

SELECCION DE CEPAS DE *Rhizobium japonicum* PARA LA INOCULACION DE SOJA EN EL NOROESTE ARGENTINO

E. A. Arrarás (1), J. L. Boiardi (1), A. P. Balatti (2) y L. A. Mazza (2)

Recibido: 30/12/82

Aceptado: 5/9/83

RESUMEN

El Noroeste Argentino es un área potencialmente apta para el cultivo de la soja, pero debido a que el *Rhizobium japonicum* no se encuentra naturalmente presente en esa zona se realizaron estudios destinados a la selección de cepas capaces de establecer una simbiosis efectiva para las condiciones de clima y suelo de dicha región.

Las experiencias fueron realizadas en dos etapas. a) en cámara de clima controlado, y b) a campo (Cerrillos, Salta). El ensayo a) revela la eficiencia de las 4 cepas de *Rhizobium japonicum* utilizadas debido a la adecuada nodulación obtenida y al aumento de peso y contenido de nitrógeno de parte aérea respecto de los testigos sin inocular.

En el ensayo a campo se observó una muy buena nodulación. No se obtuvieron diferencias significativas en peso fresco, nitrógeno en parte aérea y proteína en granos, pero sí en rendimiento en granos donde las cepas 5019 y S100 produjeron un aumento de este parámetro.

En cuanto a la competitividad en el ensayo en cámara la cepa 5019 formó el 80 por ciento de los nódulos, mientras que en el ensayo a campo la cepa S100 dió lugar al 54 por ciento de los nódulos y la 5019 al 41 por ciento de los mismos.

SELECTION OF *Rhizobium japonicum* STRAINS FOR THE INOCULATION OF SOYBEAN IN THE ARGENTINE NORTHEWEST AREA

SUMMARY

Potentially the Argentinian Northwest is a good cultivation area for soybean but since *Rhizobium japonicum* is not naturally present there, studies for selection of effective strains for efficient symbiotic capacity have been carried out.

Experiments were performed under two conditions: a) in controlled climate chamber, and b) a field study (Cerrillos, Salta).

The four *Rhizobium* strains studied under the a) condition produced an increase in weight and nitrogen content with respect of controls. All of them showed good nodulation, the best one was the 5019 strain which yield an 80 % nodulation.

Under b) conditions in spite of getting a very good nodulation no differences were observed in weight, nitrogen content and protein content of seeds. However 5019 and S100 strains showed a significant increase in grain production.

On the other hand, in competition experiments S100 strain produced a 54 % of nodules while 5019 only 41 %.

-
- (1) Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales.
 - (2) Area Tecnología Bioquímica y Farmacéutica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900) La Plata, Buenos Aires.

INTRODUCCION

El cultivo de las leguminosas en nuestro país se ha incrementado sensiblemente en los últimos años, principalmente debido al aumento del área sembrada de soja. En la región del Noroeste este cultivo se ha introducido con buenos resultados. En razón de que el *Rhizobium japonicum* no se encuentra naturalmente en esa región, se hace indispensable, para asegurar buenos rendimientos, la inoculación de las semillas con cepas eficientes. Por lo tanto, antes de indicar las cepas a emplear es necesario efectuar una selección de estirpes que puedan adecuarse a esas condiciones ecológicas.

En este trabajo se efectuaron experiencias destinadas a la selección de microorganismos mediante ensayos en cámara y a campo, empleando cepas de *Rhizobium* provenientes de organismos nacionales e internacionales. Para su realización se siguieron las pautas y la metodología propuestas por Vincent (1970), Somesagaram, et al. (1979), Halliday (1981), Vidor (1981) y de acuerdo a las conclusiones y recomendaciones de la FAO (1980).

MATERIALES Y METODOS

1. Cepas utilizadas

Estas fueron E 41 y E 45 provenientes del INTA Castelar, 5019 proveniente de MIRCEN (Microbiological Resources Center) Porto Alegre (Brasil) y S 100 aislada en el CINDEFI.

2. Semillas

Los cultivares utilizados fueron: Bragg, SRF 450 y Halesoy 71 (semillas provistas por el INTA Castelar) para el ensayo en cámara. Para los estudios a campo se utilizó únicamente el cultivar Bragg.

3. Esterilización de las semillas

Las semillas fueron esterilizadas en su-

perficie con $HgCl_2$ al 0,1 por ciento y alcohol de 96°, según lo indicado por Vincent (1970).

4. Obtención de las suspensiones bacterianas

Las suspensiones de *Rhizobium japonicum* fueron obtenidas de acuerdo a la metodología propuesta por Lopreto et al. (1972).

5. Obtención de los antisueros específicos

Estos fueron obtenidos por inoculación de conejos albinos machos de 2,5 kg de peso y de acuerdo a la metodología propuesta por Schimidt et al. (1968).

6. Diseño del experimento en cámara de clima controlado

Se utilizó un diseño factorial 3 x 8 donde incluyeron 3 cultivares de soja sometidas a 8 tratamientos: jarras inoculadas con las cepas E 45, E 41, S-100 y 5019 individualmente, jarras inoculadas con mezcla de las cepas mencionadas, jarras inoculadas con la mezcla de cepas adicionadas con 50 ppm de Nitrógeno y testigos sin inocular, con y sin la adición de Nitrógeno. En todos los tratamientos se incluyeron 3 repeticiones.

7. Diseño del experimento a campo (Cerrillos, Salta)

Se empleó un diseño en bloques al azar con 3 repeticiones de los siguientes tratamientos: parcelas inoculadas con la cepa E 45, parcelas inoculadas con la cepa S-100, parcelas inoculadas con la cepa 5019, parcelas inoculadas con la mezcla de cepas y testigo sin inocular. Para la distribución de los bloques se realizaron 8 análisis de suelos, tomando las muestras en el sentido de la pendiente local. Sobre un sector que posee textura franca, mayor contenido de Nitrógeno (0,133 g por ciento) y menor pH (6,73) se distribuyó el primer bloque. En el sector restante con textura franco arcillosa, menor cantidad de Nitrógeno (0,121 g por ciento) y un valor de

pH (7,20) superior al anterior, se distribuyeron los 2 bloques restantes. Debido a que el contenido de fósforo soluble era muy variable entre los distintos sectores (el valor medio según Bray y Kurtz N° 1 fue de 2,65 ppm) se fertilizó con 60 kg/ha de P₂O₅ en el surco a la emergencia para uniformar las parcelas.

8. Unidades experimentales, siembra y recolección de las plantas en cámara

Se utilizaron jarras tipo Leonard modificadas (Vincent 1970) cubiertas exteriormente con papel de aluminio y llenas de una mezcla de arena (95 por ciento) y carbón vegetal (5 por ciento). Estas unidades fueron esterilizadas durante 1 hora a 121°C. En cada jarra se colocaron 2 semillas desinfectadas y pregerminadas. Las condiciones empleadas en la cámara fueron: temperatura diurna 28°C; temperatura nocturna 14°C; fotoperíodo 13,5 horas y humedad superior al 60 por ciento (coincidentes con valores medios del área de cultivo).

Las macetas fueron regadas con 1 litro de solución nutritiva de Norris (1968) dos veces durante el experimento (al inicio y a los 20 días). Los restantes riesgos fueron realizados con agua destilada cada vez que fue necesario variando la frecuencia de los mismos con el desarrollo vegetal. En el caso del tratamiento adicionado con Nitrógeno las jarras fueron regadas al inicio del ensayo (únicamente) con una solución de Nitrato de Potasio de forma tal de obtener una concentración de 50 ppm de Nitrógeno en las macetas. Las plantas fueron recogidas para su evaluación a los 45 días de la siembra (en prefloración) y los resultados se expresan por jarra.

9. Unidades experimentales, siembra y recolección de las plantas a campo

Se emplearon parcelas con 6 surcos de 5 m de largo distanciados 70 cm. Las parcelas fueron sembradas a mediados de diciembre; sobre un surco previamente humedecido, con una sembradora manual, ajustándose

la densidad, por raleo, a 20 plantas por m (280.000 plantas/ha). Los utensilios utilizados se desinfectaron con alcohol. Durante el desarrollo del cultivo se realizó el manejo cultural recomendado para esta especie. A los 45 días de la siembra (prefloración) se determinó sobre 15 plantas del segundo y quinto surco de cada parcela: número de nódulos, identificación de la cepa que le dio origen por serología y el peso fresco y porcentaje de Nitrógeno de la parte aérea. Posteriormente se evaluó el rendimiento, número de plantas y porcentaje de Nitrógeno en grano sobre los dos surcos centrales, dejando 50 cm de bordura en los extremos.

10. Inoculación en cámara

La inoculación de las raíces fue efectuada en el momento de la siembra por agregado del 1 ml de una suspensión bacteriana obtenida como se indica en el punto 4; con una concentración de 1×10^9 cel/ml. En el caso del tratamiento inoculado con mezcla de cepas, la suspensión utilizada contenía la misma concentración de cada una de las cepas.

11. Inoculación a campo

El inoculante empleado fue obtenido usando como vehículo turba proveniente de Tierra del Fuego y elaborado según Balatti y Mazza (1970).

El inoculante fue agregado a la semilla en dosis masiva empleando el método húmedo con una solución de goma arábica al 40 por ciento P/V (Informe Niftal 1979).

12. Determinación serológica de las cepas formadoras de nódulos

Esta determinación fue realizada sobre una suspensión obtenida por maceración de cada nódulo en 3 ml de solución salina (0,85 por ciento). De esta suspensión (previa decantación de los restos del nódulo) 0,5 ml se enfrentaron con 0,5 ml de cada uno de los antisueros de las cepas empleadas. Los tubos conteniendo las soluciones de antígenos y

antisueros se incubaron semisumergidos durante 3 ó 4 horas a 52°C, tiempo al cabo del cual se leyeron los resultados. En todos los casos se incluyeron testigos de autoaglutinación.

El número de nódulos empleados fue de 200 en el ensayo en cámara y de 250 en el ensayo a campo.

13. Determinaciones generales

- peso seco de parte aérea: el mismo fue realizado luego del secado en estufa a 65°C hasta peso constante;
- peso fresco: fue realizado por pesada directa, inmediato a la cosecha, de cada una de las plantas;
- Nitrógeno: el porcentaje de Nitrógeno fue evaluado por el método de Microkjeldahl (AOAC 1970).

- Rendimiento: este parámetro fue evaluado utilizando como parcela útil los 2 surcos centrales dejando 25 cm de bordura en ambos extremos, corrigiendo los resultados al 14 por ciento de humedad.

14. Análisis de los resultados

Estos fueron sometidos al análisis de la varianza y diferencias mínimas significativas entre medias por el test' de Tukey y Duncan (Pimentel Gómez, 1978).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en ambos experimentos se indican en los cuadros 1 y 2.

CUADRO 1: Ensayo en cámara climatizada.

Tratamientos	Resultados						Porcentaje de nódulos formados por cada cepa (200 nódulos)	
	Número de nódulos por jarra		Peso Seco gramos por jarra		Porcentaje de nitrógeno			
Cepa E 41	E 45	38	Testigo + N	2,69	S-100	2,43	5019	79
Cepa E 45	5019	36	Mezcla	2,58	Mezcla	2,30		
Cepa S-100	Mezcla	35	Mezcla + N	2,58	E 45	2,27	S-100	15
Cepa 5019	E 41	34	E 45	2,32	E 41	2,24		
Mezcla de cepas	S-100	31	S-100	2,30	5019	2,20	E 45	6
Mezcla de cepas + N	Mezcla + N	28	E 41	2,26	Mezcla + N	2,20		
Testigo	Testigo	0	5019	2,19	Testigo + N	1,90		
Testigo + N	Testigo + N	0	Testigo	1,56	Testigo	1,08		
Halesoy 71	Bragg	40	Bragg	2,44	Bragg	2,13		
SRF 450	Halesoy	32	Halesoy	2,34	SRF	2,00		
Bragg	SRF	30	SRF	2,15	Halesoy	1,96		
3 Repeticiones	Interacción no significativa		Interacción no significativa		Interacción no significativa			
	c.v. = 35 %		c.v. = 14 %		c.v. = 4 %			

Nota: Las medias unidas por el mismo trazo no difieren entre sí en forma significativa (Tukey P: 0,05).

CUADRO 2: Ensayo a campo.

Tratamientos	Resultados										Porcentaje de cada cepa (250 nódulos) %		
	Número de nódulos		Peso Fresco gramo por planta		Nitrógeno en parte aérea %		Nitrógeno en grano %		Rendimiento kg/ha				Pl/m
Cepa S-100	Mezcla	11	5019	52	Testigo	4,3	5019	6,8	5019	4315	11	S-100	54
Cepa 5019	5019	10	Testigo	49	E 45	4,3	Mezcla	6,8	S-100	4142	11	5019	41
Cepa E 45	E 45	9	E 45	46	5019	4,3	S-100	6,6	E 45	3494	8		
Mezcla	S-100	8	Mezcla	45	S-100	4,2	E 45	6,5	Mezcla	3495	7	E 45	5
Testigo	Testigo	0	S-100	43	Mezcla	4,2	Testigo	6,3	Testigo	3485	10		
3 Repeticiones	c.v. = 23,8 %		c.v. = 14 %		c.v. = 2,2 %		c.v. = 1,7 %		c.v. = 7,8 %				

Nota: Las medias unidas por el mismo trazo no difieren entre sí en forma significativa (Duncan P: 0,05).

DISCUSION

Los valores de peso seco y porcentaje de nitrógeno obtenidos para las cepas utilizadas, en relación a los correspondientes testigos sin inocular (con y sin adición de nitrógeno) indican que las cepas empleadas establecen una adecuada simbiosis.

La buena nodulación observada en el tratamiento inoculado con la mezcla de cepas adicionada con nitrógeno no concuerda con lo revisado con Dart (1977) y Pate (1977). Sin embargo, Evans (1982) encuentra que cuando la concentración de Nitrógeno aportada por nitratos es del orden de 200 ppm se afecta marcadamente la formación de nódulos mientras que concentraciones similares a las empleadas aquí (50 ppm) tienen muy poco afecto sobre el establecimiento de la simbiosis.

Que la cantidad de Nitrógeno adicionado es baja se observa en el valor de porcentaje de Nitrógeno del tratamiento testigo adicionado con este mineral que es significativamente inferior al los tratamientos inoculados con la cepa S-100 y la mezcla.

Respecto a los cultivares se observa que Bragg es el que mayor número de nódulos formó (si bien las diferencias no son significativas), motivo por el cual fue elegido para el ensayo posterior a campo.

Las diferencias en el peso seco de parte aérea observadas entre los tres cultivares pueden deberse a características intrínsecas de los mismos. No se observan interacciones significativas cultivar cepa, por lo que no se puede optar por una determinada combinación. Debido a que la cepa E 41 no es capaz de formar nódulos en competencia con las cepas restantes fue descartada para la segunda etapa del estudio.

En el ensayo a campo (Cuadro 2) se observa que las cepas 5019 y S-100 produjeron un aumento significativo en el rendimiento (24 y 19 por ciento) respecto al testigo, a pesar del alto rinde de éste (57 por ciento superior al valor medio de la Argentina según datos de la Bolsa de Cereales). Es de hacer

notar que el testigo no presentó nodulación, lo que indica la ausencia de cepas naturalizadas y la necesidad de incorporar en ese suelo cepas eficientes.

Los valores de rendimiento de las parcelas inoculadas con la cepa E 45 y con la mezcla de cepas no presentan diferencias significativas con el testigo sin inocular, lo que probablemente sea debido a la disminución en el número de plantas. Las cepas S-100 y 5019 son las más competitivas por los sitios de infección nodular, como lo indican los porcentajes de nódulos por ellas formados. Estos valores, como se observa comparando los cuadros 1 y 2, son afectados por el ambiente, por lo que consideramos conveniente determinar la competitividad en la región donde se trate de establecer la cepa.

CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados de este trabajo, se recomiendan las cepas 5019 y S-100 para la inoculación de soja en el área del Noroeste Argentino, debido a su eficiencia y competitividad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada en el ensayo a campo al personal del INTA Cerrillos, y en especial al Ing. Agr. Somigliana, J. C.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Balatti, A. P.; Mazza, L. A., 1970. Producción de inoculantes para leguminosas. *ION*, 30: 270-275.
- 2) Bolsa de Cereales, Revista Institucional, Número Estadístico, 1981, Buenos Aires, Argentina.
- 3) Dart, P., 1977. Infection and Development of

- Leguminous Nodules, in: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. 3, Cap. VII Ed.: John Wiley & Sons, New York, 675 p.
- 4) Evans, J., 1982. Response of soybean-*Rhizobium* symbiose to mineral nitrogen. *Plant and Soil*, 66 (439-442).
 - 5) FAO, 1980. Report of the FAO-UNEP Meeting on Biological Nitrogen Fixation (BNF) Conclusions and Recomendations. Rome, 16-20 June.
 - 6) Halliday, J., 1981. Agrotecnologies Based on Symbiotic System that Fix Nitrogen. A basis for discussion during The International Workshop on BNF Technology, Cali, Colombia, 9-13 March, 1981.
 - 7) Lopreto, C. R.; Mazza, L. A. y Balatti, A. P., 1972. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de una cepa de *Rhizobium japonicum*. Anales de la Sociedad Científica Argentina. Tomo CXCI 35-47.
 - 8) Pimentel Gómez, F., 1978. Curso de Estadística Experimental, Editorial Hemisferio Sur S.A. 324 p.
 - 9) Norris, D. O., 1964. Techniques used in works with *Rhizobium*. In: Some Concepts and Methods in Subtropical Pasture Research. Comm. Bureau of Pastures and Field Crops, Hurley, Berkshire, England. Bull. No 47, p. 186-198.
 - 10) Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. Eleven Edition 16, 1970. Ed.: Horowitz H. Pub. AOAC, Washington.
 - 11) Pate, J. S., 1977. Functional Biology of Dinitrogen Fixation by Legumes. In: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. III, Cap. IX. Ed. John Wiley & Sons, New York, 675 p.
 - 12) Schmidt, E. A.; Bankole, R. O. and Bohlool, B. B., 1968. Fluorescent Antibody Approach to Study of Rhizobia in Soil. *Journal of Bacteriology* 95, 1987-1992.
 - 13) Somesagaram, P.; Hoben, H. and Halliday, J., 1979. Practical Exercises in Legume-Rhizobium Technology. Informe NIFTAL Project, Paia, Hawaii.
 - 14) Vidor, C., 1981. Fixacao do Nitrogenio pelas Gramineas e Leguminosas. Departamento de Solos/UFRGS e IPAGRO/Secretaria da Agricultura.
 - 15) Curso Latinoamericano de Tecnología de *Rhizobium*. MIRCEN, Porto Alegre, 1981.
 - 16) Vincent, J. M., 1970. A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. International Biological Programme. London. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburg. 164 pp.