

# INFLUENCIA DE INOCULANTES Y FACTORES EDÁFICOS EN EL RENDIMIENTO DE LA SOYA

María C. Nápoles✉, G. González-Anta, J. C. Cabrera, M. Varela, E. Guevara, S. Meira, F. Noguerras y J. Cricco

**ABSTRACT.** The efficiency of biological nitrogen fixation is conditioned by different factors, mainly by every participant's role in soil, plant and microorganism interaction. This work evaluates the effect of some soil factors as pH, available phosphorus content, organic matter content, nitrates and *Bradyrhizobium* population, as well as two inoculants on soybean yield in different sites of Argentina. The analysis of factors proved that, despite everyone influenced on it, only pH, *Bradyrhizobium* population existing in the soils tested and inoculant quality have a significant effect on yield. Plants growing on acid soils with a low bacteria population, which had been inoculated with an induced biopreparation, showed higher yields.

**Key words:** *Bradyrhizobium*, soybean, edaphic factors

**RESUMEN.** La eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno está condicionada por diversos factores, fundamentalmente por el papel que desempeña cada uno de los participantes en esta interacción: el suelo, la planta y el microorganismo. En este trabajo se evalúa el efecto que ejercen algunos factores del suelo como el pH, contenido de fósforo disponible, contenido de materia orgánica, nitratos y población de *Bradyrhizobium*, así como dos inoculantes sobre el rendimiento del cultivo de soya en diferentes regiones de Argentina. El análisis de los factores demostró que aunque todos inciden, solo el pH, la población de *Bradyrhizobium* existente en los suelos estudiados y la calidad del inoculante empleado ejercen un efecto significativo sobre el rendimiento. Las plantas crecidas sobre suelos con pH ácido y una escasa población de bacterias, que fueron inoculadas con un biopreparado inducido, mostraron mayores rendimientos.

**Palabras clave:** *Bradyrhizobium*, soja, factores edáficos

## INTRODUCCIÓN

La producción de soya en el cono sur es responsable de aproximadamente el 50 % de la producción mundial de esta oleaginosa, que se desarrolla en ambientes edafoclimáticos muy diversos, desde el sur de la región pampeana en Argentina hasta la región del Cerrado en Brasil.

Es reconocido que la alta demanda de nitrógeno del cultivo es mayoritariamente cubierta a partir del proceso de fijación biológica de N atmosférico (FBN) mediante la simbiosis entre la leguminosa y los rizobios. El cultivo obtiene entre el 30 y 94 % de sus requerimientos de N a partir de esta simbiosis (1, 2).

El aporte del nitrógeno total absorbido por el cultivo a partir de la FBN, no obstante, es muy variable, ya que depende de diversos factores, como la presencia o no de

rizobios y su abundancia en el suelo, el género, la especie y cepas existentes en el suelo o inoculadas, las características físico-químicas de los suelos y condiciones ambientales (3, 4). Los factores abióticos incluyen: acidez del suelo, temperatura, disponibilidad de agua, limitaciones de nutrientes, textura del suelo y contenido de materia orgánica, mientras que los bióticos incluyen: producción de antibióticos y bacteriocinas, número y tipo de microorganismos residentes y predación selectiva por protozoos (5). Estos factores influyen en la capacidad de nodulación de las diferentes poblaciones de rizobios. Adicionalmente, la competitividad de nodulación de *Rhizobium* está determinada por su constitución genética (6) y la capacidad fisiológica para producir determinantes de la interacción (7).

Las prácticas biotecnológicas ofrecen una posible solución, de manera responsable, para mejorar la producción agrícola, atendiendo a las nuevas tendencias ambientales, impulsando el estudio de nuevas tecnologías, que permitan aumentar la producción agrícola y forestal en el marco de una agricultura sostenible. Una alternativa interesante lo es entonces la potenciación de las capacidades fisiológicas de los microorganismos del suelo, a partir de elementos inductores de sus genes involucrados en la interacción con las leguminosas (7), en pos de obtener inoculantes de calidad que incidan en la nutrición y salud de los cultivos.

Dra.C. María C. Nápoles, Investigadora Titular y Dr.C. J. C. Cabrera, Investigador Auxiliar del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal; Dr.C. M. Varela, Investigador Auxiliar del departamento de Matemática Aplicada, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700; G. González-Anta, Director de Desarrollo y Servicio Técnico; F. Noguerras, Supervisor Técnico de Ensayos y J. Cricco, Asistente Técnico de Desarrollo de la Empresa Rizobacter Argentina S.A.; Dr.C. E. Guevara y Ms.C. S. Meira, Investigadores Titulares del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Pergamino (INTA), Argentina.

✉ tere@inca.edu.cu

Este trabajo evalúa el efecto de dos inoculantes a base de *Bradyrhizobium* y diferentes condiciones edáficas sobre el rendimiento de la soya en distintos suelos argentinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo sobre diferentes suelos, en disímiles regiones de Argentina, para evaluar el efecto de dos inoculantes y determinados elementos del suelo como pH, contenido de fósforo disponible, contenido de materia orgánica, nitratos y población de *Bradyrhizobium*. La fecha de plantación fue la misma en todos los ensayos: época de primavera, específicamente en noviembre. Se empleó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones sobre una superficie de 15 000 m<sup>2</sup> para cada experimento, para evaluar el efecto de los inoculantes sobre el rendimiento del cultivo, que se determinó a los 140 días después de la siembra, como el peso total de granos obtenidos por hectárea.

Los resultados de cada experimento se evaluaron mediante la prueba LSD Fisher Alfa=0,05; DMS=0,01018. El análisis estadístico del rendimiento se presenta calculando el intervalo de confianza para  $p < 0.05$ .

El análisis de algunas características químicas del suelo en cada localidad, así como la presencia de *Bradyrhizobium*, según el método del número más probable (MNP), se muestran en la Tabla I. El muestreo se realizó tomando cinco submuestras de cada sitio experimental para conformar una muestra a analizar.

**Inoculantes empleados.** Se utilizaron dos inoculantes, uno sin inducir (producto comercial de la empresa Rizobacter Argentina S.A) y el otro inducido (12). Ambos productos contienen la cepa *Bradyrhizobium japonicum* E109 a una concentración final de  $1 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonias por mililitro de medio). La dosis de inoculación fue de 140 mL por cada 50 kg de semillas.

**Determinación del contenido de factores de nodulación en los inoculantes.** El contenido de factores Nod en ambos inóculos se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. El aislamiento y la purificación se realizaron siguiendo la metodología descrita por Laeremans (13). Luego de la purificación se disolvieron en 60 % de acetonitrilo y se analizaron mediante HPLC en una columna de fase reversa Nucleosil 100-5 C18 (4 x 250 mm) empleando elución isocrática de acetonitrilo-agua 15 %, 30 min y luego un gradiente lineal 30 min desde 15 hasta 40 % de acetonitrilo. El rango del flujo fue de 1 mL.min<sup>-1</sup> y el eluyente se monitoreó a 206 nm. Se determinó el perfil cromatográfico de las moléculas producidas de acuerdo al número, la distribución e intensidad relativa de los picos obtenidos.

**Influencia de los diferentes factores edáficos sobre el rendimiento.** Relación entre estos factores y la efectividad del inoculante. Mediante la prueba estadística X<sup>2</sup> se evaluó el efecto de algunos factores del suelo como pH, contenido de fósforo disponible, contenido de materia orgánica, nitratos y población de *Bradyrhizobium*, sobre el rendimiento promedio del cultivo de soya, dado por el promedio del peso de los granos por hectárea. Mediante esta prueba se evaluó también la relación de las diferentes características del suelo, con el hecho de que uno u otro inóculo haya sido más efectivo. En ambos casos, las variables se dividieron en clases según dos categorías: bajo o alto, considerando bajo para pH<7, fósforo<14, materia orgánica<4, nitrato<20 y población de *Bradyrhizobium*< $2 \times 10^5$ . Teniendo en cuenta los sitios donde se incrementó el rendimiento por el empleo de los inoculantes, estos se relacionaron con el criterio de bajo o alto para cada variable edáfica.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del contenido de factores Nod en los inóculos empleados mediante HPLC mostró un mayor

**Tabla I. Algunas características de los suelos estudiados pH mediante potenciometría (8)**

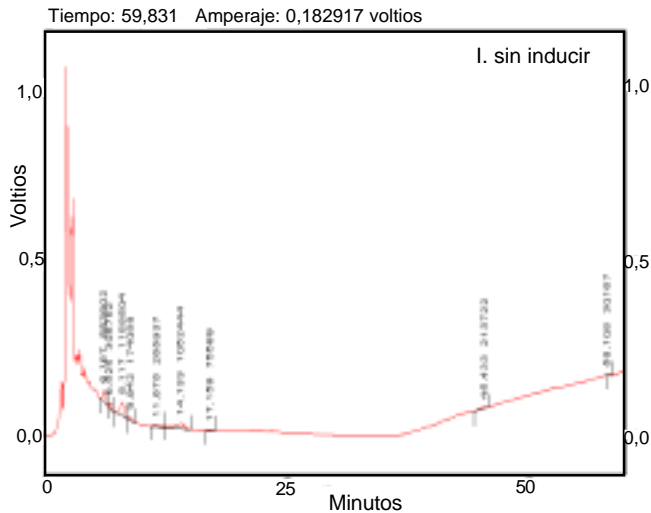
Localidad	Tipo de suelo	pH en agua 1: 2.5	Fósforo disponible (ppm)	MO (%)	N-Nitratos (ppm)	NMP <i>B.japonicum</i> bacterias.g <sup>-1</sup> de suelo
H. Vega	Hapludol éntico	6,24	11,4	4,2	7,9	>35,5 x10 <sup>4</sup>
Cnel Suárez	Argiudol típico	7,06	11,4	3,5	6,6	>35,5 x10 <sup>4</sup>
Napaleofú	Argiudol petrocálcico	7,3	34,5	6,4	31,0	>35,5 x10 <sup>4</sup>
Energía	Argiudol típico	6,2	10,4	5,8	15,7	1.13 x10 <sup>2</sup>
Rauch	Argiudol típico	5,82	7,0	5,2	19,0	>35,5 x10 <sup>4</sup>
Ferré	Argiudol típico	5.4	8.3	2.4	82	1.7x10 <sup>3</sup>
Pergamino	Argiudol típico	6.0	2.8	3.2	49.4	1.8 x10 <sup>7</sup>
Bragado	Hapludol típico	5.7	31.5	2.6	2.7	1.7 x10 <sup>5</sup>
Jesús María	Haplustol típico	6.1	41	2.3	24	1.7 x10 <sup>5</sup>
P. Muñoz	Argiudol Vértico	5.6	2.0	2.0	14.1	1.8 x10 <sup>5</sup>
Villaguay	Vertisol	6.4	83	2.8	28.6	6.6 x10 <sup>6</sup>
Bolívar	Hapludol éntico	5.5	7.5	2.2	10.9	5.8 x10 <sup>3</sup>

Fósforo disponible-extractable pH<7 (9)

Materia orgánica (10)

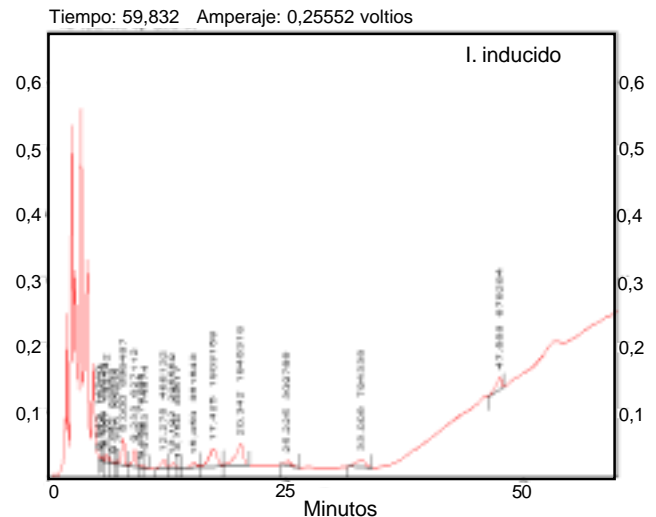
Nitratos N-NO<sub>3</sub>-ácido fenoldisulfónico (11)

número de picos, con más intensidad relativa en el inoculante inducido (Figura 1), lo que indica una mayor diversidad y concentración de estas moléculas en el biopreparado. Es posible que algunas estructuras coincidan en ambos biopreparados, dado que poseen la misma cepa de *Bradyrhizobium*. La diferencia en cuanto a cantidad y calidad en el resto de estas moléculas detectadas responde a diferencias en el medio de cultivo empleado para su multiplicación y excreción de metabolitos como los lipoquitooligosacáridos.



Sitios como Rauch y Villaguay exhibieron rendimientos más bajos, alrededor de 1800-2000 y 1300-1600 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. En el resto de las localidades el rendimiento fue superior, llegando a alcanzar los 5 277 kg.ha<sup>-1</sup> con el empleo del inoculante inducido en Bragado.

Si bien el número de nódulos no fue evaluado en este estudio, resultó superior para casi todos los tratamientos que contenían el inoculante inducido, lo que evidencia el papel de inducción ejercido por este inoculante.



**Figura 1. Perfil de factores Nod producidos por la cepa *B. japonicum* E109 en los inoculantes estudiados**

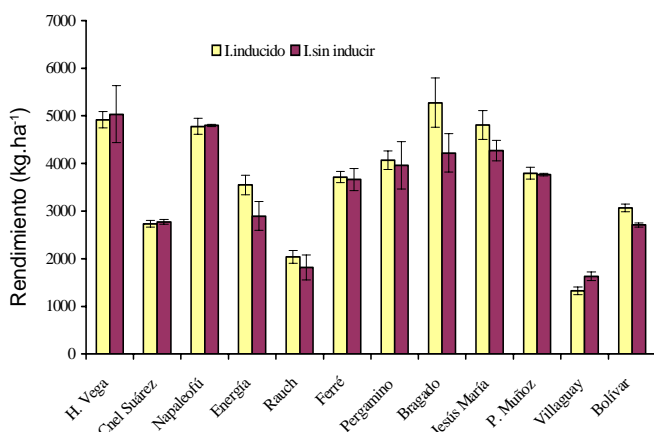
Este resultado coincide con los obtenidos al emplear medios de cultivo diferentes en cepas de *Bradyrhizobium elkanii* (7, 14).

Al analizar el comportamiento del rendimiento (Figura 2), se puede apreciar un resultado superior del inoculante inducido en cuatro de los 12 sitios experimentales (Energía, Bragado, Jesús María y Bolívar), mientras que el inoculante sin inducir fue estadísticamente superior solo en Villaguay. El resto de los siete sitios estudiados no ofrecieron diferencias estadísticamente significativas.

El análisis de los factores del suelo evaluados mostró que el contenido de fósforo, materia orgánica y nitratos no ejercieron una influencia significativa sobre los resultados en el rendimiento (Tabla II).

**Tabla II. Prueba chi-cuadrado de dependencia de los factores estudiados contra rendimiento y su significancia**

Factor	X <sup>2</sup>
pH	4.2*
Fósforo	0.06 ns
MO	1.99 ns
N-Nitratos	1.99 ns
NMP <i>B.japonicum</i>	8.57 **



Las barras indican intervalos de confianza para p<0.05

**Figura 2. Efecto de los inoculantes inducido y sin inducir sobre el rendimiento de la soya en diferentes sitios experimentales**

Sin embargo, el pH y la población naturalizada de *B. japonicum* en los suelos empleados sí determinaron una influencia significativa en el rendimiento, positiva cuando los valores de ambos parámetros fueron bajos. Según otros criterios (2), en suelos que no contienen población naturalizada de rizobios específicos para soya, se pueden esperar incrementos de rendimientos por efecto de una inoculación exitosa del orden de 500 hasta 3000 kg.ha<sup>-1</sup>.

La evaluación de los factores del suelo en relación con el efecto obtenido por cada inoculante empleado mostró que, de manera similar a lo encontrado con el rendimiento, solo los factores pH y la población de *Bradyrhizobium* ejercieron una influencia significativa sobre el efecto positivo hallado para los inoculantes (Tabla III).

**Tabla III. Prueba chi-cuadrado de dependencia entre las diferentes características del suelo y el efecto positivo de uno u otro inoculante**

Factor	X <sup>2</sup>
pH	3.36 *
Fósforo	0.17 ns
MO	0.17 ns
N-Nitratos	1.18 ns
NMP <i>B.japonicum</i>	3.36 *

Aunque existe un 66 % de casos, en los cuales independientemente de la condición de suelo, el inoculante inducido incrementó los rendimientos (Figura 2), hubo un efecto más claro y significativo de la efectividad de este biopreparado cuando el pH y la población de *Bradyrhizobium* fueron bajos. Nótese en los sitios Energía, Bragado, Jesús María y Bolívar, donde el suelo tiene un pH ácido y la población residente de *Bradyrhizobium* es relativamente baja, que el efecto del biopreparado inducido fue estadísticamente superior. Se ha demostrado que la adición de altos niveles de factores Nod a raíces de soja es capaz de restablecer el efecto nocivo causado por el estrés del pH ácido y las bajas temperaturas (15).

Teniendo en cuenta que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es responsable de un tercio del nitrógeno total que requiere la agricultura mundial (16), los mayores esfuerzos para potenciar la simbiosis se han centrado en las bacterias; es primordial que la cepa de *Rhizobium* seleccionada sea efectiva frente a las autóctonas en condiciones de campo. Una de las estrategias actuales es construir leguminosas que restrinjan la nodulación de cepas nativas y permitan el establecimiento de las cepas inoculadas, o la utilización de cepas que produzcan antibióticos para inhibir la nodulación de las cepas nativas. Sin embargo, una seria objeción al uso de esta estrategia reside en su impacto sobre las poblaciones microbianas de la rizosfera, ya que pueden inhibirse bacterias beneficiosas para el agroecosistema (17).

Nuestros intentos han estado basados en potenciar la capacidad fisiológica de las bacterias para producir los principales determinantes de la interacción mediante el diseño de sus medios de cultivo. Consideramos que la inclusión de inductores puede potenciar no solo la síntesis de factores de nodulación, sino activar otros determinantes esenciales para esta simbiosis, como son el sistema de secreción de proteínas (18) y la producción de polisacáridos (19).

La mejora de la simbiosis se obtendrá cuando se tengan en cuenta todos los factores que influyen en este proceso: microorganismo, planta, suelo y diferentes factores bióticos y abióticos, que pueden constituir un estrés o activador para cualquiera de los organismos que participan. Según algunos criterios (20), entramos a la era biotecnológica conociendo cada vez más sobre las leguminosas a nivel genético, pero solo pocas veces logramos traducir esta información en productividad.

## REFERENCIAS

- Hungria, M. y Campo, R. J. Economical and environmental benefits of inoculation and biological nitrogen fixation with the soybean: situation in South America. *En: Moscardi et al.* (eds), VII World Soybean Research Conference Foz do Iguassu, 2004, p. 488-498.
- Perticari, A. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Actas del Congreso Mundo Soja, Buenos Aires (Argentina), 2005, p. 121-126.
- Graham, P. H., y Vance, C. P. Legumes: importance and constraints to greater utilization. *Plant Physiol.*, 2003, vol. 131, p. 872-877.
- Dennison, R. F. y Kiers, E. T. Sustainable crop nutrition: constraints and opportunities. *En: Broadley, M. R., White, P. J.*, eds. Plant nutritional genomics. Oxford: Blackwell, 2005, 242-264p.
- Vlasaak, K. M. y Vanderleyden, J. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1997, vol. 16, p. 163-229.
- Luyten, E. y Vanderleyden, J. Survey of genes identified in *Sinorhizobium meliloti* spp., necessary for the development of an efficient symbiosis. *Eur. J. Soil Biol.* 2000, 36: 1-26.
- Nápoles, M. C.; Cabrera, J. C.; Luyten, E.; Dombrecht, B. y Vanderleyden, J. Study of the inducer effect of some compounds on synthesis and excretion of nodulation factors in different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2001, vol. 43, no. 1, p. 7-11.
- Black, C. A. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Inc, Publisher, Madison, Wisconsin USA. 1965.
- Bray, R. y Kurtz, L. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.*, 1945, vol. 59, p. 39-45.
- Walkley, A. y Black, A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.*, 1934, vol. 37, p. 29-38.
- Harper, H. The accurate determination of nitrates in soils. Phenoldisulfonic acid method. *Ind. Eng. Chem.*, 1924, vol. 16, p. 180-183.
- Nápoles, M. C.; Gutiérrez A. y Corbera, J. Patente Cubana 22 797. 2002.
- Laeremans, T.; Coolsaet, N.; Verreth, C.; Snoeck, C.; Hellings, N.; Vanderleyden, J. y Martínez-Romero, E. Functional redundancy of genes for sulphate activation enzymes in *Rhizobium* sp. BR 816. *Microbiology*. 1998, vol. 143, p. 3933-3942.
- Nápoles, M. C.; Luyten, E.; Dombrecht, B.; Laeremans, T.; Vanderleyden, J.; Costales, D.; Gutiérrez, A. y Corbera, J. Growth media modulating the symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium elkanii*. *Symbiosis*. 2005, vol. 38, no. 1, p. 87-98.
- Duzan, H. M.; Zhou, X.; Souleimanov A. y Smith, D. L. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.*, 2004, vol. 55, no. 408, p. 2641-2646.

16. Hoff, P. de y Hirsch, A. M. Nitrogen comes down to earth: report from the 5th European Nitrogen Fixation Conference. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2003, vol. 16, p. 371-375.
17. Felipe, M. R. de. Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del medio ambiente y la salud. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2004, vol. 70, p. 743-77.
18. Marie, C.; Deakin, W. J.; Ojanen-Reuhs, T.; Diallo, E.; Reuhs, B.; Broughton, W. J. y Perret, X. Tsl, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2004, vol. 16, p. 743-751.
19. Broughton, W. J.; Hanin, M.; Relic, B.; Kopcińska, J.; Golinowski, W.; Simsek, S.; Ojanen-Reuhs, T.; Reuhs, B.; Marie, C.; Kobayashi, H.; Bordogna, B.; Le Quéré, A.; Jabbouri, S.; Fellay, R.; Perret, X. y Dealkin, W. J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234-legume symbioses. *J. Bacteriol.* 2006, vol. 188, p. 3654-3663.
20. Catroux, G.; Hartmann, A. y Revellin, C. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil*, 2001, vol. 230, p. 21-30.

Recibido: 11 de agosto de 2008

Aceptado: 15 de mayo de 2009

