

Factores determinantes de la Nodulación

Edición ampliada y actualizada



Lic. (MSc) María Virginia Fernández Canigia

ISBN: 978-987-86-5482-9

Nitragin[®]
By Novozymes

Nº1 en
Inoculantes
desde 1898

Julio 2020

FACTORES DETERMINANTES DE LA NODULACIÓN

Edición ampliada y actualizada

Lic. (MSc.) MARÍA VIRGINIA FERNÁNDEZ-CANIGIA

Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina)



Esta publicación se encuentra disponible en formato digital. Puede descargarse ingresando a la web www.nitragin.com.ar o solicitándola por correo electrónico a mvferca@gmail.com.



Fernández-Canigia, María Virginia

Factores determinantes de la nodulación : edición ampliada y actualizada / María Virginia Fernández-Canigia. - 1a ed ampliada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : María Virginia Fernández-Canigia, 2020.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-86-5482-9

1. Biofertilización. 2. Leguminosas. 3. Microbiología Aplicada. I. Título. CDD 631.86

Fecha de Catalogación: 22-07-2020

Foto de tapa: Lote de soja en Gualeguaychú (Entre Ríos, Argentina), M. Díaz-Zorita.

Reservados todos los derechos de esta edición. Los contenidos de esta publicación sólo podrán ser utilizados haciendo mención explícita de la fuente. No se podrá reproducir en forma completa por ningún método gráfico, electrónico, mecánico u otro sin expresa autorización del autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Alejandro Peticari (INTA San Luis) y al Dr. Gabriel Gutkind (UBA-CONICET) por elaborar contribuciones incorporadas en esta publicación, a la Dra. Noella Gardella (Novozymes BioAg S.A.), junto con otros investigadores de Novozymes BioAg S.A., por la revisión de esta edición, al Dr. Martín Díaz-Zorita (UNLPam) por la revisión y estímulo para lograr esta publicación, al Ing. Agr. Andres Grasso (Fertilizar AC) por sus aportes en la revisión y edición, a la Lic. Guadalupe Díaz-Zorita por su colaboración y dedicación en el diseño de imágenes y el financiamiento de Novozymes BioAg S.A.

TABLA DE CONTENIDOS

PRÓLOGO EDICIÓN IMPRESA	7
PRÓLOGO EDICIÓN AMPLIADA	9

RESUMEN	
Nodulación de leguminosas y Fijación Biológica del Nitrógeno	11

INTRODUCCIÓN	
Importancia Agronómica del Nitrógeno	13

CAPITULO 1	
El Nitrógeno en los Sistemas Biológicos.....	15

CAPITULO 2	
Fijación Simbiótica de Nitrógeno	23

CAPITULO 3	
Etapas de la Nodulación	31

CAPITULO 4	
Condiciones Ambientales, Nodulación y Fijación Biológica de Nitrógeno.....	37

CAPITULO 5	
Factores de Estrés, Nodulación y Fijación Biológica de Nitrógeno	47

CAPITULO 6	
Efectividad de la Nodulación.....	51

CAPITULO 7	
Los Inoculantes y la Nodulación	59
<i>La calidad de los inoculantes y su evaluación</i>	65

CAPITULO 8	
Inoculación.....	71
<i>Las “B” en el manejo adecuado de productos biológicos para la nutrición vegetal</i>	77

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	81
--------------------------------------	----

PRÓLOGO EDICIÓN IMPRESA

Cuando a fines de la década del 50 comenzaron las primeras experiencias con soja en la Argentina nada hacía prever el crecimiento exponencial que tendría el cultivo pocos años más tarde.

Fue durante la década del setenta que el cultivo se estableció como una verdadera alternativa de producción empezando a utilizar espacios anteriormente sembrados con sorgo, girasol o maíz, y más tarde expandiendo la frontera agrícola a lugar donde solo se realiza ganadería, muchas veces en forma precaria.

¡Se iniciaba una era revolucionaria en la agricultura argentina al incorporar al gran cultivo una especie capaz de fijar Nitrógeno del aire! Empresas, técnicos y productores nos entusiasmos discutiendo alternativas que iban desde una soja visualizada como fuente de recuperación” de fertilidad de suelos hasta posiciones antagónicas, como ocurre a menudo en Argentina.

La compañía Nitragin estuvo presente prácticamente desde el inicio de la expansión del cultivo ya desde 1973 se comercializaban nuestros inoculantes en el país.

Los primeros 16 años se importaba el producto desde USA hasta que en 1989 se construyó la moderna planta situada en el parque industrial de Pilar.

Durante este largo periodo mucho y muy profundos cambios se han incorporado a la producción de soja. La explosión tecnológica de la mano de los enormes avances en genética, la siembra directa, la tecnología RR y los cocimientos en materia de nutrición vital y de suelos hacen que el cultivo actual tenga poco que ver con aquél que sembrábamos con entusiasmo en las etapas iniciales.

Comenzamos sembrando en suelos bien rotados, bien provistos de nutrientes y con adecuados tenores de materia orgánica. Hoy muchas de estas condiciones han cambiado y se escucha con insistencia algunas críticas al “modelo” ya que existe el temor (fundado) de que se expande la siembra de soja más allá de lo conveniente poniendo en riesgo la sustentabilidad del sistema.

Desde Nitragin hemos querido hacer un modelo aporte a la producción presentando este manual de nodulación que intenta aclarar muchos aspectos de la fijación biológica, algunos de ellos muy conocidos y otros tal vez no tanto.

Intentamos responder las preguntas más frecuentes que a menudo encontramos en el mercado de una manera sencilla y de fácil lectura.

La Licenciada Virginia Fernandez-Canigia ha realizado una magnífica recopilación de información permitiendo echar luz sobre temas que tienen una enorme importancia en los planteos de producción y que muchas veces no son tratados con la profundidad que se merecen

Hemos sido bendecidos con una tierra y un clima maravillosos y contamos en nuestro sistema de producción con una planta que tiene la capacidad de fijar el nutriente más valioso ¡del Aire!

¿estaremos aprovechando este potencial al máximo?

Espero que les resulte de utilidad el manual y que entre todos sepamos encontrar los caminos que nos permitan seguir produciendo soja por mucho tiempo más.

Santiago Norris
Gerente Gral.
Nitragin Argentina S.A.
Octubre 2003

PRÓLOGO EDICIÓN AMPLIADA

Han transcurrido 17 años desde aquella primera edición fundacional e innovadora del “Manual de Nodulación”. Si bien en este período hemos sido testigos de grandes cambios, participando de una verdadera revolución en el acceso a la información y a la manera de comunicarnos, una variable fundamental para el desarrollo de nuestro país y de la región se ha mantenido inalterable: la dependencia de nuestras economías de la cadena agro-productora.

Hemos presenciado también cómo el mundo ha adoptado el concepto de “Biológico” como bandera en el camino hacia un futuro mejor. Los productos enmarcados en esta categoría han pasado de ser oscuras opciones de un nicho de mercado, a verdaderos protagonistas de una revolución cuyo motor es la sustentabilidad, en el contexto de una sociedad que ha tomado conciencia de que nuestra actividad deja huellas en el planeta y que las mismas afectan en forma directa a las generaciones futuras. Por eso, es imperioso que nuestra generación asuma la responsabilidad de cambiar los paradigmas y realmente abocarse a producir más, con menos.

Nitragin ha estado presente junto a los productores agropecuarios desde 1898 cuando, en los Estados Unidos de América, creaba lo que hoy denominamos Bio-Agricultura o, en su forma abreviada, BioAg. Aquellos visionarios pioneros no buscaban generar un negocio sino impulsar una nueva agricultura basada en la ciencia y la innovación, cuyo pilar fundacional fuera el incremento de la producción a partir de una menor cantidad de recursos.

Estos valores forman parte del ADN de Nitragin hasta hoy y constituyen la fuerza motriz que nos guía en la búsqueda de soluciones eficientes y amigables con el medio ambiente. Esto explica que otra empresa cuya esencia está también signada por la innovación y la sustentabilidad, como es el caso de la danesa Novozymes, haya decidido apoyar y adoptar la “Misión y Visión” de Nitragin.

Hoy, renovando el compromiso que los predecesores de quien suscribe estas líneas iniciaran hace 122 años, tengo el gran honor y privilegio de presentar la nueva y ampliada versión de “Factores Determinantes de la Nodulación”. Este trabajo es el resultado de la colaboración de especialistas en el tema, todos ellos coordinados por la Licenciada María Virginia Fernández-Canigia con el sólo objetivo de poner a disposición de todos los interesados, este compendio de conocimientos relevantes para lograr el objetivo de una agricultura sustentable a partir del uso racional de productos científicamente probados y de alta calidad.

Es mi intención, en nombre de todos los que formamos parte de Nitragin y a su vez de Novozymes, que este trabajo se convierta en una referencia para los productores y profesionales del sector agropecuario, contribuyendo a acelerar la transformación hacia una agricultura cada vez más sustentable.

Maximiliano D’Alessio
Director
Novozymes BioAg América Latina
Julio 2020

RESUMEN**NODULACIÓN DE LEGUMINOSAS Y FIJACIÓN BIOLÓGICA
DEL NITRÓGENO**

- Las leguminosas (soja, alfalfa, tréboles, etc.) forman simbiosis con bacterias fijadoras (rizobios) en ambientes deficitarios en nitrógeno.
- La simbiosis se manifiesta por la presencia de nódulos en la raíz dentro de los que se produce la fijación del nitrógeno por los rizobios.
- Los inoculantes son productos empleados para introducir altas concentraciones de rizobios seleccionados por su infectividad y efectividad para fijar nitrógeno en el ambiente de la raíz de leguminosas.
- El éxito de la nodulación con bacterias del inoculante dependerá de las condiciones del suelo y de crecimiento del cultivo en los primeros 20 días desde la siembra.
- Las condiciones adversas desde la siembra y durante el desarrollo de los cultivos (ej. temperaturas extremas, sequía o anegamiento, deficiencia de nutrientes, etc.) impiden la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno. La planta regula el número de nódulos fijados dependiendo de su estado fisiológico. Mejoras en el manejo agronómico del cultivo (ej. control de plagas, fertilización sin N, etc.) favorecen la fijación biológica del nitrógeno.
- Los excesos de nitrógeno en el suelo reducen y llegan a inhibir totalmente la nodulación.
- El fósforo es imprescindible para lograr una adecuada nodulación y fijación biológica
- El mal manejo de la inoculación produce mortandad de rizobios y se manifiesta por la ausencia de nódulos en los primeros centímetros de la raíz principal y de las raíces laterales (región del “cuello de la raíz”).
- Los nódulos sobre raíces laterales alejadas de la principal indican principalmente nodulación proveniente de rizobios del suelo.
- Los rizobios del inoculante son más efectivos que los naturalizados en el suelo y provenientes de campañas anteriores.
- Cuanto más rojo es un nódulo, más efectivo es.
- En soja, la mayor actividad de fijación biológica del nitrógeno se produce a partir de la floración.

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA AGRONÓMICA DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es indispensable para el crecimiento de todos los seres vivos. Es componente de moléculas esenciales para la vida, condicionando la calidad de las estructuras y los procesos en los que estas intervienen. Es parte de la regulación genética formando parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Está presente en las vitaminas y en las moléculas de almacenaje de energía (ATP, ADP). Forma parte de los aminoácidos, base de las proteínas, las que son parte constitutiva de todas las células vivas.

Es uno de los elementos más importantes para las plantas, y su disponibilidad condiciona en gran medida la productividad de los cultivos. El nitrógeno forma parte de la clorofila e interviene en su síntesis, por lo que está involucrado en la fotosíntesis (captación y eficiencia de uso de la radiación). Sin N (y clorofila), los cultivos no podrían utilizar la luz del sol como fuente de energía para crecer y reproducirse. El síntoma visual característico de carencia de nitrógeno es el amarillamiento de las plantas y la reducción del crecimiento.

En los cultivos, mejoras en la disponibilidad e incorporación de N no sólo permiten el logro de altos rendimientos sino también de mayores concentraciones de proteínas en los forrajes y granos producidos.

CAPITULO 1

EL NITRÓGENO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

¿CÓMO LLEGA EL NITRÓGENO A LAS PLANTAS?

Las plantas absorben principalmente por las raíces formas minerales de nitrógeno, que luego de ser incorporadas en su composición, son exportadas en los productos de cosecha o forrajeros.

El nitrógeno es el gas que en mayor proporción se encuentra en la atmosfera. Representa el 78 % de los gases que componen el aire.

Ingresa al suelo en forma natural, a través de las lluvias, ya sea por la ruptura de su triple enlace por tormentas eléctrica y posterior arrastre o por la combinación con formas gaseosas. Otra forma de ingreso es mediante los abonos orgánicos e inorgánicos (fertilizantes) y de la fijación biológica, la cual pueden realizarla únicamente organismos procariotas. Los compuestos orgánicos (excreciones animales, rastrojos, o abonos orgánicos) son degradados por los organismos del suelo produciendo la **mineralización** del N que los compone (conversión del N orgánico en N mineral). El primer paso es la **amonificación** mediante la cual los organismos descomponedores degradan la materia orgánica muerta liberando amonio NH_4^+ , que por tener carga positiva puede ser retenido por las arcillas. El amonio es oxidado a nitritos (NO_2^-) por bacterias específicas, como *Nitrobacter* sp. y posteriormente a nitratos (NO_3^-) por *Nitrosomonas* sp y *Nitrococcus* sp entre otras. Estos dos procesos en conjunto se denominan **nitrificación**. La **fijación biológica** es la transformación del N_2 atmosférico en amonio a partir de procesos en los que intervienen microorganismos de vida libre o asociados a las raíces o en simbiosis con plantas superiores.

Parte de los compuestos de N inorgánico del suelo se **inmovilizan** en células bacterianas y fúngicas (conversión del N mineral en N orgánico). Este es el proceso inverso a la amonificación. El N inorgánico oxidado (nitritos o nitratos) en ambientes poco oxigenados pueden ser utilizados por bacterias como fuente de oxígeno (**desnitrificación**) reduciéndose los nitratos a N_2 u otros compuestos gaseosos de N que se pierden hacia la atmósfera. Los excesos hídricos favorecen a otros procesos de pérdida del N del suelo: lavado hacia capas profundas (lixiviación) fuera del alcance de las raíces de las plantas o escurrimiento superficial (Fig. 1.1).

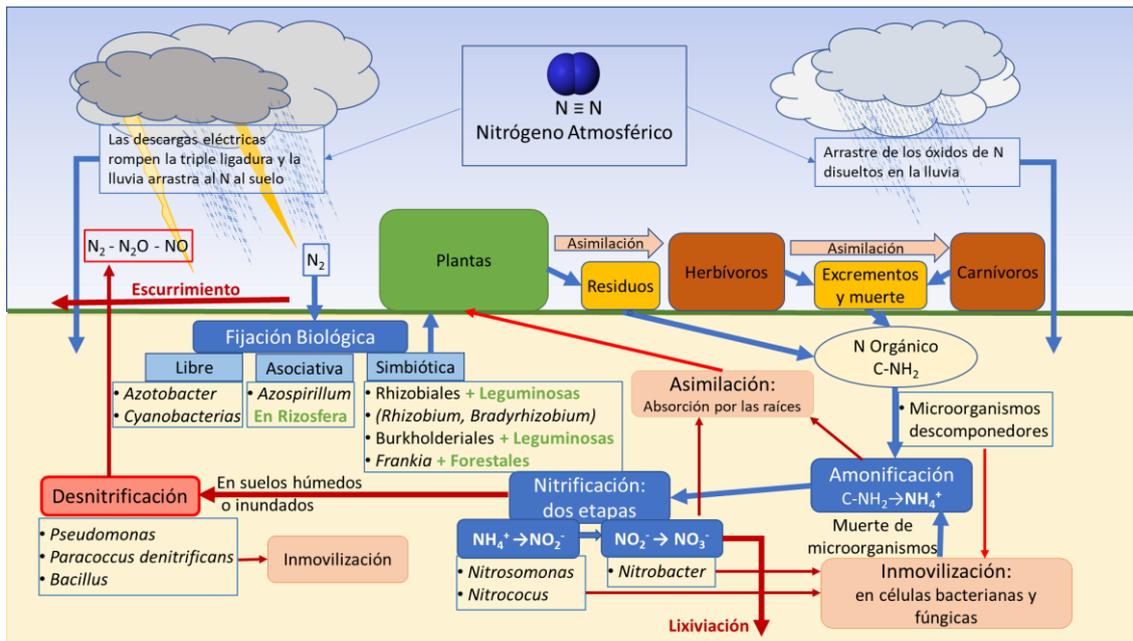


Fig. 1.1. Ciclo del nitrógeno en la naturaleza

¿DE QUÉ MANERA SE PUEDE AUMENTAR EL NIVEL DE NITRÓGENO EN EL SUELO?

La gran reserva natural de N_2 es la atmósfera, donde representa el 78% de los gases que componen el aire. No obstante, la triple ligadura ($N \equiv N$) de la molécula de dinitrógeno (N_2) es una de las más fuertes conocidas y se requiere mucha energía para romperla. Por esto, el N_2 atmosférico no es utilizado directamente por las plantas o los animales superiores y se requiere de procesos industriales o biológicos para su incorporación y transformación en formas asimilables.

INCORPORACIÓN INDUSTRIAL

La síntesis industrial de amoníaco (proceso de Haber Bosch) requiere hidrógeno (derivado del gas de petróleo), altas temperaturas (300 a 600 °C) y altas presiones (200 a 800 atm), se necesitan aproximadamente 6 barriles de petróleo por tonelada de NH_3 incorporada desde la atmósfera. Además del costo energético de la transformación química, el uso de fertilizantes nitrogenados requiere de su transporte desde las fábricas y centros de distribución y la aplicación en los campos. El precio de los fertilizantes nitrogenados está afectado por el costo del petróleo (Fig. 1.2).

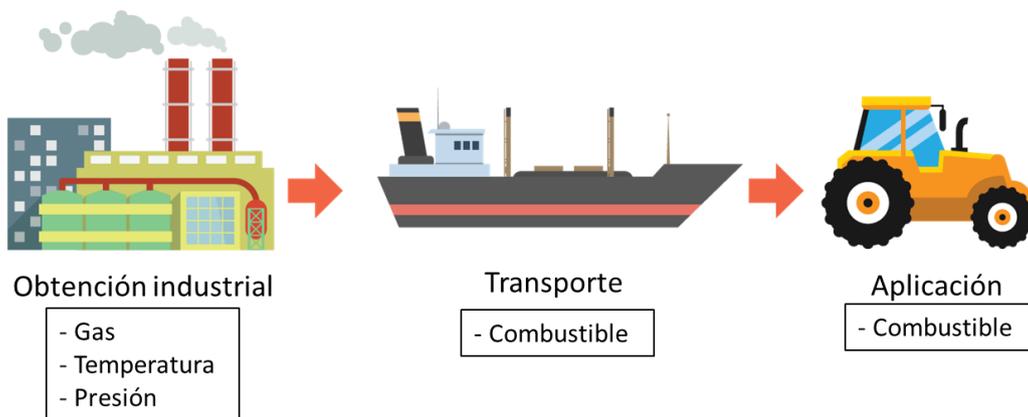


Fig. 1.2. Esquema de requerimientos energéticos en la aplicación de nitrógeno como fertilizante (Adaptado de Ortega, 2003)

INCORPORACIÓN BIOLÓGICA

En la naturaleza hay organismos procariotas (bacterias, actinomicetes, cianobacterias) a presión y temperaturas ambientales, capaces de romper la unión triple del N_2 . Para ello utilizan una enzima (nitrogenasa) y requieren energía metabólica (ATP). La ecuación simplificada de la incorporación, o fijación biológica de N_2 se detalla a continuación:



Varios organismos, siempre procariontes, pueden llevar a cabo este proceso. Según el tipo de organismo varían las fuentes de energía que utilizan (Fig. 1.3).

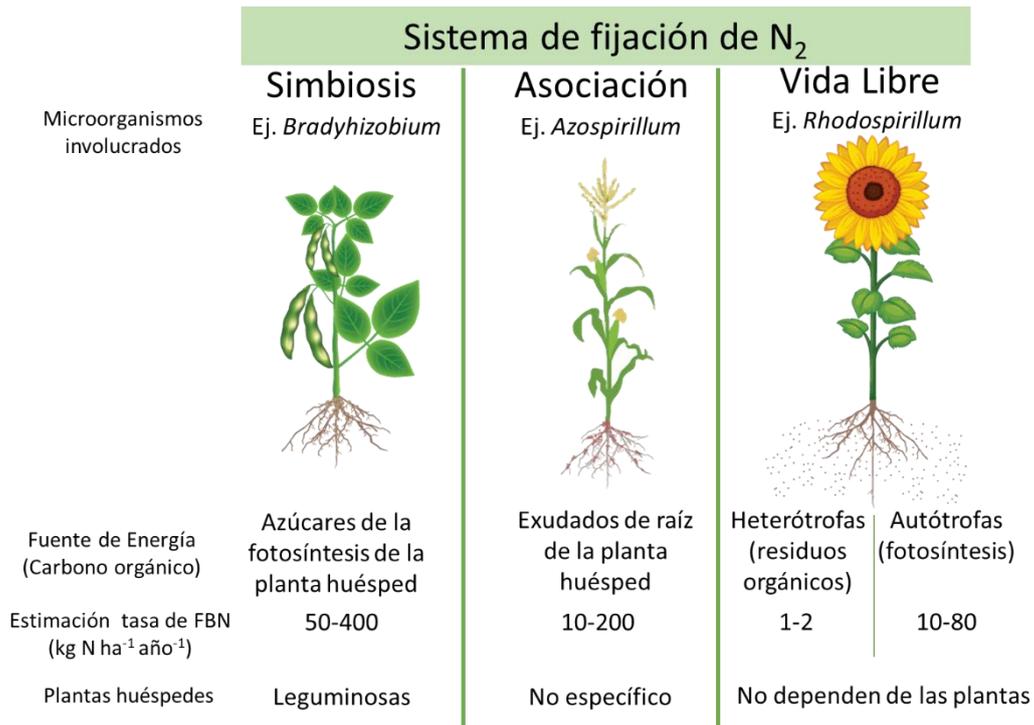


Fig. 1.3. Sistema de fijación biológica de N₂ atmosférico. Fuente de energía utilizada por los organismos y tasa estimada de fijación (Adaptado de Marschner 1990).

La ubicación de estos en el sistema suelo-planta varía, lo que determina su método de fijación de N₂. Convencionalmente, se han caracterizado tres situaciones en el suelo (Richter y col. 2007)

- 1- **Rizoplana:** superficie inmediata de la raíz, en la que interaccionan la planta y el suelo.
- 2- **Rizosfera:** volumen de suelo que se adhiere a las raíces rodeando la rizoplana y que es inmediatamente afectada por la actividad metabólica de la raíz (respiración, exudados)
- 3- **Suelo** propiamente dicho: masa de suelo no afectado por las plantas a menos de 5 mm de la raíz.

La **endorrizosfera** es el tejido de la raíz colonizado por organismos, tanto hongos como bacterias generando así una continuidad entre el suelo y la planta, y no como compartimientos estancos. Esta continuidad sugiere que el conjunto de rizoplana y endorrizosfera, se podría caracterizar como un *sistema raíz-microorganismos* que incluyen las células de la raíz, los hongos micorrízicos y los hongos no micorrízicos y bacterias asociados.

En cada uno de estos “compartimientos” hay organismos que pueden fijar nitrógeno atmosférico, pero lo hacen de formas diferentes (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Tipos de relaciones entre organismos fijadores de nitrógeno y las plantas

Interacción	Descripción
Neutralismo	Sin interacción con las plantas. Utilizan el carbono de la materia orgánica y rastrojos como fuente de energía para fijar N ₂ . Son los fijadores libres.
Mutualismo	Relación de provecho mutuo. Las bacterias pueden localizarse en la rizoplasma o en la endorizosfera. Usan los exudados rizosféricos como fuente de carbono para la FBN, liberando directamente el amonio para la absorción por la planta (de cualquier clase taxonómica).
Simbiosis	Es un tipo de mutualismo, ya que hay provecho mutuo. Esta es una relación estable entre dos organismos. Ej. <i>Rhizobium</i> (captura el N ₂ atmosférico y lo entrega a las leguminosas, las cuales proporcionan los compuestos carbonados para al rhizobio).

Los organismos capaces de fijar N₂ atmosférico, también denominados diazotrofos, se dividen en bacterias productoras de nódulos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Las formadoras de nódulos incluyen a los rizobios y Frankia. Los Rizobios (alfa y beta -proteobacterias son simbioses de leguminosas y Frankia (un actinomicete), son simbioses de plantas leñosas actinorícicas (llamadas así por su capacidad de establecer esta simbiosis). Algunas desarrollan interacciones endosimbióticas con cianobacterias (*Nostoc*). Algunas PGPR pueden fijar N₂ en forma asociativa o endófito con cereales (Fig.1.4).

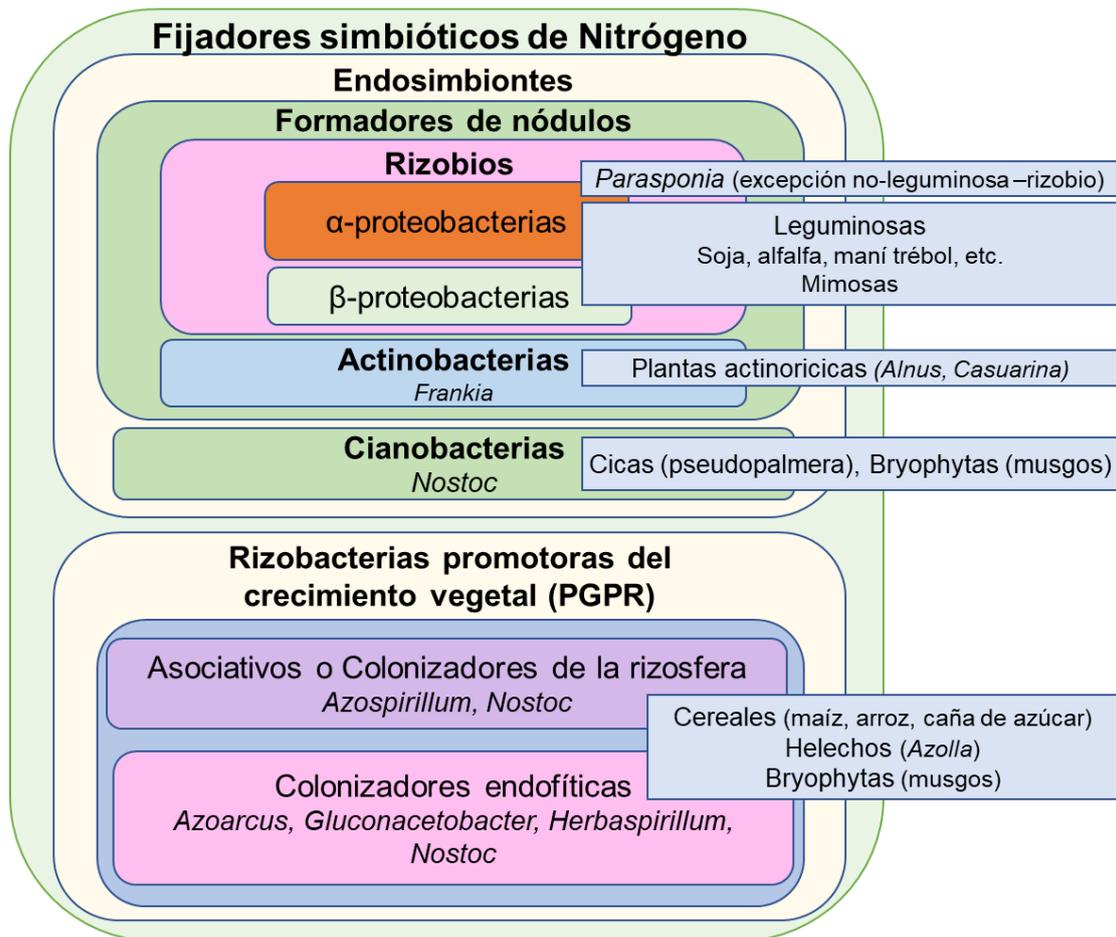


Fig. 1.4. Esquema simplificado de asociaciones diazotróficas (Adaptado de Muss y col, 2016)

Los organismos de vida libre deben generar su propia energía mientras que los organismos simbióticos usan los productos de la fotosíntesis de la planta para fijar el N₂ atmosférico, por lo que es un proceso muy eficiente para la bacteria. Además, este proceso es inhibido, por la presencia de oxígeno, por lo que para los organismos libres o asociados a la raíz es aun energéticamente más costoso. En el caso de la simbiosis, la planta colabora en la generación del sistema anaeróbico requerido. Por esto, la fijación simbiótica es la más eficiente.

Estos valores son variables, según el ambiente, nitrógeno disponible en el suelo, manejo, etc. (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Estimación de fijación de dinitrógeno (N₂) por diferentes sistemas de fijación biológica. (Adaptado de Bohlool, B.B. y col. 1992; Dobbelaere y Okon, 2003)

Sistema de fijación de N ₂	N ₂ fijado (kg N ha ⁻¹)
Simbiótica	
Arroz-Azolla	20-100 cultivo ⁻¹
Leguminosas- rizobiaceas	
<i>Leucaena leucocephala</i>	100-300 año ⁻¹
<i>Glycine max</i>	0-237 cultivo ⁻¹
<i>Trifolium repens</i>	13-280 cultivo ⁻¹
<i>Sesbania rostrata</i>	320-360 cultivo ⁻¹
No-leguminosa- Frankia Casuarina sp	40- 60 año ⁻¹
Asociativa	
Arroz-asociación bacteriana	10- 30 cultivo ⁻¹
Caña de azúcar- asociación bacteriana	20-160 cultivo ⁻¹
Maíz- <i>Azospirillum</i>	Hasta 10 cultivo ⁻¹
Forrajes- <i>Azospirillum</i>	Hasta 10 cultivo ⁻¹
Vida libre	
Arroz-algas verde azules	10- 80 cultivo ⁻¹

La fijación de N en la biosfera se estima en unos 287 millones de toneladas anuales, de los cuales 193 millones corresponden a la fijación biológica, 85 millones a la industrial, y 9 millones a la atmosférica o espontánea. La fijación biológica representa casi el 70 % del N fijado (Fig. 1.5).

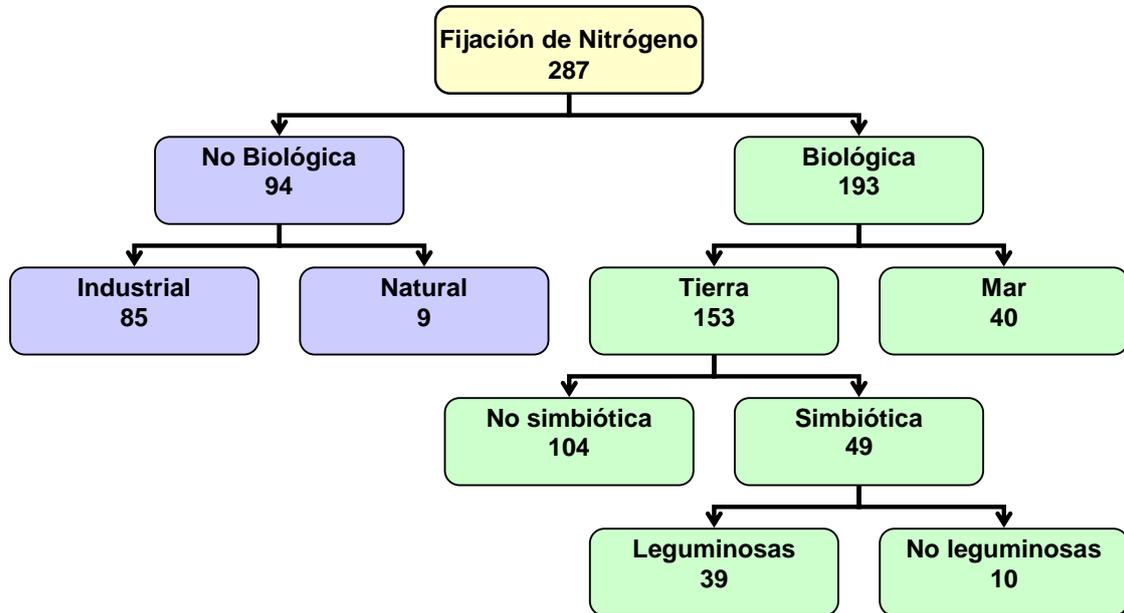


Fig. 1.5. Cantidades estimadas de nitrógeno fijado anualmente (millones de toneladas por año) por diferentes fuentes biológicas y no biológicas. (Adaptado de Miyamoto y col. 2008).

CAPITULO 2

FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO

La simbiosis con capacidad de fijación biológica de N_2 con mayor importancia agronómica es entre las plantas de la familia Leguminosas (como soja, lupino, arveja, lenteja, alfalfa, tréboles, vicia, maní, etc.) con bacterias de la familia Rhizobiaceae o rizobios.

¿TODAS LAS LEGUMINOSAS FIJAN CANTIDADES SIMILARES DE NITRÓGENO?

La cantidad de N fijada por año varía de acuerdo con su ciclo de vida (anuales o perennes), a la cantidad de biomasa aérea producida y a las condiciones ambientales. En la figura 2.1 se observan las tasas medias de fijación biológica de nitrógeno (FBN) de algunas leguminosas comunes en Argentina.

La estimación de la cantidad de N proveniente de la fijación biológica de N_2 atmosférico se realiza mediante diferentes métodos, uno es por la cuantificación de isótopos ^{15}N y considera únicamente las partes aéreas. Consecuentemente, se debe tener en cuenta también la cantidad de N proveniente de la fijación biológica derivado a las raíces y nódulos. Por lo tanto, los valores reales pueden ser significativamente mayores a los presentados por distintos autores y son variables entre las diferentes fuentes bibliográficas.

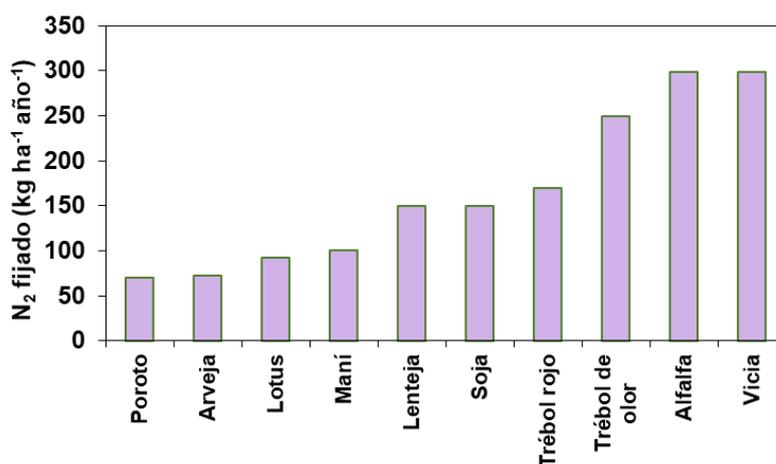


Fig. 2.1. Estimaciones del nitrógeno fijado por leguminosas cultivadas en la República Argentina.

¿QUÉ ES SIMBIOSIS?

Simbiosis es la convivencia de dos organismos no semejantes en una relación de beneficio mutuo generándose una interdependencia fisiológica.

En el caso de la simbiosis leguminosa-rizobio, el microsimbionte, la bacteria, utiliza el carbono y la energía fotosintética del macrosimbionte (la planta) y le entrega amoníaco, producto de la fijación de N_2 atmosférico (Fig. 2.2). Este proceso se lleva a cabo en los nódulos.

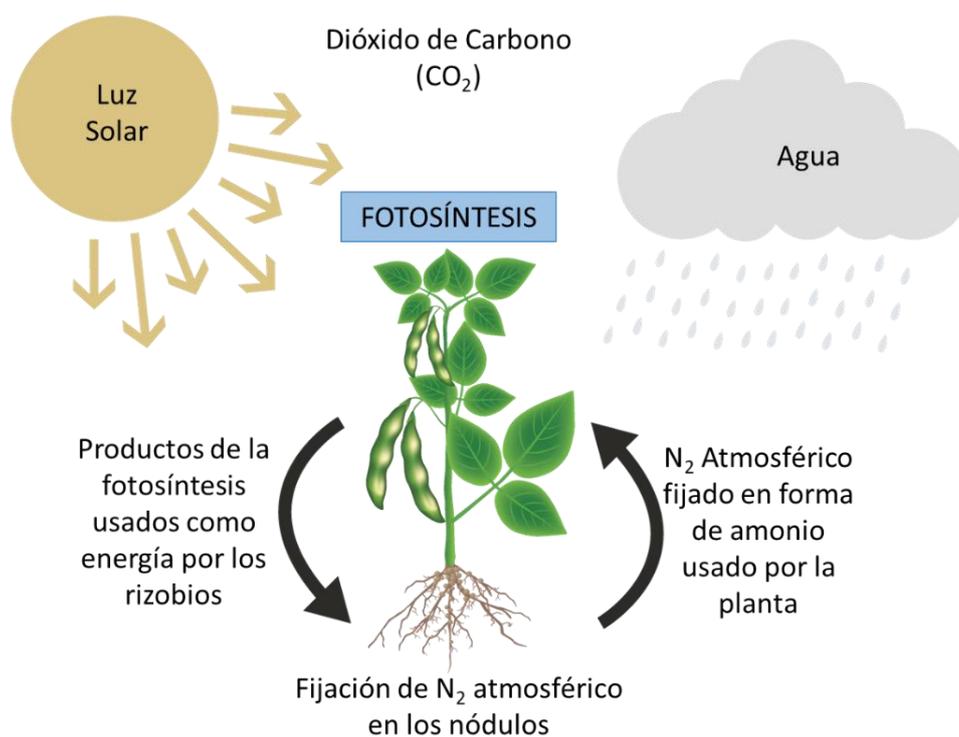


Fig. 2.2. Esquema simplificado de la simbiosis rizobio-leguminosa.

La simbiosis leguminosa-rizobio es la adaptación a un medio deficitario en nitrógeno. En suelos ricos en N, las leguminosas prefieren utilizar el N inorgánico del suelo, independientemente de la presencia de las bacterias. Por el contrario, si la bacteria está presente y los niveles de N del suelo son bajos, la planta estimula el ingreso de los rizobios a la raíz, que fijarán N_2 atmosférico.

La fijación biológica de N_2 tiene un alto costo energético para la planta en simbiosis, mayor que el de incorporar el N del suelo. La planta debe destinar entre 6 y 12 g de compuestos carbonados por cada gramo de N fijado. La asimilación de N a partir de nitratos del suelo es entre 6 a 8 veces energéticamente más eficiente para el cultivo.

Como la planta debe producir los compuestos carbonados, existe una relación directa entre fotosíntesis y fijación biológica. La planta entrega los compuestos carbonados para generar energía y parte de la molécula leghemoglobina, que protegerá del oxígeno al rizobio (en ese momento convertido en bacteroide). Esta proteína tiene un grupo hemo, con hierro, que captura al oxígeno y toma color rojo. Dentro del nódulo, se fija el nitrógeno atmosférico (N_2) en dos moléculas de amonio que son entregadas a la leguminosa (Fig. 2.3).

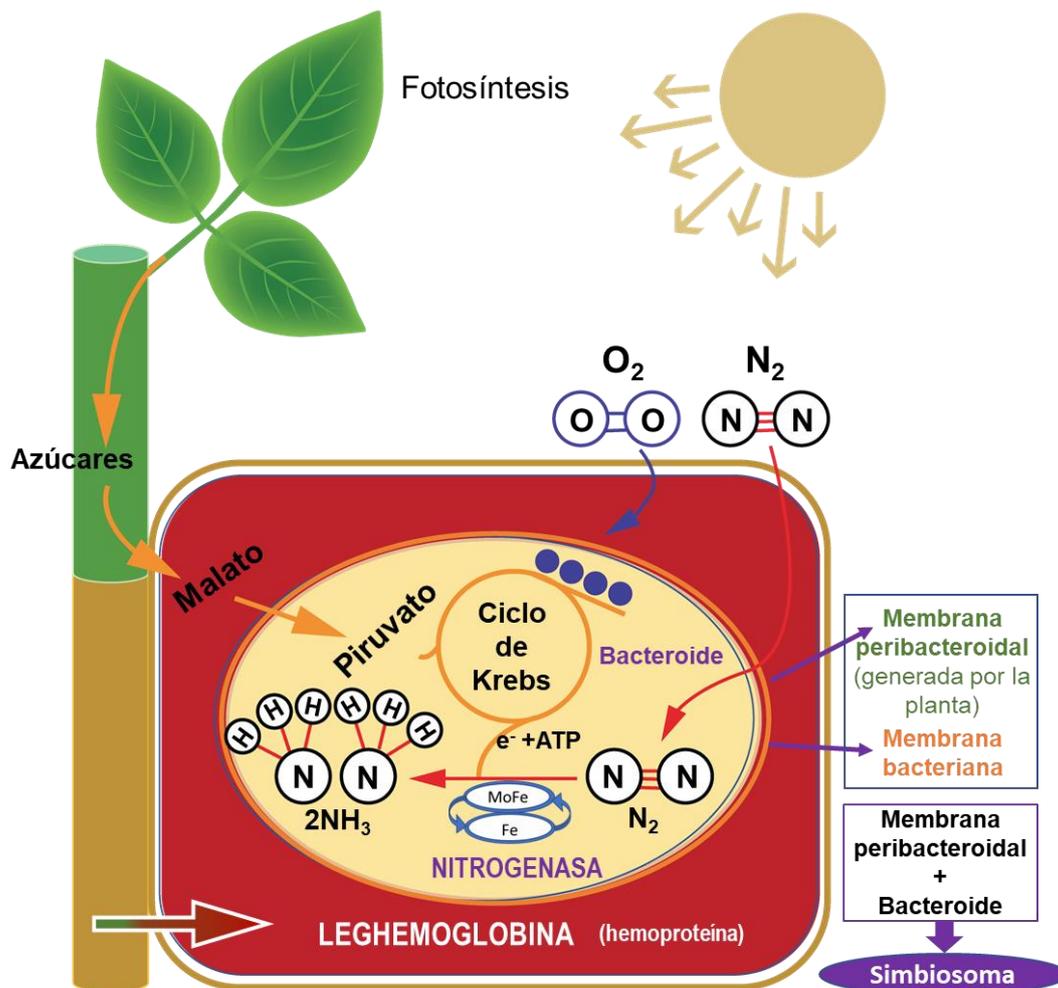


Fig. 2.3. Esquema del funcionamiento del nódulo (Adaptado de Laich, 2018)

Por lo tanto, la fijación biológica se relaciona estrechamente a la producción de biomasa aérea y rendimiento (Fig. 2.4): cuanto mayor sea la biomasa aérea, mayor será la fotosíntesis, y habrá mayor fijación. En la región pampeana, se describieron 23,2 kg derivados de la FBN por cada tonelada de materia seca de alfalfa y 43,6 kg por tonelada de granos de soja producidos (Fig. 2.5).

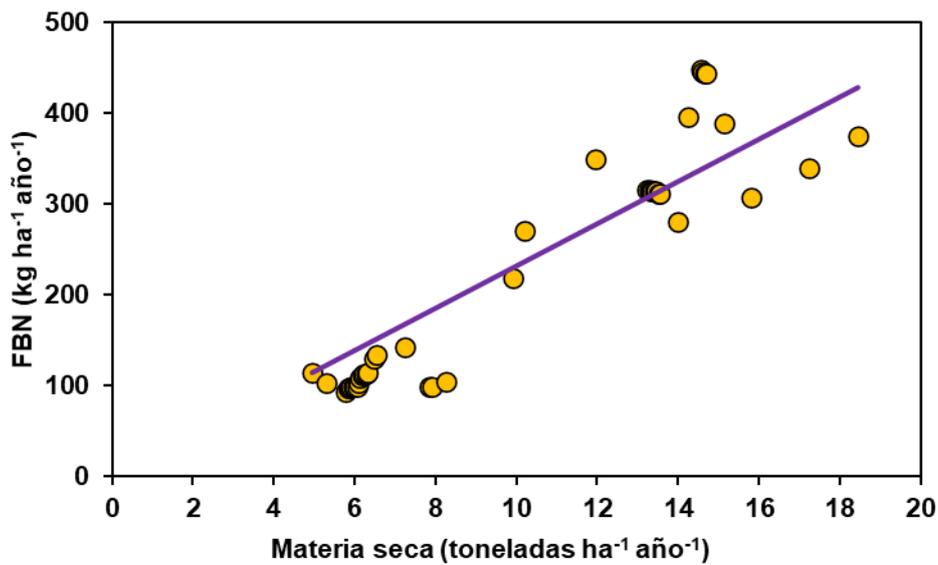


Fig. 2.4. Relación entre la producción de forraje en alfalfa y la fijación biológica del nitrógeno (FBN); $y=23,2x$ $r^2=0,96$ (Adaptado de Racca y col. 2001)

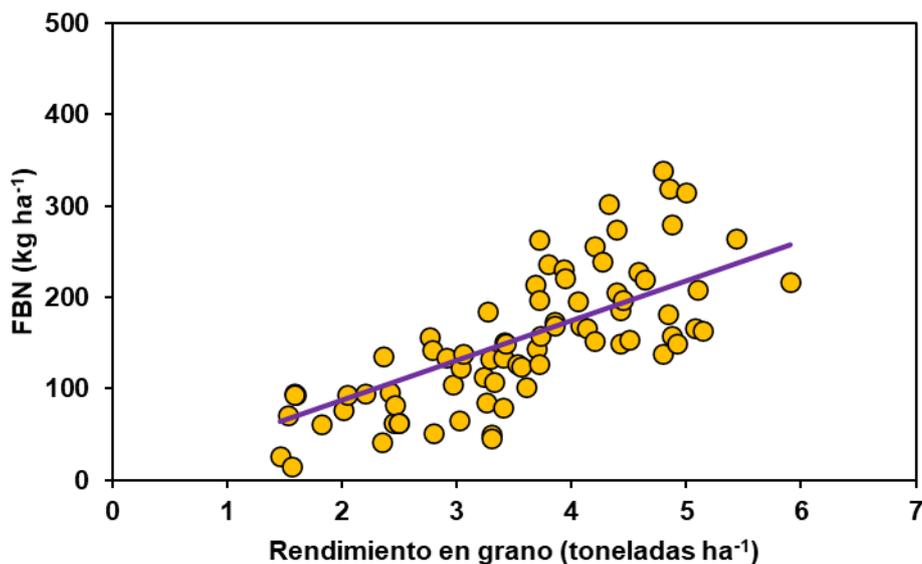


Fig. 2.5. Relación entre la producción de soja y la fijación biológica del nitrógeno (FBN); $y=43,63x$ $r^2=0,92$ (Adaptado de Collino y col. 2015).

¿QUÉ CARACTERÍSTICAS TIENEN LOS RIZOBIOS?

En el suelo, los rizobios son bacilos de vida libre, móviles e incapaces de formar esporas (formas resistentes ante condiciones adversas). Son saprófitos, es decir, se alimentan de la descomposición de organismos muertos, materia orgánica o compuestos químicos secretados por las raíces de las plantas. Requieren oxígeno para vivir (son

aerobios) y son incapaces de fijar nitrógeno atmosférico. Dentro de los **nódulos** radicales tienen formas irregulares, aumentan su tamaño, se alimentan de formas carbonadas sintetizadas por la planta huésped (leguminosas), requieren bajo nivel de oxígeno, y fijan nitrógeno atmosférico que le entregan a la planta.

Anteriormente se agrupaban todas las bacterias que nodulaban leguminosas en el género *Rhizobium* por lo que genéricamente se los denomina rizobios o rhizobios. A partir de la década del '80 fueron reclasificados en nuevos géneros, en un principio según su velocidad de crecimiento y sus características bioquímicas. Posteriormente se agregaron características genéticas para su clasificación.

¿PUEDE CUALQUIER LEGUMINOSA SER NODULADA POR CUALQUIER RIZOBIO?

No cualquier rizobio puede nodular cualquier leguminosa. Las leguminosas están representadas por diversas especies vegetales, entre las que encontramos cultivos de grano (soja, garbanzo, etc), forrajeras (alfalfa, tréboles), plantas herbáceas, arbustivas y arbóreas. Todas estas pueden ser noduladas por un amplio espectro de bacterias. Existe **especificidad** rizobio-planta huésped. Existen grupos de especies de leguminosas que pueden ser efectivamente noduladas por la misma especie de rizobio, denominados **grupos de inoculación cruzada**. Los grupos de inoculación cruzada son los grupos de cepas de rizobios que solo infectan a un determinado grupo de especies de leguminosas. Esta especificidad fue usada originalmente para clasificarlas. El aporte de los estudios genéticos permitió reconocer nuevas especies y recategorizar muchos géneros. Así, en la Tabla 2.1 se observa que dentro del orden Rhizobiales, se separaron siete familias con 14 géneros y 362 especies (Andrews y Andrews, 2017 adaptado por Laich, 2018).

Tabla 2.1. Grupos de inoculación cruzada de Rhizobiales y Burkholderiales con algunas leguminosas. (Andrews y Andrews, 2017; Laich, 2018)

Clase: α - proteobacterias				
Orden: Rhizobiales				
Familia	Género	N° spp	Especies tipo	Hospedante representante
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	111	<i>R. leguminosarum</i>	Tréboles, porotos
	<i>Sinorhizobium</i> = <i>Ensifer</i>	11	<i>S. fredii</i>	<i>Melilotus-</i>
		11	<i>E.meliloti</i>	<i>Medicago</i> alfalfa
	<i>Shinella</i>	7	<i>S. granuli</i>	<i>Kummerowia</i>
	<i>Allohizobium</i>	5	<i>A. undicola</i>	<i>Lotus - Medicago</i>
<i>Neorhizobium</i>	4	<i>N. galegae</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	
Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	38	<i>B. japonicum,</i> <i>B. diazoefficiens</i> <i>B. elkanii</i>	Soja
			<i>Bradyrhizobium</i> spp	Maní
Brucellacea	<i>Ochrobactrum</i>	18	<i>O. anthropi</i>	<i>Lupinus</i>
Xanthobacteracea	<i>Azorhizobium</i>	3	<i>X. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>	23	<i>D. riboflavina</i>	<i>Neptunia natans</i>
Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	53	<i>M. organophilum</i>	<i>Crotalaria spp.</i>
	<i>Microvirga</i>	16	<i>M. suterranea</i>	<i>Lupinus</i>
Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	46	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
			<i>M. cicerii</i>	Garbanzo
	<i>Aminobacter</i>	6	<i>A. aminovorans</i>	
	<i>Phyllobacterium</i>	11	<i>P. myssinacearum</i>	<i>Trifolium</i> y <i>Lupinus</i>
Clase: β - proteobacterias				
Orden: Burkholderiales				
Familia	Género	N° spp	Especies tipo	Hospedante representante
Burkholderiaceae	<i>Bukolderia</i>	121	<i>B. cepacia</i>	Mimosa
	<i>Cupriavidus</i>	16	<i>C. nectator</i>	Mimosa
Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum</i>	16	<i>H. seropedicae</i>	

¿QUÉ SON LOS NÓDULOS?

Son órganos vegetales que se producen en la raíz de la planta huésped al ingresar los rizobios. Los nódulos son pequeñas tumoraciones dentro de las que las bacterias se transforman en bacteroides, los cuales producen la fijación de N_2 .

La morfología de los nódulos varía según las leguminosas. En general las más tropicales, (ej. soja), tienen nódulos redondos de crecimiento determinado. En estas el tejido o meristema de crecimiento se ubica en forma radial y, una vez alcanzado su máximo desarrollo, dejan de crecer. Las leguminosas de ambientes templados, como alfalfa, trébol, vicia, etc., tienen nódulos de crecimiento indeterminado. Tienen forma de dedos de guante y continúan su desarrollo en cada extremo, donde se localiza el meristema de crecimiento (Foto 2.1).

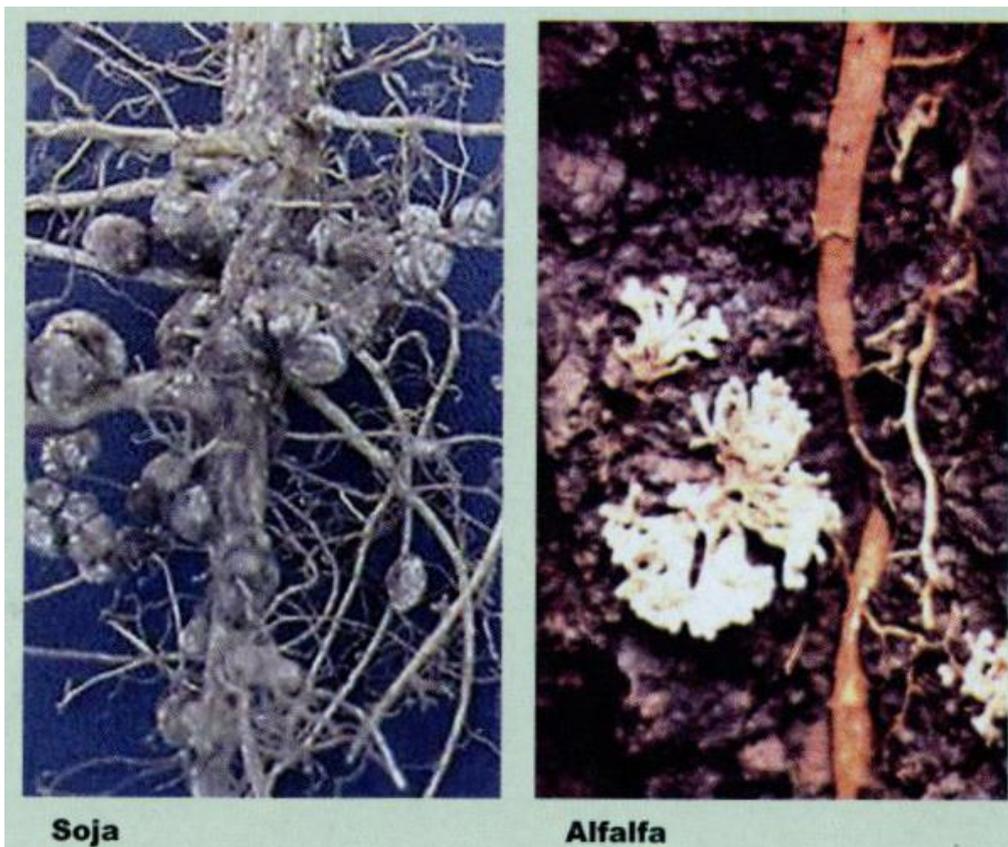


Foto 2.1. Nódulos de crecimiento determinado (soja) y de crecimiento indeterminado (alfalfa).

CAPITULO 3

ETAPAS DE LA NODULACIÓN

¿CÓMO LLEGA EL RIZOBIO AL ENTORNO DE LA RAÍZ?

En el suelo hay tres tipos de poblaciones rizobianas según su origen:

- **Nativas:** poblaciones que evolutivamente desarrollaron junto con leguminosas nativas de una zona determinada. La soja, por ejemplo, es originaria del sudeste asiático y, por lo tanto, solamente en esa zona se encuentran naturalmente sus cepas específicas.
- **Naturalizadas:** son poblaciones que ingresaron a lotes agrícolas por haber sido sembrados en campañas anteriores con una leguminosa inoculada con un inoculante comercial y que se adaptaron a las condiciones ambientales.
- **Introducidas:** son las cepas introducidas con un inoculante comercial. Las bacterias que se adaptan quedan viviendo en el suelo en forma aeróbica y saprofitica transformándose en poblaciones naturalizadas.

¿CÓMO INGRESAN LOS RIZOBIOS EN LA PLANTA HUESPED?

Una vez germinada la semilla, la rizosfera presenta condiciones favorables para la multiplicación de los rizobios y para que se inicie el proceso de nodulación. Durante todo el proceso intervienen tanto el macrosimbionte (leguminosa) como el microsimbionte (rizobio). Para el establecimiento de nódulos funcionales ocurren varias etapas.

1. **Reconocimiento mutuo planta-rizobio específico mediante señales bioquímicas:** La leguminosa secreta sustancias químicas (principalmente **flavonoides**) de distinta naturaleza según la especie de que se trate, a través de las células de la raíz (ej. genisteína en soja y luteína en alfalfa y *Melilotus*). En respuesta a ellos, se induce la síntesis de la proteína nodD en los rizobios, que es el sensor que reconoce los químicos excretados por las raíces de la planta huésped. Estas activan una serie de genes implicados en el proceso de nodulación, incluyendo aquellos requeridos para producir los factores de nodulación, denominados **lipo-quito-oligosacáridos** o **LCO** (del inglés, lipochito-oligosaccharides) correspondientes a esa especie de leguminosa.

Una serie de genes comunes a todos los rizobios *nodABC*, codifican una parte de la molécula común a todos los LCO, y los *genes nodD*, que sintetizan la proteína nodD codifican las sustituciones que los hacen específicos para cada leguminosa (o grupos de leguminosas) (Fig. 3.1). Las sustancias secretadas por las plantas estimulan la multiplicación de la población bacteriana alrededor de las raíces (rizosfera) y la adhesión a los pelos radicales (o pelos absorbentes de la raíz en desarrollo). A partir que aquí comienzan a sucederse los pasos que llevan a la formación del nódulo (Fig. 3.2)

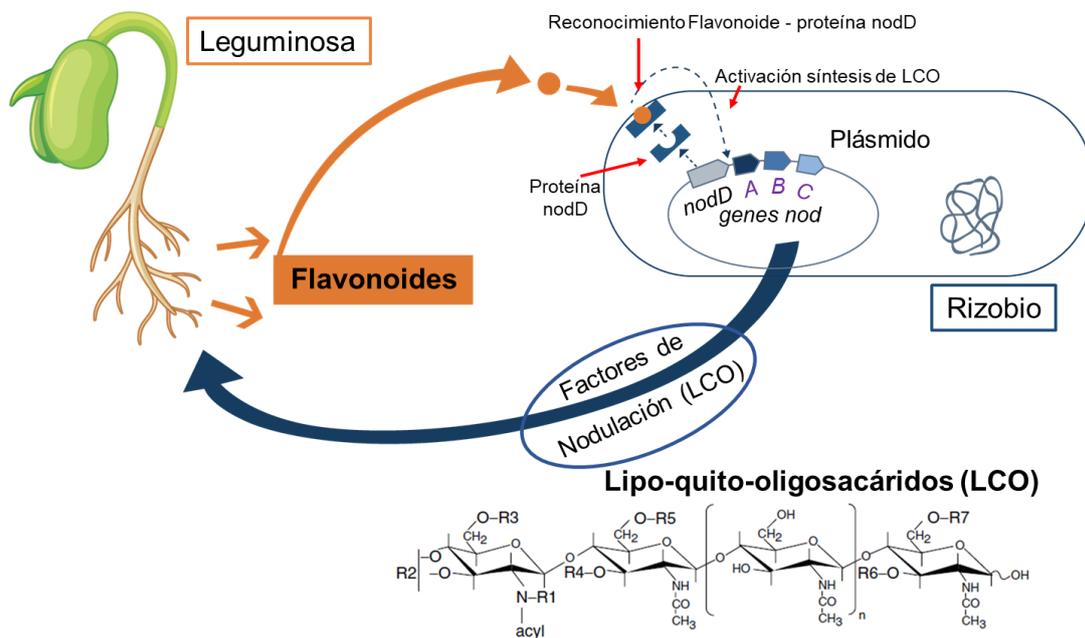


Fig. 3.1. Reconocimiento planta huésped-rizobio específico.

2. **Adherencia de los rizobios a los pelos absorbentes:** Los rizobios secretan polisacáridos que se unen a ciertas proteínas de la planta (lectinas), encontradas en los extremos de los pelos radicales sobre los que se adhieren.
3. **Enroscamiento de los pelos absorbentes:** Los factores Nod secretados a la rizósfera (LCO o lipo-quito-oligosacáridos) por los rizobios son reconocidos por moléculas específicas de la planta huésped y se desencadena una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en sus pelos radicales. Una vez que los rizobios están adheridos a los pelos radicales, se detiene el crecimiento celular de los pelos, y se enroscan hacia el lado al que se adhirieron los rizobios, formando una estructura que, por su forma, es conocida como cayado de pastor.

4. **Invasión del pelo radical y formación de un cordón infeccioso:** A medida que el cayado se forma, debido a que el material de la pared celular de la planta huésped crece a su alrededor, los rizobios inducen a la formación por parte de la planta, de un conducto en el interior del pelo absorbente. Este es un tubo vacío recubierto de celulosa y mucopolisacáridos, en el que se multiplican los rizobios. Los rizobios se liberan de las puntas de estos hilos de infección en estructuras unidas a la membrana dentro de las células huésped llamadas simbiosomas donde luego se diferencian en su forma de fijadora de N₂ conocida como bacteroide.
5. **Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección:** Los rizobios penetran a las células adyacentes a los pelos radicales y los factores Nod (LCO) estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo.
6. **Ingreso de las bacterias a las células de la raíz y diferenciación de los bacteroides:** Simultáneamente con la división de las células vegetales que formarán el nódulo, los rizobios son endocitados, es decir envueltos por la membrana celular de las células corticales de la raíz y liberados en el interior de dichas células. Quedan entonces rodeados por una membrana producida por la planta denominada membrana peribacteroidal. Dentro de esta membrana, los rizobios se multiplican activamente. Finalizada la multiplicación, las bacterias se vuelven deformes, hinchadas y ramificadas. Son hasta 40 veces más grandes que los rizobios que los originaron y se las conoce como bacteroides. Los bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidal forman los simbiosomas. Se pueden encontrar hasta 10000 bacteroides por célula vegetal. Las bacterias de crecimiento rápido (ej. *Rhizobium leguminosarum*) cesan rápidamente de dividirse, mientras que los de crecimiento lento (ej. *Bradyrhizobium japonicum*) continúan dividiéndose dentro del saco de secuestro.
7. **Establecimiento del nódulo funcional maduro e inicio de la fijación biológica de Nitrógeno:** El nódulo comienza a fijar nitrógeno sólo cuando terminó el desarrollo de los bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Se sintetizan sustancias básicas para la fijación de nitrógeno, como la

leghemoglobina que regula el nivel de oxígeno dentro del nódulo, y la enzima nitrogenasa, responsable de la ruptura de la molécula de N₂.

Tanto el macrosimbionte (planta) como el microsimbionte (rizobio) intervienen y regulan las 7 etapas del establecimiento del nódulo en relación con el ambiente.

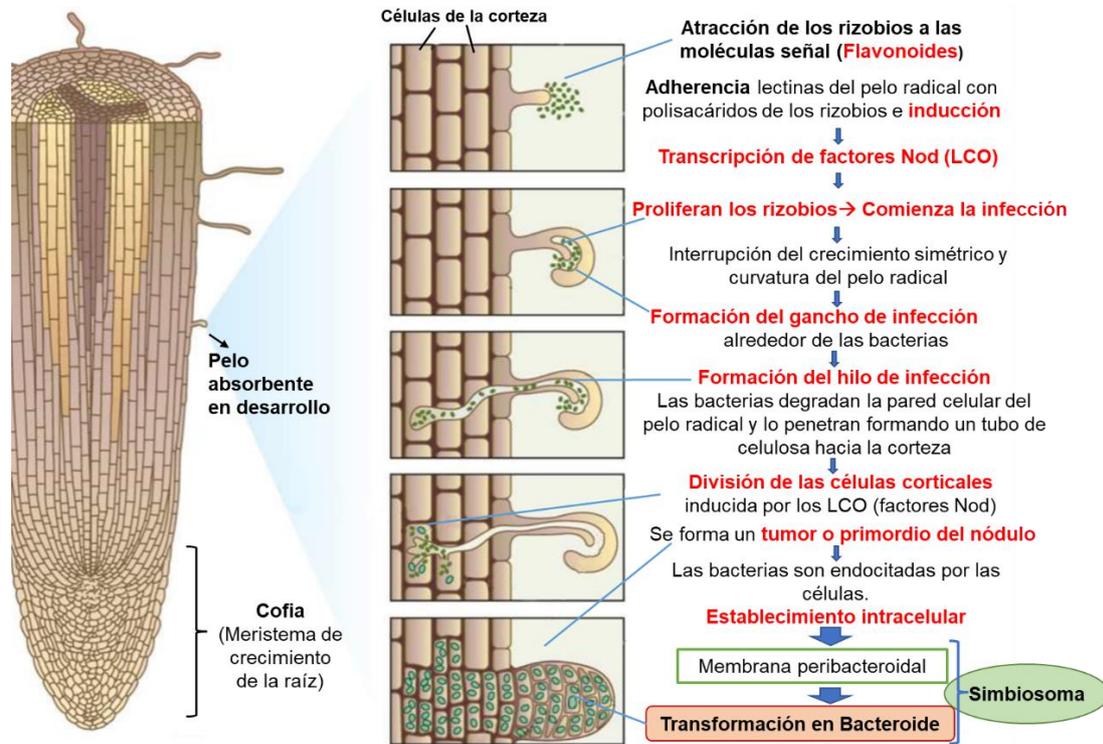


Fig. 3.2. Pasos para el establecimiento de un nódulo en la raíz de una leguminosa.

LCO = Lipo-quitino-oligosacáridos.

¿POR QUÉ ALGUNOS NÓDULOS SON ROJOS EN SU INTERIOR Y OTROS NO?

La actividad de la enzima nitrogenasa requiere baja concentración de oxígeno, que en los nódulos está regulada por la leghemoglobina. Esta es una proteína que contiene hierro con características similares a la hemoglobina animal, con capacidad para unirse al O₂. Provee suficiente oxígeno para las funciones metabólicas del bacteroide, pero previene la acumulación de O₂ libre que destruiría la actividad de la nitrogenasa.

La leghemoglobina le da el color rojo al interior de los nódulos activos. Si un nódulo tiene el interior rojo, indica que está fijando activamente N₂ y se consideran **nódulos efectivos**. Dentro de cierto rango, cuanto más rojo el nódulo, más efectivo es. Cuando los nódulos son jóvenes y aún no fijan N₂, su coloración interna es blanca o gris. Los nódulos que ya no fijan N₂ se tornan verdes y pueden ser descartados por la planta. La falta de color rojo en nódulos maduros, indica que se formaron por cepas infectivas, pero no efectivas, por lo que no nunca serán buenos fijadores de nitrógeno (Foto 3.1).



Foto 3.1. Coloración interna de nódulos de soja de diferente edad (jóvenes blancos no efectivos a maduros rojos efectivos). Fuente: J. Burton. En Legumes Inoculants and their Use, 1984. University of Hawaii NifTAL Project and FAO.

¿QUE SON CEPAS EFECTIVAS E INFECTIVAS?

Aún si una cepa rizobiana es capaz de **infectar** una leguminosa, los nódulos formados pueden no ser **efectivos** para fijar N_2 (Fig. 3.3).

- **Cepas infectivas:** son cepas con capacidad de infectar la leguminosa.
- **Cepas efectivas:** son cepas con capacidad de fijar N_2 .

Tanto la efectividad, como la infectividad, están reguladas genéticamente, pero también están vinculadas con los factores ambientales que afectan a la planta.

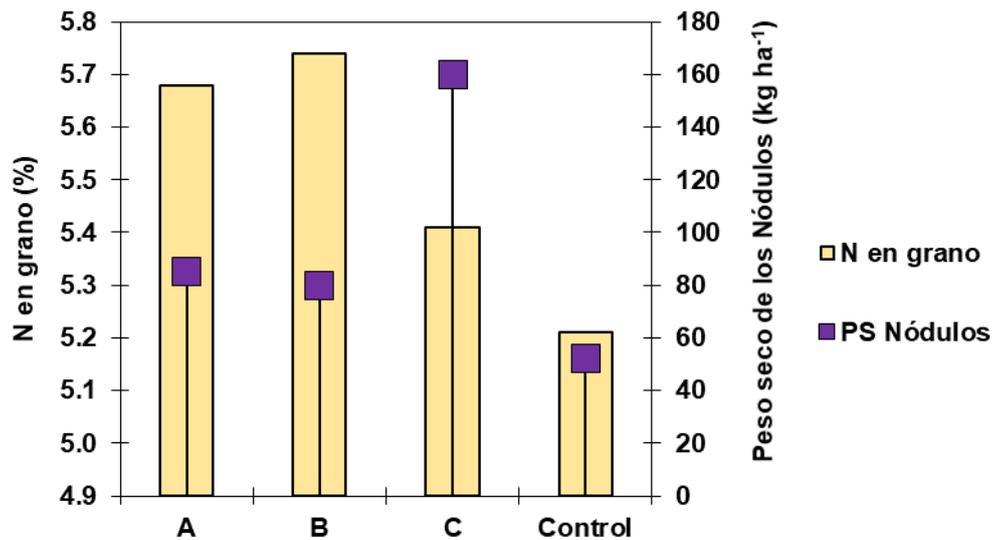


Fig. 3.3. Comparación entre cepas de *Bradyrhizobium japonicum*: nodulación y porcentaje de nitrógeno en grano a la cosecha. Las cepas A y B son infectivas y efectivas, la cepa C es muy infectiva y no efectiva. Las tres son cepas de *Bradyrhizobium japonicum* registradas. PS = peso seco (Adaptado de González 1994).

¿CÓMO ESTÁ REGULADA LA FORMACIÓN Y PRESENCIA DE LOS NÓDULOS?

La fijación biológica de N_2 tiene un alto costo energético para la planta. Para generar esa energía, debe consumir más compuestos carbonados y energía proveniente del ATP, una planta nodulada que una no nodulada. Por lo tanto, y si bien ambos simbiontes (planta y bacteria) intervienen en la formación de los nódulos, en presencia de rizobios específicos e infectivos, es la leguminosa quién regula la nodulación al definir la provisión de energía.

En condiciones óptimas de crecimiento (temperatura, humedad, etc.), es la leguminosa la que manda la primera señal a la bacteria y continúa colaborando en la formación del nódulo. Sin embargo, los factores ambientales, como exceso de nitrógeno, o algún tipo de estrés condicionarán directamente este proceso.

La regulación se produce por la alteración de mecanismos fisiológicos (ej. limitando la secreción de moléculas receptoras de rizobios, disminuyendo el número de pelos absorbentes, etc.), que impiden la nodulación, o eliminan nódulos ya establecidos.

CAPITULO 4

CONDICIONES AMBIENTALES, NODULACIÓN Y FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

Los actores en la nodulación (rizobio y leguminosa), su asociación y funcionalidad, son afectados positiva o negativamente por las condiciones ambientales durante su ciclo de vida.

La ocurrencia de factores ambientales adversos (estrés por temperatura, humedad, acidez, etc.) afecta la supervivencia del rizobio, disminuyendo el número de la población naturalizada o introducida con el inoculante. Las cepas de distintas especies rizobianas tienen condiciones óptimas de crecimiento según distintos factores ambientales. Lo mismo sucede con los cultivares de leguminosas. Si la planta se encuentra en condiciones subóptimas de desarrollo, limitará la simbiosis y por lo tanto la fijación biológica de nitrógeno. Por ejemplo, en la figura 4.1 se esquematiza la respuesta de la planta a la sequía y las deficiencias nutricionales.

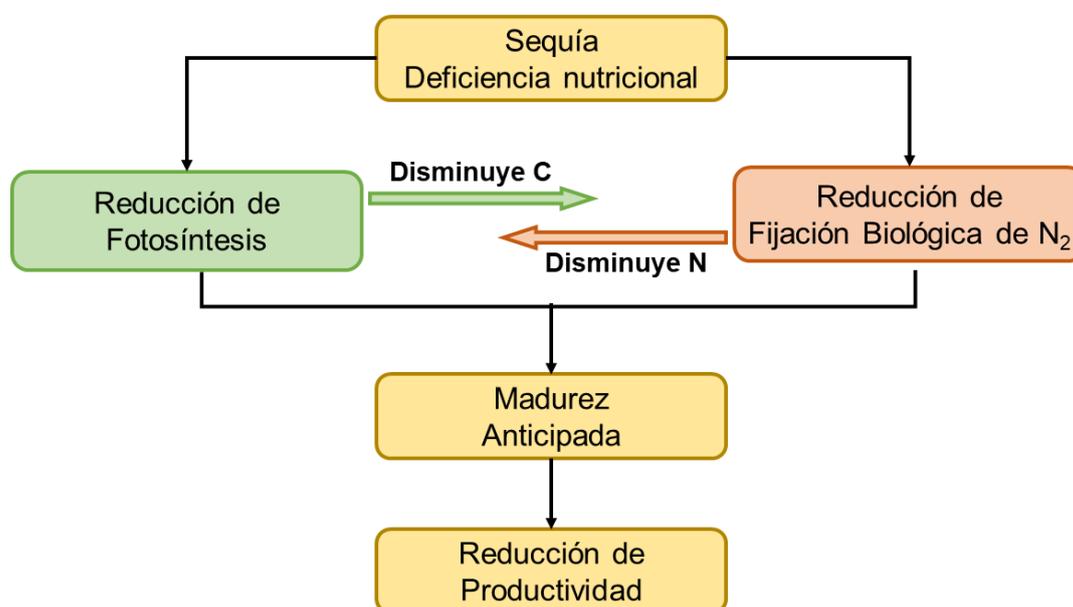


Fig. 4.1. Efecto de la sequía y de las deficiencias nutricionales sobre la fijación biológica de nitrógeno y la producción de soja (Adaptado de Purcell (1999) según F. García, com. pers)

◆ Temperatura

La temperatura afecta la persistencia de los rizobios en inoculantes y puede influir sobre su supervivencia en el suelo. De esta manera las variaciones de la temperatura a lo largo del año condicionan el número en las poblaciones naturalizadas (Fig. 4.2). Además, puede limitar tanto la nodulación como la fijación de nitrógeno. Si el estrés térmico se produce en el momento de la inoculación, el número de bacterias introducidas disminuirá marcadamente.

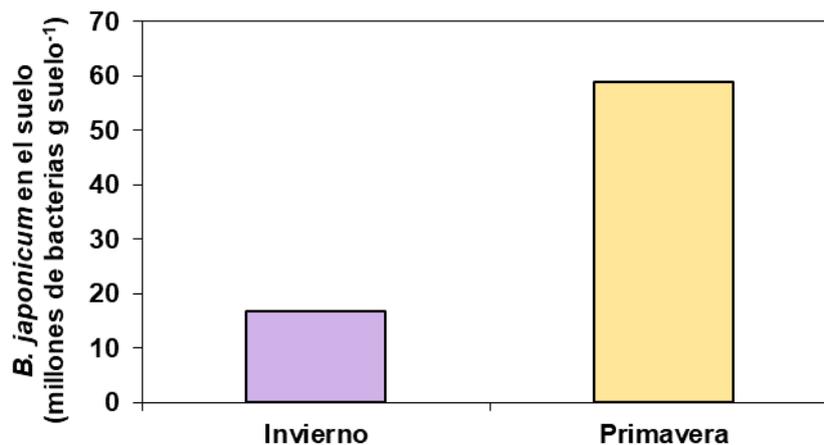


Fig. 4.2. Número de *Bradyrhizobium japonicum* en suelos con historia sojera del partido de Rivadavia (Buenos Aires) según la época del año (Adaptado de Silva 1997)

En general, temperaturas del suelo superiores a 40°C limitan la nodulación. Por el contrario, temperaturas menores retardan el desarrollo de la planta, la formación de nódulos y consecuentemente, disminuyen las tasas de fijación de N₂. Los rizobios de crecimiento rápido, como los que nodulan alfalfa, tienen un rango óptimo de temperatura (28-37°C) y los de crecimiento lento que son en general tropicales, como los específicos de soja (32-42°C).

En soja, la nodulación es inhibida por temperaturas superiores a 42°C. La fijación de N₂ en soja muestra ser más tolerante al calor que en otras leguminosas de nuestro país y se inhibe con temperaturas diarias mayores a 41°C.

◆ Humedad

El número de rizobios del suelo se reduce a medida que el suelo se seca (Fig. 4.3).

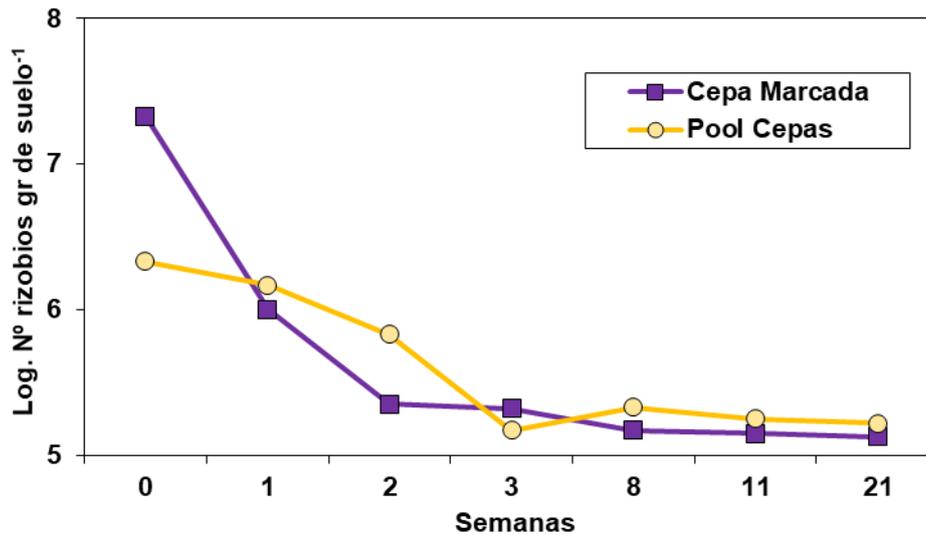


Fig. 4.3: Evolución de *Bradyrhizobium japonicum* cepa 29 W marcada con antibióticos y de un conjunto de cepas naturalizadas del suelo en un suelo seco (tensión H₂O entre -2 y -16 b). (Adaptado de Sagardoy, 1979 en Racca, 2003a).

La resistencia de los rizobios a la sequía, aún dentro de una especie, es muy variable. La fijación biológica de N₂ es un proceso aún más sensible al déficit de agua que la transpiración, la fotosíntesis, la tasa de crecimiento de las hojas o la asimilación de nitratos. Ante un déficit hídrico, la planta, como primera medida, inactiva la enzima nitrogenasa, y por lo tanto la fijación N₂. Dentro de ciertos límites de tiempo, si se recupera la humedad edáfica, se reactiva la enzima. Si la sequía continúa, la enzima es destruida y hay muerte y desprendimiento nodular. La primera respuesta a la sequía es reversible, mientras que la respuesta a sequías prolongadas es irreversible (Fig. 4.4).

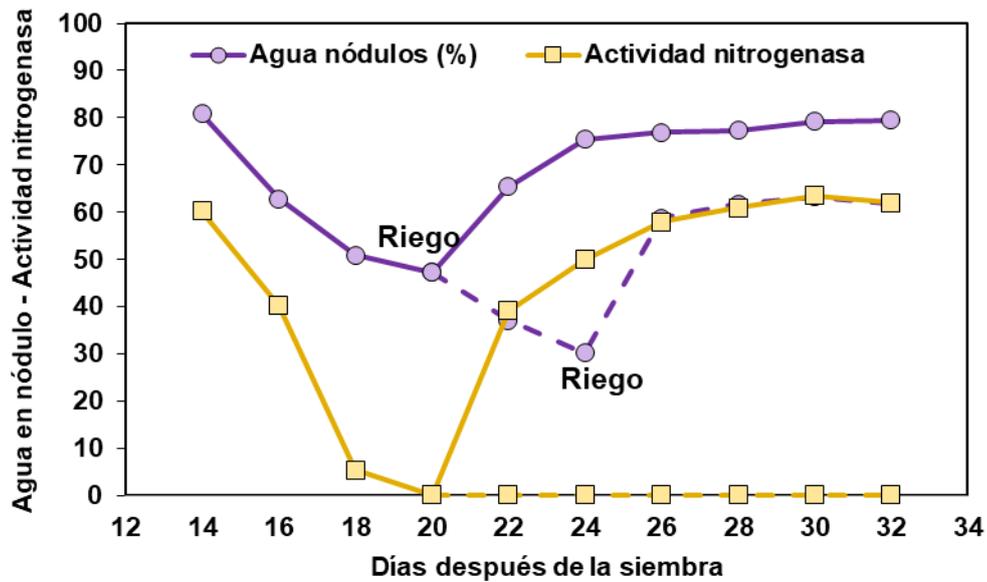


Fig. 4.4. Evolución de la fijación de nitrógeno evaluada según la actividad nitrogenasa ($\text{mM C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1} \text{ ha}^{-1}$) y el contenido de agua de los nódulos (%) (Racca, 2003)

En períodos de sequía (condiciones de estrés hídrico), los factores naturales que en un lote condicionen la capacidad de almacenar agua en el suelo, como cantidad de rastrojo, tipo de labranza, diferencias leves en el relieve del terreno, etc, inducen a variaciones en la nodulación (Fig. 4.5).

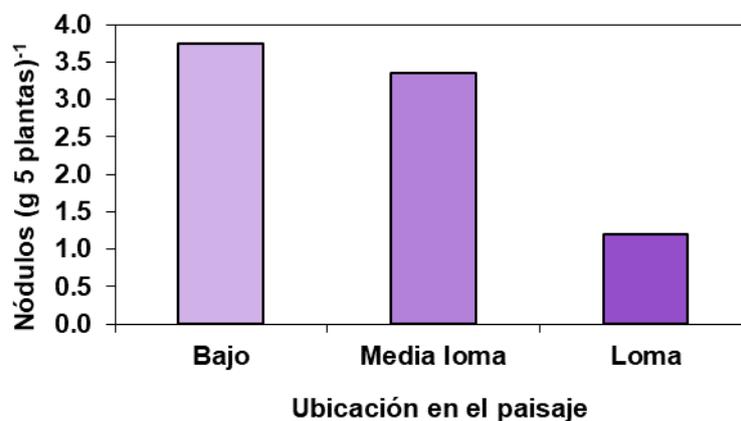


Fig. 4.5. Nodulación (peso seco) de plantas de soja según el relieve del lote en Gral. Villegas, Buenos Aires (Fernández-Canigia y Díaz-Zorita 1997).

El exceso de agua (anegamiento) también afecta a los dos socios de esta simbiosis, rizobio y leguminosa, al generar anaerobiosis (falta de O_2) en el suelo. El oxígeno es indispensable para la vida del rizobio libre en el suelo y para la raíz de la planta. El encharcamiento llevará a la muerte de las bacterias del suelo, y a un detrimento de las

condiciones de crecimiento para la planta, que impedirá la nodulación y la fijación biológica, hasta la eliminación de los nódulos ya establecidos. El efecto de la inundación es más severo en las plantas que crecen a expensas del N₂ proveniente de la fijación biológica que en las que usan el N edáfico, indicando que la fijación de N₂ es más sensible que la planta misma.

En soja, las condiciones de anoxia (falta de oxígeno) completa detienen enteramente el crecimiento radical en 2 a 3 minutos. Cuando este estrés es de hasta 30 minutos la tasa de crecimiento retorna a la normalidad. Pero si dura más de 5 horas causa la muerte de las raíces.

◆ **Salinidad y sodicidad**

El estrés generado por la sequía o la alta temperatura es temporario y en muchos casos reversible, mientras que el estrés salino es más permanente, por lo que los organismos deben vivir y crecer en esas condiciones. Las cepas de diferentes especies de rizobios muestran una marcada variabilidad en cuanto a la tolerancia a los suelos salinos. Las leguminosas y el proceso de iniciación nodular son altamente sensibles al estrés salino, probablemente por la inhibición en el desarrollo de los pelos absorbentes.

La fijación de N₂ es menos sensible a la salinidad que otros procesos fisiológicos, como la expansión de las hojas. En soja se observó que una vez formados los nódulos la fijación biológica de N₂ se lleva a cabo, pero puede ser afectada indirectamente al reducirse la tasa de crecimiento del cultivo.

En La Pampa, Argentina, se observó que cepas de *Ensifer meliloti* adaptadas a condiciones de salinidad muestran mayor actividad enzimática (nitrogenasa, sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa), en el contenido de osmolitos (glucosa, fructosa y sacarosa) y promueven a mayor producción de biomasa aérea de plantas de alfalfa.

◆ **Acidez**

La acidez del suelo afecta todos los aspectos de la simbiosis, desde la supervivencia y multiplicación de los rizobios en el suelo, la infección y nodulación hasta la fijación de N_2 .

La acidez afecta a la simbiosis ya sea directamente, por el pH que tienen que soportar ambos simbioses, como indirectamente al generar toxicidades (ej. aluminio y manganeso), o deficiencias de nutrientes (calcio, molibdeno, fósforo, etc). Su importancia varía según el tipo de suelo.

Las especies de rizobio de crecimiento rápido son generalmente más sensibles que las de crecimiento lento a bajos valores de pH. Por ejemplo, *S. meliloti*, microsimbionte de alfalfa, casi desaparece en suelos de pH menor a 6.0, mientras que *B. japonicum*, microsimbionte de soja tolera valores de pH menores. Es de importancia el efecto del pH sobre los nutrientes del suelo. El pH bajo, generará, por ejemplo, deficiencias en la disponibilidad del fósforo, nutriente importante para la fijación de N_2 . Cuando los suelos son ácidos se recomienda encalar antes de la siembra para tener valores de pH cercanos a la neutralidad (pH 7).

◆ **Estrés biológico**

Al igual que otros factores que influyan sobre la planta, cualquier patógeno o plaga, que condicione la normal supervivencia de la planta afectarán directamente a la fijación de N_2 , deteniendo este proceso, desprendiendo los nódulos, o impidiendo la nodulación. Los nódulos pueden ser consumidos por algunos insectos del suelo.

La supervivencia de los rizobios en vida libre, como la de cualquier bacteria, está condicionada a la competencia con otros microorganismos, a los efectos antibióticos (ej. hongos) y a la predación por otros organismos (ej. protozoos).

◆ **Nutrición mineral**

• **Nitrógeno:**

Las plantas absorben el N del suelo en forma de nitratos o amonio. Esta obtención de nitrógeno es energéticamente menos costosa para la planta que el proceso simbiótico. Por lo tanto, el exceso de nitrógeno en el suelo especialmente en forma de nitratos tiene

un efecto inhibitorio sobre la simbiosis en todos los pasos, desde la infección, formación del nódulo y la fijación de N_2 .

En los primeros estadios, en los que todavía los nódulos no son funcionales, niveles moderados de N en el suelo pueden ser beneficiosos para el crecimiento de la planta y establecimiento del sistema nodular. Pero, a medida que el nitrógeno proveniente de los suelos aumenta, la nodulación se ve inhibida y, el nitrógeno derivado de la fijación biológica disminuye (Fig. 4.6 y 4.7).

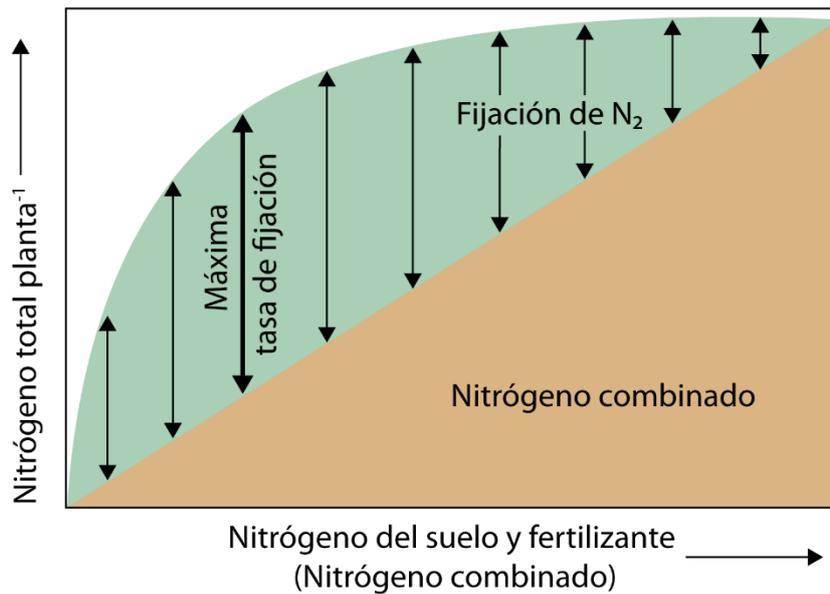


Fig. 4.6. Esquema simplificado de la relación entre la fijación de N_2 y la absorción de nitrógeno del suelo y del fertilizante en leguminosas noduladas (Adaptado de Marschner, 1990).

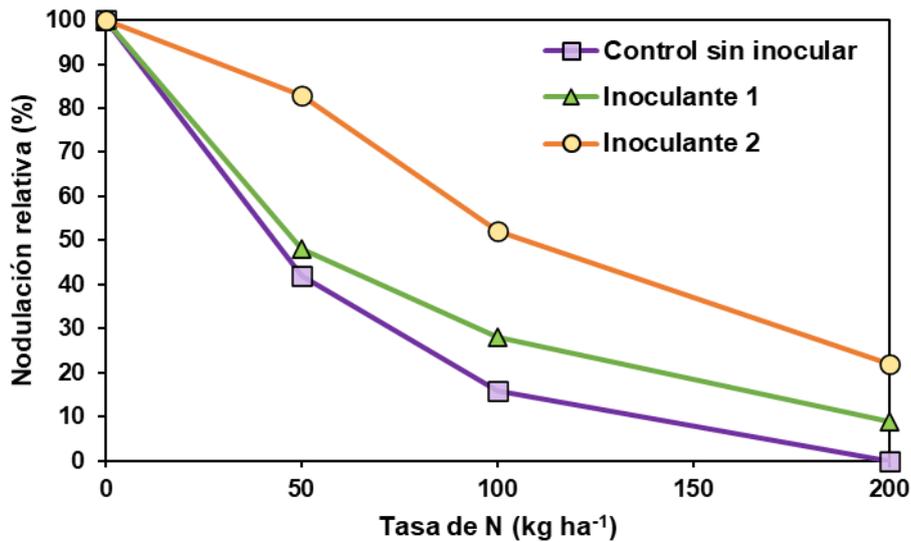


Fig. 4.7. Disminución de la nodulación de soja al aumentar la dosis de fertilización con nitrógeno (Adaptado de Díaz-Zorita y Barraco, 2004)

- **Fósforo:**

La simbiosis rizobio-leguminosa es altamente sensible a la carencia de fósforo (Fig. 4.8). El fósforo forma parte de las moléculas de ATP, que son las responsables de la liberación e intercambio de la energía. El fósforo es indispensable para la fijación biológica de nitrógeno por la alta energía que este proceso insume (16 moléculas de ATP/N₂ fijado) a lo que se debe sumar el consumo para la formación de los tejidos de los nódulos y para los procesos de reconocimiento genético (señales entre la planta y el rizobio). Para que sea posible la nodulación y fijación de N₂, es necesario un aporte adecuado de fósforo. Cuando la concentración de P en la planta es inferior al 0.2% la nodulación y la fijación de N₂ son casi despreciables. Por debajo de 0.1% ni siquiera se formarán nódulos. Las concentraciones de fósforo en los nódulos son en general, mayores que las concentraciones en el tallo o en el resto de la raíz.

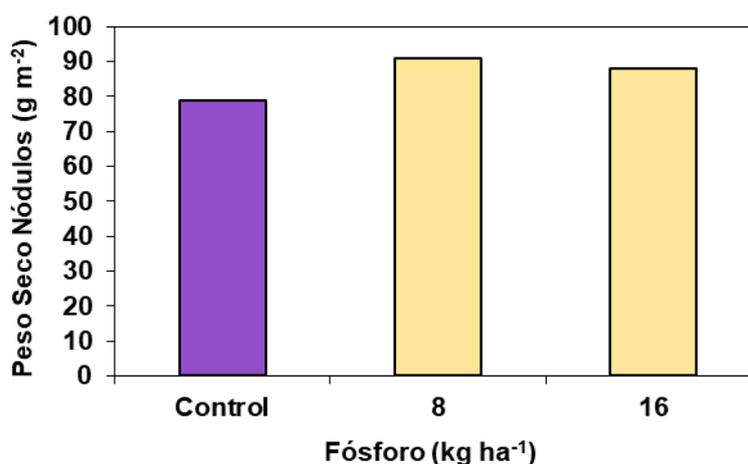


Fig. 4.8. Peso seco de los nódulos de soja con distintos niveles de fertilización con fósforo (Ferraris y col. 2001).

- **Azufre**

El azufre cumple una función en el metabolismo de los nódulos y forma parte de ciertas proteínas (ferredoxinas) que intervienen en la reducción del N₂. En condiciones deficientes, el azufre de la planta se concentra en los nódulos. No se ha descrito el efecto directo del azufre sobre la nodulación. Sin embargo, se observan incrementos en la nodulación como respuesta a la fertilización azufrada en suelos deficientes en este elemento (Fig. 4.9).

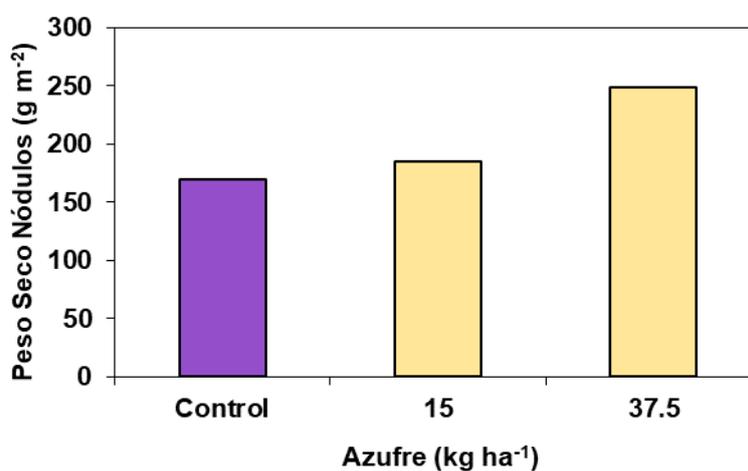


Fig. 4.9. Peso seco de los nódulos de soja con distintos niveles de fertilización con azufre (Ferraris y col. 2000).

- **Micronutrientes**

En el proceso de fijación biológica intervienen sustancias químicas (enzimas, proteínas y otros compuestos) que tienen en su constitución micronutrientes. Sus carencias generan por lo tanto fallas en el proceso de fijación (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Efecto de la carencia de los principales micronutrientes en la simbiosis rizobio-leguminosa y su función en la planta (Adaptado de Guiller 2001).

Elemento	Efecto (por carencia)	Función
Boro	Reducción en el tamaño de los nódulos	División celular
Cobalto	Reducción y retraso en la iniciación nodular	Presente en enzimas rizobianas
Cobre	Reducción en la fijación de N	(No es claro)
Hierro	Reducción en la iniciación nodular, desarrollo de los nódulos y tasa de fijación	Constituyente de proteínas y leghemoglobina
Molibdeno	Nódulos inefectivos. Deficiencia de N	Constituyente de la nitrogenasa
Níquel	Retraso de la nodulación. Reducción del crecimiento de la planta	Presente en enzimas en la planta y en los rizobios
Selenio	Reducción de la actividad hidrogenasa y crecimiento en Bradyrhizobios libres	Constituyente de la hidrogenasa de <i>Bradyrhizobium</i>
Zinc	Reducción en el número y tamaño nodular	Posiblemente involucrado en la síntesis de leghemoglobina

CAPITULO 5

FACTORES DE ESTRÉS, NODULACIÓN Y FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

¿CÓMO PODEMOS PREVENIR LOS EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ESTRÉS?

Son varias las alternativas agronómicas que permiten prevenir y reducir los efectos negativos de ciertas condiciones estresantes sobre la nodulación y la fijación biológica de N₂. Debido a que se trata de una simbiosis, para lograr una nodulación exitosa, se deben evitar las condiciones estresantes tanto en la planta como en el rizobio.

Las siembras con suelos húmedos y su mantenimiento favorecen la nodulación. La presencia de rastrojos atenúa las temperaturas extremas, manteniendo los suelos más frescos y húmedos. Además, en siembra directa la menor mineralización reduce el estrés por nitrógeno, favoreciendo la mejor nodulación inicial de los cultivos. Por lo tanto, en zonas de secano, los barbechos con cobertura de rastrojos (siembra directa), son una alternativa de manejo favorable (Fig. 5.1).

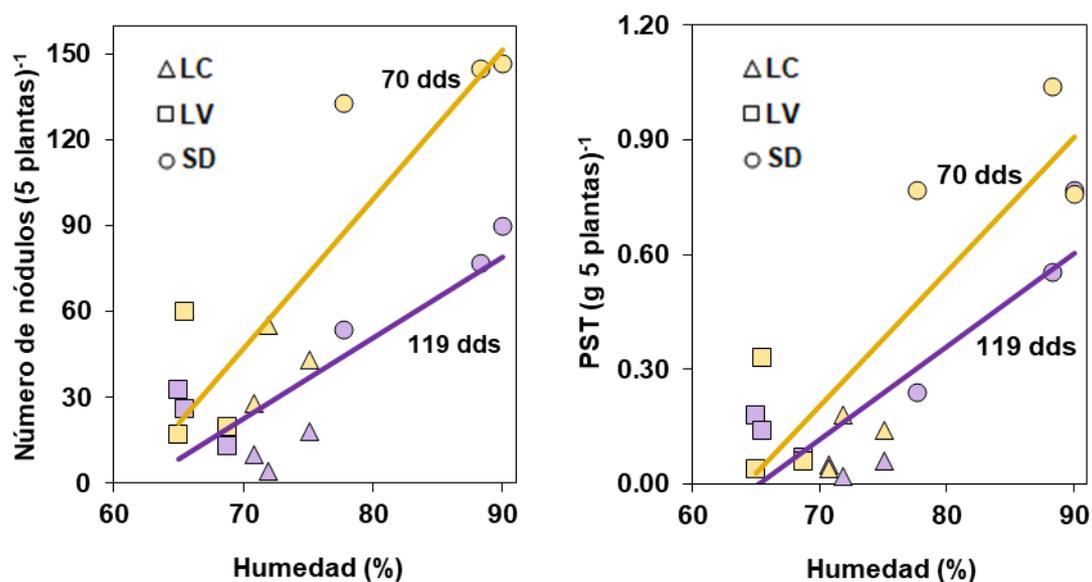


Fig. 5.1. Número y peso seco total (PST) de nódulos de soja según contenidos de humedad edáfica bajo tres sistemas de labranza LC labranza convencional, LV labranza vertical, SD siembra directa. dds días desde la siembra (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia 1999).

En suelos ácidos, el pH se controla con encalado, lográndose condiciones favorables para la supervivencia de las bacterias y nutrición del cultivo. En el caso de suelos con valores de pH mayores a 7 (alcalinos o sódicos), es recomendable el uso de yeso (CaSO_4) y su lavado, para su corrección.

Las altas acumulaciones de nitrógeno en suelos ricos en materia orgánica, generarán plantas con poca nodulación. No obstante, se recomienda la inoculación con el fin de que los nódulos presentes sean mayormente ocupados por cepas efectivas.

Los problemas de deficiencias nutricionales para el cultivo y/o las bacterias, se solucionan con la aplicación de los fertilizantes adecuados. En la República Argentina es frecuente la necesidad de fertilizar con fósforo y/o azufre. Su aplicación mejora la nodulación y rendimientos de los cultivos (Figs. 5.2 y 5.3).

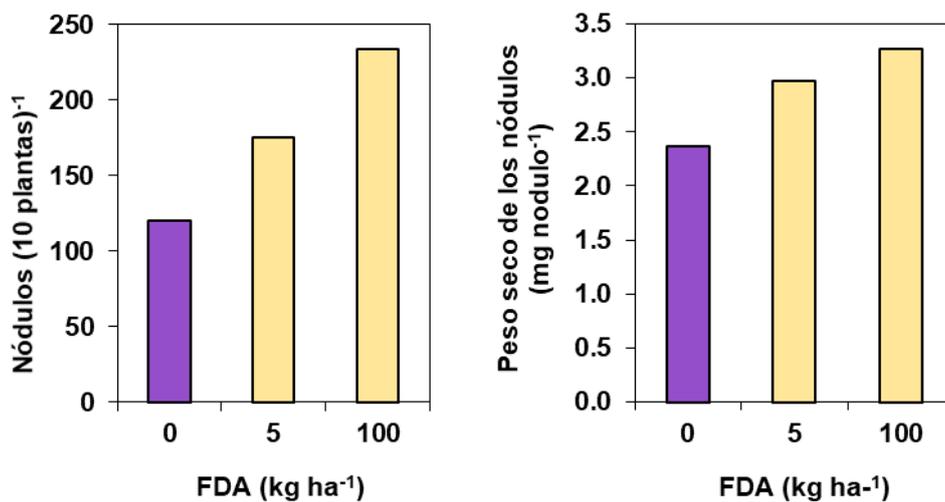


Fig. 5.2. Efecto de la aplicación de fosfato diamónico (FDA) sobre el número y peso seco de los nódulos de soja en R2 (Díaz-Zorita y col. 1999)

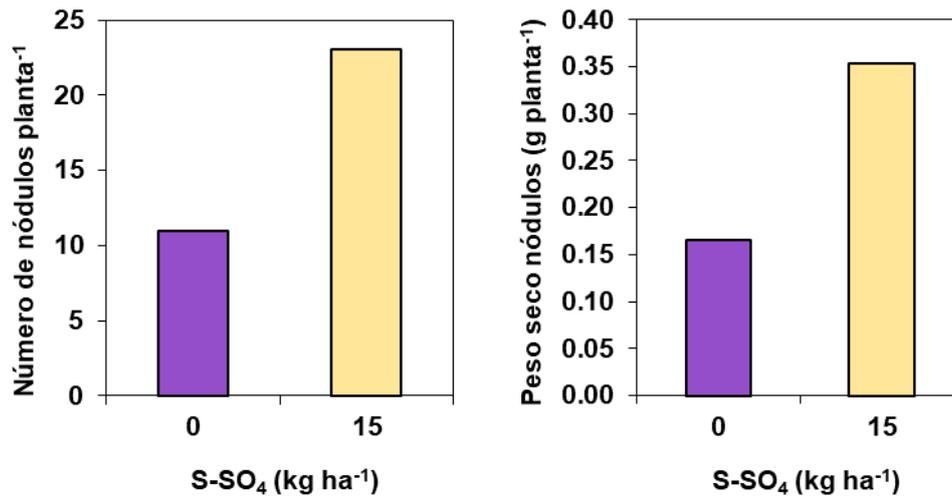


Fig. 5.3. Efecto de la fertilización azufrada con sulfato de potasio (K_2SO_4) sobre la nodulación de soja en Monte Redondo, Tucumán (Adaptado de Medina y col., 2002).

El estrés biológico es muy marcado cuando la planta reduce su crecimiento por enfermedades, siendo muy importante mantener adecuada sanidad de los cultivos.

La salinidad, junto con la sequía son las condiciones estresantes de más difícil manejo. No se recomienda sembrar soja en suelos salinos o sódicos ni en suelos secos. Si la salinidad es baja, se puede sembrar e inocular soja, pero es importante que el suelo se mantenga húmedo (mediante cobertura de rastrojos), para limitar la evapotranspiración y así evitar el aumento de la concentración de las sales.

EFFECTIVIDAD DE LA NODULACIÓN

¿INFLUYE EL VIGOR DE LAS SEMILLAS EN LA NODULACIÓN?

La nodulación temprana es influida por el vigor de la plántula, el que depende directamente de la calidad de las semillas y de las condiciones de siembra. Por ejemplo, en soja, a medida que aumenta el tiempo entre la siembra y la emergencia, disminuye el número de nódulos en la raíz principal. En menor medida, también se ven afectados el número de nódulos totales y el peso de nódulos por planta (Fig. 6.1)

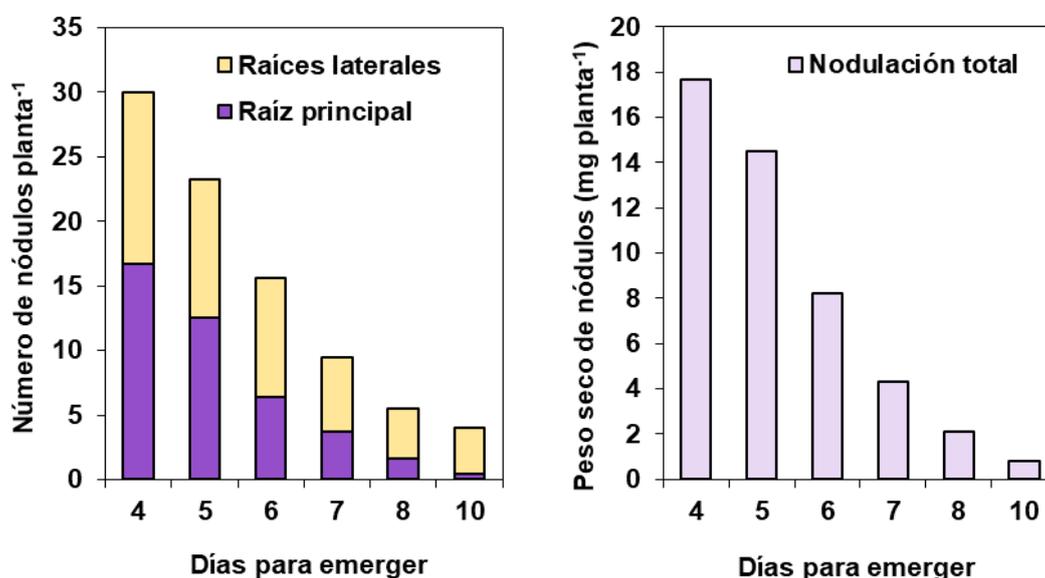


Fig. 6.1. Nodulación en plantas de soja según la duración entre la siembra y la emergencia (Adaptado de Smith y Ellis 1980)

LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO, ¿SE PRODUCE DURANTE TODO EL CICLO DE LA PLANTA?

En las leguminosas anuales, como soja, la tasa de fijación varía a lo largo del ciclo de crecimiento. Es muy baja en los estadios vegetativos. En ese período son más importantes los aportes de nitrógeno desde el suelo. No obstante, es la etapa crítica para la formación de los nódulos con cepas de calidad seleccionada provistas por los inoculantes.

La mayor tasa de fijación biológica en soja se produce a partir del comienzo de las etapas reproductivas (fin de floración y llenado de grano) y que coincide con la mayor

demanda de nitrógeno. Luego de R5 la tasa de fijación disminuye hasta hacerse nula antes de la madurez fisiológica (Fig. 6.2). Este fenómeno ocurre porque la planta destina gran cantidad de hidratos de carbono (fuente de energía para los rizobios) hacia los granos, desactivando así la actividad de la fijación biológica de N_2 . Los nódulos quedan sin “alimentación”, mueren y se desprenden.

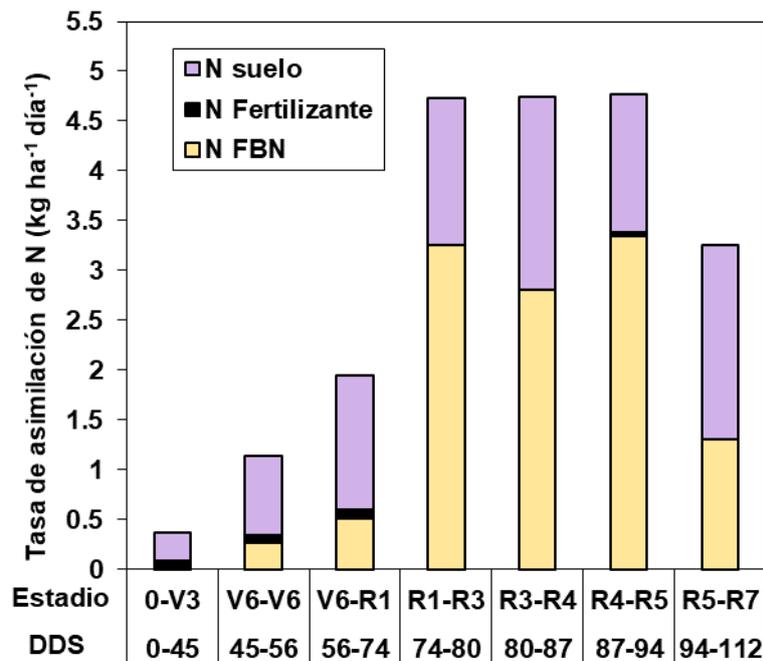


Fig. 6.2. Tasa diaria de asimilación de nitrógeno del fertilizante, del suelo y de la fijación biológica en soja. DDS: Días desde la siembra (Adaptado de Zapata y col. 1987).

¿SON LAS POBLACIONES NATURALIZADAS Y LAS INTRODUCIDAS, IGUALMENTE COMPETITIVAS Y EFECTIVAS?

Las **cepas naturalizadas**, las cuales fueron incorporadas por la inoculación y sobrevivieron en forma libre, son capaces de soportar los diferentes tipos de estrés ambiental, (ej. desecación del suelo, altas temperaturas, heladas, etc). Las cepas que superan esas condiciones lo hacen por tener una mejor adaptación a las condiciones adversas, es decir, son competitivas, pero no necesariamente efectivas en la fijación de N_2 .

Por el contrario, las **cepas introducidas** con un inoculante se desarrollaron bajo condiciones óptimas para su crecimiento en laboratorio. Son más vulnerables a las condiciones de estrés y menos competitivas que las cepas naturalizadas. Las **cepas introducidas** son seleccionadas, entre otras características, por su capacidad de fijar

nitrógeno. Por lo tanto, un inoculante de calidad está formado por cepas altamente efectivas, e infectivas para las leguminosas específicas.

Las bacterias no son organismos genéticamente estables como lo son los organismos superiores. Si bien las cepas naturalizadas en el momento de ingresar al suelo, provenían de un inoculante seleccionado, sus características varían a medida que transcurre el tiempo. Las cepas naturalizadas, adaptadas al sitio, fijan menos nitrógeno que las introducidas (seleccionadas para fijar N_2).

Por lo tanto, las cepas naturalizadas son más competitivas y menos efectivas que las introducidas. Debido a esto, en el caso de soja, en lotes con historia sojera, aunque ya tienen alto número de rizobios naturalizados, se recomienda inocular los cultivos que sean sembrados.

¿EXISTE DIFERENCIA EN LA EFICIENCIA DE LOS NÓDULOS DE LA RAÍZ PRINCIPAL Y LAS LATERALES?

El crecimiento de las raíces se produce a partir de tejidos especializados que se multiplican activamente (meristemas de crecimiento) localizados en sus extremos. Por lo tanto, en una raíz madura, lo que fue originalmente la radícula, que emergió de la semilla, corresponderá a la parte superior de la raíz principal (corona o cuello de la raíz). Además, la zona de los pelos absorbentes, donde se produce la infección, se encuentra cerca de los extremos de las raíces. Los nódulos se desarrollan en crecimiento activo. Por lo tanto, el crecimiento de las raíces principal o laterales hace que la “zona infectable” de la raíz se aleje del cuello y en consecuencia de las cepas de rizobios introducidas con el inoculante.

Las cepas provenientes del inoculante se desarrollan alrededor de la radícula. Si bien los rizobios son bacterias móviles, su desplazamiento es limitado y depende del movimiento del agua alojada en los microporos, por lo que se genera una zona rica en rizobios introducidos alrededor de la radícula. La nodulación que se produce en esa etapa, en una raíz madura se verá en el cuello de la raíz (raíz principal y primeros centímetros de las laterales). A medida que la raíz crece, la zona de los pelos absorbentes se aleja del núcleo de alta carga rizobiana en el suelo (Fig. 6.3).

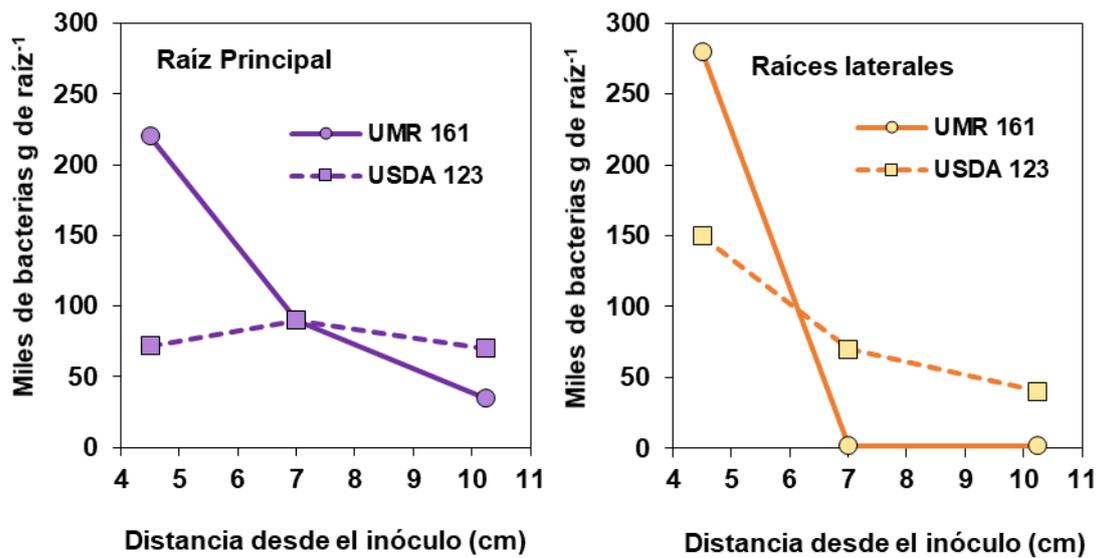


Fig. 6.3. Poblaciones de dos cepas *B. japonicum* (UMR 161 y USDA 123) en raíces de soja. Disminución del número de bacterias al aumentar la distancia desde el sitio del inóculo (Adaptado de McDermott y Graham 1989)

Si bien algunos rizobios pueden acompañar el crecimiento de la raíz algunos centímetros, la raíz se “encontrará” a su paso con rizobios naturalizados que serán los que, en mayor medida, nodulen las raíces laterales.

En síntesis, en el cuello de la raíz (raíz principal y primer parte de las laterales) predominan las cepas introducidas, más eficientes, y en las raíces laterales, alejadas de la principal, cepas naturalizadas, menos eficientes (Foto 6.1).

Aunque los nódulos laterales se formen por cepas introducidas efectivas, tienen menor actividad nitrogenasa (fijadora de N_2) con respecto a los ubicados sobre la raíz principal. Por ejemplo, Racca (1986) registró que en soja la actividad nitrogenasa específica de los nódulos de la raíz principal, medida por la capacidad reductiva del etileno a acetileno, a igualdad de peso seco, es de $36,02 \mu M g^{-1} h^{-1}$ mientras que la de los nódulos de las raíces laterales es de $2,86 \mu M g^{-1} h^{-1}$. Esta diferencia sería por el menor aporte de energía por parte de la planta en raíces laterales respecto a la principal.



Foto 6.1. Nodulación en la corona de la raíz y nodulación en las raíces laterales de soja (gentileza A. Peticari).

¿QUÉ FACTORES AFECTAN LOS PATRONES DE NODULACIÓN?

Las condiciones de estrés (sequía durante la siembra, retardo en la emergencia de la radícula, etc.) afectan a las cepas introducidas, ya que estas no están adaptadas a sobrevivir ante factores adversos. Si las condiciones ambientales en el momento de la inoculación y de manejo del inoculante son adversas (ej. falta de humedad a la siembra, etc), generarán la muerte de cepas introducidas con el inoculante disminuyendo su número y predominarán las cepas naturalizadas, prevaleciendo los nódulos en raíces laterales. El cultivo de soja bajo riego es un ejemplo de condiciones óptimas de humedad en el momento de la siembra, mientras que las condiciones de cultivo en secano, donde la falta de humedad es más difícil de manejar, inducirían a una mayor mortandad del inoculante y, por lo tanto, menor nodulación en cuello de la raíz (Fig. 6.4).

La siembra directa, al mantener más humedad en el suelo que las labranzas con remoción, provee mejores condiciones de sobrevivencia para las bacterias del inoculante y una mejor nodulación sobre la raíz principal (Fig. 6.5).

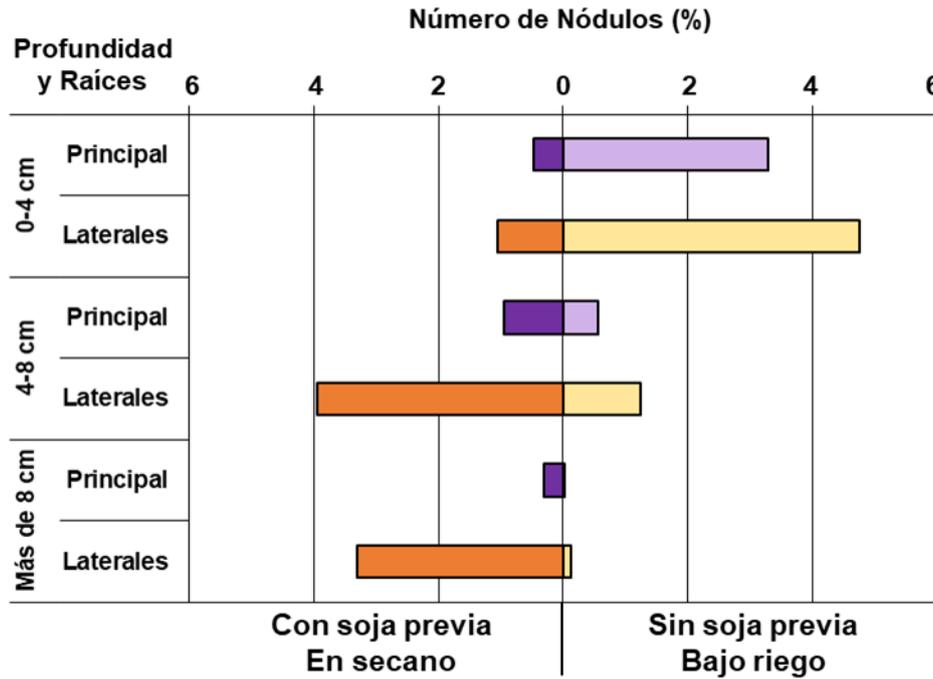


Fig. 6.4. Distribución relativa de los nódulos según su ubicación en el sistema de raíces en un suelo con antecedentes de producción de soja en seco (adaptado de Silva 1997) y sin antecedentes del cultivo bajo riego (adaptado de Fernández-Canigia 1993).

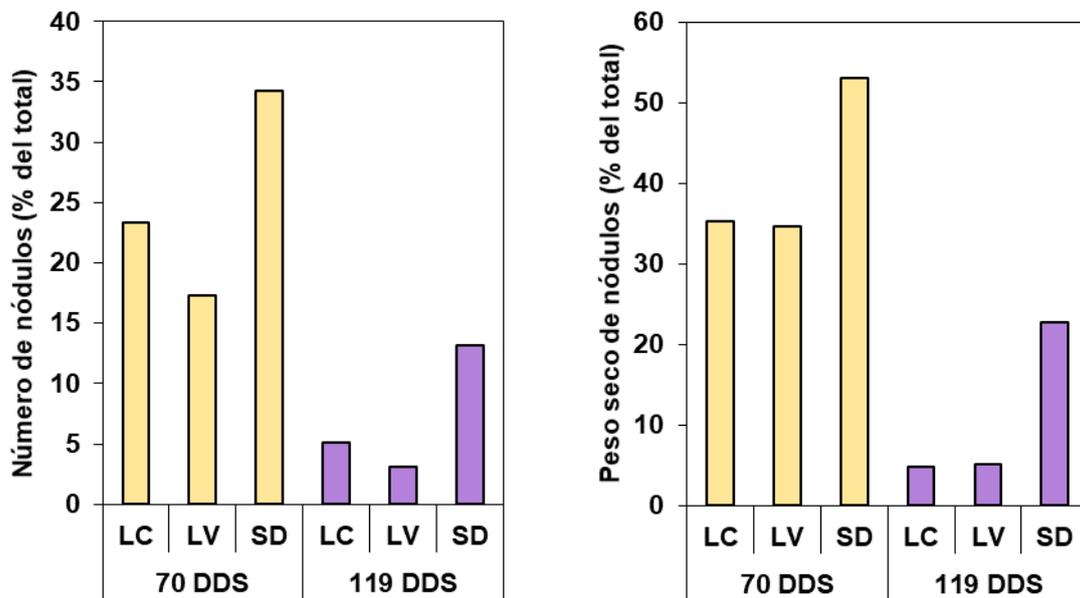


Fig. 6.5 Efecto de las labranzas sobre el porcentaje de número y peso seco de los nódulos en la corona de la raíz. LC: Labranza convencional (reja); LV: Labranza vertical (cincel); SD: Siembra directa. DDS: Días desde la siembra. (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia 1999)

¿PODEMOS DIAGNOSTICAR SI LA NODULACIÓN ES EFECTIVA?

En el campo, la observación del cultivo (color de la parte aérea, presencia, tamaño, ubicación y color del interior de los nódulos) permite diagnosticar el éxito de la nodulación y de la efectividad de esos nódulos (Fig. 6.6 y Foto 6.2).

Según la ubicación de los nódulos en la raíz, se puede estimar el éxito de la práctica de inoculación.

- La nodulación en la corona de la raíz (sobre un cilindro imaginario de 2 a 3 cm alrededor de la raíz principal sin considerar el tallo) sugiere que los nódulos provienen mayormente del inoculante (inoculación exitosa) (Fig. 6.7 y Foto 6.2)
- La ausencia de nódulos en la corona y presencia de nódulos en los extremos de las raíces laterales sugiere que nodulación proviene fundamentalmente de las cepas naturalizadas (fallas en la inoculación).

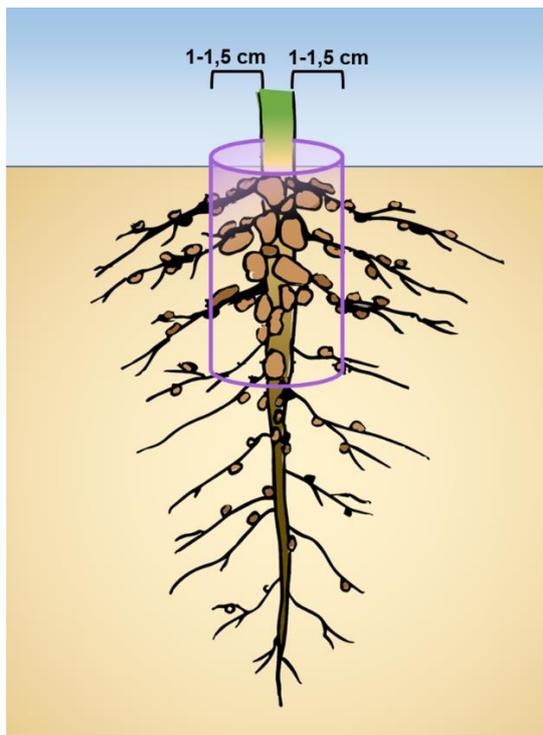


Fig. 6.7. Nódulos en el cilindro alrededor de la corona de la raíz principal (Fernández-Canigia, 1993).



Foto 6.2. Nodulación en la corona de la raíz mostrando el interior de los nódulos rojos. (gentileza A. Peticari).

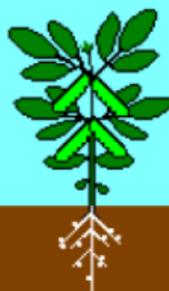
	<p>NO INOCULADA</p> <p><i>Planta amarilla. Sin nódulos.</i></p> <p>Sin rizobios nativos capaces de nodular esa leguminosa</p>		<p>INOCULADA</p> <p><i>Planta verde oscuro. Nódulos grandes y con el interior rojo.</i></p> <p>Los rizobios del inoculante son altamente efectivos y los rizobios nativos son inefectivos.</p>
	<p>NO INOCULADA</p> <p><i>Planta amarilla. Muchos nódulos pequeños y blancos en su interior.</i></p> <p>Los rizobios nativos son inefectivos en la fijación de nitrógeno</p>		<p>NO INOCULADA</p> <p><i>Planta verde. Sin nódulos.</i></p> <p>Suelo con alta concentración de nitrógeno mineral. Rizobios del suelo no compatibles con la leguminosa</p>
	<p>INOCULADA</p> <p><i>Planta amarilla. Sin nódulos.</i></p> <p>Fracaso en la inoculación. Rizobios inadecuados o muertos</p>		<p>NO INOCULADA</p> <p><i>Planta verde oscuro. Nódulos grandes con el interior rojo.</i></p> <p>Rizobios del suelo efectivos.</p>
	<p>INOCULADA</p> <p><i>Planta verde oscuro. Nódulos pequeños.</i></p> <p>Suelo con alta concentración de nitrógeno mineral. Los nódulos no fijan nitrógeno atmosférico.</p>		<p>NO INOCULADA</p> <p><i>Planta verde oscuro. Nódulos pequeños.</i></p> <p>Suelo con alta concentración de nitrógeno mineral. Rizobios nativos pueden ser efectivos o inefectivos</p>

Fig. 6.6. Guía para el diagnóstico de la nodulación y eficiencia de fijación aparente de N₂ en plantas de soja (Adaptado de Singleton, 2003).

CAPITULO 7

LOS INOCULANTES Y LA NODULACIÓN

¿QUÉ ES INOCULAR?

Inocular es incorporar en la rizosfera (con las semillas u otro método) bacterias seleccionadas por su alta eficiencia de fijación biológica de nitrógeno, en alta concentración, capaces de formar simbiosis con la leguminosa cultivada.

EN SUELOS QUE NUNCA TUVIERON SOJA, ¿ES NECESARIO INOCULAR?

En condiciones naturales el proceso de simbiosis requiere del desarrollo evolutivo de los dos simbiote. El centro de origen de la soja está en la China y fue introducido en Sudamérica por lo que en los suelos argentinos no se encuentra naturalmente a su microsimbionte (*Bradyrhizobium japonicum*, *B. diazoefficiens* o *B. elkanii*). En ausencia de inoculación, introducción del microsimbionte en el entorno rizosférico de la soja, no se logra nodulación y en consecuencia no hay fijación biológica de N₂.

Es así como en suelos sin antecedentes de manejo de soja con inoculación esta práctica es indispensable para el normal abastecimiento de nitrógeno de la leguminosa.

EN SUELOS CON HISTORIA SOJERA, ¿ES NECESARIO INOCULAR?

Las cepas naturalizadas, además de ser más inefectivas que las provenientes de un inoculante, están en el suelo en estado inactivo. En contacto con los exudados de la raíz y, a medida que esta crece, comienzan a multiplicarse, para luego infectarla. En cambio, las bacterias del inoculante presentes en altas concentraciones, producen una nodulación inmediata, con abundancia de nódulos en la corona de la raíz principal (Fig. 7.1).

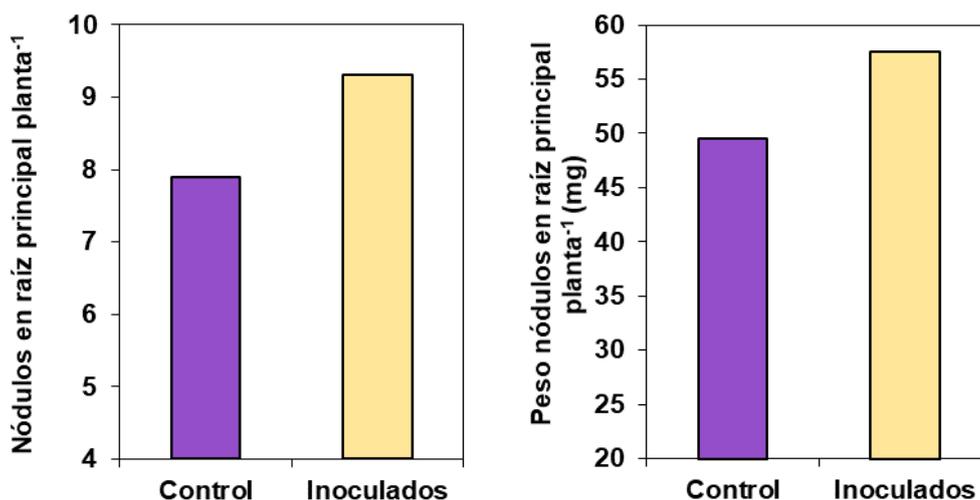


Fig. 7.1. Cambios en la nodulación de soja según tratamientos de inoculación. Promedio de 28 sitios de producción en Argentina. (Adaptado de Piccinetti y col., 2011).

¿QUÉ SON LOS INOCULANTES?

Los inoculantes son productos utilizados para introducir rizobios en el ambiente de la raíz de leguminosas. Son cultivos de bacterias especialmente seleccionados, acondicionados y formulados sobre un soporte (“carrier”) sólido o líquido, para su aplicación en tratamientos de semillas o directamente en el surco durante la operación de siembra.

¿QUÉ CARACTERÍSTICAS DEBE TENER UN INOCULANTE?

◆ Especificidad:

La inoculación de una leguminosa debe realizarse únicamente con la especie específica para esa leguminosa (por ej. *Ensifer meliloti* para alfalfa y *Bradyrhizobium japonicum*, *B. diazoefficiens* o *B. elkanii*, para soja). No habrá nodulación si no se utiliza el inoculante correcto.

Tabla 7.1. Principales especies de rizobios recomendables para producir inoculantes para leguminosas cultivadas en Argentina.

Cultivo	Género y especie de rizobio
Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>B. diazoefficiens</i>
Maní	<i>Bradyrhizobium sp (Maní)</i>
Lupino	<i>Bradyrhizobium sp (Lupino)</i>
Alfalfa, <i>Melilotus</i> , <i>Medicago</i>	<i>Ensifer meliloti</i>
<i>Lotus glaber</i> , <i>Lotus corniculatus</i>	<i>Mesorhizobium loti-M. huakii</i>
Garbanzo	<i>Mesorhizobium cicerii</i>
Poroto	<i>Rhizobium etli</i> , <i>R. tropici</i>
Arveja, Lenteja, Vicia	<i>Rhizobium leguminosarum biovar viceae</i>
Tréboles	<i>Rhizobium leguminosarum sv trifolii</i>

¿Cómo asegurarse de que el inoculante es el adecuado?

- En el marbete del producto a utilizar como inoculante, entre otras informaciones, se indica el nombre de la leguminosa para la que está indicado su uso.

◆ **Infectividad:**

La infectividad de los rizobios en los inoculantes se relaciona con la cantidad y la calidad o estado fisiológico de las bacterias provistas sobre semillas y en particular en la rizosfera. El número de bacterias vivas aportadas por el inoculante debe ser adecuado para superar la competencia con las cepas naturalizadas del suelo. También estas bacterias deben estar fisiológicamente adaptadas para enfrentar diversos factores de estrés a las que se expondrán hasta desencadenar la nodulación tanto por condiciones ambientales durante el tratamiento, almacenaje y siembra de las semillas como de habilidad de competencia frente a cepas naturalizadas y otros microorganismos del suelo.

La formulación del inoculante, definida no solo por sus componentes sino por sus procesos de elaboración y acondicionado previo a la inoculación es de singular importancia para lograr la infectividad buscada. El número, o concentración, de las bacterias en los inoculantes son una parte de la formulación sin ser el único factor determinante de su infectividad. Es por esto por ejemplo que, en Argentina, la regulación indica una concentración mínima de rizobios en el momento de elaboración de los inoculantes en el momento de vencimiento además de demostrar su capacidad de formación de nódulos ubicados en el cuello de la raíz de una alta proporción de las plantas

inoculadas. En términos de unidades formadoras de colonias (ufc) o forma indirecta de cuantificar el número de bacterias los inoculantes de soja deben garantizar al menos 1×10^9 ufc $\text{ml}(\text{g})^{-1}$ en el momento de su elaboración y más de 1×10^8 ufc $\text{ml}(\text{g})^{-1}$ en su vencimiento. Al considerar la dosis de uso recomendada se tienen que lograr aportes aparentes de al menos 80.000 bacterias semilla^{-1} .

¿Cómo asegurarse de que el número de bacterias del inoculante es el adecuado?

- No utilizar inoculantes después de la fecha de su vencimiento. A partir de la fecha de envasado el número de bacterias disminuye (Fig. 7.2). En el momento del vencimiento los inoculantes tienen el número límite de bacterias aceptado por la legislación.

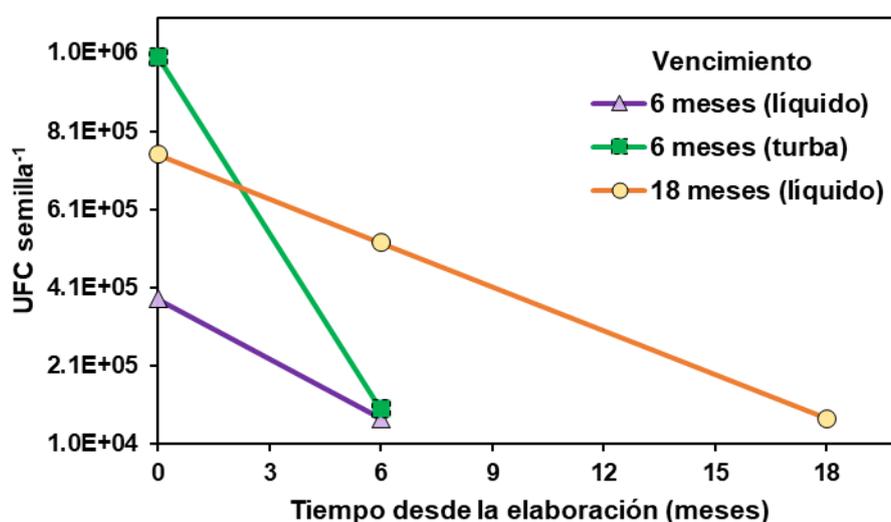
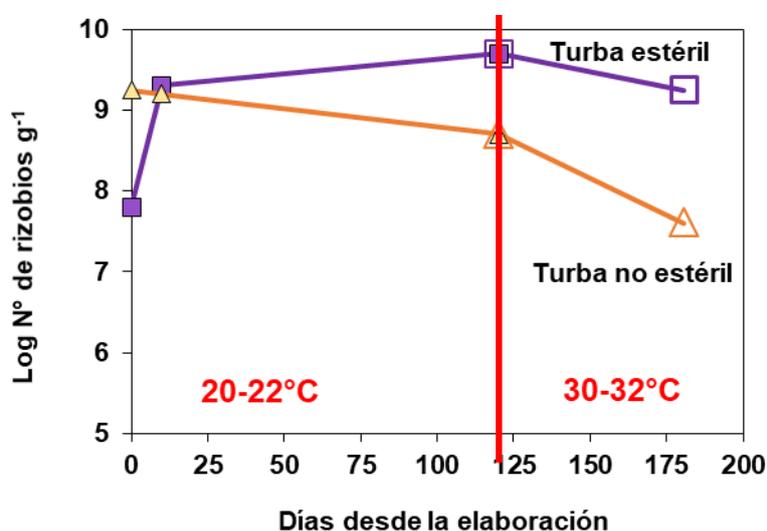


Fig. 7.2. Evolución de las unidades formadoras de colonias (UFC) de rizobios en distintos tipos de inoculantes según sus datos de marbete (Adaptado de Penna y col., 2002).

- Deben adquirirse en comercios responsables. Los rizobios son organismos vivos. Si en el comercio, o durante su transporte, el inoculante no se manipuló en condiciones adecuadas de temperatura (debe ser mantenido en lugares frescos y oscuros, sin congelarlo y sin exponerlo a temperaturas elevadas), pudo disminuir drásticamente el número, aunque no esté vencido.
- Después de la compra debe ser mantenido en un lugar fresco y oscuro hasta su uso. En sólo unas horas a pleno sol, el número caerá significativamente. El sol, no solo afecta a las bacterias por la temperatura que puede generar, sino también por el efecto bactericida de los rayos ultravioletas.

◆ Esterilidad:

La esterilidad es la ausencia de cualquier microorganismo. Cuando nos referimos a un inoculante, se habla de la esterilidad del soporte sobre el cual se mezcla el rizobio específico. En nuestro país existen inoculantes, como algunos de los formulados sobre turbas, los formulados con caolines, dolomita, bentonitas y los oleosos que están producidos en forma no estéril. Los microorganismos extraños compiten con los rizobios con ventaja, debido a que ya están adaptados a ese ambiente antes del agregado de los rizobios. Esta competencia deriva en un descenso en el número de rizobios vivos (Fig. 7.3). En la actualidad gran parte de los inoculantes en base turba y todos los inoculantes acuosos son estériles, lo que elimina la competencia microbiana.



1. **Esterilidad = mayor estabilidad.** En ambas temperaturas, es mayor la caída del número de rizobios en el soporte no estéril.
2. **Al aumentar la temperatura** de almacenamiento se **acelera la muerte** de los rizobios

Fig. 7.3. Evolución del número de rizobios por gramo de inoculante húmedo a partir de su cultivo en turba estéril (cuadrados) y turba no estéril (triángulos) y dos condiciones de temperatura (20-22°C hasta 120 días y 30-32°C desde 120 días) en el almacenamiento. (Adaptado de Cozzi y Benitende en Maddonni y col. 2003).

¿Cómo asegurarse de que el inoculante está estéril?

- Asegurarse de que el marbete indique que se trata de un inoculante estéril.
- Controlar que los envases estén cerrados y precintados por el fabricante.
- Nunca abrir el envase hasta su uso. Utilizarlo inmediatamente una vez abierto. No es recomendable guardar el inoculante si el envase fue abierto debido al alto riesgo de contaminación que generará la disminución del número de rizobios.

¿HAY DIFERENCIAS EN LA EFICACIA AL INOCULAR CON LOS INOCULANTES EN BASE TURBA Y CON LOS LÍQUIDOS?

No. Existen estudios que demuestran que los dos tipos de inoculante son comparables (siempre que se trate de turba estéril) (Fig. 7.4). La turba es un sustrato orgánico, muy rico en nutrientes, y con capacidad para retener humedad. Por este motivo, los inoculantes sobre la base de turba, tradicionalmente se consideraron más seguros en cuanto a la supervivencia de la bacteria en el inoculante o sobre la semilla. Sin embargo, la tecnología actual de los inoculantes y su correcto manejo hace que los inoculantes líquidos acuosos sean tan eficaces como los basados en turba estéril.

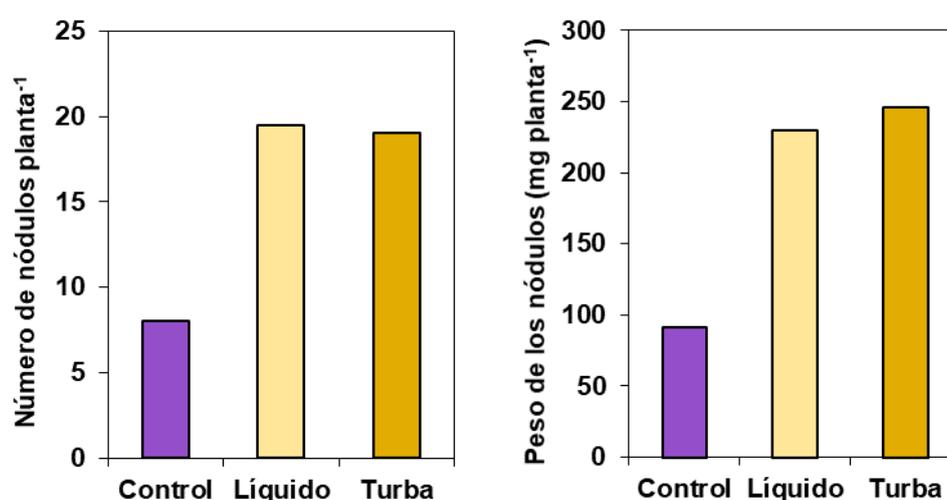


Fig. 7.4. Nodulación en soja en condiciones de campo a partir de inoculantes líquidos y turba estéril como soporte. Control: no inoculado (Adaptado de Thao, 2002).

El manejo de los dos tipos de inoculante es similar. La diferencia radica en que la turba necesita adhesivos para que se fije a la semilla. La adherencia de la turba a la semilla depende de su calidad (debe tener textura fina, bajo tenor de arcilla y de partículas gruesas). Los adhesivos normalmente se adquieren junto con el inoculante. Los inoculantes líquidos no requieren ningún adherente.

La calidad de los inoculantes y su evaluación

Elaborado por Gabriel Gutkind (UBA-CONICET) y Alejandro Peticari (INTA)

El concepto de calidad de los inoculantes ha ido variando con el tiempo tanto en función de las metas accesibles para los productores como de los métodos evaluación disponibles para asegurar su cumplimiento.

Históricamente los inoculantes para soja eran producidos por fermentación líquida, en forma de cultivos puros, o conteniendo una mezcla de cepas, seleccionados para una efectiva nodulación en una zona o clima determinado. Estos cultivos eran mezclados con diferentes soportes sólidos, entre los que la turba molida fue el más utilizado hasta bien entrados los años 90; si bien no eran estériles, podían ser sujetos a diferentes estrategias de descontaminación previa (Burton 1967 y 1984). Como los rizobios recomendados para soja son de crecimiento lento, disminuir la carga microbiana acompañante era la mejor estrategia para obtener inoculantes en base turba que tuviesen una mayor sobrevida y homogeneidad en su calidad, superior a aquellos realizados sobre soportes sólidos muy contaminados con una microbiota variable y no caracterizarle. En los soportes sin disminución de la carga microbiana acompañante, los microorganismos de crecimiento rápido desplazan por su desarrollo a aquellos inoculados. La inoculación y la maduración de estos inoculantes se realizaba en recipientes abiertos, a granel y, una vez envasados, aún los de mejor calidad y estabilidad, podían garantizar estos parámetros solo hasta seis meses.

En los muy pocos casos en los que se intentaba la esterilización, por ejemplo, con exposición de la turba a 121°C durante 3,5 horas o a muy altas dosis de radiación gama, el material estaba previamente fraccionado en bolsas resistentes y la inoculación se realizaba, bolsa por bolsa, en cabinas de flujo laminar por lo que los costos aumentaban considerablemente.

Aun usando medios de cultivo selectivos y diferenciales, sólo los inoculantes producidos en forma estéril podían ser controlados por los métodos convencionales de recuento en placa. En el resto de los soportes los microorganismos contaminantes, durante los 7 a 10 días necesarios para su enumeración como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de producto, superaban en su crecimiento a los rizobios. Esto implicaba necesariamente enumerar las bacterias presentes en el inoculante con ensayos de nodulación en plantas. De los diferentes métodos y diseños experimentales, el más

empleado era la determinación del número más probable de microorganismos capaces de generar nódulos. Para ello, se esterilizaban semillas de soja superficialmente y, una vez germinadas en recipientes adecuados, se inoculaban. Los recipientes evolucionaron desde las primitivas jarras de Leonard que requerían aproximadamente 1 kg de un soporte poroso estéril, humectados con una solución mineral sin incluir una fuente de nitrógeno al empleo de recipientes de menor volumen. En cada lote y ensayo, el procedimiento implicaba inocular 6 semillas estériles pregerminadas para cada dilución ensayada; luego de 3 semanas de incubación en invernáculos con ciclos de iluminación y condiciones ambientales controladas se examinaba si las plantas estaban o no noduladas. A partir del número positivo por dilución y usando tablas estadísticas específicas, con un intervalo de confianza del 95% de aproximadamente desde 1/3 hasta 3 veces el valor determinado, se podía establecer cuál era el número más probable de bacterias del inoculante capaces de nodular. La duración del ensayo se descontaba del potencial período de validez del inoculante, reduciendo su vida útil.

Más tarde, a partir de la provisión por los organismos oficiales de control, se usaron semillas de pequeño tamaño como las de siratro (*Macroptilium atropurpureum*), una leguminosa muy promiscua en su capacidad para ser infectada y formar nódulos por diferentes especies de rizobios. Para ser infectadas, estas semillas de una cutícula muy resistente debían ser escarificadas y simultáneamente esterilizadas con ácido sulfúrico. Por su tamaño, podían ser evaluadas después del desarrollo en tubos de ensayo o pequeñas bolsas plásticas o *pouches* y además se reducía el tiempo de incubación a 2 semanas. Analizando series de diluciones seriadas al décimo con 6 repeticiones, su intervalo de confianza era semejante al de la metodología con semillas de soja descripta.

La identidad de las cepas específicas era reconocida por reacciones serológicas. Los productores de inoculantes, y también los organismos oficiales de control, debían contar o producir sus antisueros para enfrentar a las bacterias presentes en el inoculante, una vez recuperadas de nódulos como única forma de asegurar su capacidad de infección. Este procedimiento era una limitación importante para la habilitación de los lotes de producción, muy difícilmente compatible con el tiempo requerido para que los productos lleguen en adecuadas condiciones a los productores.

Durante los primeros 15 años en los que la soja fue tomando un papel relevante en las economías regionales, muchas de las empresas productoras eran pequeñas y sin

capacidad para efectuar los controles de calidad que entonces ya eran considerados como mínimos.

Hasta avanzada la década del '90, la práctica de inoculación recomendada por algunos productores de inoculantes era el espolvoreo de la turba en polvo sobre las semillas. Sin embargo, el entonces Instituto de Microbiología del INTA (hoy IMYZA, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola) y algunos productores de inoculantes preconizaban el uso de adherentes o al menos soluciones azucaradas para una mejor adherencia del polvo y la sobrevivencia de los rizobios sobre las semillas. Estas recomendaciones, sugeridas por las principales empresas del sector para su uso aun en producción extensiva, serían de difícil aceptación hoy por la demanda de tiempo y de operaciones, porque las semillas se inoculaban en hormigoneras en tandas de hasta 50 kg, eran volcadas sobre alguna superficie limpia a la sombra para ser secadas y luego cargadas en las sembradoras.

Este esfuerzo adicional que requería una buena inoculación hizo que el método de inoculación en seco fuese muy utilizado, por lo que los microorganismos inoculados se desprendían de las semillas. Junto con la baja calidad de algunos inoculantes comerciales que no alcanzaban a los valores requeridos de recuento mínimos en el momento de su vencimiento se lograban pobres nodulaciones en los cultivos, lo que condujo a un paulatino descrédito de la práctica de la inoculación.

Dado que los microorganismos aportados en el inoculante podían ser perdidos si las recomendaciones de marbete sugerían prácticas incorrectas de inoculación, desde el INTA se propuso un ajuste al método para semillas preinoculadas propuesto por Burton (1978). Los tratamientos de inoculación satisfactorios eran en los que, el 80 % de las plántulas tenían 3 o más nódulos en la parte superior de su raíz primaria. En este ajuste, las semillas tratadas de acuerdo con la recomendación explícita en el marbete del fabricante eran colocadas directamente en pequeños vasos plásticos que contenían un soporte sólido estéril (ej. vermiculita), regadas periódicamente con una solución de micronutrientes e incubadas en invernáculos claramente definidos. La participación en la validación por los entonces principales laboratorios productores de inoculantes y el IASCAV (Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal) dio una herramienta de control para este último, y tuvo un importante efecto para la revalorización de la inoculación. Tal como fue anticipado desde el INTA, mostró una excelente correlación positiva con los resultados obtenidos en condiciones de campo en suelos sin historia de

siembra previa con soja. Actualmente, el organismo de contralor está en la estructura del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) y esta metodología de evaluación, conocida como “método SENASA”, sigue siendo oficial en la República Argentina, y fue también la base para evaluar nuevos inoculantes líquidos (Cozzi y col. 1996). Estos nuevos inoculantes fueron transferidos al sector privado con 6 meses de garantía, luego superados por la introducción de inoculantes con al menos 18 meses de validez. Esta transformación de un método de control oficial que antes era sobre el inoculante, a un método de control del desempeño del inoculante, al menos en su capacidad de nodulación, fue un avance tecnológico importante y el origen de la readecuación de las recomendaciones y tecnologías productivas de muchas empresas. Este método incluido en la Resolución SENASA 310/94 fue ratificado por la Resolución SENASA 264/11 (Albanesi y col. 2013).

La creación del MERCOSUR en 1991 significó una nueva etapa en el mejoramiento de la calidad de los inoculantes ya que solo podrían intercambiarse entre fronteras inoculantes libres de contaminantes. Además, fue un estímulo para los laboratorios que habían desarrollado los primeros inoculantes líquidos que solo contenían los microorganismos declarados en su formulación y, con fechas de validez más extensas. Los inoculantes líquidos, y los que contienen turba estéril en su formulación, son mucho más sencillos de controlar porque los microorganismos presentes pueden ser contados a partir de diluciones del inoculante, sembradas sobre medios de cultivo agarizados que permitan el reconocimiento de las colonias compatibles y la eventual presencia de contaminantes. Se desarrollaron, de manera colaborativa, nuevos procedimientos de control de inoculantes. Brasil, dado que inicialmente allí no había producción de inoculantes en soportes estériles, protocolizó normas propias de control para liberar el tránsito de inoculantes producidos en Argentina. Esta recomendación incluye, desde su origen, la necesidad de contener la combinación de al menos 2 de las 4 cepas recomendadas oficialmente por sus autoridades identificadas por análisis inmunológico. En Argentina, la fiscalización originalmente realizada por IASCAV pasó a los laboratorios del SENASA, y se exige además cumplir con el ensayo de Burton modificado.

La regulación de la comercialización a través de la frontera significó además el inicio del análisis de otra incertidumbre sobre la calidad de los inoculantes: la duración del tiempo de expiración de los inoculantes producidos. Con los inoculantes

convencionales, teniendo seis meses como período de validez, era imposible cumplir con las etapas de producción, control de calidad interno, verificación por la autoridad sanitaria argentina, control de calidad en las fronteras y en cuarentena hasta su liberación, para llegar a su importador o distribuidor y ser finalmente comercializados y entregados en su sitio de empleo en Brasil o en Argentina dependiendo de su origen. Sólo algunas las empresas lograron desarrollar sus inoculantes para soportar, al menos, el tiempo mínimo necesario para este proceso. Este cambio en la extensión en la validez de la calidad de los inoculantes repercutió positivamente en la cadena local de uso y sus resultados agronómicos.

Junto con los cambios en la forma de producción y en los métodos de control de la calidad de los inoculantes, se modificaron otras variables del mercado tales como los aumentos en las escalas de los sistemas de tratamiento y de las extensiones de siembra, la incorporación de agroquímicos en los tratamientos de semillas tales como fungicidas aplicados en el momento de la inoculación. Así, es que nuevamente hubo que recurrir a sistemas de recuento sobre las semillas para evaluar no sólo la cantidad de microorganismos aportados o presentes inmediatamente después de la inoculación, sino aquellos que sobreviven en contacto con diferentes formulaciones de agroquímicos y a las condiciones de uso a las que son expuestas las semillas tratadas.

Como las semillas tratadas no son estériles, nuevamente nos enfrentamos a la necesidad de evaluar la cantidad de rizobios presentes en muestras donde los contaminantes pueden invadir una parte importante de las placas de recuento antes del desarrollo de los microorganismos buscados e invalidar la evaluación. En este caso, la incorporación de algunos antibióticos a los medios de cultivo, convirtiéndolos en selectivos y diferenciales permitieron resolver, en la mayor parte de los casos, los problemas de recuento (Penna y col. 2004). Luego de su primer presentación en una reunión de la RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) esta metodología fue incorporada, y continúa en la actualidad, como un procedimiento estándar en la legislación de Brasil (Instrução Normativa SDA/MAPA 30/2010, D.O.U. 17/11/2010) Además de posibilitar cuantificar los rizobios sobre las semillas, este procedimiento permitió definir mejor la compatibilidad entre diferentes agroquímicos y la población de rizobios presentes en los inoculantes (Penna y col. 2010).

Simultáneamente con los cambios en los procedimientos de control de la cantidad y de algunas habilidades de los rizobios presentes en los inoculantes, también evolucionaron los métodos de control de la identidad de las cepas presentes, siguiendo a la incorporación inicial de métodos basados en la amplificación de DNA por PCR incluyendo BOX, REP y ERIC-PCR (Instrução Normativa SDA/MAPA 30/2010 D.O.U. 17/11/2010 (Fernandez y col., 2003), la incorporación de la secuencia de los amplicones producidos y recientemente técnicas de MLST o secuenciamiento masivo (Azevedo y col., 2015). La sub-tipificación por espectrometría de masa (MALDITOF-MS), de reciente desarrollo, posiblemente será en breve incorporada en los manuales de procedimiento por diferentes organismos de control (Puente y col., 2019, Rolim y col., 2019).

Además de estos avances en la caracterización de los inoculantes, algunos laboratorios de desarrollo y empresas de producción utilizan estudios en condiciones controladas para complementar los análisis de calidad de inoculantes a partir de las respuestas biológicas en las plantas inoculadas. Entre otras, se consideran evaluaciones directas y estimaciones del estado nitrogenado de las plantas, cantidad y localización de nódulos, producción de biomasa aérea y de raíces. Las evaluaciones de las plantas creciendo en condiciones de invernáculo o de cámaras de crecimiento son continuamente discutidos entre equipos de investigación y resultan en avances en la elaboración de inoculantes de calidad ajustada a las condiciones actuales de uso.

CAPITULO 8

INOCULACIÓN

El inoculante es solo uno de los componentes que forman parte de los procesos de tratamientos de semillas, donde se usan diferentes recetas que incluyen otros productos (fungicidas, insecticidas, nematicidas, polímeros, pigmentos, micronutrientes), que además difieren en las condiciones y la duración entre su ejecución y la siembra. Por tal motivo, es importante, además de la formulación del inoculante la de sus aditivos específicos que determinarán el estado fisiológico de las bacterias (calidad) y su adaptación a las necesidades y condiciones de uso según sistemas de producción. El estado fisiológico de las bacterias en el inoculante determinará la capacidad de resistencia, sobrevivida y respuesta de éstas en cada una de las etapas de nodulación y fijación biológica de nitrógeno.

¿QUÉ SON LOS PROTECTORES EN LOS INOCULANTES?

Son formulaciones propias para cada inoculante que mejoran la viabilidad de las bacterias al aplicarse sobre las semillas mejorando así su infectividad. Estos compuestos, líquidos o sólidos, reducen el estrés oxidativo, la desecación, aportan nutrientes y otros factores de crecimiento.

¿PUEDEN INCORPORARSE OTROS TRATAMIENTOS DE SEMILLAS JUNTO CON LOS INOCULANTES?

El vigor y la sanidad de las plántulas condicionan su nodulación. Los tratamientos con fungicidas (“curasemillas”) se utilizan para proteger las semillas y las plántulas de patógenos. En su mayoría son productos químicos de síntesis compuestos por principios activos y otros compuestos acompañantes (“excipientes”). Al aplicarse sobre las semillas, estarán en contacto directo con los rizobios específicos incorporados en el momento de la inoculación. Por lo tanto, los formulados, principios activos y excipientes, deben ser inocuos para las bacterias, de lo contrario se afectará el número de rizobios por semilla y consecuentemente, la nodulación.

En general, los fungicidas (letales únicamente para los hongos) actúan de un modo diferente a los bactericidas o antibióticos (letales para las bacterias). Sin embargo, la formulación química en algunos fungicidas puede afectar a las bacterias por su acción

biocida directa o como lo haría el contacto directo con cualquier producto químico. Este concepto que es extensivo a los insecticidas y nematocidas.

La gran mayoría de los principios activos (compuestos fungicidas libres de excipientes) presentes en los fungicidas son compatibles con los rizobios. Sin embargo, es muy importante evaluar cada presentación (producto) en particular por la posible presencia de excipientes incompatibles (ej. dispersantes, conservantes, colorantes, etc.). La disminución del tiempo de contacto previo a la siembra entre fungicidas e inoculantes, favorece la supervivencia de las bacterias. Los rizobios mueren sobre las semillas, aún sin la presencia de fungicidas (Fig. 8.1). Este efecto es de mayor magnitud en presencia de productos con principios activos y excipientes no compatibles con los rizobios y se incrementa con el tiempo, con efectos directos no deseados sobre la nodulación (Fig. 8.2). Para atenuar este efecto se recomienda el uso de protectores bacterianos específicos o la aplicación secuencial durante el tratamiento de las semillas evitando así la mezcla o contacto directo del inoculante con el resto de los productos.

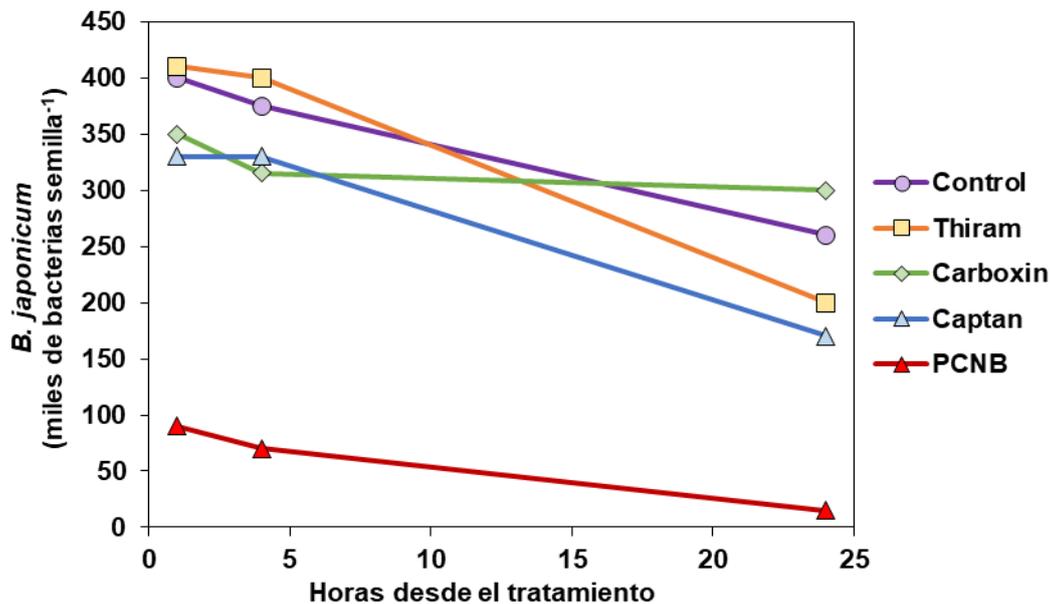


Fig. 8.1. Supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum* sobre semillas de soja tratadas en mezcla con cuatro principios activos de fungicidas. El control fue inoculado, pero no fue tratado con fungicidas. Todos los tratamientos comenzaron con igual número de bacterias. (Adaptado de Curley y Burton, 1975).

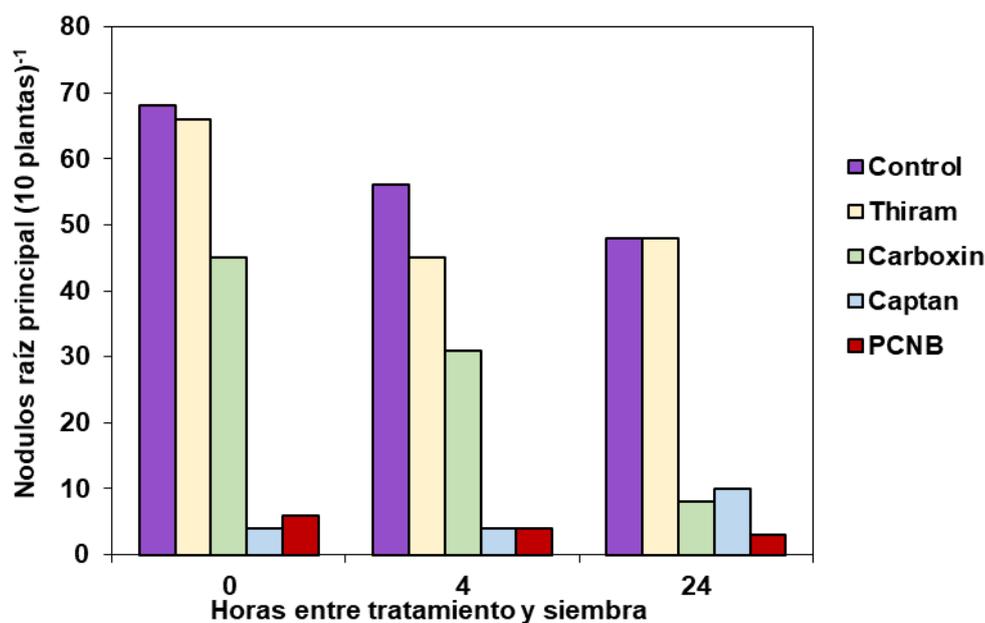


Fig. 8.2. Nodulación sobre la raíz principal de plantas de soja según la duración entre la aplicación del tratamiento de semillas con inoculante y funguicidas y el de la siembra (Adaptado de Curley y Burton, 1975).

Los herbicidas, si bien podrían afectar a los rizobios, en general no toman contacto directo con ellos, y el momento y la ubicación de su aplicación no coincide con el de las semillas. Las concentraciones aplicadas tendrían que ser muy altas para que tuviera efecto residual sobre el inoculante cuando éste llega al suelo. Su efecto sobre la nodulación puede ser indirecto al reducir el crecimiento de plántulas ante la aplicación en pos-emergencia.

TRATAMIENTO INDUSTRIAL

De la misma manera que algunos productos en los tratamientos de semillas reducen la infectividad de los inoculantes, al realizarse la aplicación anticipada al momento de la siembra se incrementa el estrese sobre los rizobios y la nodulación. Por esta razón, al realizarse tratamiento anticipados al momento de la siembra es importante incluir protectores bacterianos específicos.

Al incrementarse la complejidad en la operación de inoculación por la combinación en el uso con diferentes productos según condiciones de protección y momentos de aplicación es recomendable implementar procesos profesionales para el tratamiento de las semillas. Estos son implementados en sitios para el tratamiento de

semillas centralizados en la empresa o distribuidor de insumos agropecuarios o a nivel industrial (ej. peleteo de semillas de alfalfa). En cada caso se desarrollan recomendaciones ajustadas, no solo según los productos a usar, sino según a las instalaciones de aplicación y condiciones de almacenamiento y de transporte de las semillas tratadas hasta su siembra. En la medida que la complejidad operativa (cantidad de productos a aplicar, condiciones de almacenamiento y logística) se incrementan las contribuciones de los procedimientos profesionales de aplicación mejoran los resultados de nodulación y fijación del nitrógeno propósitos de la inoculación.

¿SE PUEDE FERTILIZAR EN EL MOMENTO DE LA SIEMBRA DE UNA SEMILLA INOCULADA?

Debido al alto costo energético que la fijación de N_2 , representa para la planta, ésta requiere condiciones nutricionales óptimas. La fertilización, siempre que no sea nitrogenada, es complementaria de la inoculación. Se han observado resultados aditivos de ambas prácticas, tanto en número de nódulos como en rendimientos (Fig. 8.3). Por lo tanto, lo recomendado es realizar un análisis de suelo previo a la siembra y, cuando los niveles de nutrientes sean insuficientes para el normal crecimiento del cultivo, fertilizar con fertilizantes fosfatados o azufrados en lo posible libres de nitrógeno (superfosfato triple, superfosfato simple), y si es necesario, incorporar micronutriente (ej. Zn).

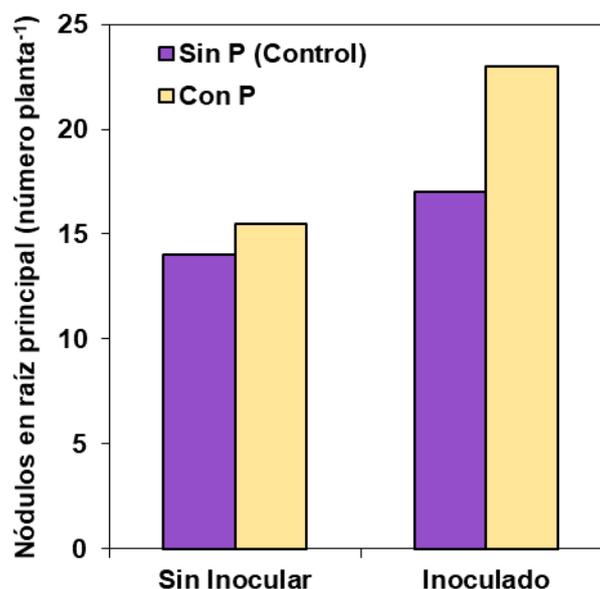


Fig. 8.3. Efecto de la fertilización fosfatada y de la inoculación sobre la nodulación de soja en Venado Tuerto, Sta. Fe (Adaptado Chamorro y col. en Díaz-Zorita, 2003).

¿ES CONVENIENTE FERTILIZAR CON NITRÓGENO?

No. La fertilización nitrogenada en cualquier estadio de la leguminosa inhibe la nodulación y la fijación de N₂ por incorporar en la solución del suelo formas de nitrógeno inorgánico de fácil asimilación para la planta.

¿CÓMO LOGRAR UNA INOCULACIÓN EXITOSA?

Los inoculantes contienen y aportan organismos vivos. Por lo tanto, para lograr un resultado satisfactorio del proceso de inoculación es conveniente,

- 1- Asegurarse de que el inoculante se encuentre dentro de la fecha de vigencia para su uso y que desde su elaboración se mantuvo bajo las condiciones adecuadas para mantener de su calidad según las recomendaciones de su fabricante.
- 2- Utilizar en tratamientos de semillas con otros productos solamente si estos son compatibles según las formulaciones y recomendaciones de uso indicadas por el fabricante del inoculante.
- 3- Al realizar la inoculación varios días antes del momento de la siembra incorpore protectores bacterianos específicos según recomendación del fabricante del inoculante. Hay que considerar que la mayor calidad de los tratamientos de semillas complejos (aplicación de varios productos y con anticipación prolongada hasta la siembra) se logra al implementar procesos de tratamiento profesional o industrial de las semillas.
- 4- Realizar la inoculación de las semillas en condiciones protegidas, a la sombra. La exposición al sol, además de acelerar el desecamiento, aumenta las posibilidades de mortandad por la acción bactericida de los rayos ultravioletas.
- 5- Lograr distribución y mezclado uniforme del inoculante sobre las semillas. La inoculación directamente en el cajón de siembra no es una práctica efectiva ni recomendable. Tampoco es conveniente la extensión en el tiempo de mezclado tanto por riesgos en los daños a las semillas (pérdida de poder germinativo) como por acentuar la distribución no uniforme de los productos aplicados.
- 6- Almacenar, hasta el momento de siembra las semillas, en lugares frescos y ventilados.
- 7- No sembrar en suelos secos o con temperaturas extremas.
- 8- Asegurarse que el cultivo no tenga limitaciones de fósforo, azufre u otros elementos. Evitar el uso de fertilizantes nitrogenados en altas dosis el momento de la siembra.

Las “B” en el manejo adecuado de productos biológicos para la nutrición vegetal

Alejandro Peticari (INTA San Luis) en Grasso y Díaz-Zorita (2020).

Los procesos de disponibilidad e incorporación de nutrientes en las plantas se logran, y son naturalmente eficientes, con la participación de abundantes microorganismos. Algunos de estos, o sus productos derivados, al incorporarse en los planteos de producción aportan nutrientes en forma directa (ej. fijación de nitrógeno en la simbiosis de rizobios con leguminosas) o derivadas de su actividad sobre fracciones poco disponibles de estos (ej. *Pseudomonas sp.*, *Penicillium bilaiae*, etc.) y al mejorar el crecimiento de las plantas y su capacidad captar los elementos (ej. *Azospirillum sp.*). Estos productos, conocidos como inoculantes, se presentan en diversas formulaciones y con variadas recomendaciones de uso dependiendo de los cultivos y condiciones de manejo por lo que para su aplicación responsable es importante considerar algunas pautas sobre la elección del inoculante, del proceso de aplicación y del manejo del cultivo.

Buena elección del inoculante

Los inoculantes son formulados que contienen microorganismos que contribuyen al crecimiento y la nutrición de las plantas. Algunos forman asociaciones con plantas de diferentes especies (ej. *Azospirillum sp.*, *Pseudomonas sp.*) mientras que en el caso de los rizobios fijadores simbióticos de nitrógeno con leguminosas su relación es específica. Además, estos inoculantes contienen cepas seleccionadas por su infectividad (capacidad de formar nódulos) y efectividad (capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico).

En su composición los inoculantes tiene que contener una concentración (número) de rizobios viables tal que se logre una adecuada y rápida formación de nódulos. Los inoculantes tienen que prepararse y envasarse en condiciones de asepsia tal de estar libres de contaminantes.

Los tratamientos biológicos contienen, además de los microorganismos específicos a aportar otros compuestos que mejoran su actividad fisiológica, capacidad de nodulación y su tolerancia a condiciones de estrés. Los aditivos de osmoprotección permiten la aplicación de algunos inoculantes con anticipación al momento de la siembra y es recomendable su uso junto con procesos específicos para cada formulación, combinación con otros tratamientos de semillas y condiciones de aplicación y de manejo de las semillas tratadas (ej. temperatura y duración del almacenamiento).

Las condiciones de almacenamiento y de transporte de los inoculantes varían según formulaciones y presentaciones y es muy importante su consideración para el mantenimiento de la calidad de los productos. En la mayoría de los casos evitar la exposición directa al sol, a temperaturas superiores a los 20°C y su almacenamiento en contacto con productos químicos.

Buena elección de proceso de aplicación (inoculación)

La aplicación de los inoculantes se realiza mayormente a través del tratamiento de semillas y sólo en situaciones con alto riesgo para la sobrevivencia de los microorganismos es conveniente su uso en forma directa durante la operación de siembra (inoculación en el surco de siembra).

Al tratar las semillas se espera aportar los microorganismos a cada una tal que, independientemente de otros tratamientos y las condiciones de manejo de las semillas, se logre una suficiente cantidad en el momento de la siembra tal de lograr los propósitos de su uso (ej. formación de nódulos y fijación del nitrógeno, mejoramiento del crecimiento vegetal, etc.).

Los pasos para lograr una adecuada inoculación de las semillas se aplican indistintamente del tipo de producto a utilizar y sitios de aplicación (i.e. en el campo, en un establecimiento rural o en un centro de tratamientos distante del campo). Una vez elegido el inoculante (y demás componentes) de acuerdo con el uso con otros tratamientos de semillas y condiciones de almacenamiento de las semillas tratadas, es importante la elección y calibración del equipo para la inoculación. El propósito es lograr que todas las semillas reciban cantidades equivalentes del inoculante sin afectar su calidad ni la calidad de las semillas tratadas. Las herramientas disponibles son variadas entre las que se encuentran equipos para el tratamiento de las semillas en diferentes escalas según cantidades, tiempos y combinaciones de diferentes tipos de productos junto con la adaptación de implementos para su uso junto con la carga de semillas en la sembradora próximo al momento de la siembra. La aplicación directa en el cajón de semillas de la sembradora no logra una distribución apropiada del inoculante, quedan muchas semillas sin inocular, con sobredosificaciones de otros tratamientos y con pérdidas de productos por lo que en ninguna circunstancia es aconsejable su uso.

Del mismo modo que se requiere atender al cuidado de los productos a utilizar durante su transporte y almacenamiento es necesario considerar algunas pautas durante el

proceso de inoculación. Entre estos es preferible su realización a la sombra, con temperaturas moderadas (inferiores a los 30°C) y dependiendo del tipo de tratamiento aplicado efectuar la siembra de las semillas tratadas. En el caso de la inoculación sin protectores microbianos o con formulaciones para su uso en el lote tratar las semillas y sembrar dentro de las 12 horas de aplicados los productos. Si las condiciones de riesgo de sobrevivencia de los microorganismos son altas (ej. aplicación combinada con terapéuticos con compatibilidad desconocida, con alta temperatura ambiente y baja humedad relativa, etc.) acotar la duración entre el tratamiento de la siembra a hasta 4 horas. En el caso de utilizar tratamientos anticipados de inoculación (“pre-inoculados”) el proceso, y las condiciones de cuidado, se extienden durante el almacenamiento de las semillas tratadas a realizar en ambientes frescos (temperatura media inferior a 20°C) y ventilados. En estos casos recordar rotular las estibas de semillas registrando la fecha de aplicación de los tratamientos tal que, dependiendo de las condiciones de almacenaje y formulación biológica aplicada, su siembra se realice dentro de los tiempos de efectividad de los productos aplicados.

Buenas condiciones de crecimiento de los cultivos

Los resultados de mejoramiento en la nutrición y en el crecimiento de las plantas derivado de la actividad de microorganismos seleccionados y aportados al inocular requiere del activo crecimiento de las plantas cultivadas. La actividad fotosintética (crecimiento) de las leguminosas provee de la energía requerida para la fijación del nitrógeno atmosférico con rizobios. El primer paso para este proceso es la formación de nódulos en las raíces en activo crecimiento requiriéndose de una rápida germinación y vigorosa implantación de los cultivos. Las condiciones hídricas de los suelos alteran la normal nodulación y actividad biológica. Al sembrar en suelos secos (contenidos de humedad inferiores al punto de marchitez permanente) se reduce la sobrevivencia de los inóculos limitando el logro adecuado de nódulos. En condiciones de salinidad o de anegamiento prolongado (mayor a 3 días) se limita el crecimiento de las plantas restringiendo la energía para el sostenimiento de los nódulos y acelerando su mortandad.

La efectividad de los aportes de los tratamientos biológicos se extiende a todo el ciclo de crecimiento de las plantas. La implementación de buenas prácticas de manejo no solo contribuye al cuidado del cultivo y su logro productivo sino también a la eficiente expresión de las contribuciones propósito de la inoculación.

En suelos con muy altas concentraciones de nitratos la nodulación se retarda y en condiciones extraordinarias se inhibe la actividad del sistema de fijación. Por el contrario, las limitaciones de otros nutrientes (fósforo, azufre, potasio, calcio y varios micronutrientes) reducen el crecimiento de las plantas durante su implantación disminuyendo así la formación de nódulos y consiguiente fijación del nitrógeno. En estas condiciones es importante la fertilización correcta considerando la disponibilidad e incorporación temprana de los nutrientes. así se logra tanto mejorar las condiciones para la formación inicial de nódulos (número) como su crecimiento (tamaño).

Las pautas para el uso eficiente de tratamientos biológicos integra la calidad de los inoculantes en concordancia con el proceso de aplicación (inoculación) en el contexto de un adecuado manejo del cultivo. Los buenos inoculantes dejan de serlo si falla su aplicación o cuando las plantas fallan en su crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Albanesi, A.S., Benintende S., Cassán F., Peticari A. (Eds.). 2013. Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes. Red Nacional de Control de Calidad de Inoculantes de la División Agrícolas y Ambiental de la Asociación Argentina de Microbiología. C.A.Buenos Aires (Argentina), 78 pp. ISSN 978-987-26716-4-8
- Andrews, M., Andrews M.E. 2017. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi: 10.3390/ijms18040705
- Azcón González De Aguilar C., Barca J-M., Olivares J. 1983. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. *Investigación y Ciencia* 82: 84-93.
- Azevedo, H., F.M. Lopes, P.R. Silla, M. Hungria. 2015. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. *BMC Genomics* 16, S10 doi: 10.1186/1471-2164-16-S5-S10.
- Bhuvanewari T.V., Turgeon B.G, Baver W.D. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. I- Localization of infectible root cells. *Plant Physiol.* 66: 1027-1031.
- Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity D.P., George T. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant Soil* 141: 1-11.
- Burdass D. 2002. *Rhizobium*, Root Nodules & Nitrogen Fixation. Hurst, J. (ed.) Society for General Microbiology. 4 pp.
- Burton G.W. 1976. Legume nitrogen versus fertilizer nitrogen for warm-season grasses. En: Hoveland, CS, Knight WE, Marten GC (eds) *Biological N Fixation in Forage-Livestock Systems*. American Society of Agronomy. Special Publication Ner 28. Madison, WI. USA. pp. 55-72.
- Burton, J. 1984. *Legumes Inoculants and their Use*. En: University of Hawaii NifTAL Project and FAO, Hawaii. USA. 63 pp.
- Burton, J.C. 1967. *Rhizobium* culture and use. En H.J. Peppler (Ed.), *Microbial Technology* (pp. 1-33). New York: Van Nostrand-Reinhold.
- Burton, J.C. 1978. Monitoring quality in legume inoculants and preinoculated seed. *Actas IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium*. México. Pág. 308-325.
- Burton, J.C. 1984. *Legume inoculant production manual*. NifTAL Center – MIRCEN. Paia, Maui, Hawaii, USA. 96 pp.

- Carcova J., Abeledo L.G., López Pereira M. 2003. Análisis de la generación del rendimiento: Crecimiento, partición y componentes. En: Satorre EH., Benech Arnold L, Slafer G.A., de la Fuente E.B. Miralles DJ, Otegui ME, Savin R. (eds) Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires Argentina. 783 pp.
- Collino D.J, Salvagiotti F., Peticari A., Piccinetti C., Ovando G., Urquiaga S., Racca R.W. 2015. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. Plant Soil DOI 10.1007/s11104-015-2459-8
- Coyne, M. 1999. Soil Microbiology: An exploratory Approach. Delmar Publishers. ITP. Albany, NY. USA. 462 pp.
- Cozzi J., Benintende G., Pacheco Basurco J.C. 1996. Nuevo inoculante líquido para semillas de soja (*Glycine max*). Rev. Facultad de Agronomía, 16 (1-2): 127-132.
- Curley R.L., Burton J.C. 1975. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. Agronomy Journal. 67: 807-808.
- Date R.A. 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. Field Crops Research. 65:123-136.
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3342-3351.
- Dénarié, J. 2001. Nod Factors, p. 1330-1332. En Brenner, S. y J.H. Miller (eds.), Encyclopedia of Genetics. ed. Academic Press, New York.
- Díaz-Zorita M. 2003. Soja: Criterios para el manejo de la fertilización del cultivo. Presentaciones del Congreso Mundo Soja, 26 y 27 de junio de 2003, Buenos Aires. Argentina. s/p
- Díaz-Zorita M., Fernández-Canigia M.V. 1999. Patrones de nodulación de soja en relación con propiedades de suelos bajo tres sistemas de labranza. Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata 104: 53-60.
- Díaz-Zorita M., Grosso G.A., Fernández-Canigia M.V., Duarte G.A. 1999. Efectos de la ubicación de un fertilizante nitrógeno-fosfatado sobre la nodulación y la producción de soja en siembra directa en la región de la Pampa Arenosa, Argentina. Ciencia del Suelo 17: 62-65.
- Dobbelaere, S., Okon Y. 2003. The plant growth promoting effect and plant responses, p. 1-26. En Elmerich, C. y W.E. Newton (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

- Fernandes, M.F., R.P.M. Fernandes, M. Hungria. 2003. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes para as culturas do guandu e caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, p.911-920. doi: 10.1590/S0100-204X2003000800003.
- Fernández-Canigia M.V., Díaz-Zorita M. 1997. Fijación simbiótica de nitrógeno. En Melgar R, Díaz-Zorita M (eds.). La fertilización de cultivos y pasturas. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp. 11-18.
- Fernández-Canigia M.V. 1993. Microbiología asociada a la introducción del cultivo de soja (*Glycine max* L. Merrill) en la zona bajo riego del sur de la provincia de Buenos Aires. Tesis para optar por el grado de Magister en Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, BA. Argentina. 256 pp.
- Ferraris, G., Ferrari M., Ostojic J. 2000. Momentos de aplicación de fertilizantes azufrados en Soja de Primera. Campaña 1999/2000. Informe de Resultados. (Informe preparado para la empresa PASA S.A.) EEA Pergamino, INTA, 15 p.
- Ferraris, G., Ferrari M., Ostojic J. 2001. Fertilización fosforada en soja: fitotoxicidad en aplicaciones localizadas a la siembra y efectos sobre el rendimiento. Revista de Tecnología Agropecuaria, EEA INTA Pergamino, VI (18):20-23.
- Gallace M.E, Lorda G., Molas M.L. 2019. Respuesta adaptativa de *Ensifer meliloti* a salinidad mejora la simbiosis con Alfalfa. VI Congreso de la Red Argentina de Salinidad. Buenos Aires, Argentina. Actas pp. 184.
- Gallace M.E., López Gómez M., Hidalgo J., Jiménez Jiménez S., Marín Peña A., Palma F., Molas M.L., Lorda G. 2019. Interacción *Medicago sativa*-*Ensifer meliloti*: respuesta del metabolismo carbonado nodular al estrés salino. XII Reunión Nacional Científico -Técnica de Biología de Suelos. Buenos Aires, Argentina. Presentación en panel. Actas pp. 84.
- Gallace M.E., Lorda G., Molas M.L. 2017. *Medicago sativa* L. and *Sinorhizobium meliloti* association under salinity conditions. 20th International Congress on Nitrogen Fixation. Granada, España. Presentación en panel. Actas pp. 305.
- González López J., Lluch Pla C.1992. Interacción Planta-Microorganismo. Biología del Nitrógeno. Editorial Rueda.
- González N.S. 1994. Dinámica de la fijación de nitrógeno en soja, en suelos con alta fertilidad nitrogenada. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata - EEA INTA Balcarce. Argentina. 62 pp.
- Graham P.H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Can. J. Microbiol. 38: 475-484.

- Graham P.H., Vance C.P. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater Use. *Plant Physiology*. 131: 872-877.
- Grasso, A.A., Díaz-Zorita M. 2020. Manual de buenas prácticas de manejo de fertilización (2da ed.) Fertilizar AC, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Guiller K. 2001. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CAB International Publishing. USA. 448 pp.
- Harris R.F. 1980. Effect of water potential on microbial growth and activity. En: Parr JF, Gardner WR, Elliot LF (eds.) *Water Potential Relations in Soil Microbiology*. Soil Science Society of America. Special Publication Ner 9. Madison, WI. USA. pp. 23-95.
- Hungria M., Campo, R.J. y Carvalho Mendes, L.2001. Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura da Soja. Embrapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Londrina. PR. Brasil. 48 pp.
- Laich F. 2018. La fijación biológica del nitrógeno y la fertilidad del suelo. En: Curso Teórico-Práctico Restauración de la Fertilidad de los Suelos. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. (ed.), ICIA, Santa Cruz de Tenerife, España. https://www.icia.es/icia/download/Agroecolog%C3%ADa/Federico_Laich.pdf
- Marschner H. 1990. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press Inc. San Diego, CA. USA. 674 pp.
- McDermott T.R., Graham P.H. 1989. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and Acetilene Reducction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol* 55: 2493-2498.
- McDermott T.R., Graham P.H., Ferrey M.L. 1991. Competitiveness of indigenous populations of *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 as determined using a root-tip marking procedure in growth pouches. *Plant Soil* 135: 245-250.
- Medina L.F., Medina E.R., Orlando C.A., Morandini M., Colacelli N A. 2002. Efecto de la fertilización con azufre en la nodulación en el cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merr) en Monte Redondo, Tucumán (RA). En Bellone C H (ed.). *Manejo de Sistemas Microbianos para Optimizar la Producción Agrícola y Silvopastoril en algunas Areas del NOA*. FAZ Pulicaciones, Tucumán. Argentina.pp. 163-165.
- Miyamoto C., Ketterings Q., Cherney J., Kilcer T. 2008 Nitrogen Fixation. *Agronomy Cornell University. Agronomy Fact Sheet Series. Fact Sheet 39. 1-2.* <http://nmsp.cals.cornell.edu/publications/factsheets/factsheet39.pdf>

- Mus F., Crook M.B., Garcia K., Garcia Costas A., Geddes, BA, Kouri E.D., Paramasivan, P., Ryu, M-H, Oldroyd G.E.D., Poole, P.S., Udvardi, M.K., Voigt, C.A., Ané J-M., y Peters, J.W. 2016. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Appl. Environ. Microbiol* 82: 3698. doi: 10.1128/AEM.01055-16.
- Ortega E. 2003. Aspectos fisiológicos del papel de los microorganismos en la nutrición nitrogenada y fosfórica de las plantas. Curso de postgrado: Aspectos Fisiológicos y Bioquímicos de las Relaciones Plantas – Microorganismos. E. Taleisnik E, Racca RW (coord.) IFFIVE-INTA. 17 al 21 de marzo del 2003 Córdoba, Arg.
- Penna C., Díaz-Zorita M., Fernández-Canigia M.V. 2002. Estabilidad de inoculantes para soja: Importancia de la utilización de productos con vencimiento a largo plazo. *RELARE*. Sao Paulo, Brazil. p. s/p.
- Penna C., Massa R., Olivieri F., Gutkind G., Cassán, F. 2011. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Expr* 1, 21. doi: 10.1186/2191-0855-1-21.
- Penna C.A., Demares D.O, Guerrero M.E., Gutkind G.O. 2004. Vancomycin as a selective agent in agarized media for evaluating bacterial inoculants after seed treatment. In: Latin-american Conference on Rhizobiology and I Brazilian Conference on Biological Nitrogen Fixation, Miguel Pereira, RJ (Brasil). *RELAR - Programm and abstracts*.
- Piccinetti C.F., Enrico J.M., Capurro J.E., Murúa, L.A., Martínez F., Resch G.F., Peticari A. 2011. La inoculación con la cepa E10 de *Bradyrhizobium japonicum* mejora la fijación biológica del N₂ y la producción del cultivo de soja en la región pampeana argentina. XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología (XXV RELAR) y I Congreso Nacional de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (I MIPCV). Piriápolis, Maldonado. Uruguay. 4-9 sept 2011. pp 39
- Pijnenborg J. 1998. Metodología de la investigación en la fijación biológica de nitrógeno. Proyecto Rhizobiología Bolivia (CIAT-CIF-PNLG-CIFP-WAU). Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. 74 pp.
- Puente M., Piccinetti C., Barrios R., Vay C., Gutkind G., Santella G. 2019. Identificación de *Bradyrhizobium spp.* basada en sus perfiles proteicos obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF. XXIX Reunión Latinoamericana de Rizobiología (RELAR) y 1er Simposio Internacional de Microbiología de Suelos y Ecología Microbiana. Puerto Varas, Chile.

- Racca R., Collino D., Dardanelli J., Basigalup D., González N., Brenzoni E., Hein N., Balzarini M. 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA. Buenos Aires. Argentina. 56 pp.
- Racca R.W, Argüello J.A, Núñez S.B, Luna V., Frioni L., Botini R. 1990. Endogenous growth inhibitors, nodulation and nitrogen fixation in soybean under drought and treated with gibberellic acid and abscisic acid. *Rev. Cs. Agropec.* 7: 13-17.
- Racca R.W. 2003. Algunos conceptos sobre la fijación biológica del nitrógeno en cultivos. IV Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos. IV Encuentro de Fijación Biológica del Nitrógeno. Termas de Río Hondo. S.E.
- Racca R.W. 2003. Ecofisiología de la simbiosis *Rhizobium* –leguminosa. Curso de postgrado: Aspectos Fisiológicos y Bioquímicos de las Relaciones Plantas – Microorganismos. E. Taleisnik E, Racca RW (coord.) IFFIVE-INTA. 17 al 21 de marzo del 2003 Córdoba, Arg.
- Racca, R. 1986. Efectos de diferentes períodos de penuria hídrica sobre: crecimiento, desarrollo y productividad en soja. *Revista de la Asociación Argentina de Soja VII:* 6-11.
- Richter, D.D., Oh N.H., Fimmen R., Jackson J. 2007. The Rhizosphere and Soil Formation, p. 179-200. En Cardon, Z.G. y J.L. Whitbeck (eds.), *The Rhizosphere. An Ecological Perspective.* ed. Elsevier Academic Press, USA.
- Rolim, L, T.R.Santiago, F.B. dos Reis Junior, L. de Carvalho Mendes, H.M. Martins do Vale, M. Hungria, y L. P. Silva. 2019. Identification of soybean *Bradyrhizobium* strains used in commercial inoculants in Brazil by MALDI-TOF mass spectrometry. *Braz J Microbiol* 50, 905–914. Doi: 10.1007/s42770-019-00104-3.
- Sarrantonio M. 1991. Soil-Improving Legumes. Methodologies for screening. Rodale Institute. Emmaus, PA. USA. 310 pp.
- SENASA. 2011. Resolución N° 0264/2011 Anexo I. Manual para el registro de fertilizantes, enmiendas, sustratos, acondicionadores, protectores y materias primas en la República Argentina. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)
- Silva N.I. 1997. Caracterización y comportamiento de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* aisladas de suelos y plantas de soja (*Glycine max* L.) en la región noroeste de la provincia de Buenos Aires. Tesis para optar por el grado de Magister en Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, BA. Argentina. 117 pp.
- Singleton, P.M. Supplying nitrogen through legumes. Nifal Center for BNF Technologies. www2.ctahr.hawaii.edu/depart/tpss/research_extension/soliresearch/nifal/(accedido 2003).

- Siqueira, A.F., Ormeño-Orrillo E., Souza R.C., Rodrigues E.P., Almeida L.G.P., Barcellos F.G., Batista J.S.S., Nakatani A.S., Martínez-Romero E., Vasconcelos A.T.R., y Hungria M. 2014. Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. *BMC Genomics* 15: 420.
- Smith R.S., Ellis M.A. 1980. Soybean nodulation as influenced by seedling vigor. *Agron. J.* 72: 605-608.
- Taboada M.A., Micucci, F.G. 2002. Fertilidad Física de los Suelos. Editorial Facultad de Agronomía, UBA. Buenos Aires. Argentina. 80 pp.
- Thao T.Y, Singleton P.W., Herridge D. 2002. Inoculation responses of soybean and liquid inoculants as an alternative to peat-based inoculants. En Herridge D (ed.). *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*. ACIAR Proceeding 109e. PK Editorial Services, Brisbane, Australia. pp. 67-74.
- Vlassak K.M, Vanderleyden J. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 163-229.
- Wang E.T, Martínez Romero J., López Lara I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. En: Martínez Romero E, Martínez Romero JC (ed) *Microbios en Línea*. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/> (accedido en 2003).
- Weaver R.W., Frederick L.R. 1972. A new technique for most-probable-number counts of Rhizobia. *Plant and Soil* 36 219-222.
- Zapata F, Danso S K A, Hardarson G, Fried M. 1987. Time course of Nitrogen fixation in field-grown soybean using Nitrogen-15 methodology. *Agron. J.* 79: 172-176.
- Zhang F., Smith D L. 1999. Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] physiology and symbiotic dinitrogen fixation. En Smith D L y Hamel C (eds.). *Crop Yield, Physiology and Processes*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 375-399.

Nitragin[®]

By Novozymes

Nº1 en
Inoculantes
desde 1898

Novozymes Bioag S.A.

Planta industrial: Calle 10 N°753, Esq. 11 - Parque Industrial Pilar

Unidad Postal 1 - B1629MXA Pilar - Buenos Aires - Argentina -

Tel +54 (230) 4496100

Web: www.nitragin.com.ar

ISBN 978-987-96-5482-9



9 789878 165482 9