

Inoculación de cianobacterias en el cultivo de soja, efectos sobre la infectividad de *Bradyrhizobium japonicum* y la producción de materia seca.

Monteros Solito, Ramiro I. - Iglesias, María C.

Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

Sargento Cabral 2131, 3400 Corrientes, Argentina.

Correos: ramiromonteros@hotmail.com / mariaiglesias@ciudad.com.ar / microfca@universia.com.ar

Introducción

La soja (*Glycine max* L.) es el cultivo de leguminosas de grano mas importante del mundo y Argentina, junto con Brasil, China y Estados Unidos son países de gran producción. El protagonismo actual de esta leguminosa, tanto en nuestro país como en el mundo entero se debe principalmente, a su calidad como alimento, e industrialmente, por la cantidad de productos derivados que de ella se extraen (Iglesias 2004).

En cuanto a la nutrición mineral de soja, la demanda de nutrientes varía proporcionalmente con los niveles de producción logrados, que en términos generales son mayores que los requeridos por los cultivos de cereales. La alta demanda de nitrógeno (N) lo constituye en el elemento que en mayor medida limita el logro del cultivo de alta producción (Diaz-Zorita & Duarte 2004). El cultivo de soja presenta la característica de generar nódulos en sus raíces como consecuencia de la asociación simbiótica con bacterias específicas como *Bradyrhizobium japonicum*. Dicha característica le permite al cultivo abastecerse de N, cubriendo hasta un 60% las necesidades de este nutriente en algunos casos (Iglesias 2004). El proceso de FBN es energéticamente costoso para la planta, 6 y 12 g de carbohidratos por g de N fijado y esto explica las estrechas relaciones observadas entre crecimiento del cultivo y la FBN. Factores que restrinjan el crecimiento limitarán la FBN y reducirán su eficiencia (Diaz Zorita & Duarte 2004). La FBN depende de la materia seca nodular y de la eficiencia de la cepa bacteriana utilizada. Si bien no es el mejor estimador, la materia seca nodular permite evaluar la fijación biológica y la acumulación de N (Cicore *et al.* 2004). Al ser un fenómeno tan complejo, la nodulación se ve influenciada por un gran número de factores, tanto por los ambientales como los genéticos propios de ambos simbioses. Entre los factores edáfico-ambientales que afectan la nodulación cabe destacar: temperatura, acidez, humedad, presencia de N combinado, microorganismos del suelo. Estos factores sin llegar a afectar sensiblemente el desarrollo de la planta o de la raíz, pueden influir de gran manera sobre las primeras etapas de formación de los nódulos (Orive & Temprano 1983)

La raíz es una zona de intensa actividad, donde ocurre gran parte del ciclaje de los nutrientes. La densidad de población es mayor en la superficie de la raíz que se magnifica cuando está involucrada una asociación simbiótica. La rizosfera presenta un nicho ecológico donde las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas desarrollan diversos mecanismos de promoción, a través de la producción de sideróforos, hormonas, cianidas (HCN) solubilizan fósforo, inhiben o compiten con los patógenos del suelo o porque actúan como agentes de control biológico, posibilitando indirectamente un mejor crecimiento de las plantas (Altamirano 2003). Dentro de la rizosfera también podemos encontrar a un grupo grande y heterogéneo de fotótrofos del dominio bacteria como las Cianobacterias. Difieren de las bacterias rojas y verdes en aspectos fundamentales, principalmente en que son fotótrofos oxigénicos (Madigan *et al.* 1997). Este grupo considerado como cianofíceas en la taxonomía antigua, ha sido incluido entre las bacterias, ya que poseen estructura y organización de protistas inferiores. Muchos integrantes poseen la doble capacidad de fijar carbono y nitrógeno (reducen el CO₂ y el N₂) (Frioni 1999). Las que tienen esta capacidad forman heterocistes, células redondas y con aspectos de estar mas o menos vacías, que se encuentran distribuidas regularmente a lo largo de un filamento o en un extremo del mismo (Madigan *et al.* 1997). La incorporación de cianobacterias fijadoras de N al suelo, es una práctica agrícola antigua en el cultivo del arroz, en el sudeste de Asia, pero aún no se ha implementado en nuestro país (Zaccaro 2005). Los biodermas algales (colonias o agregados de cianobacterias) principalmente de *Nostoc sp.* y *Anabaena sp.* tienen una amplia difusión, desde los fríos ambientes de la Antártida y el Ártico hasta en áridos y cálidos desiertos del planeta. Los biodermas algales contribuyen a cementar los agregados del suelo en una capa que resiste al viento y la fuerza de arrastre del agua, favorecen una mejor retención de la humedad y representan una fuente de materia orgánica, promoviendo el incremento de nitrógeno dentro del área de influencia. (Ansín *et al.* 2003). La habilidad de las cianobacterias de fijar N₂ atmosférico les permite desarrollarse sin inconvenientes en suelos pobres en este elemento. En ambientes con una alta porción de suelo descubierto de vegetación, la importancia de estos microorganismos fotótrofos se manifiesta en la promoción de procesos relacionados con la formación de agregados y la estabilización del suelo (Ansín *et al.* 2003). Tiene importancia ecológica también como colonizadora de suelos quemados, erosionados y degradados donde se desarrollan a partir de sales, agua y luz, es de destacar las asociaciones con vegetales inferiores como las Briofitas, helechos (*Azolla sp.*) y con hongos (líquenes), en donde la fijación biológica es mas eficiente (Frioni 1999).

Los Objetivos fueron evaluar los efectos de la inoculación de Cianobacterias en la infectividad de *Bradyrhizobium japonicum* en el cultivo de soja. Comparar la producción de materia seca entre tratamientos, inoculados y naturalizados.

Materiales y métodos

Se estableció un ensayo en invernáculo usando macetas con capacidad de 1kg de suelo, siguiendo un diseño en bloque completos al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, teniendo entonces 20 unidades experimentales, se hizo el doble de estas unidades donde se sacó a los 30 días una primera extracción (1ª extracción), con el fin de observar la evolución de la infectividad de los rizobios, finalizando el ensayo a los 60 días (2ª extracción), se tomó la precaución de que estos tengan las mismas condiciones de riego y exposición del sol, por tal motivo se pusieron juntos cada bloque de la 1ª y 2ª extracción.

Los tratamientos fueron:

- T1: Testigo, sin inocular.
- T2: Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum*.
- T3: Inoculado con Cianobacterias.
- T4: Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y Cianobacterias.

El suelo es de un establecimiento cercano a la capital correntina perteneciente a la serie Berón de Astrada y es un Udipsament árgico (familia franco fina mixta), son suelos de baja fertilidad natural y retención de humedad pero con excelentes condiciones físicas, sin ningún impedimento para la penetración del agua y de las raíces con una profundidad efectiva de 100 cm, tiene bajos tenores de materia orgánica (0,55%) y bases de cambio (3,1 meq 100 g⁻¹), con un pH que ronda por 6,8 (INTA 1996).

Se sembró cinco semillas por maceta, el día **02/05/05** con un poder germinativo del 90 %. A los 5 días posteriores a la siembra germinaron más del 50 % de las macetas, y cuando comenzó a desplegarse la hoja unifoliada, a los 9 días se realizó la inoculación de los diferentes tratamientos, para eso se procedió de la siguiente manera:

❖ Se pesó 0,6 gramos de fertilizante biológico en base sólida formulado con Cianobacterias *Nostoc sp* (Holt *et al.*) y se diluyó en 50 cm³ de H₂O destilada.

❖ Se fraccionó inoculante comercial en medio líquido conteniendo *Bradyrhizobium japonicum* E 109 INTA (Holt *et al.*) 3x 10⁹ UFC ml⁻¹ en 50 ml.

Al atardecer se efectuó la inoculación distribuyendo uniformemente sobre las macetas de la siguiente manera:

- T1: Agua de canilla
- T2 : 2 ml de *Bradyrhizobium japonicum*.
- T3: 2 ml de Cianobacterias.
- T4: 1 ml de *Bradyrhizobium japonicum* y 1 ml de Cianobacterias.

Luego se regó con agua de canilla 5 ml al finalizar la inoculación. Se mantuvo con una adecuada humedad los días siguientes y protegiendo de las exposiciones al sol y de las altas temperaturas. A los 15 días de la siembra se realizó el raleo dejando tres plantas por macetas. A partir de que la hoja unifoliada se expandió totalmente se procedió a medir altura de la planta (inserción de la última hoja desplegada), cada 7 días hasta la extracción de las mismas. Al cumplirse los treinta días del ensayo se procedió a realizar la primera extracción por bloques, se realizaron varias tareas, que consistían en extraer las plantas de las macetas, al ser un suelo arenoso no se tuvo mayores inconvenientes, con un suave agitado con la mano ya se limpiaban las raíces. Limpias las raíces de las plantas se determinó posición de los nódulos (raíz principal o raíces secundarias), y cantidad. Una vez extraídos los nódulos fueron colocados en cajas de petri y llevadas a estufa con 60°C hasta peso constante, luego se obtuvo peso seco. En las plantas se midió altura, se contaron las hojas totalmente desplegadas y fueron llevadas en sobres de papel de diario a estufa hasta peso constante, al cabo de unos días se pesaron por separado la parte aérea y las raíces de las plantas. Estas tareas también fueron llevadas a cabo en la 2ª extracción, estaba planificado que sea a los 60 días posteriores a la siembra, sin embargo, debido a razones sanitarias de la mayoría de las plantas se anticipó la extracción, concluyendo el ensayo a los 57 días (29/06/05). Posteriormente se tabularon y analizaron los datos. El análisis consistió en el análisis de la variancia, mediante modelo lineal-General AOV/AOCV y prueba de Tukey (P < 0.05) para la comparación de los promedios.

Resultados y discusión

Se presenta el resultado del análisis estadístico a los 30 y 57 días (1ª y 2ª extracción) de cada una de las variables tomadas para determinar el efecto de la inoculación de Cianobacterias en la infectividad de *Bradyrhizobium japonicum* y la producción de materia seca.

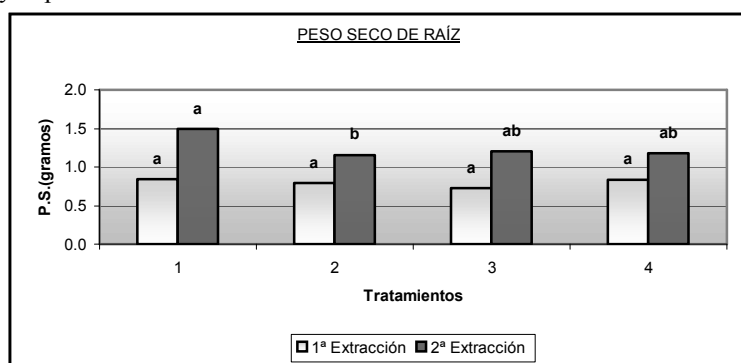


Figura 1: Comparación de medias de la variable Peso Seco de Raíz. (Letras iguales no difieren estadísticamente).

Para la 1ª extracción no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, a pesar de ello puede verse que el T2 y T4 son los que mayor PS presentan.

En el caso de la 2ª extracción el Testigo difiere estadísticamente al T2. El T2 presenta 25% de Coeficiente de Variación (CV) mientras que los otros tratamientos oscilan entre 5 y 12%.

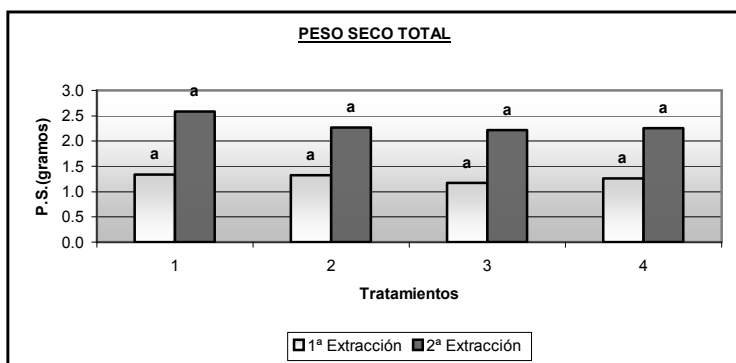


Figura 2: Comparación de medias de la variable Peso Seco Total. (Letras iguales no difieren estadísticamente).

En ambas extracciones no hubo diferencias significativas en el peso seco total de las plantas, en ambos casos el testigo presenta el mayor valor.

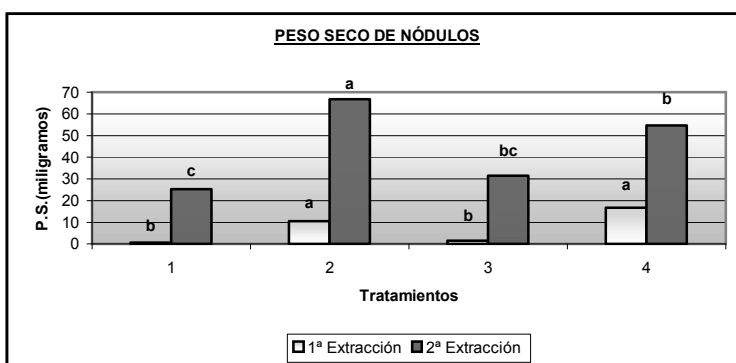


Figura 3: Comparación de medias de la variable Peso Seco de los Nódulos. (Letras iguales no difieren estadísticamente).

En la 1ª extracción, el P.S. de los nódulos el inoculado con rizobio y la combinación rizobio-cianobacterias fueron estadísticamente diferentes al Testigo y al inoculado con cianobacterias, en estos últimos tratamientos esta variable presentó un CV mayor al 220%. En la 2ª extracción el T2 difiere significativamente del T1, T3 y también del T4, este a su vez se diferencia estadísticamente del T1. En este caso la variable presentó un CV

entre 20 y 65% en los tratamientos.

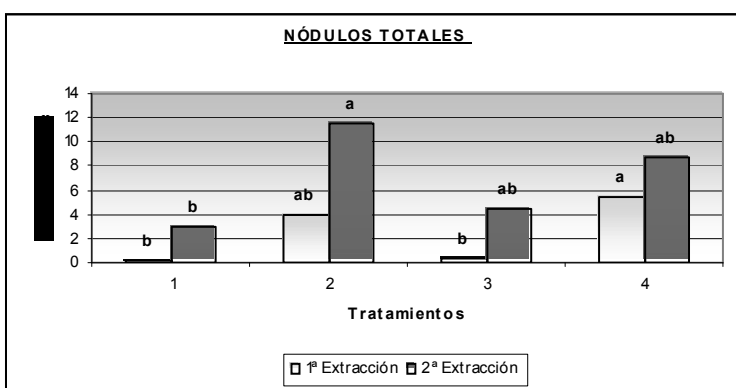


Figura 4: Comparación de medias de la variable Nódulos totales. (Letras iguales no difieren estadísticamente).

Para la 1ª extracción el T4 es estadísticamente diferente al T1 y al T3 en la cantidad de nódulos totales, presenta un CV más del 220% para los T1 y T3. En la 2ª extracción el T2 difiere significativamente al T1, el T4 presenta también más que los otros tratamientos pero no llega a ser significativa, el CV para el T1 es de 45%.

De estos datos obtenidos por el análisis estadístico podemos enunciar lo siguiente:

- ❖ El número de hojas a la mitad del ensayo era mayor con la inoculación de rizobio, y la combinación rizobio-cianobacterias parecía afectar el número de hojas pero al finalizar no hubo diferencias entre los tratamientos a pesar de que el inoculado con rizobio es el que más hojas presentó.
- ❖ La altura de las plantas no se vio influenciada al agregar cianobacterias con respecto al testigo, y habría un leve incremento al combinar con rizobios, a pesar de que no llega a ser significativo este aumento. Se notó en la mitad del ensayo, que el inoculado con Rizobio supera al inoculado con cianobacterias, pero no se mantiene esto al finalizar el mismo.
- ❖ El peso seco de raíz en el testigo fue superior al inoculado con rizobios, la inoculación de cianobacterias, se vio favorecida si se combina con rizobio, añadiendo que fue más abundante la cabellera de raíces, la presencia de agregados y en mejor retención de la humedad.
- ❖ La inoculación de rizobio incrementó el peso seco de la parte aérea con respecto a la combinación rizobios-cianobacterias, pero esta no difiere al del testigo.
- ❖ La producción de materia seca reflejada en el peso seco total no fue perjudicada por la incorporación de cianobacterias, tanto con el testigo como en la combinación con rizobios.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005

- ❖ La inoculación de cianobacterias y rizobios mejoró la presencia de nódulos en la raíz principal, se pudo ver también que la inoculación de cianobacterias superó al testigo en la presencia de los nódulos, se puede decir que los rizobios naturalizados mostraron mejores condiciones para la infección.
- ❖ La presencia de nódulos en raíces secundarias fue mayor con la inoculación de rizobios, se favoreció con la combinación rizobio-cianobacterias, pero no es estadísticamente diferente al testigo.
- ❖ El peso seco de los nódulos aumentó con la inoculación de rizobios, también la combinación rizobio-cianobacterias favoreció el incremento de peso seco con respecto al testigo pero menos si lo comparamos con rizobio.
- ❖ La cantidad de nódulos fue mayor con la inoculación de rizobios y con la combinación rizobio-cianobacterias, sin llegar a ser significativo, el agregado de cianobacterias superó al testigo a pesar de que no sea diferente estadísticamente pero hay que destacarlo.

Conclusión

En esta experiencia la inoculación de cianobacterias en el cultivo de soja benefició la infectividad de *Bradyrhizobium japonicum*.

Los rizobios naturalizados expresaron su potencial en el tratamiento de inoculado simple de cianobacterias.

En relación con la materia seca, no se presentaron mayores diferencias.

Referencias

- ❖ Altamirano F. E. 2003. Ecofisiología de las rizobacterias. Microbiología Agrícola, Un aporte de la investigación Argentina. 1ª Edición, Santiago del Estero. Universidad Nacional de Santiago del Estero. p. 113-118.
- ❖ Ansín O., Deregius A., Lanfranco J. & Ringuet J. 2003. Rol del alga *Nostoc commune* en la promoción de la cobertura vegetal y el valor forrajero de pastizales alcalinos de la Pampa deprimida bonaerense. Microbiología Agrícola, Un aporte de la investigación Argentina. 1ª Edición, Santiago del Estero. Universidad Nacional de Santiago del Estero. p. 59-65.
- ❖ Cicore P., Sainz Rosas R., Echeverría H. & Barbieri P. 2004. Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en un cultivo de soja bajo diferentes condiciones de manejo. XIX Congreso de las Ciencias del Suelo-Paraná. p. 322.
- ❖ Diaz Zorita M. & Duarte G. A. 2004. Manual Práctico para la Producción de soja. 1ª Edición, Editorial Hemisferio Sur S.A. 230 p.
- ❖ Frioni L. 1999. Procesos Microbianos. Tomo I y II. Fundación de UNRC. Río Cuarto. Córdoba. 282 p. y 286 p.
- ❖ Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P., Staley J. & Williams S. 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology 787 p.
- ❖ Iglesias M. C. 2004. Inoculación en la región NEA (Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE). Resultados de Investigación en Argentina Campaña 2003-04. NITRAGIN. p. 21.
- ❖ INTA, Centro Regional Corrientes, EEA Corrientes 1996. Suelos, Mapa de Suelos de la provincia de Corrientes 1:500.000. 432 p.
- ❖ Madigan M. T., Martinico J. M. & Parker J. 1997. Brock Biología de los microorganismos. 8ª Edición, PRETICE may, Madrid España. 1064 p.
- ❖ Orive R. & Temprano F. 1983. Simbiosis Rhizobium-leguminosa. Leguminosas de grano. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid 1983. 259 p.
- ❖ Zaccaro M., C. 2005. Biofertilizantes cianobacteriales: una estrategia ecológica para mejorar la producción vegetal. <http://www.rec.uba.ar/Programacion%2098-00/htm/tx79.htm> extraído de la Web el 11/06/05.

- ❖ **Agradecimientos a RIZOBACTER ARGENTINA SA y BILAB S A.**