

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE UN INOCULANTE Y DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN

LA FERNÁNDEZ, MA GÓMEZ, MA SAGARDOY

Departamento de Agronomía, Altos del Palihue s/nº, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca  
E-mail: fernandezletic@yahoo.com.ar

Recibido 11 de diciembre de 2003, aceptado 31 de marzo de 2004

### EVALUATION OF THE INFECTIVE CAPACITY OF AN INOCULANT AND METHODS OF INOCULATION

The nodule-appearance period was studied by means of a plant infection technique using inoculants that had been stored at 5, 20 and 30°C during 16 and 31 days. In addition, two soybean inoculation methods were compared via experiments in the growth chamber: seed-applied inoculation and soil-applied inoculation. The application of a liquid inoculant directly on soil surface was done the day of the sowing, and 5, 11 and 20 days after planting at different distances from the seed (0 cm, 1 cm and 2 cm). Results indicated that inoculated plants with an inoculant stored at high temperature (30°C) during 31 days delayed soybean nodulation. An increase in both the nodule weight and number was observed when inoculation was carried out on the soil surface.

**Keywords:** liquid inoculant, inoculation, nodulation, soybean.

### INTRODUCCION

Los rizobios son bacterias del suelo que tienen capacidad para establecer simbiosis con distintas leguminosas. Esa asociación simbiótica permite que las bacterias transformen el nitrógeno gaseoso en amoníaco, facilitando que el hospedante obtenga del aire parte del nitrógeno que necesita para vivir (Azpilicueta 1999). La simbiosis soja (*Glycine max* L. Merrill)-*Bradyrhizobium spp.* es importante desde el punto de vista económico, ya que puede fijar hasta 300 kg de N/ha bajo condiciones óptimas de desarrollo (Keyser y Li 1992).

La inoculación de leguminosas es una práctica que permite incorporar bacterias fijadoras de nitrógeno a las semillas o al suelo (Hardanson *et al.* 1989). Los agricultores disponen de distintos tipos de inoculantes para soja, aceptándose que condiciones como la temperatura y períodos de conservación son algunos de los factores que inciden en su calidad. En Francia, Maurice *et al.* (2001) demostraron que el número de *B. japonicum* de distintos inoculantes investigados, disminuía a medida que aumentaba la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Gómez *et al.* (1997) demostraron, trabajando con inoculantes del mercado argentino, la existencia de una regresión lineal significativa

entre el tiempo de aparición de los nódulos y el número de rizobios que contenía el inoculante al momento de la inoculación de la semilla de soja. En la actualidad, la inoculación de semillas es un método más utilizado que la incorporación del inoculante al suelo. Sin embargo, la inoculación sobre la superficie del suelo posee ventajas tales como permitir un aumento de la dosis inoculada y la posibilidad de poder realizar una reinoculación después de la siembra de la leguminosa (Smith 1992). Más aún, la dosis inoculada puede aumentarse hasta 50 veces más cuando se inocula directamente sobre el suelo (Nelson *et al.* 1978). Muldoon *et al.* (1980) compararon en campos de Ontario (Canadá) los dos métodos y detectaron un aumento en el rendimiento del cultivo de soja al practicar la técnica de inoculación del suelo.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar la capacidad infectiva de un inoculante líquido para soja, conservado a tres temperaturas, en dos períodos diferentes y 2) evaluar y comparar la infectividad utilizando dos métodos de inoculación bajo condiciones controladas.

### MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un inoculante líquido comercial para soja (400 mL/50 kg semilla) obtenido

directamente de fábrica formado por dos cepas de *B. japonicum*. La determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc)/mL del inoculante se realizó de acuerdo con la técnica de las diluciones decimales y siembra en placa de Petri (Pérez *et al.* 2001), utilizando el medio agar manitol extracto de levadura (AMEL) (Vincent 1970) y tres placas por dilución sembrada. Las cajas fueron incubadas a 28°C durante 7-8 días.

Para estudiar la capacidad infectiva del inoculante mantenido a tres temperaturas diferentes (5, 20 y 30°C) durante dos períodos de incubación (16 y 31 días) se inocularon 20 plantas de soja/tratamiento con 0,7 mL del inoculante líquido por tubo. Las plántulas de soja se sembraron en tubos de 25 mm de diámetro x 190 mm de altura y desarrollaron en base a una solución libre de nitrógeno (Vincent 1970). Los tubos se mantuvieron en cámara de crecimiento con 16 h de luz (24°C) y 8 h de sombra (20°C) y se controlaron diariamente durante 23 días, con el objeto de observar la aparición de nódulos en las plantas de soja.

Para evaluar y comparar los dos métodos de inoculación, se trabajó con macetas de 14 cm de diámetro y 16 cm de altura que contenían suelo franco arenoso (pH=6,8; carbono orgánico=16,71 g kg<sup>-1</sup>; nitrógeno total=1,78 g kg<sup>-1</sup>; limo=730 g kg<sup>-1</sup>, arcilla=202 g kg<sup>-1</sup>) humedecido a capacidad de campo y libre de *B. japonicum*. Cada una de las 70 macetas, independiente del tratamiento realizado, fue sembrada con una semilla de soja Nidera 4423 RG. Los tratamientos realizados fueron: 1) inoculación convencional: 100 g de semillas de soja se mezclaron con 0,7 mL del inoculante líquido siguiendo las indicaciones del marbete y 2) agregado del inoculante directamente sobre la superficie del suelo: 0,70 mL de inoculante por maceta y por

tratamiento y a distinta distancia de la semilla (0 cm, 1 cm y 2 cm). Esa inoculación se repitió a los 5, 11 y 20 días después de sembradas las simientes, trabajando con cinco macetas por tratamiento. Además, se dejaron como testigo cinco macetas con una semilla/maceta sin inocular. Las plantas se regaron con agua destilada estéril y se mantuvieron durante 30 días a 24°C (16 h) y a 20°C (8 h). Al final del experimento se determinó número, peso fresco y seco de los nódulos de soja. Con los valores obtenidos como resultado de la inoculación sobre la semilla y directamente sobre el suelo el primer día de la siembra y a tres distancias distintas de la semilla, se realizó un test de Diferencia Mínima Significativa (DMS ó LSD). Por otro lado, con los resultados logrados del tratamiento 2, se realizó un ANOVA DOBLE con factores fijos trabajando con un diseño completamente aleatorizado y balanceado (Steel, Torrie 1997).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En este estudio se comprobó que los inoculantes conservados a 5°C y 20°C, durante 16 y 31 días con un número que osciló entre 9,4 y 9,7 (expresado como log<sub>10</sub>) bradyrhizobios/mL<sup>-1</sup> de producto, provocaron la aparición de nódulos entre los 7 y 8 días después de la siembra de la soja (Tabla 1). En contraste, cuando el inoculante se conservó a 30°C durante 31 días y el número era 6,1 (expresado como log<sub>10</sub>) bacterias/mL<sup>-1</sup>, la nodulación se retrasó hasta 12 días (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gómez *et al.* (1997) al trabajar con la misma técnica. Estos investigadores sugieren una variación en la actividad fisiológica de las

**Tabla 1.** Número de plantas de soja noduladas luego de ser inoculadas con un inoculante líquido sometido a diferentes temperaturas y períodos de conservación.

**Table 1.** Number of nodulated soybean plants after inoculation with a liquid inoculant stored at different temperatures and conservation periods.

Temperatura de almacenaje	Días después de la inoculación																						
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Uf					
5°C(16) <sup>1</sup>	22	1	2	3	-	2	2	3	1	2	2	-	-	-	-	-	-	9					
5°C(31)	1	2	4	-	2	2	3	4	-	1	1	-	-	-	-	-	-	10					
20°C(16)	-	4	1	3	2	2	2	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	9					
20°C(31)	1	3	2	3	-	3	2	2	1	-	-	-	1	1	-	-	-	9					
30°C(16)	-	-	3	3	2	3	3	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	9					
30°C(31)	-	-	-	-	-	4	-	3	-	-	-	-	-	-	1	1	2	6					

Ufc: Número de unidades formadoras de colonias por semilla inoculada, expresado como log<sub>10</sub><sup>-1</sup> Período de conservación del inoculante líquido (16 o 31 días). <sup>2</sup>Número de plantas que nodularon en esa fecha.

**Tabla 2.** Número de nódulos por planta en soja inoculada a distinta distancia de la semilla.**Table 2.** Number of nodules in soybean inoculated at different distances from the seed.

Distancia (cm)	Inoculación tardía (días después de la siembra)				
	0	5	11	20	Media
0	19,4 <sup>1</sup> ± 9,76 <sup>2</sup>	21,8 ± 13,14	59,2 ± 38,45	36,2 ± 41,51	34,15 a
1	23,2 ± 16,42	36,8 ± 13,08	30 ± 11,55	55,6 ± 61,67	36,04 a
2	22,4 ± 11,19	26 ± 10,46	39,4 ± 21,09	37,8 ± 28,46	31,40 a
Media	21,66 a <sup>3</sup>	28,2 a	42,86 a	43,2 a	-----

<sup>1</sup>Cada valor es la media de 5 repeticiones. <sup>2</sup>Desvío estándar. <sup>3</sup>Valores medios con letras iguales no son estadísticamente diferentes (p=0,05)

bacterias de acuerdo a las condiciones de incubación del producto; de modo que los inoculantes con alta capacidad infectiva son aquellos que presentan rizobios viables por estar conservados a temperaturas y durante períodos adecuados.

No se hallaron diferencias estadísticas (p=0,05) en el número de nódulos como así tampoco en los pesos de los mismos al comparar la inoculación sobre la semilla con respecto a la practicada directamente sobre el suelo el primer día de la siembra y a tres distancias distintas de la semilla. Sin embargo, Wadisirisuk (1989) comprobó que la inoculación de semillas provocaba un menor número de nódulos que su aplicación al suelo, ya sea directamente sobre el mismo o a distintas profundidades. Hardarson *et al.* (1989) demostraron en experimentos de invernáculo que la inoculación de semillas y del suelo producen patrones de nodulación distintos, e incluso observaron diferencias en

los valores de fijación de nitrógeno. Estos autores determinaron mayores porcentajes en el nitrógeno derivado de la atmósfera (fijación) y en el peso fresco de los nódulos en inoculaciones realizadas a una profundidad de 5-25 cm en comparación con las inoculaciones de semillas puestas a germinar a la misma profundidad.

No se observó interacción entre las distancias de inoculación a la semilla (0 cm, 1 cm, 2 cm) y los días de inoculación después de la siembra (0, 5, 11 y 20 días). Se separaron entonces las medias de cada tratamiento y se realizaron pruebas de comparación de medias como el DMS. En este análisis no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p=0,05) en el número de nódulos en las distancias de inoculación a la semilla ensayadas (0 cm= 34,2; 1 cm= 36,0 y 2 cm= 31,4) (Tabla 2). Es posible que las distancias elegidas resultaron muy próximas entre sí, como para detectar una movilidad

**Tabla 3.** Peso de nódulos por planta en soja inoculada a distinta distancia de la semilla.**Table 3.** Weight of nodules in soybean inoculated at different distances from the seed.

Distancia (cm)	Inoculación tardía (días después de la siembra)				
	(mg)				
	0	5	11	20	Media
0	48 <sup>1</sup> ± 18 <sup>2</sup>	79,2 ± 51,3	238,6 ± 210	188 ± 142	138,45 a
1	91,6 ± 72,4	170,4 ± 66,4	135 ± 90	328 ± 353	181 a
2	89,6 ± 62,6	81,4 ± 58,5	166 ± 200	336 ± 263	168,25 a
Media	76,4 a <sup>3</sup>	110,33 a	179,86 a	284 b	-----

<sup>1</sup>Cada valor es la media de 5 repeticiones. <sup>2</sup>Desvío estándar. <sup>3</sup>Valores medios con letras iguales no son estadísticamente diferentes (p=0,05)

diferente de los bradyrhizobios en el suelo, en consecuencia, no se logró provocar una nodulación media diferente entre esos tratamientos bajo las condiciones en que se realizó este estudio. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,05$ ) en el número de nódulos en las inoculaciones realizadas el día de la siembra de las semillas y en distintos períodos después de la misma (Tabla 2). Sin embargo, si se obtuvieron diferencias en el peso fresco de los nódulos ( $p=0,05$ ) en las inoculaciones realizadas a los 20 días después de la siembra de las semillas de soja, con respecto al resto de los tratamientos (día de la siembra, a los 5 y 11 días después de la misma) (Tabla 3). Estos resultados se asemejan a lo observado por Boonkerd *et al.* (1978), quienes comprobaron que la proporción de nódulos formados aumentó debido a la aplicación del inoculante sobre el suelo. Además, estos ensayos demuestran que es posible que la inoculación tardía facilite la colonización de las raíces secundarias de la planta ampliando de esa forma la superficie de nodulación (Danso *et al.* 1990).

En conclusión, los resultados de este trabajo demostraron: 1) que el mantenimiento del inoculante a 30 grados durante aproximadamente un mes retrasa la aparición de los nódulos en las plantas inoculadas, y 2) que la técnica de inoculación tardía de la soja (hasta 20 días después de sembradas las semillas en un suelo libre de *B. japonicum*), con el inoculante líquido aplicado directamente sobre la superficie del suelo, incrementó la nodulación indicando que es posible realizar nuevas inoculaciones de la leguminosa cuando existen fracasos iniciales de la misma.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la SECYT (UNS) y por el CONICET mediante el PIP 0909/98.

#### REFERENCIAS

Azpilicueta C. 1999. Características competitivas en cepas de *B. japonicum*. Tesis de Magister en

Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, 129 p.

Boonkerd N, Weber D F, Bezdicek D F. 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia-populated soil. *Agron. J.* 70:547-549.

Danso S K A, Zapata F, Awomaiké K O. 1990. Effect of postemergence, supplemental inoculation on nodulation and symbiotic performance of soybean at 3 levels of soil nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1793-1798.

Gómez M A, Silva N, Hartmann A, Sagardoy M A, Catroux G. 1997. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World J. Microbiol. Biotech.* 13:167-173.

Hardarson G, Golbs M, Danso S K A. 1989. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L. Merrill) as affected by nodulation patterns. *Soil Biol. Biochem.* 21:783-787.

Keyser H H, Li F. 1992. Potencial for increasing nitrogen fixation in soybean. *Plant Soil* 141:119-135.

Maurice S, Beauclair P, Giraud J, Sommer G, Hartmann A, Catroux G. 2001. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after long-term storage. *World J. Microbiol. Biotech* 17:635-643.

Muldoon J F, Hume D J, Beversdorf W D. 1980. Effects of seed and soil applied *Rhizobium japonicum* inoculants on soybeans in Ontario. *Can. J. Plant Sci.* 60:399-409.

Nelson D W, Swearing M L, Beckham L S. 1978. Response of soybeans to commercial soil-applied inoculants. *Agron. J.* 70:517-518.

Pérez M T, Sagardoy M A, Gómez M A, Salerno C M, Zanconi L M. 2001. Manual práctico de Microbiología. Departamento de Agronomía, Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, 125 p.

Smith R S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* 38:485-492.

Steel R, Torrie J. 1997. Bioestadística: principios y procedimientos. Ed. McGraw Hill. México, 622 p.

Vincent J M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 154 p.

Wadisirisuk P. 1989. Influence of *Bradyrhizobium japonicum*: location and movement on nodulation and nitrogen fixation in soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1711-1716.