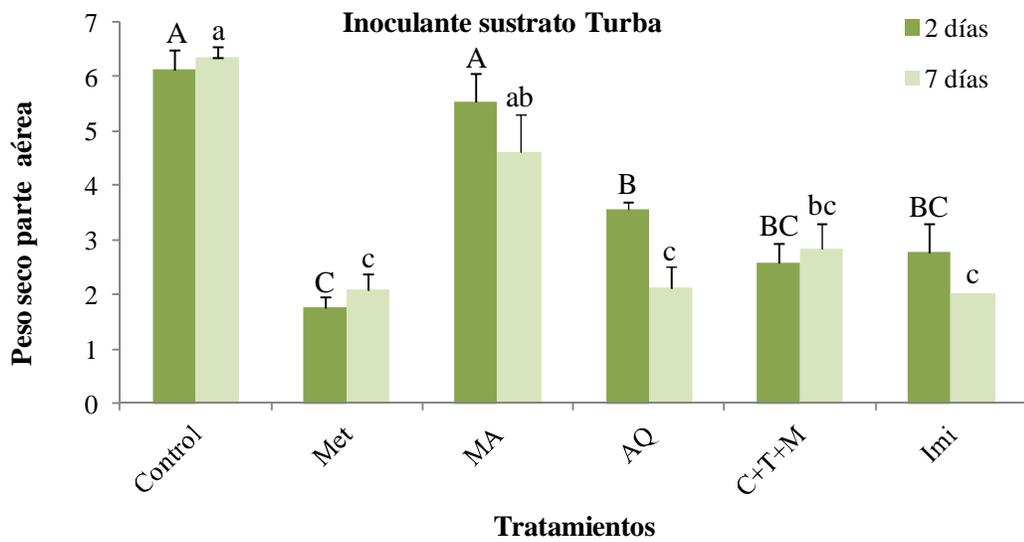
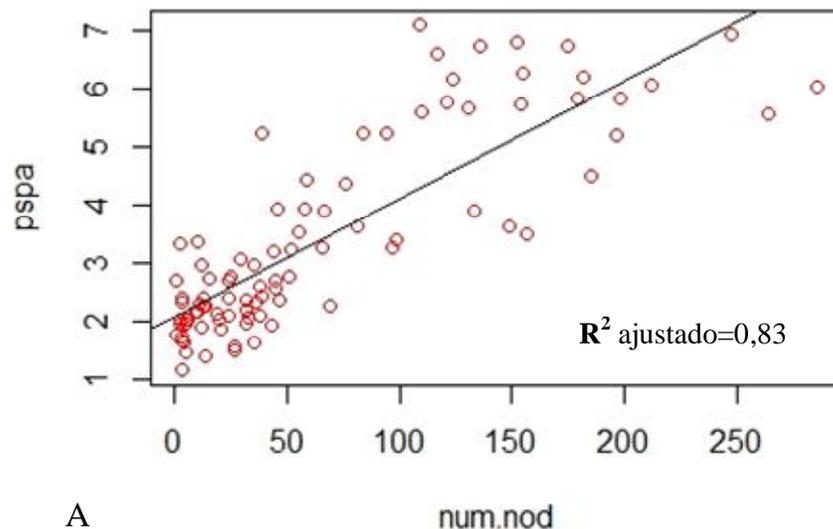


Figura 17. Peso seco promedio de la parte aérea (en g), por maceta, obtenidos en plantas de soja sembradas a los 2 y 7 días luego de tratadas las semillas. Se muestran cada uno de los tratamientos (4 repeticiones), con sus respectivos errores estándar. Arriba los tratamientos realizados con inoculante soporte turba y abajo los utilizados con inoculantes soporte líquido. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona; C+T+M: fungicida compuesto; Imi: imidacloprid. Las letras indican comparaciones estadísticas dentro de la misma siembra (Tukey 95% de confianza). Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los 2 días y minúsculas de la siembra a los 7 días.

Se registraron diferencias entre los distintos tratamientos y los controles del experimento ($F= 34,9$; $p<0,05$), así como en la interacción tratamiento por tiempo ($F=2,0$; $p<0,05$). Debido a que esta interacción resultó significativa, se analizó cada tiempo trabajado por separado.

El metil antranilato utilizado con inoculante en soporte turba no evidenció diferencias estadísticamente significativas en el peso seco de la parte aérea con el control para las siembras realizadas 2 y 7 días luego que las semillas fueran tratadas (Figura 17). Esta variable (peso seco de la parte aérea) disminuye estadísticamente para el resto de los productos evaluados en relación a los controles (Figura 17). Al correlacionar el peso seco de la parte aérea con los parámetros de nodulación (número y peso seco), se observa que ambas correlaciones del peso seco de la parte aérea resultaron significativas ($t= 14,4$; $p< 0,05$, para número de nódulos y $t= 17,1$; $p< 0,05$ para peso seco de nódulos, Figura 18). Por lo tanto esta variable también está aportando información indirecta de la FBN realizada por la planta.



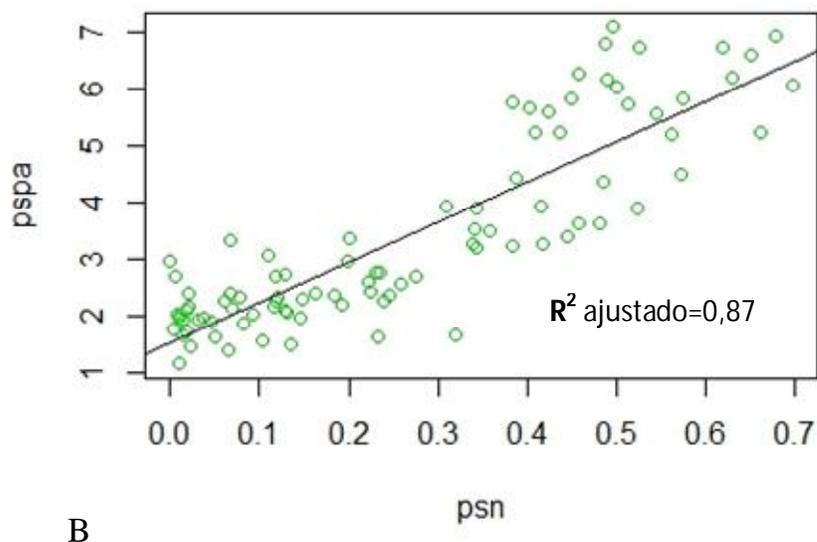


Figura 18. Correlaciones entre el Peso seco de la parte aérea (PSPA) con: número de nódulos (A) y peso seco de nódulos (B) (n = 4).

A mi entender, la interacción entre los repelentes trabajados y alguna especie o cepa de rizobio no ha sido evaluada previamente de manera técnica o científica. Al menos no se encontraron publicaciones técnicas o científicas disponibles que así lo demuestren. Solo se menciona este aspecto en una recomendación de la etiqueta de Draza® (metiocarb), aconsejando que luego de inoculada la semilla no se debe esperar más de 2 días para su siembra (<http://www.agromil.com.uy/productos-bayer-draza.html>). No obstante eso, no se mencionan trabajos científicos que respalden dicha recomendación.

En el caso de los productos evaluados a nivel comparativo (fungicida C+T+M e insecticida-imidacloprid) con los repelentes químicos, se hallaron resultados disímiles en cuanto a la toxicidad del fungicida e insecticida con los rizobios. En el caso del C+T+M, y también en experimentos de invernáculo, el número de nódulos en plantas sembradas a las 24 hs luego de tratadas con un formulado que incluía thiram, y otras con metalaxil, disminuyó estadísticamente en relación al control, no así el peso seco de los mismos (Revellin *et al.* 1993). En cambio, para productos formulados con carbendazim, sí se observa una disminución del número y peso de

los nódulos. Cabe destacar que en el trabajo de Ravellin *et al.* (1993), la cantidad de ingrediente activo en el formulado difiere del utilizado en este estudio. Para el carbendazim, la proporción de ingrediente activo empleada de Ravellin *et al.* (1993) es menor; la de thiram y metalaxil, mayor. En contraste con este estudio, no hubo una disminución significativa del peso seco de nódulos con un formulado a base de carbendazim más thiram con *B. japonicum* pero sí una con *B. elkanii* (Zilli *et al.* 2009). En cuanto a imidacloprid, y a diferencia de este estudio, habría evidencias que no traería impactos negativos en la nodulación en raíces de frijoles también inoculados con *Rhizobium* spp (Trotuş *et al.* 1996). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la toxicidad de los productos difiere entre especies y cepas de rizobios. Cabe destacar además, que el imidacloprid además de ser un insecticida, también posee cualidades repelentes para pájaros negros en arroz y trigo (Avery *et al.* 1993; Avery *et al.* 1994).

A diferencia de la cámara de crecimiento, en invernáculo se encontraron diferencias entre el peso seco de la parte aérea del control y el resto de los tratamientos, a excepción del metil antranilato con inoculante en soporte turba, donde no existieron diferencias significativas. Asimismo, en invernáculo se obtuvo una correlación significativa entre el peso seco de la parte aérea y los parámetros de nodulación, con alta correlación (R^2). En este caso, esta medida indirecta de la FBN pudo expresarse debido a que las condiciones ambientales del invernáculo son más parecidas a las del campo (luz y fotoperiodo natural, temperatura ambiente y espacio para el desarrollo foliar) si se comparan con la cámara de crecimiento. No obstante, es de destacar que, esta cámara de crecimiento nos permite tener resultados preliminares de nodulación en los casos en que no se pueden realizar experimentos de invernáculo, ya sea por la época del año o por no contar con dicha infraestructura. A fin de completar la investigación de los efectos de los repelentes químicos sobre los rizobios, será necesario evaluar estos productos a campo, donde se obtiene una respuesta más completa e integrada de la interacción con los rizobios. Dicho experimento no se pudo realizar en el marco de esta tesis por los tiempos biológicos en que se llevó a cabo.

Para el caso del invernáculo, donde el peso de la parte aérea aportó información de la FBN, se observaron las plantas amarillentas y con muy menor tamaño (Figura 19).

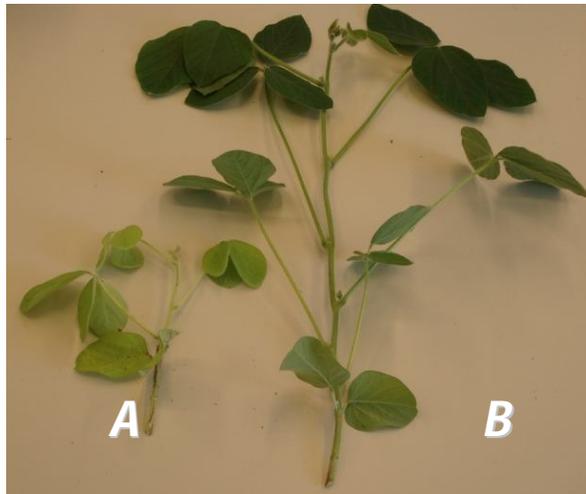


Figura 19. Parte aérea de las plantas cultivadas en invernáculo. A: Control negativo sin inoculante; B: Control con inoculante pero sin producto.

Al analizar todos los recuentos de rizobios viables sobre las semillas y los resultados de nodulación de las plantas provenientes de las mismas, se encuentra una coherencia entre los resultados. En los recuentos, solo se registraron valores que superaban el orden de 10^3 en los controles y el metil antranilato (turba y líquido) no presentando diferencias significativas entre ellos. Cuando analizamos los parámetros de nodulación así como la parte aérea se obtuvieron con este repelente los mayores valores e incluso en algún caso superando estadísticamente al control. Por lo tanto, podemos afirmar que una mayor carga bacteriana en la semilla repercutió en una mejor nodulación (con nódulos más grandes y en mayor cantidad), mejor desarrollo del follaje y, consecuentemente, en un mayor rendimiento del grano (Zilli *et al.* 2009).

3.4. CONSIDERACIONES FINALES

Al analizar los resultados obtenidos para los tres repelentes (Cuadro 5), la utilización de éstos aplicados a la semilla de soja para prevenir el daño de aves en plántulas podría ser factible.

Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos con los repelentes. El símbolo √ hace referencia a un resultado favorable. La cruz (X) hace referencia a uno desfavorable, mientras el símbolo (---) indica que no se realizó la evaluación específica con este producto. Las referencias entre paréntesis indican: 2d: ese resultado es favorable solo para semillas hasta 2 días luego del tratamiento de la semilla; T: para sustrato turba. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona.

	Toxicidad de rizobios sobre discos de papel	Viabilidad de rizobios sobre la semilla	Párametros nodulación en cámara de crecimiento	Párametros nodulación en invernáculo	Permanencia en cotiledones
Met	√	X	√ (2 d)	X	---
MA	X	√ (T)	√	√ (T)	X
AQ	√	X	√ (2 d)	√ (2 d T)	√

Para el caso del metiocarb (bajo su nombre comercial de Draza®), su inocuidad con el rizobio debería ser verificada con más estudios, dados los resultados de disminución en la nodulación de semillas sembradas a los 7 días posteriores de su tratamiento para la situación de cámara de crecimiento y toxicidad en invernáculo (2 y 7 días). No obstante, no se descarta que sea un candidato para ser utilizado no más allá de 2 días posterior al tratamiento de la semilla, como se observa en la recomendación de la etiqueta de dicho producto (<http://www.agromil.com.uy/productos-bayer-draza.html>). Esto se basa en que no se observó, en este estudio, una disminución significativa en los parámetros de nodulación en la siembra de semillas luego de 2 días de tratadas en situación de

cámara de crecimiento. No se midió la prueba de penetración y permanencia en cotiledones por ser un producto registrado para este uso desde hace ya varios años.

El metil antranilato, en tanto, sería un buen candidato para ser utilizado con inoculante en soporte turba, debido a que, los parámetros de nodulación aumentaron significativamente con este soporte, lo cual conlleva a que no exista una disminución significativa en el peso seco de la parte aérea. No obstante eso, se observó en la etapa *In vitro* del estudio (pruebas en discos de papel) una alta toxicidad, que puede ser debida a dos motivos. Por un lado, a que el compuesto sea altamente difusible en agar y se extendiera más rápidamente por toda la placa en comparación con los otros compuestos (Johnen y Drew 1977 en Mohamed Ahmed *et al.* 2007). Por otro lado, se postula en este trabajo que este repelente, al ser colocado en la semilla junto con la turba, cumpla una función de protección que no permita la inhibición y muerte de los rizobios. Un aspecto que sin duda debe ser mejorado para la utilización comercial del repelente, es el aumento de la permanencia del producto en los cotiledones, aunque por el momento no se conoce la cantidad de ppm necesarias en los cotiledones para que este producto provoque un efecto repelente (y, por ende, no se puede inferir si la cantidad de producto que permaneció en los cotiledones en este estudio sería suficiente para repeler a las aves). Ensayos realizados en aviario para probar la efectividad del repelente Rayén® (metil antranilato 30%) en aplicación foliar de cotiledones de soja, resultaron en porcentajes de repelencia superiores al 80% con una dosis de 4 L/Ha del repelente (Olivera y Rodríguez, en prensa). Desafortunadamente, en dichos experimentos no se pudo realizar el análisis de residuos correspondiente debido a que el Laboratorio de residuos de Plaguicidas de la DGSSAA (MGAP) no contaba con la técnica necesaria para realizar el tratamiento de las muestras. De todos modos, dados los resultados favorables de repelencia encontrados con este producto y la compatibilidad que existe con el inoculante para semillas de soja, sería pertinente, completar estos estudios a fin de dilucidar si las ppm presentes en los cotiledones están en la dosis efectivamente repelente. Asimismo, sería válido explorar un cambio en la formulación del producto (modificación viscosidad, coadyuvantes, etc.), para facilitar la entrada del mismo a la semilla.

Finalmente, la antraquinona debería ser utilizada con inoculante en turba y las semillas sembradas antes de los 2 días posteriores al tratamiento, para evitar una disminución significativa de los parámetros de nodulación. Como mencionamos en este trabajo, este tiempo (2 días) es reducido para la logística actual de los sistemas agrícolas. Consecuentemente, deberían realizarse estudios adicionales para conocer con certeza hasta que momento la nodulación no disminuye significativamente y si es posible tecnológicamente superar este problema. En relación a las pruebas de permanencia en los cotiledones, los residuos encontrados (47,6% y 61,1% de las ppm agregadas a las semillas) son superiores a los registrados en los cotiledones cuando se realizaba la aplicación foliar del producto. Puesto que, con la aplicación foliar del producto se obtuvieron buenos niveles de repelencia con palomas torcazas (Olivera y Rodríguez, en prensa), serían esperables resultados satisfactorios de repelencia en el producto aplicado como curasemilla, aunque deberían realizarse los ensayos de repelencia correspondientes para corroborar este efecto. En el transcurso de la realización de este trabajo, se registró en Uruguay y a nivel comercial un repelente a base de antraquinona (92%). No se encontró bibliografía que estudiara la interacción de este producto con el inoculante ni la permanencia del ingrediente activo en los cotiledones luego de emergida la plántula, aunque sí se encontró un trabajo mostrando los resultados de efectividad del repelente aplicados a la semilla para prevenir el daño de aves (<http://www.calister.com.uy/wp-content/files-mf/1381238624EFICACIADEREPEL1000.pdf>). Cabe destacar que, son necesarios evaluaciones adicionales que midan la eficiencia de este producto como repelente de aves que dañan la soja, debido a que el estudio mencionado se realizó en un solo ambiente y sin repeticiones dentro del ensayo, condiciones esenciales para los experimentos a campo, a fin de medir más fehacientemente la eficiencia del producto. Al realizar experimentos de eficiencia en diferentes tipos de ambientes, se puede tener la respuesta del repelente en distintos escenarios con diferentes características (presión de aves, implantación del cultivo, factores del paisaje, ambientales, etc.) y consideramos que en este tipo de investigaciones es imprescindible captar la variabilidad de respuestas del producto evaluado. Como mencionamos, este experimento se realizó solo en una situación, la cual correspondió

a baja presión de aves: el autor menciona que esto se debió a la presencia de alimento más apetecible que la soja, en los alrededores del ensayo. En estas condiciones es esperable que las palomas opten por un alimento alternativo, no atacando la soja y haciendo al repelente más efectivo.

Al ordenar los cinco productos químicos estudiados (repelentes, fungicida e insecticida) en función de su toxicidad sobre los rizobios del inoculante, de forma general se ubicaría en primer lugar y como más tóxico para los rizobios el metiocarb, seguido por el imidacloprid y el C+T+M; posteriormente seguiría la antraquinona y para terminar el metil antranilato, siendo el producto más inocuo y compatible con el inoculante. De modo que, en base a los resultados de este trabajo, debería tenerse precaución en el uso de metiocarb como repelente para soja en el momento de la emergencia pues, a la dosis que se utiliza actualmente en Uruguay, además de resultar más tóxico para los rizobios que el fungicida e insecticida utilizados, es un producto categoría Ib (producto muy peligroso). Si bien el metiocarb es un repelente conocido y evaluado internacionalmente (Stickley e Ingram 1976; Tobin *et al.* 1989; Cummings *et al.* 1992) y está registrado en nuestro país desde el año 1980, no se han encontrado al presente estudios que optimicen su uso respecto al escenario productivo actual. Al presente, la población de palomas torcaza es cada vez mayor y las mismas se han adaptado a comer cotiledones de soja, debido a la gran oferta temprana en la primavera de plántulas de este cultivo, generándole grandes daños en la implantación. Asimismo, la soja es actualmente el cultivo predominante en nuestro territorio, representando el 86% del área sembrada (DIEA 2012). Este escenario es, indudablemente, diferente al escenario en el cuál se evaluó la eficacia del metiocarb como repelente para aves (Calvi *et al.* 1976), y podría tener implicancias en su validez a escala comercial. Indudablemente, una disminución de la dosis de metiocarb a utilizar es un aspecto a examinar en futuros estudios, debido a que una dosis menor podría ser menos nociva para la semilla, además de disminuir el posible impacto ambiental secundario. Asimismo, debería estudiarse la cantidad de residuos de metiocarb (ppm) que permanecen en los cotiledones. Por ser un producto sistémico, se esperaría que esta cantidad sea muy alta, lo cual también podría hacer viable utilizar una dosis menor. Finalmente, al tener el metiocarb propiedades

insecticidas, podría considerarse en reemplazo del imidacloprid, como un fitosanitario de doble propósito.

La incorporación de estos repelentes al mercado representaría nuevas medidas de protección del cultivo de soja a los daños de aves y más inocua para el ambiente y los rizobios del inoculante. Asimismo representan una herramienta de manejo alternativo al uso de métodos letales ilegales como los cebos tóxicos y la conservación de los rizobios del inoculante. Por ello, sería importante promover la investigación para mejorar y adaptar nuevas sustancias repelentes para prevenir el daño de aves en soja. Tanto el metil antranilato como la antraquinona son inocuas para el ambiente (categoría IV de toxicidad) y efectivas para disminuir el consumo de semillas por las aves (Addy Orduna y Canavelli 2010). Asimismo, el metiocarb, con un uso revisado y optimizado, podría potencialmente ser de ayuda. Finalmente, sería también valioso explorar en la eficacia y viabilidad de uso de nuevas sustancias repelentes provenientes de compuestos orgánicos (aceite de neem, compuestos fenólicos de la familia de los ácidos cinámicos, terpenos cítricos, etc.), las cuales, dada su inocuidad, es menos probable que sean tóxicas para los microorganismos del suelo. En todos los casos, resta verificar si estos repelentes combinados con otros productos (como insecticidas y/o fungicidas) no manifestarían un efecto agregado de toxicidad que fuera perjudicial tanto para la nacencia de la semilla como para los rizobios.

4. CONCLUSIONES

La presencia de los repelentes químicos evaluados en este estudio (metil antranilato, y antraquinona) en los cotiledones de soja varió según el producto. Lo que se recuperó de metil antranilato respecto a lo que se le aplicó a la semilla fue menor del 1%, mientras que con la antraquinona, el porcentaje que se recuperó en los cotiledones (54%) sería aceptable desde el punto de vista del potencial efecto repelente sobre palomas.

El metiocarb, el metil antranilato, y la antraquinona no afectaron la nacencia de las semillas.

La sobrevivencia de los rizobios del inoculante y su capacidad de nodular varió con los repelentes. El metil antranilato no disminuyó la sobrevivencia de los rizobios sobre la cubierta de la semilla, y la capacidad de nodular de los rizobios no fue afectada hasta la siembra de las semillas tratadas en los 7 días posteriores al tratamiento. Con la antraquinona, la sobrevivencia de rizobios sobre la semilla se vió disminuida; la capacidad de nodular de los rizobios no fue disminuida para las semillas sembradas luego de 2 días de tratadas. Por último, con el metiocarb también disminuyó la sobrevivencia de los rizobios sobre la semilla y la capacidad de nodular de los mismos. En estos resultados influyeron los sustratos del inoculante utilizados (turba o líquido).

En relación a la toxicidad comparada con los otros productos testados (fungicida e insecticida), el metiocarb sería más tóxico para los rizobios que el fungicida e insecticida, mientras la antraquinona y el metil antranilato serían de menor toxicidad.

Resta por evaluar los costos y beneficios de aumentar la permanencia del metil antranilato en los cotiledones y disminuir la toxicidad de los otros dos repelentes sobre los rizobios.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Addy Orduna L, Canavelli S, Benzaquin M, Zaccagnini M.E. 2010. Repelencia de antranilato de metilo en granos de girasol para paloma mediana (*Zenaida auriculata*). Agricultura Sustentable 2010. Actualización Técnica. Proyecto Regional Agrícola - 630021. Estación Experimental Agropecuaria Paraná Serie Extensión n° 58: 66-70.
- Addy Orduna L, Canavelli S. 2010. Químicos para el manejo del daño por aves en cultivos. Estación Experimental Agropecuaria INTA Paraná. Serie Técnica N°58:1-78.
- Arias MV, Rucks PM. 2012. Análisis comparativo de tres productores de feedlots en los departamentos de Flores y Soriano en Uruguay. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Administración de Agronegocios, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 1-37.
- Avery ML, Decker D, Fisher D. 1994. Cage and flight pen evaluation of avian repellency and hazard associated with imidacloprid-treated. Crop Protection. Vol 13: 535-540.
- Avery ML, Decker D, Fisher D, Stafford T. 1993. Responses of captive blackbirds to a new insecticidal seed treatment. Journal Wildlife Management 57: 652-656.
- Avery ML, Humphrey JS, Decker DG. 1997. Feeding deterrence of anthraquinone, anthracene, and anthrone to rice-eating birds. Journal of Wildlife Management 61: 1359–1365.
- Avery ML, Humphrey J, Primus T, Decker DG, McGrane A.1998. Anthraquinone protects rice seed from birds. Crop Protection 17 (3): 225-230.
- Avery ML, Tillman EA, Laukert CC. 2001. Evaluation of chemical repellents for reducing crop damage by dickcissels in Venezuela. International Journal of Pest Management 47: 311–314.

- Ayansina AD, Oso BA. 2006. Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. *African Journal of Biotechnology*. 5: 129-132.
- Bernal G, Suarez A, Perez M, Campana D. 2002. Inoculación de la semilla de leguminosas con la bacteria *Rhizobium*. Plegable Divulgativo No. 195. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. 1-8.
- Bewley JD, Black M. 1978. The structure of seeds and their food reserves. En: Bewley JD, Black M. (Eds.). *Physiology and Biochemistry of seeds*. Vol 1. Berlin. Springer-Verlag. 7-37.
- Bishop J, McKay H, Parrott D, Allan J. 2003. Review of international research literature regarding the effectiveness of auditory bird scaring techniques and potential alternatives. 14 de junio del 13. <http://archive.defra.gov.uk/environment/quality/noise/research/birdscaring/bird-scaring.pdf>. 52.
- Brockwell J, Bottomley PJ. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 683–697.
- Blum A. 2007. Caracterización del cultivo de soja y de su complejo agroindustrial. En: Blum A, Narbondo I, Oyhantcabal G, Sancho D. *Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. La nueva colonización*. Montevideo, I. Rosgal S.A. 7-58.
- Bruggers R. 1998. Control Integrado de Aves Plaga. Reporte Técnico Final. Proyectos TCP/RLA/8965 (A)/2363/6721. 1- 22.
- Bruggers RL, Zaccagnini ME. 1994. Vertebrate Pest Problems Related to Agricultural Production and Applied Research in Argentina. *Vida Silvestre Neotropical* 3(2): 71-83.
- Bucher E. 1998. Palomas: biología y dinámica poblacional. En Rodríguez EN, Zaccagnini ME (Eds.) "Manual de Capacitación sobre Manejo Integrado de Aves Perjudiciales a la Agricultura". Organización de las Naciones Unidas

para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Proyecto "Control Integrado de Aves Plaga". Uruguay- Argentina. 1-171.

Bucher E. 1986. The influence of changes in regional land-use patterns of Zenaida Dove populations. In: Pinowski J, Summers-Smith JO (Eds). Granivorous Birds in the Agricultural Landscape. Proceedings of General Meetings of the Working Group on Granivorous Birds INTECOL, Warszawa. 291-303.

Bucher EH, Orueta A. 1977. Ecología de la reproducción de la paloma Zenaida auriculata. II. Época de cría, suceso y productividad en las colonias de nidificación de Córdoba. Ecosur 4 (8): 157-185.

Calvi C, Besser JF, De Geazio JW, Mott DF. 1976. Protecting Uruguayan Crops from bird damage with methiocarb and 4-aminopyridine. en Proc. 7th Bird Control Seminar, Bowling Green State University, Bowling Green, Ohio. 255-258.

Calvo M. 2006. Alimentación de la Paloma torcaza (*Zenaida auriculata*) en el norte de Córdoba, Argentina. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba; Argentina. 1-43.

Campo RJ, Hungria M. 2000. Compatibilidad de uso de inoculante e fungicidas no tratamiento de semillas de soja. Circular Técnica N.26, Embrapa Soja. 1-32.

Canavelli S. 2010. Consideraciones de manejo para disminuir los daños por aves en girasol. INTA – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información Técnica Cultivos de Verano. Campaña 2010. Miscelánea 118: 175-190.

Catroux G, Hartmann A, Revellin C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant Soil 230: 21-30.

Centeno J. 1999. Study on the Blackbird, *Agelaius ruficapillus* Vieillot, in the rice production areas of southern Rio Grande do Sul, Brazil: Basis for a population control management program. Wageningen: LUW. Tese (Doutorado)– Landbouwwetenschappelijke Universiteit Wageningen. 1-116.

- Clark L. 1998. Physiological, ecological and evolutionary bases for the avoidance of chemical irritants by birds. In Current ornithology, Nolan V. y E. Ketterson (Eds.) Vol 14. 1-37.
- Contreras AJ, Tejera AG, García JA. 2003. Las aves como plaga, control y manejo. Ciencia UANL, 6 (1): 93-98.
- Cummings, J.L., Avery, M.L., Mathre, O., Wilson, E.A., York, D.L., Engeman, R.M., Pochop, P. A. y J. E. Davis. 2002. Field evaluation of Flight Control™ to reduce blackbird damage to newly planted rice. Wildlife Society Bulletin 30 816–820.
- Cummings J, Otis D, Davis J. 1992. Dimethyl and methyl anthranilate and methiocarb to deter feeding in captive Canada geese and mallards. Journal of Wildlife Management 56: 349-355.
- De Grazio J. 1985. Bird Pest Problems in Uruguay with special notations on damage appraisal methodology. Unpublished Trip Report, Denver Wildlife Research Centre, Denver, Colorado 80225-0266 U.S.A. 1-18.
- Díaz R. 2006. Desafíos de la Intensificación Agrícola en el Uruguay. Informe preparado para el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. [En línea]. 29 mayo 2012 [http://www.iica.org.uy/index.php?option=com_content&view=article&id=477:agosto 2006&catid=70:coyuntura-agropecuaria&Itemid=112](http://www.iica.org.uy/index.php?option=com_content&view=article&id=477:agosto%202006&catid=70:coyuntura-agropecuaria&Itemid=112).
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias), 2011. Anuario Estadístico Agropecuario. 20 mayo 2012. Extraído de <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU>.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias), 2012. Anuario Estadístico Agropecuario. 26 diciembre 2013. Extraído de <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU>.

- Dolbeer RA, Seamans TW, Blackwell BF, Belant JL. 1998. Anthraquinone formulation (Flight Control™) shows promise as avian feeding repellent. *Journal of Wildlife Management*, 62: 1558–1564.
- Feare CJ. 1989. The changing fortunes of an agricultural bird pest: the European starling. *Agricultural Zoology Reviews* 3: 317-342.
- Fehr W, Caviness C, Burmood D, Pennington J. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, glycine max (L.) Merrill. *Crop Science*. 11: 929-931.
- Ferrés A. 1994. Los feedlots en Uruguay. *Revista de Fucra*, 179: 15-16.
- Gamba F. 2008. Evaluación comparativa de una nueva formulación de fungicida curasemilla para el control de enfermedades sobre partidas de semilla de soja de calidad comprometida. 21 setiembre 2012 http://www.calister.com.uy/wpcontent/files_mf/1311179448Soja_Curasemilla_ENVION_Facultad_de_Agronoma.pdf
- González, 2012. Eficiencia de los fungicidas para el control de enfermedades en semillas de soja. 15 diciembre 2013. http://www.calister.com.uy/wp-content/files_mf/1372708431ResultadoCalister2012INIA.pdf
- Kremer RJ, Peterson HL. 1983. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*. 45:1790-1794.
- Khokhar SN. 1990. Bradyrhizobium compatibility with *Glycine Max*. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, Vol 11 (1): 56-58.
- Labandera C. 2003. Soja: Inoculantes e inoculación. *Revista del Pan agropecuario* 107. 53-54.
- Luke MA, Frodberg JE, Doose GM, Mosumoto HT. 1981. Improved multiresidue chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce using flame photometric and electrolytic

conductivity detectors. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 64: 1187-1195.

Lupwayi NZ, Olsen PE, Sande ES. 2000. Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*. 65: 259-270.

Martensson AM. 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biology y Biochemistry*. Vol 24. N° 5. 435-445.

Mason JR, Clark L. 1997. Avian repellents: options, modes of action, and economic considerations. In *Repellents. Wildlife Management*. National Wildlife Research Centre, Fort Collins, Colorado 371–391.

Mason J, Adams M, Clark L. 1989. Anthranilate repellency to starlings: chemical correlates and sensory perception. *Journal. Wildlife. Management*. 53: 55-64.

Materon LA. Weaver RW. 1984. Survival of *Rhizobium trifolii* on toxic and non-toxic arrowleaf clover seeds. *Soil Biology and Biochemistry* 16:533-535.

Mayz-Figueroa J. 2004. Fijación Biológica de Nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 1-20.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2009. Colección nacional de cepas de rizobios. [www.cebra.com.uy/.../Coleccion-de- Rhizobium-CATALOGO.FINAL-2009](http://www.cebra.com.uy/.../Coleccion-de-Rhizobium-CATALOGO.FINAL-2009). Consultado 26 de febrero de 2014.

Mohamed Ahmed TH, Elsheikh EA, Mahdi A.A. 2007. The in vitro Compatibility of some *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Strains with Fungicides. *African Crop Science Conference Proceedings* 8. 1171-1178.

Montero F, Sagardoy M. 2006. Uso de un protector Bacteriano sobre la nodulación de plantas de soja. <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/uso-protector-bacteriano-sobre-t689/415-p0.htm>.

Mubeen F, Shiekh MA, Iqbal T. Khan QM, Malik KA, Hafeez FY. 2006. In vitro investigations to explore the toxicity of fungicides for plant growth promoting rhizobacteria. *Pakistan Journal of Botany* 38:1261-1269.

- Murton R, Bucher E, Nores M, Gomez E, Reartes J. 1974. The Ecology of the Eared Dove (*Zenaida auriculata*) in Argentina. *The Condor* 76 (1): 80-88.
- Obaton M, Rollier M. 1970 L'inoculation du soja: influence de la qualité de l'inoculum sur le rendement en grain et la richesse en proteine de la récolte. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 1174–1189. En: Catroux, *et al.*, 2001.
- Olivera L, Rodríguez E. En prensa. Incremento el rendimiento de cultivos oleaginosos y cerealeros invernales mediante el manejo ambientalmente sustentable del daño de aves. Proyecto FPTA-284. INIA/COPAGRAN/MGAP. 1-21.
- Prévost D, Jain DK, Bordeleau LM. 1990. Growth inhibition of rhizobia isolated from arctic légumes (*Astragalus* and *Oxytropis* spp.) and sainfoin (*Onobrychis viciifolià*) by sainfoin seed diffusâtes. *Phytoprotection* 71: 113-119.
- Revellin C, Leterme P, Catroux P. 1993. Effect of some fungicide seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean [*Glycine max.* (L) Merr.]. *Biology and Fertility of Soils* 16: 211-214.
- Rodríguez E. 1994. An Integrated Strategy to decrease Eared Dove damage in Sunflowers. PhD Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 1-92.
- Rodríguez E. 1998. Control letal de aves perjudiciales a la agricultura. En: Rodríguez, E.N y M. E. Zaccagnini (Eds). *Manual de capacitación sobre el Manejo integrado de aves perjudiciales a la agricultura.* FAO. 1-147.
- Rodríguez E, Tiscornia G, Olivera L. 2011. Disminución del daño por aves en pequeños predios. Proyecto FPTA-236 Estrategia de disminución del daño por aves en pequeños predios de alto valor utilizando métodos no contaminantes. INIA/COPAGRAN/MGAP. 1-64.
- Salema MP, Parker CA, Kidby DK, Chatel DL. 1982. Study of Rhizobium in the legume rhizosphere. 213- 217. In P. H. Graham y S. C. Harris (ed.),

Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

Skipper HD, Palmer JH, Giddens JE, Woodruff JM. 1980. Evaluation of commercial soybean inoculants from South Carolina and Georgia. *Agron. J.* 72: 673–674.

Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for Rhizobia. *Methods in Legume-Rhizobium technology*. Springer-Verlag, New York. 332-341.

Stickley AR. Jr. Ingram CR. 1976. Methiocarb as a bird repellent for mature sweet corn. *Proceeding Bird Control Seminar 7*: 228-238.

Sutton S. 2011. Accuracy of plates counts. *Journal of Validation Technology* 17 (3): 42 -46.

Tobin ME. Dolbeer RA. Webster CM. 1989. Alternate-row treatment with the repellent methiocarb to protect cherry orchards from birds. *Crop Protection* Vol. 8 (6): 461–465

Tracey J, Saunders GR. 2010. A technique to estimate bird damage in wine grapes. *Crop Protection*. 29: 435-439.

Tracey J, Bomford M, Hart Q, Saunders G, Sinclair R. 2007. *Managing Bird Damage to Fruit and Other Horticultural Crops*. Bureau of Rural Sciences, Canberra. Commonwealth of Australia 1-268.

Trotuş E, Ghizdavu I, Guran M. 1996. Experimental results concerning the compatibility among different fungicides, insecticides and bacterial preparations (*Rhizobium* spp.) used for treating bean seeds. *Cercetări Agronomice în Moldova* Vol. 29: 105-109.

Tu CM. 1980. Effects of fungicides on growth of *Rhizobium japonicum* in vitro. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 25: 364- 368.

Tu CM. 1982. Effects of some pesticides on *Rhizobium japonicum* and on the seed germination and pathogens of soybean. *Chemosphere* Vol. 11 (10): 1027–1033.

- Weaver RW, Frederick L. 1972. Effect of inoculum size on nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill, variety Ford. *Agronomy Journal*. 64, 597–599 pp. En: Catroux, *et al.*, 2001.
- Wemún S.A. 2010. Aves en agricultura: un problema que preocupa. Daños causados por la paloma mediana. Informe técnico *Revista Producción Setiembre/Octubre 2010*: 80-81.
- Werner S, Linz G, Carlson J, Pettit S, Tupper S, Santer M. 2011. Anthraquinone-based bird repellent for sunflower crops. *Applied Animal Behaviour Science* 129: 162–169.
- Wright EN. 1962. Experiments with anthraquinone and thiram to protect germinating maize against damage by birds. *Annals des Epiphytes* 13: 27–31.
- Zaroug MG, Munns DN. 1980. Screening strains of *Rhizobium* for the tropical legumes *Clitoria tearnatea* and *vigna trilobata* in soils of different pH. *Tropical Grasslands Vol. 14* (1): 28-33.
- Zilli JE, Ribeiro KG, Campo RJ, Hungria M. 2009. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 33: 917-923.

6. ANEXOS

6.1. MEDIO AGAR M-79. EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL

K_2HPO_4 : 0.5g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2g

NaCl: 0.1g

Manitol: 10g

Extracto levadura: 0.4g

Agua destilada: 1000 ml

Agar : 15g

Se corrige el pH que debe de ser entre 6,8 y 7.

6.2. MEDIO LÍQUIDO TY

Triptona: 5 g

Extracto de levadura: 3 g

CaCl₂.2H₂O: 1 g

Agua destilada: 1000 ml.

Se corrige el pH que debe de ser entre 6,8 y 7,2.