

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

**Crecimiento, desarrollo y rendimiento de granos de soja (*Glycine max* (L.) Merr.),
inoculados con distintas cepas de *Bacillus* spp, en cámara de crecimiento y a
campo**



Gustavo G. González Anta
Director

Matías S. Ábalo
Co-Director

Pergamino, junio de 2019

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

**Crecimiento, desarrollo y rendimiento de granos de soja (*Glycine max* (L.) Merr.),
inoculados con distintas cepas de *Bacillus* spp, en cámara de crecimiento y a
campo**



Nombre y Apellido

Nombre y Apellido

Nombre y Apellido

Pergamino, junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| I.1. La soja | 2 |
| I.1.1. Origen y generalidades | 2 |
| I.1.2. Importancia de la soja en Argentina | 5 |
| I.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal..... | 6 |
| I.2.1. Definición y características | 6 |
| I.2.2. Rizósfera e interacciones planta-microorganismos | 7 |
| I.2.3. Mecanismos de acción..... | 8 |
| I.2.3.1. Mecanismos de acción directos | 8 |
| I.2.3.2. Mecanismos de acción indirectos..... | 9 |
| I.2.4. Importancia en los cultivos agrícolas | 9 |
| I.3. Género <i>Bacillus</i> | 10 |
| I.3.1. Clasificación | 10 |
| I.3.2. Principales características..... | 11 |
| I.3.3. Ciclo de vida..... | 11 |
| I.3.4. Ecología..... | 12 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 14 |
| II.1. Hipótesis..... | 14 |
| II.2. Objetivos | 14 |
| II.2.1. Objetivo general | 14 |
| II.2.2. Objetivos específicos | 14 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| III.1. Medios de cultivo y soluciones..... | 15 |
| III.2. Cepas bacterianas experimentales | 16 |
| III.3. Inoculantes bacterianos experimentales..... | 17 |
| III.4. Ensayo en cámara de crecimiento..... | 19 |
| III.4.1. Tratamiento de semillas | 19 |
| III.4.2. Siembra del ensayo | 20 |
| III.4.3. Determinaciones agronómicas | 21 |

| | |
|--|-----------|
| III.5. Ensayo a campo | 22 |
| III.5.1. Tratamiento de semillas | 22 |
| III.5.2. Siembra del ensayo | 23 |
| III.5.2.1. Características edáficas..... | 24 |
| III.5.2.2. Condiciones meteorológicas..... | 27 |
| III.5.2.3. Aplicaciones..... | 28 |
| III.5.3. Determinaciones agronómicas..... | 30 |
| III.6. Análisis estadístico..... | 30 |
| IV. RESULTADOS..... | 30 |
| IV.1. Inoculantes bacterianos experimentales..... | 30 |
| IV.2. Ensayo en cámara de crecimiento..... | 31 |
| IV.2.1. Longitud de la planta..... | 31 |
| IV.2.2. Peso fresco de la planta..... | 33 |
| IV.2.3. Peso seco de la planta..... | 35 |
| IV.2.4. Número de nódulos en raíz..... | 37 |
| IV.2.5. Peso seco de nódulos en raíz..... | 39 |
| IV.3. Ensayo a campo..... | 40 |
| IV.3.1. Número de plantas por m ² | 43 |
| IV.3.2. Número de nódulos en raíz..... | 43 |
| IV.3.3. Peso seco de nódulos en raíz..... | 45 |
| IV.3.4. Rendimiento de granos..... | 46 |
| V. DISCUSIÓN | 48 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 53 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 54 |
| VIII. ANEXOS | 63 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Identificación y descripción de los inoculantes bacterianos experimentales utilizados en este estudio. | 18 |
| Tabla 2. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo en cámara de crecimiento..... | 20 |
| Tabla 3. Parámetros agronómicos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento en plantas de 35 días. | 21 |
| Tabla 4. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo a campo..... | 22 |
| Tabla 5. Datos analíticos correspondientes a la serie de suelo Pergamino (Pe)..... | 24 |
| Tabla 6. Características químicas del suelo. | 27 |
| Tabla 7. Precipitaciones (mm) y temperaturas (°C) medias mensuales registradas durante el ensayo a campo. | 27 |
| Tabla 8. Registro de aplicación de insecticidas realizadas durante el ensayo a campo. | 28 |
| Tabla 9. Registro de aplicación de herbicidas realizadas durante el ensayo a campo. .. | 29 |
| Tabla 10. Registro de aplicación de fungicidas realizadas durante el ensayo a campo. | 29 |
| Tabla 11. Parámetros agronómicos evaluados en el ensayo a campo. | 30 |
| Tabla 12. Parámetros de calidad de los inoculantes bacterianos experimentales. | 30 |
| Tabla 13. Comparación de parámetros agronómicos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento respecto al testigo absoluto y al testigo PGPR. | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estadios fenológicos externos del cultivo de soja..... | 5 |
| Figura 2. Zonas de producción de soja en Argentina, campaña 2017/18. | 6 |
| Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal en Bacterias Promotoras de Crecimiento..... | 8 |
| Figura 4. <i>Bacillus subtilis</i> crecido en el medio Luria Bertani y en proceso de esporulación. | 11 |
| Figura 5. Ciclo de reproducción del género <i>Bacillus</i> , modificado de Errington (2003). 12 | |
| Figura 6. Identificación y localización de los sitios de aislamiento de las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio..... | 17 |
| Figura 7. Diseño en bloques completos al azar utilizado para el ensayo a campo. | 24 |
| Figura 8. Longitud aérea de plantas (mm) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 32 |
| Figura 9. Longitud radical de plantas (mm) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 32 |
| Figura 10. Longitud total de plantas (mm) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 33 |
| Figura 11. Peso fresco aéreo de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 34 |
| Figura 12. Peso fresco radical de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 34 |
| Figura 13. Peso fresco total de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 35 |
| Figura 14. Peso seco aéreo de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 36 |
| Figura 15. Peso seco radical de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 36 |
| Figura 16. Peso seco total (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 37 |
| Figura 17. Número de nódulos por planta en raíz principal en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento..... | 38 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Número de nódulos por planta en raíz total en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento..... | 38 |
| Figura 19. Peso seco de nódulos por planta en raíz principal (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. | 39 |
| Figura 20. Peso seco de nódulos por planta en raíz total (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento.. | 40 |
| Figura 21. Número de plantas por m ² en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo..... | 43 |
| Figura 22. Número de nódulos por planta en raíz principal en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. | 44 |
| Figura 23. Número de nódulos por planta en raíz total en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo.. | 44 |
| Figura 24. Peso seco de nódulos por planta en raíz principal (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo.. | 45 |
| Figura 25. Peso seco de nódulos por planta en raíz total (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo.. | 46 |
| Figura 26. Rendimiento de granos (kg/ha) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. | 47 |

RESUMEN

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) es un cultivo de interés agrícola por su importancia económica a nivel mundial. El uso de agroquímicos para reducir las enfermedades, si bien permite abastecer la demanda manteniendo la productividad, genera problemas ambientales y sociales. Como estrategia para desplazar el uso de químicos agrícolas y mitigar estos impactos sin afectar la producción, se aplica la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR). Estas bacterias generan efectos benéficos en el desarrollo vegetal: potencian su crecimiento, mejoran la disponibilidad o la absorción de minerales, colaboran a la producción de hormonas, protegen a los cultivos contra posibles agentes patógenos y combaten la contaminación de los suelos.

En este contexto, el objetivo del trabajo fue evaluar en cámara de crecimiento, el efecto PGPR de 17 cepas del género *Bacillus*, mediante la inoculación de semillas para luego seleccionar las de mejor comportamiento en términos de promoción de crecimiento y evaluarlas en un ensayo a campo sobre el cultivo de soja. La preselección se realizó a partir de la evaluación de parámetros como longitud aérea y radical, peso fresco y seco de parte aérea y radical de plantas, número y peso de nódulos. Se seleccionaron las 9 cepas que tuvieron el mejor comportamiento respecto de un testigo PGPR (inoculado con *Bradyrhizobium japonicum*) y 3 cepas por su poder de biocontrol.

El ensayo de campo de las 12 cepas elegidas se llevó a cabo durante la campaña 2012-2013 en la Estación Experimental Agrícola (EEA) del INTA Pergamino, provincia de Buenos Aires. Se evaluaron variables agronómicas en estadios fenológicos determinados, como recuento inicial de plantas, número y peso de nódulos y rendimiento de granos.

Sin diferencias significativas, las cepas MAG2, TNO14 y PUR7 mostraron una tendencia positiva en el rendimiento de grano de 3,1 %, 3,5 % y 4,5 %, respectivamente, en relación al testigo absoluto.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La soja

I.1.1. Origen y generalidades

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) es una especie leguminosa nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China. En dicho país existen datos de la utilización de la soja con fines medicinales desde hace más de 3000 años. Fue introducida en América (Georgia, Estados Unidos) en el año 1765, llegando a Brasil en 1882, mientras que en Argentina las primeras plantaciones se realizaron en 1862 (Giorda, 1997). Actualmente Estados Unidos, Brasil, Argentina y China son los países que lideran la producción de dicha oleaginosa a nivel mundial (Soy Stats, 2018).

La soja es una planta anual cultivada comercialmente, especialmente para la producción de aceite y harina. La planta alcanza en general una altura de 90 a 120 cm, cuyas dos primeras hojas son simples y opuestas, y todas las demás alternas y trifoliadas. La escala desarrollada por Fehr y col. (1971), es la más utilizada para la descripción de los estadios fenológicos externos del cultivo de soja, donde se distinguen dos etapas principales (Figura 1):

a) Etapa vegetativa: se extiende a partir que las plantas se autoabastecen, con la expansión de la primera hoja trifoliada, hasta la floración. En esta etapa se construye la fábrica fotosintética que luego servirá para formar y alimentar las vainas y los granos. El período de crecimiento vegetativo dependerá principalmente del cultivar y de las condiciones de luz. Condiciones ambientales favorables de temperatura, disponibilidad de agua y fertilidad del suelo, contribuyen a una mayor tasa de crecimiento (Hermoso, 1974). En esta etapa pueden distinguirse diferentes estadios, los dos primeros se identifican con letras y el resto de los estadios se identifican con el número de nudos.

- *Etapa de emergencia (VE):* se observa el hipocótilo en forma de arco, empujando al epicótilo y a los cotiledones, haciéndolos emerger sobre la superficie del suelo.

- *Etapa cotiledonar (VC):* el hipocótilo se endereza, los cotiledones se despliegan totalmente y en el nudo inmediato superior los bordes de las hojas unifoliadas no se tocan.

- *Etapa del 1^{er} nudo (V1)*: el par de hojas opuestas unifoliadas están expandida totalmente y en el nudo inmediato superior se observa que los bordes de cada uno de los foliolos de la 1^{er} hoja trifoliada no se tocan.
- *Etapa del 2^{do} nudo (V2)*: la 1^{er} hoja trifoliada está totalmente desplegada, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los foliolos de la 2^{da} hoja trifoliada no se están tocando.
- *Etapa del 3^{er} nudo (V3)*: la 2^{da} hoja trifoliada está completamente desarrollada, y en la 3^{er} hoja trifoliada los bordes de cada uno de sus foliolos no se tocan.
- *Etapa del 5^{to} nudo (V5)*: la 4^{ta} hoja trifoliada está completamente desarrollada, y en la 5^{ta} hoja trifoliada los bordes de cada uno de sus foliolos no se tocan.
- *Etapa n nudo (Vn)*: la hoja trifoliada del nudo (n) está expandida totalmente, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los foliolos no se tocan.

b) Etapa reproductiva: hace referencia a la inducción floral, estímulo fisiológico que induce a la planta a producir órganos reproductivos. En esta etapa se distinguen los siguientes estadios:

- *Inicio de floración (R1)*: se observa una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal. La floración comienza en la parte media de la planta progresando hacia la parte superior e inferior.
- *Floración completa (R2)*: se observa una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas. Esta etapa indica el comienzo de un período de acumulación diaria y constante de materia seca y nutrientes que continuará hasta poco después de R6, asimismo el ritmo de fijación de los nódulos aumenta rápidamente.
- *Inicio de formación de vainas (R3)*: una vaina de 5 milímetros de largo en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, y con hojas totalmente desplegadas. La formación de vainas se inicia en los nudos inferiores, en este momento en la misma planta se encuentran vainas formándose, flores marchitas flores abiertas y pimpollos.
- *Vainas completamente desarrolladas (R4)*: una vaina de 2 cm en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas. Alguna de las vainas de los nudos inferiores del tallo principal han alcanzado su máximo tamaño, pero en general la mayoría lo logra en R5. En esta etapa comienza el periodo crítico del cultivo;

ya que ha finalizado la floración y cualquier situación de stress afectará el número final de vainas y de granos, provocando la reducción de rendimiento.

- *Inicio de formación de semillas (R5)*: una vaina, ubicada en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla de 3 mm de largo.

Entre las etapas R5 y R6 ocurren eventos importantes: a) la planta logra la máxima altura, número de nudos y área foliar; b) se incrementa el ritmo de fijación de nitrógeno, llegando al máximo, para luego disminuir marcadamente; c) las semillas inician un período rápido de acumulación de materia seca y nutrientes.

- *Semilla completamente desarrollada (R6)*: una vaina, en cualquiera de los cuatro nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla verde que llena la cavidad de dicha vaina, con hojas totalmente desplegadas. A partir de esta etapa, las hojas en los nudos inferiores comienzan a ponerse amarillas, envejecen y se caen.

- *Inicio de maduración (R7)*: una vaina normal en cualquier nudo del tallo principal ha alcanzado su color de madurez. La semilla alcanza la madurez fisiológica cuando ésta finaliza la acumulación de peso seco, y generalmente, junto con la vaina, van perdiendo su coloración verde. La semilla en este momento contiene el 60 % de humedad.

- *Maduración completa (R8)*: el 95 % de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez. Luego de R8, se necesitan cinco a diez días de tiempo seco (baja humedad relativa ambiente), para que las semillas reduzcan su humedad por debajo del 15 %.

La planta de soja requiere para un buen desarrollo de suelos de reacción ligeramente ácida (con un pH de 6-6,8) y húmedos, ya que la germinación depende directamente de la disponibilidad de agua. El contenido de humedad de la semilla (base peso seco) requerido para que germine es cercano al 50 %, siendo mayor al requerido por otros cultivos, como maíz que sólo requiere el 30 % (Hunter y Ericson, 1952). La temperatura óptima para la germinación de la semilla es de 34/36 °C, con un mínimo de 2/4 °C y el máximo de 42/ 44 °C (Inouye, 1953).

La soja, además de ser un alimento milenario, tiene un valor nutricional alto ya que posee 9 de los 10 aminoácidos esenciales, su valor biológico es similar al de la carne vacuna, aunque contiene mayor porcentaje total de proteínas y es más económica.

La importancia de la soja como producto destinado a cubrir necesidades alimenticias en todo el mundo genera el desafío de aumentar la producción del cultivo. Son muchos los aspectos que se investigan para desarrollar el cultivo con éxito, además de tratar de

superar los valores de rendimiento a través del tiempo. Los logros más importantes se han obtenido con el mejoramiento genético, la utilización de nuevas técnicas de manejo del cultivo, la explotación de nuevas zonas de producción y el mejoramiento de la calidad del producto (Gally, 2006).

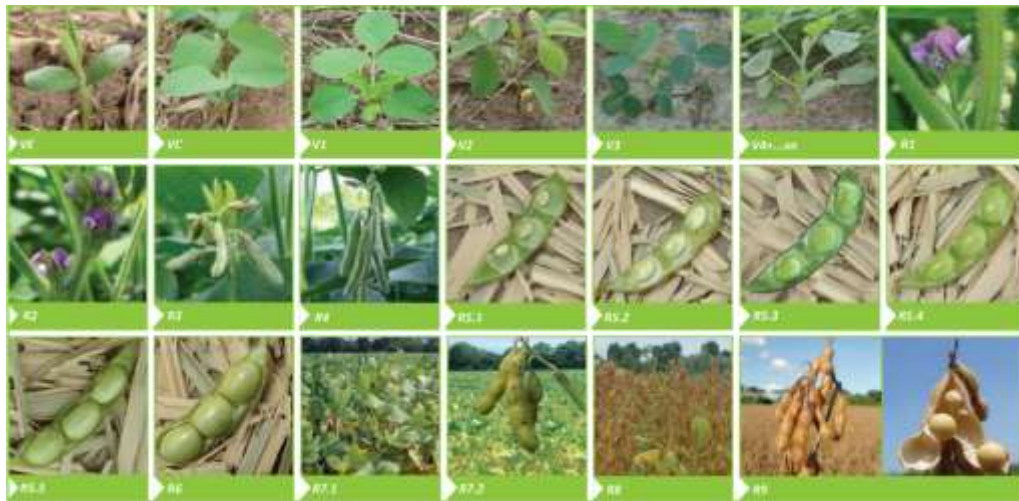


Figura 1. Estadios fenológicos externos del cultivo de soja.

1.1.2. Importancia de la soja en Argentina

El cultivo de la soja es uno de los más importantes en la Argentina luego de la rápida expansión que experimentó durante las décadas de 1970 y 1980. En nuestro país, la producción de soja durante la campaña 2017/2018 alcanzó las 35 millones de toneladas, con un área sembrada de 17,7 millones de hectáreas y un rendimiento promedio de 21,1 qq/ha (BCR, 2018). La soja no es solo el principal cultivo de Argentina, sino también su principal fuente de divisas por intermedio de la exportación. El complejo sojero argentino aporta más de 15.000 millones de dólares en concepto de exportaciones, siendo el sector más relevante de la economía argentina y representando el 26,6 % de las exportaciones agroindustriales (INDEC, 2017). El 85 % de la producción se exporta, ya sea como materia prima o como productos derivados del procesamiento principalmente, aceite, harinas o pellets (BCR, 2018).

Actualmente, el cultivo de soja ocupa en Argentina una amplia zona agroecológica concentrándose principalmente en la región pampeana, con aproximadamente el 94 % de la superficie sembrada y el 95 % de la producción total del país. En dicha región, las

provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires muestran mayor producción por área sembrada y magnitud de los rendimientos. La figura 2 muestra la dispersión geográfica del cultivo en función del área sembrada en la campaña 2017/18 (BCBA, 2018).

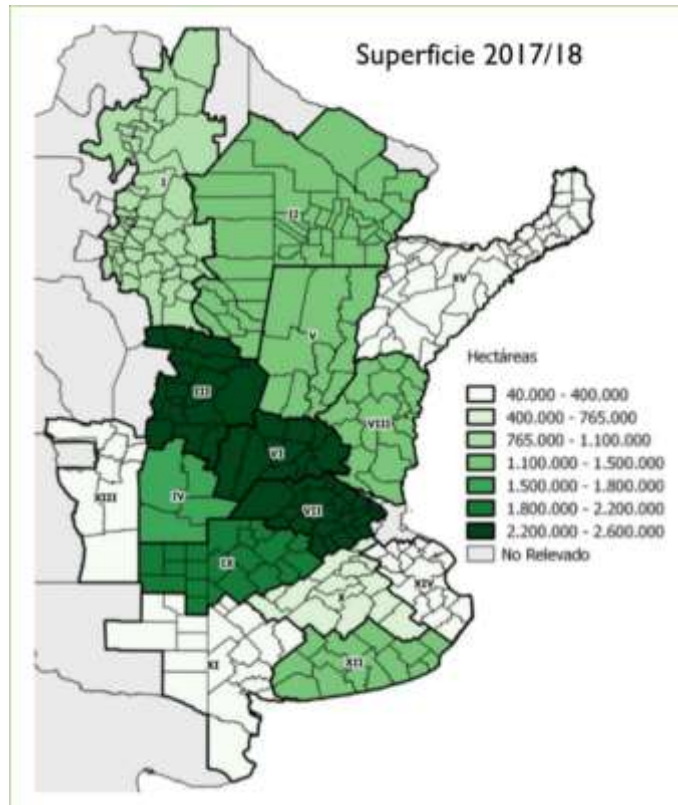


Figura 2. Zonas de producción de soja en Argentina, campaña 2017/18.

I.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

I.2.1. Definición y características

La rizósfera fue definida primeramente por Hitlner en 1904, describiéndola como una capa de tierra alrededor de la raíz incluido el rizoplasma y la superficie de estas. Etimológicamente RIZÓSFERA se deriva de la palabra griega «*rhiza*», que significa raíz, y la «*sphere*», que significa campo de influencia y se refiere al entorno de influencia de la raíz (Uren, 2007). La rizósfera es compleja y dinámica, habitada por comunidades microbianas que se componen de una microbiota (bacterias, hongos y algas); y una micro y mesofauna (protozoos, nemátodos, insectos y ácaros). La

distribución y composición de la microbiota está determinada por las características del medio ambiente, así como la ubicación geográfica y los constituyentes físico-químicos del suelo que se estén desarrollando (Stamford y col., 2005).

Un importante grupo de estas comunidades microbianas que ejerce efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas colonizando las raíces se definió por primera vez como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas o PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) por Joseph Kloepper y Milton Schroth en 1978 (González, 2000; Franco, 2008). Las PGPR son bacterias libres del suelo que pueden directa o indirectamente facilitar el enraizamiento (Mayak y col., 1999) y crecimiento de las plantas (Glick, 1995).

El número de especies de bacterias identificadas como PGPR ha aumentado recientemente como consecuencia de los numerosos estudios que abarcan una amplia gama de especies de plantas, avances en la taxonomía bacteriana y progreso en la comprensión de los diferentes mecanismos de acción de las PGPR (Ochoa y col., 2010). Los géneros bacterianos que se incluyen dentro de este grupo son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Gray y Smith, 2005).

I.2.2. Rizósfera e interacciones planta-microorganismos

Las interacciones planta-microorganismos suelen ocurrir principalmente en tres lugares de la planta: filósfera, endósfera y rizósfera. La filósfera se relaciona con las partes aéreas (tallos, hojas y flores o frutos) y la endósfera con el sistema de transporte. La rizósfera, es la región de suelo más rica en bacterias que todo el resto, y es un área de intensa actividad biológica y química influenciada por los compuestos exudados por la raíz, como ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y pequeños péptidos (Hinsinger y col., 2005; Suckla y col., 2011).

Las interacciones entre los microorganismos y la rizósfera pueden ser beneficiosas, perjudiciales o neutras para las plantas, y el efecto puede variar como consecuencia de las condiciones del suelo (Singh y Varaprasad, 2008).

I.2.3. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de las PGPR en el crecimiento de las plantas son variados y se pueden clasificar, según su acción, en dos tipos: directos e indirectos (Figura 3). La diferencia principal es que los mecanismos indirectos ocurren fuera de la planta, mientras que los directos ocurren dentro de ella y afectan directamente a su metabolismo a través de la modificación de la expresión de genes (Birch y Kamoun, 2000).

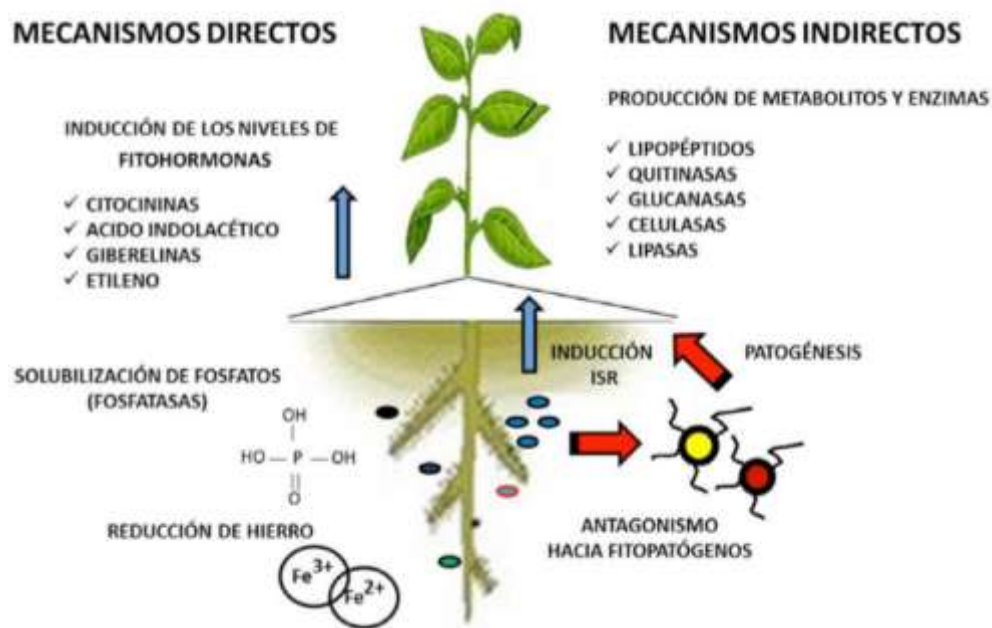


Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal en Bacterias Promotoras de Crecimiento (Rojas-Solís y col., 2013).

I.2.3.1. Mecanismos de acción directos

Los mecanismos de acción directos del crecimiento son aquellos donde la bacteria puede influir positivamente en el crecimiento de la planta a través de:

- Abastecer a las plantas de compuestos que estimulan su crecimiento por medio de la síntesis y excreción de sustancias fitoestimuladoras, que pueden incluir diversos tipos de fitohormonas como las auxinas ó citocininas, compuestos orgánicos volátiles, vitaminas y enzimas (Gómez-Luna y col., 2012).

- Facilitar la disponibilidad de diferentes elementos nutritivos, requeridos para su metabolismo y para mejorar su proceso de nutrición, mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo inorgánico, la mineralización de fosfato orgánico, la oxidación de sulfuros y la secreción de sideróforos (Gómez-Luna y col., 2012).
- Estimular en la planta mecanismos de resistencia localizada, activando la producción *in planta* de compuestos que refuerzan la inmunidad vegetal como ácido jasmónico, ácido salicílico y fitoalexinas (Ahmad y col., 2008).

En cada uno de estos casos, a diferencia de la promoción indirecta, no existen otros organismos involucrados más que la planta y las PGPR (Cárdenas, 2005).

I.2.3.2. Mecanismos de acción indirectos

Los métodos de acción indirectos son aquellos donde la bacteria disminuye o previene los efectos deletéreos producidos por microorganismos fitopatógenos. Las principales vías por las cuales evitan el establecimiento y desarrollo de estos microorganismos son: la competencia por nutrientes, la exclusión de nicho, la producción de metabolitos antifúngicos como lipopéptidos, sideróforos, enzimas líticas y toxinas, y la inducción a la respuesta sistémica vegetal (Orrieta-Fernández y Larrea-Vega, 2001; Wojciech y col., 2002; Infante y col., 2009).

I.2.4. Importancia en los cultivos agrícolas

En la actualidad la tierra arable y la capacidad de producción mundial de alimentos han comenzado a ser insuficientes para satisfacer la demanda de la creciente población. Se prevé que esta situación se acentuará con los años alcanzando índices de 0,16 hectáreas arables por persona en 2025, con una reducción de 36 % respecto al año 2000 (Borriss, 2011). Por esto, deben tomarse medidas para alcanzar una producción sostenible de alimentos para la población mundial, la cual se estima en 9,2 mil millones de personas para 2050 (FAO, 2009). El crecimiento de la demanda alimentaria ha activado el uso desmedido de agroquímicos para explotar la capacidad de producción del suelo, creando problemas como la acidificación de los suelos, polución de las aguas, contaminación del aire y potenciando enfermedades relacionadas con la presencia de nitritos y nitratos en las fuentes de alimento humano y animal (Prashar y Shah, 2016).

Dado el interés creciente de la agricultura ecológica y la reducción del uso de productos

agroquímicos, han surgido nuevas tecnologías para optimizar la implantación de cultivos agrícolas. El uso de productos biológicos, son una opción que permite incorporar al sistema productivo organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos.

Las PGPR podrían ser una alternativa para la solución de las problemáticas asociadas a los impactos negativos de agroquímicos en la agricultura, además de mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas. También pueden ampliar el espectro de suelos que se destinan para el cultivo, ya que mejoran la absorción de nutrientes en las plantas, aumentando la eficiencia en el uso de fertilizantes y abonos (Adesemoye y Kloepper, 2009), disminuyen el estrés y aumentan la producción de los cultivos sembrados en suelos pobres, degradados y/o contaminados (de-Bashan y col., 2012; Ahemad y Kibret, 2013).

Durante décadas, los estudios de promoción de crecimiento con PGPR se han centrado en el aislamiento y evaluación de características bioquímicas de los aislados, con el fin de tener bancos de cepas promisorias para el desarrollo de productos biofertilizantes o bioestimulantes (Bashan, 1998; Dinesh y col., 2015).

I.3. Género *Bacillus*

I.3.1. Clasificación

El género *Bacillus* fue reportado primeramente por Cohn (1872), quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor y lo nombró por primera vez *Bacillus subtilis* como la primera especie de este género (Aguilar y col., 2007).

Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino *Bacteria*; Filo *Firmicutes*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales* y Familia *Bacillaceae* (Maughan y van der Auwera, 2011). Actualmente, el género incluye más de 336 especies, las cuales por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos, siendo los más destacados: a) el grupo de *Bacillus cereus*, asociado a patogenicidad, que incluye a *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*; b) los bacilos ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, comprendido por *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*; c) el grupo de *Bacillus clausii* y *B. halodurans*; y d) el grupo que incluye a *Bacillus* spp. NRRLB-14911 y *B. coahuilensis* (Alcaraz y col., 2010;

LPSN, 2016).

I.3.2. Principales características

Entre las características del género *Bacillus* se destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 $^{\circ}\text{C}$), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Tejera-Hernández y col., 2011). Además, las especies de este género tienen la capacidad de producir endosporas como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés producidos por factores físicos perjudiciales, como la temperatura, la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (Calvo y Zúñiga, 2010; Layton y col., 2011; Tejera-Hernández y col., 2011) (Figura 4).

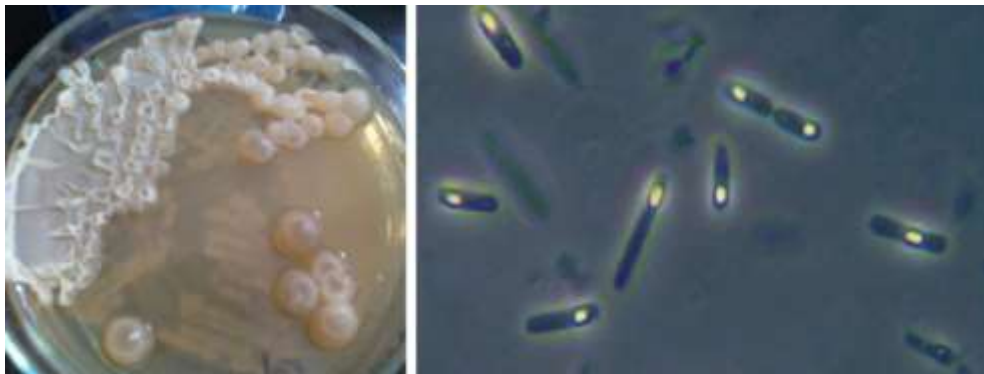


Figura 4. *Bacillus subtilis* crecido en el medio Luria Bertani y en proceso de esporulación.

I.3.3. Ciclo de vida

La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas, éstas se forman durante su segunda fase del ciclo de vida, el cual se encuentra conformado por una fase de crecimiento vegetativo y una fase de esporulación (Figura 5).

Durante la primera etapa, la bacteria crece de forma exponencial mediante fisión

binaria, ya que se encuentra en un medio con las condiciones favorables para su desarrollo. La segunda fase comienza como una estrategia de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés, así la célula vegetativa inicia la formación de la endospora, lo cual implica la división celular asimétrica, dando lugar a la formación de dos compartimentos, célula madre y la inmersión de una pre-espora. Posteriormente, la pre-espora es engullida, formando una célula dentro de la célula madre. Durante las etapas posteriores, la pre-espora es recubierta de capas protectoras (componentes protéicos, peptidoglicano y una pared que reside debajo de ésta, formada por células germinales), seguido de la deshidratación, y la maduración final de la pre-espora. Finalmente, la célula madre se lisa mediante muerte celular programada, liberando la endospora. La endospora puede permanecer viable en el ambiente hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Errigton, 2003; Tejera-Hernández y col., 2011; CALS, 2016).

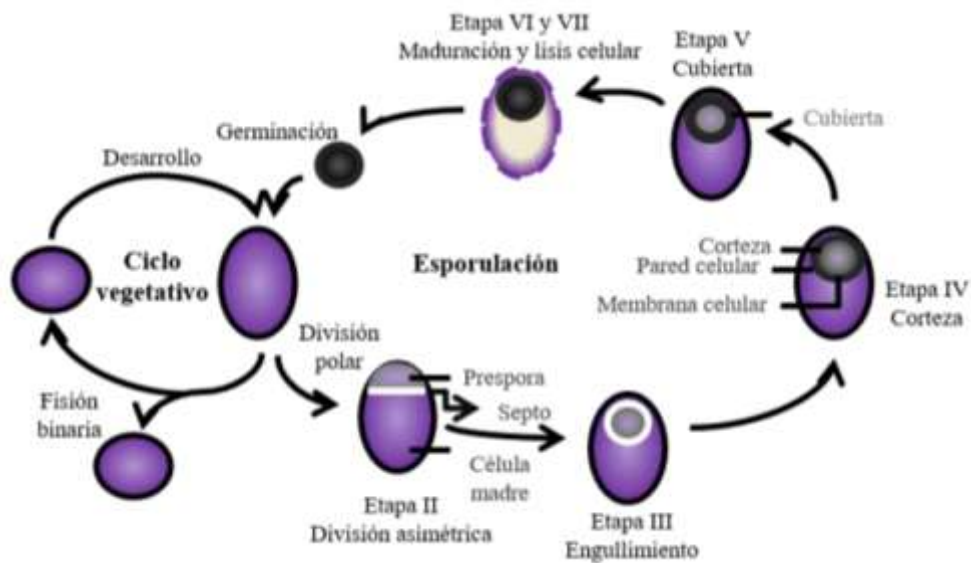


Figura 5. Ciclo de reproducción del género *Bacillus*, modificado de Errigton (2003).

I.3.4. Ecología

Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas (Tejera-Hernández y col.,

2011).

El suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas (McSpadden, 2004).

Bajo un enfoque dirigido a la sustentabilidad agrícola se han realizado escasas investigaciones con el objetivo de comprender la diversidad y dinámica poblacional específica de *Bacillus* en suelos rizosféricos, donde las comunidades bacterianas que habitan la rizósfera responden particularmente a la fertilidad del suelo y los exudados de las raíces de las plantas, los cuales varían con la fenología y genotipo vegetal (de Souza y col., 2015), por lo que bacterias que interaccionen con las plantas y presenten capacidades asociativas, endofíticas o procesos simbióticos para adaptarse a las condiciones rizosféricas son reconocidas como potenciales inoculantes microbianos. Rudrappa y col. (2008) reportaron que la producción de biopelículas de *B. subtilis* FB17 es un mecanismo de colonización rizosférica, esto debido a su atracción por el ácido L-málico secretado por las raíces de *Arabidopsis thaliana* e inducido por el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Por otra parte, otras investigaciones señalan que diversas especies de *Bacillus* pueden ser residentes de tejidos internos en plantas de uva (*Vitis vinífera*) y algodón (*Gossypium barbadense* L.) (Kumar y col., 2011; López-Fernández y col., 2016; Selim y col., 2016) Estas características tienen un papel determinante en el desarrollo, la colonización y la función de *Bacillus*, estimulando su asociación con la planta hospedera, cuyas características de control biológico son potenciadas.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis

Las bacterias del género *Bacillus* producen sustancias que promocionan el crecimiento y el desarrollo de la planta y aumentan el rendimiento de grano en el cultivo de soja.

II.2. Objetivos

II.2.1. Objetivo general

Caracterizar el efecto PGPR de distintas cepas del género *Bacillus* en el cultivo de soja.

II.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto PGPR de distintas cepas del género *Bacillus* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de soja crecidas en condiciones controladas.
- Evaluar el efecto PGPR de distintas cepas del género *Bacillus*, seleccionadas en condiciones controladas, sobre el crecimiento y desarrollo de plantas, y rendimiento de granos de soja crecidas en condiciones a campo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Medios de cultivo y soluciones

A continuación, se describe la composición de los medios de cultivos y soluciones utilizados en el presente trabajo.

- **Medio de cultivo Luria-Bertani (LB):** peptona de caseína 10 g; cloruro de sodio (NaCl) 5 g; extracto de levadura 5 g; agar 15 g; agua desmineralizada 1000 ml. pH: 7,2 +/- 0,2.
- **Medio de cultivo Agar Tripteína Soja (TSA):** peptona de caseína 12 g; peptona de soja 3 g; cloruro de sodio (NaCl) 5 g; fosfato dipotásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{H}$) 2,5 g; dextrosa 2,5 g; agar 15 g; agua desmineralizada 1000 ml. pH: 7,3 +/- 0,2.
- **Medio de cultivo Sporulation Medium (SM):** peptona de carne 5 g; extracto de carnes 3 g; cloruro de potasio (KCl) 1 g; sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g; solución de cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1 ml; solución de cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 1 ml; solución de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1 ml; agua desmineralizada 1000 ml. pH: 6,8 +/- 0,2.
- **Solución de cloruro de manganeso:** cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 198 g; agua desmineralizada 1000 ml.
- **Solución de cloruro de hierro:** cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 270,3 g; agua desmineralizada 1000 ml.
- **Solución de cloruro de calcio:** cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 111 g; agua desmineralizada 1000 ml.

Para la preparación de cada uno de los medios de cultivo, se pesaron las drogas en un vaso precipitado y luego se añadieron a un pírex conteniendo agua desmineralizada con

el volumen correspondiente. Las soluciones se agitaron en un agitador magnético, de manera de facilitar la correcta disolución de cada componente del medio de cultivo.

Para los medios de cultivo agarizados, LB y TSA, las soluciones homogeneizadas se fraccionaron, a razón de 350 ml, en frascos de borosilicato con capacidad de 500 ml, los cuales contenían la cantidad de agar necesario para ese volumen. En el caso del medio SM, la solución se fraccionó de a 100 ml, en Erlenmeyer de 500 ml.

Los pH de todos los medios de cultivo se ajustaron con una solución ácida de cloruro de potasio 1M ó una básica de hidróxido de sodio 1M, según necesidad, y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Transcurrida la esterilización, los medios agarizados se fraccionaron en placas de Petri, luego que la temperatura del medio descendió a 65 °C, y se incubaron en estufa de cultivo a 30 °C durante 48 h para permitir su secado y corroborar la ausencia de contaminantes.

Las soluciones de sales se prepararon en Erlenmeyer y luego se esterilizaron por filtración con filtros bacteriológicos de tamaño de poro de 0,2 µm, en frascos estériles con cierre hermético.

III.2. Cepas bacterianas experimentales

En este estudio, se utilizaron un total de 17 cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, aisladas de suelo rizosférico de distintas localidades del país (Figura 6), y depositadas en el banco de cepas de la empresa Rizobacter S.A.

Todas las cepas utilizadas provenían de crioviales madres conservados en una suspensión de glicerol al 20 % y a -70 °C, a partir de los cuales los aislamientos fueron recuperados, mediante estrías por agotamiento, en placas de Petri que contenían el medio de cultivo TSA, para confirmar su pureza y activar su metabolismo.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron seleccionadas por su capacidad antagónica de biocontrol frente a los patógenos más importantes de las semillas de soja: *Fusarium* spp. *Phomopsis* spp. y *Cercospora* spp. (datos no mostrados) a fin de evaluar el efecto de promoción de crecimiento sobre el cultivo de soja.

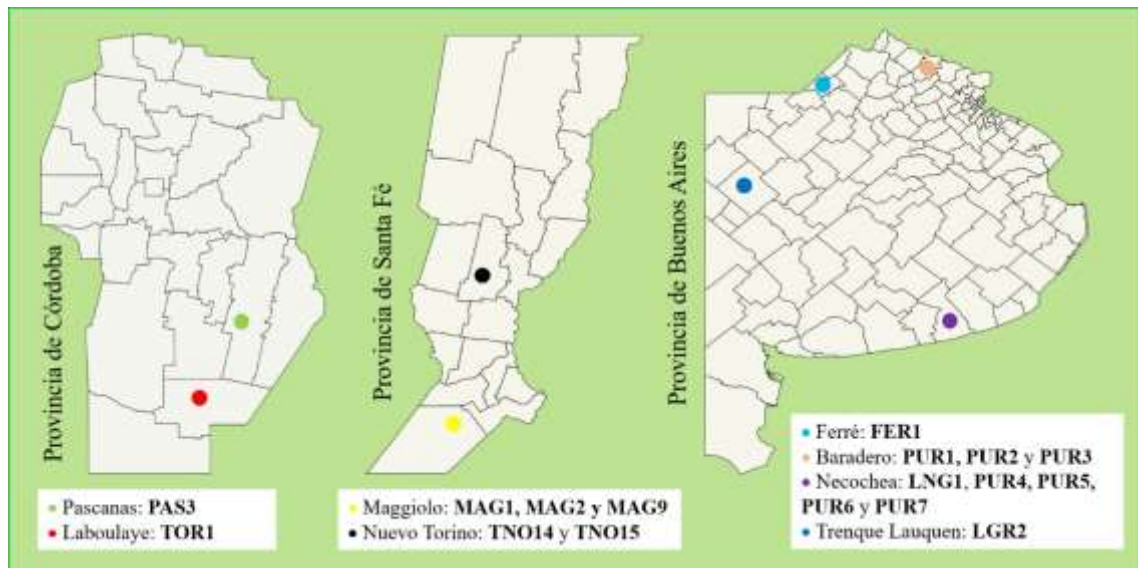


Figura 6. Identificación y localización de los sitios de aislamiento de las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio.

III.3. Inoculantes bacterianos experimentales

Para la producción de los inoculantes experimentales bacterianos, se utilizaron las 17 cepas de *Bacillus* descritas anteriormente (Tabla 1). Se tomaron dos ansadas de las colonias aisladas, crecidas en el medio TSA, y se inocularon en Erlenmeyer conteniendo el medio SM, medio óptimo para la esporulación bacteriana. Los caldos inoculados se incubaron a 30 °C durante 48 h., en agitación constante a 200 rpm.

Transcurrida la incubación, se tomaron alícuotas de 8 ml de cada cultivo en tubos de ensayos estériles, y se realizó el control de calidad de los mismos. Los controles consistieron en: recuento de Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml), tanto de células vegetativas como de esporas, pureza y pH.

Para el recuento de UFC de las células vegetativas se realizó la técnica de siembra en superficie. Para ello, mediante pipeta automática y tip estéril, se transfirió 1 ml del caldo a un tubo con 9 ml de agua desmineralizada estéril, y se mezcló mecánicamente mediante vórtex durante 10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} . Luego la operación se repitió, a partir de la última dilución, y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} .

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 0,1 ml (100 μ l) de las últimas dos diluciones, y se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo LB. El inóculo sembrado se extendió cuidadosamente en forma uniforme sobre la superficie del agar,

mediante el uso de una espátula de Drygalsky, previamente flameada con alcohol. Las placas sembradas se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos hasta que el inóculo se absorbió en el agar y luego se incubaron, de forma invertida, a 30 °C durante 48 h en estufa de cultivo.

Para el recuento de esporas, se procedió de la misma manera que lo descrito para células vegetativas, pero antes de la siembra en el medio agarizado, se sometieron los tubos de las diluciones sembradas a un tratamiento con calor a 80 °C durante 20 minutos.

Transcurrida la incubación, se realizó el conteo de colonias, y se calculó el número de UFC/ml y el porcentaje de Eficiencia de Esporulación (EE), en función de la dilución usada para el conteo, según la siguiente fórmula: % EE= (N° esporas x 100)/N° viables. Para el control de las purezas de los caldos, se realizaron estrías por agotamiento en placas con los medios TSA y LB, incubadas a 30 °C durante 48 h, y examinadas en lupa estereoscópica post incubación. Finalmente, se midió el pH de los cultivos.

Los caldos se fraccionaron a razón de 100 ml en vejigas estériles con capacidad de 500 ml, y se almacenaron a 16 °C hasta su uso.

Tabla 1. Identificación y descripción de los inoculantes bacterianos experimentales utilizados en este estudio.

| Identificación de los inoculantes experimentales | Descripción |
|--|---|
| IBE-1 | Inoculante experimental a base de la cepa PAS3 |
| IBE-2 | Inoculante experimental a base de la cepa TOR1 |
| IBE-3 | Inoculante experimental a base de la cepa MAG1 |
| IBE-4 | Inoculante experimental a base de la cepa MAG2 |
| IBE-5 | Inoculante experimental a base de la cepa MAG9 |
| IBE-6 | Inoculante experimental a base de la cepa TNO14 |
| IBE-7 | Inoculante experimental a base de la cepa TNO15 |
| IBE-8 | Inoculante experimental a base de la cepa FER1 |
| IBE-9 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR1 |
| IBE-10 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR2 |

| | |
|---------------|--|
| IBE-11 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR3 |
| IBE-12 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR4 |
| IBE-13 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR5 |
| IBE-14 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR6 |
| IBE-15 | Inoculante experimental a base de la cepa PUR7 |
| IBE-16 | Inoculante experimental a base de la cepa LNG1 |
| IBE-17 | Inoculante experimental a base de la cepa LGR2 |

III.4. Ensayo en cámara de crecimiento

III.4.1. Tratamiento de semillas

En el ensayo en cámara de crecimiento se utilizó la variedad de semilla de soja BioSoja 4.60.

Se pesaron 200 g de semillas en bolsas de polietileno limpias y rotuladas, a las cuales se les aplicaron los productos, de manera secuencial, según los tratamientos descritos en la Tabla 2. Se realizaron 17 tratamientos con los inoculantes experimentales (T03-T19), uno como testigo absoluto con semilla sin tratar (T01) y otro como testigo PGPR con semilla tratada únicamente con un inoculante comercial Signum a base de la cepa *Bradyrhizobium japonicum* y el protector bacteriano comercial Premax (T02).

Para la preparación de las mezclas de los productos, se tomaron vasos plásticos descartables, a los cuales se les añadió primero el protector bacteriano en una dosis de 1 ml/kg de semilla y luego los inoculantes experimentales bacterianos en una dosis de 5 ml/kg de semilla, tomados con una jeringa estéril a partir de las vejigas preparadas. Las mezclas se agitaron para permitir su homogenización.

Se tomaron alícuotas de 1,2 ml de las mezclas, mediante el uso de una jeringa graduada estéril, y se esparcieron sobre las semillas previamente pesadas en las bolsas, según cada tratamiento. Las bolsas se cerraron, dejando aire suficiente dentro de la misma, para permitir una correcta agitación, y se agitaron manualmente durante 2 minutos, de manera de asegurar que todas las semillas tomen contacto con el producto. Posteriormente las semillas tratadas se dejaron reposar durante 10 minutos con las bolsas abiertas, en un ambiente fresco.

Cabe aclarar que, previo al tratamiento con los inoculantes bacterianos experimentales, todas las semillas fueron tratadas con el inoculante Signum (Lote: E030318, UFC/ml: 1,70E+10) en una dosis de 3 ml/kg de semilla.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo en cámara de crecimiento.

| N° Tratamiento | Descripción |
|----------------|--|
| T01 | Testigo absoluto- Sin tratar |
| T02 | Testigo PGPR- Inoculante Signum + Premax |
| T03 | IBE-1 (PAS3) + Inoculante Signum + Premax |
| T04 | IBE-2 (TOR1) + Inoculante Signum + Premax |
| T05 | IBE-3 (MAG1) + Inoculante Signum + Premax |
| T06 | IBE-4 (MAG2) + Inoculante Signum + Premax |
| T07 | IBE-6 (TNO14) + Inoculante Signum + Premax |
| T08 | IBE-7 (TNO15) + Inoculante Signum + Premax |
| T09 | IBE-9 (PUR1) + Inoculante Signum + Premax |
| T10 | IBE-12 (PUR4) + Inoculante Signum + Premax |
| T11 | IBE-14 (PUR6) + Inoculante Signum + Premax |
| T12 | IBE-15 (PUR7) + Inoculante Signum + Premax |
| T13 | IBE-8 (FER1) + Inoculante Signum + Premax |
| T14 | IBE-16 (LNG1) + Inoculante Signum + Premax |
| T15 | IBE-5 (MAG9) + Inoculante Signum + Premax |
| T16 | IBE-10 (PUR2) + Inoculante Signum + Premax |
| T17 | IBE-11 (PUR3) + Inoculante Signum + Premax |
| T18 | IBE-13 (PUR5) + Inoculante Signum + Premax |
| T19 | IBE-17 (LGR2) + Inoculante Signum + Premax |

III.4.2. Siembra del ensayo

La siembra del ensayo se efectuó el 22 de marzo de 2012, en la cámara de crecimiento de la empresa Rizobacter S.A., situada en la ciudad de Pergamino.

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con 7 repeticiones por tratamiento, descritos en la Tabla 2.

Se sembraron 2 semillas por repetición en vasos plásticos descartables, los cuales contenían como soporte suelo Alpachiri hasta un 85 % de su capacidad. Las macetas se incubaron en condiciones controladas de temperatura (25 °C) durante 35 días. Emergidas ambas plántulas, se realizó el raleo de una de ellas, dejando una planta por maceta.

Las plantas se regaron con agua de osmosis filtrada, mediante un sistema de riego por goteo, a intervalos de 72 h.

III.4.3. Determinaciones agronómicas

La evaluación de los caracteres agronómicos descritos en la Tabla 3, se realizó transcurrido el tiempo de incubación.

Las plantas se descalzaron cuidadosamente de los vasos y se lavaron con agua de osmosis, de manera de eliminar el sustrato adherido. Posteriormente se midió la longitud aérea y radical (P1-A y P2-A) y se determinó el número de nódulos por planta en raíz principal (P4-A). Los nódulos fueron segregados de las raíces para la evaluación del peso seco de los mismos (P9-A). Finalmente, las plantas se fraccionaron en raíces y parte aérea, y se registraron los pesos frescos (P6-A y P7-A) y secos (P11-A y P12-A) de cada órgano por separado.

La determinación de los pesos secos, se realizó en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 48 h hasta peso constante.

Tabla 3. Parámetros agronómicos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento en plantas a los 35 días desde la siembra

| N° Parámetro | Descripción |
|--------------|--|
| P1-A | Longitud aérea (mm) |
| P2-A | Longitud radical (mm) |
| P3-A | Longitud total (mm) |
| P4-A | Número de nódulos/planta en raíz principal |
| P5-A | Número de nódulos/planta en raíz total |

| | |
|--------------|--|
| P6-A | Peso fresco aéreo (g) |
| P7-A | Peso fresco radical (g) |
| P8-A | Peso fresco total (g) |
| P9-A | Peso seco de nódulos/planta en raíz principal (mg) |
| P10-A | Peso seco de nódulos/planta en raíz total (mg) |
| P11-A | Peso seco aéreo (g) |
| P12-A | Peso seco radical (g) |
| P13-A | Peso seco total (g) |

III.5. Ensayo a campo

III.5.1. Tratamiento de semillas

En el ensayo a campo se utilizó la variedad de semilla de soja Nidera 4613 de ciclo IV largo ya que no se contaba con disponibilidad suficiente de la semilla utilizada en el ensayo en cámara de crecimiento, pero ambas variedades presentaban buena calidad.

Se pesaron 1 kg de semillas en bolsas de polietileno limpias y rotuladas, a las cuales se les aplicaron los productos, de manera secuencial, según los tratamientos descritos en la Tabla 4. Se realizaron 12 tratamientos con los inoculantes experimentales (T03-T14), uno como testigo absoluto con semilla sin tratar (T01) y otro como testigo PGPR con semilla tratada únicamente con un inoculante comercial Signum a base de la cepa *B. japonicum* y el protector bacteriano comercial Premax (T02).

Para la preparación de las mezclas de los productos y el tratamiento de las semillas, se procedió de igual manera que en el ensayo en cámara de crecimiento.

Tabla 4. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo a campo.

| N° Tratamiento | Descripción |
|-----------------------|---|
| T01 | Testigo absoluto- Sin tratar |
| T02 | Testigo PGPR- Inoculante Signum + Premax |
| T03 | IBE-1 (PAS3) + Inoculante Signum + Premax |
| T04 | IBE-2 (TOR1) + Inoculante Signum + Premax |
| T05 | IBE-3 (MAG1) + Inoculante Signum + Premax |

| | |
|------------|--|
| T06 | IBE-4 (MAG2) + Inoculante Signum + Premax |
| T07 | IBE-6 (TNO14) + Inoculante Signum + Premax |
| T08 | IBE-7 (TNO15) + Inoculante Signum + Premax |
| T09 | IBE-9 (PUR1) + Inoculante Signum + Premax |
| T10 | IBE-12 (PUR4) + Inoculante Signum + Premax |
| T11 | IBE-14 (PUR6) + Inoculante Signum + Premax |
| T12 | IBE-15 (PUR7) + Inoculante Signum + Premax |
| T13 | IBE-8 (FER1) + Inoculante Signum + Premax |
| T14 | IBE-16 (LNG1) + Inoculante Signum + Premax |

III.5.2. Siembra del ensayo

La siembra del ensayo se realizó el día 27 de noviembre de 2012, en el campo de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino, ubicado en la ciudad de Pergamino, a 33° 56' de Latitud Sur y 60° 33' de Longitud Oeste, con una altura de 65,5 m sobre el nivel del mar.

El lote elegido para la realización del ensayo tuvo soja como cultivo antecesor, y al momento de la siembra se encontraba libre de malezas, producto del barbecho químico realizado previo a la siembra.

Se realizó un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA), con 3 repeticiones por tratamiento, descritos en la Tabla 4. La Figura 7 muestra el DBCA utilizado en el presente ensayo.

Para la siembra se utilizó una sembradora neumática marca Baumer, y se realizó un sistema de siembra en parcelas de 6 metros de largo por 4 surcos, con una distancia de 0,52 m entre sí, y una densidad de siembra con el objetivo de obtener 25 plantas/metro cuadrado.

Al momento de la siembra se realizó una fertilización de base de superfosfato simple (SSP), en una dosis de 65 kg/ha, aplicado con una sembradora al voleo.

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|----|----|----|----|----|---|---|----|---|----|----|
| 10 | 5 | 8 | 12 | 1 | 6 | 14 | 2 | 9 | 4 | 11 | 3 | 7 | 13 |
| 2 | 9 | 13 | 14 | 11 | 5 | 4 | 8 | 7 | 3 | 12 | 6 | 10 | 1 |
| 7 | 3 | 6 | 2 | 8 | 12 | 1 | 10 | 5 | 9 | 13 | 4 | 14 | 11 |

Frente del lote

Figura 7. Diseño en bloques completos al azar utilizado para el ensayo a campo. Los números indican el tratamiento por parcela dentro del bloque.

III.5.2.1. Características edáficas

El suelo donde se realizó el ensayo corresponde a la serie Pergamino, con características de suelo oscuro, muy profundo y bien drenado, formado sobre sedimentos loésicos franco limosos gruesos. Se encuentra localizado en un paisaje de lomas y pendientes con gradiente de 0 a 1 % en la Región Pampa Ondulada y cuya clasificación taxonómica es: Argiudol Típico, Fina, illítica, térmica (USDA-Soil Taxonomy, 2006). La Tabla 5 describe los parámetros analíticos de dicha serie de suelo (INTA, 1966).

Tabla 5. Datos analíticos correspondientes a la serie de suelo Pergamino (Pe).

| Horizontes | Ap1 | Ap2 | BAt | Bt1 | Bt2 | BC | Ck |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|
| Profundidad (cm) | 0-13 | 13-25 | 25-34 | 34-75 | 75-95 | 95-160 | 160-200 |
| Materia orgánica (%) | 2,91 | 2,55 | 1,50 | 1,10 | 0,60 | 0,41 | 0,26 |
| Carbono total (%) | 1,69 | 1,48 | 0,87 | 0,64 | 0,35 | 0,24 | 0,15 |
| Nitrógeno (%) | 0,158 | 0,143 | 0,106 | 0,090 | 0,061 | 0,039 | 0,024 |
| Relación C/N | 11 | 10 | 8 | 7 | NA | NA | NA |
| Arcilla < 2 μ (%) | 22,7 | 22,8 | 30,3 | 43,5 | 30,2 | 17,0 | 7,0 |
| Limo 2-20 μ (%) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Limo 2-50 μ (%) | 64,8 | 65,1 | 56,8 | 47,5 | 56,4 | 65,5 | 69,9 |
| AMF 50-75 μ (%) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| AMF 75-100 μ (%) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| AMF 50-100 μ (%) | 11,3 | 11,7 | 11,9 | 8,6 | 12,6 | 14,3 | 15,7 |
| AF 100-250 μ (%) | 1,2 | 0,4 | 1,0 | 0,4 | 0,8 | 3,2 | 7,4 |
| AM 250-500 μ (%) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| AG 500-1000 μ (%) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| AMG 1-2 mm (%) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Calcáreo (%) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Eq. humedad (%) | 25,5 | 24,7 | 27,3 | 37,7 | 31,3 | 27,6 | 27,3 |
| Re.pasta.Ohms | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Cond. mmhos/cm | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| pH en pasta | 5,5 | 5,6 | 5,7 | 5,7 | 6,0 | 6,0 | 6,8 |
| pH H₂O 1:2,5 | 5,9 | 6,1 | 6,2 | 6,3 | 6,5 | 6,4 | 7,3 |
| pH KCl 1:2,5 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Cationes de cambio | | | | | | | |
| Ca⁺⁺ m.eq./100g | 12,5 | 12,9 | 11,8 | 19,3 | 16,2 | 14,9 | 18,1 |
| Mg⁺⁺ m.eq./100g | 3,1 | 3,3 | 3,5 | 5,8 | 6,3 | 5,3 | 3,9 |
| Na⁺ m.eq./100g | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 |
| K m.eq./100g | 1,6 | 1,2 | 1,2 | 2,4 | 2,2 | 2,2 | 2,0 |
| H m.eq./100g | 7,8 | 6,8 | 5,8 | 6,0 | 5,4 | 4,8 | 3,5 |
| Na (% de T) | 2,8 | 2,4 | 3,2 | 1,9 | 2,2 | 2,0 | 2,3 |
| V.S m.eq./100g | 17,8 | 17,9 | 17,1 | 28,1 | 25,3 | 22,9 | 24,6 |
| CIC m.eq./100g | 21,1 | 20,3 | 18,6 | 32,0 | 27,2 | 24,1 | 25,3 |
| Sat. con bases (%) | 84 | 88 | 92 | 88 | 93 | 95 | 97 |

NA: no analizado

El análisis de suelo al momento de la siembra mostró un suelo típico de la zona, con agricultura continua, basada en la siembra directa y escasas rotaciones de cultivo. El mismo presentó valores medios a bajos de fósforo, levemente por debajo del umbral de respuesta que indican que por debajo de 16 ppm el cultivo respondería positivamente a la fertilización (Ferraris, 2008).

El valor de pH resultó ligeramente ácido, acorde a lo relevado en el partido de Pergamino por Sainz-Rozas y col. (2012).

El contenido de materia orgánica, producto de las escasas rotaciones y prácticas no conservacionistas, presenta valores bajos pero comunes a la zona. Este indicador suele usarse como imagen del estado de degradación de los suelos, ya que valores inferiores a 2,7 % podrían influir negativamente en el rendimiento de los cultivos (Alvarez y Steinbach, 2006).

La Tabla 6 muestra los resultados de las características químicas del suelo.

Tabla 6. Características químicas del suelo.

| Profundidad | pH | Nitratos N-NO ₃ (ppm) | Fósforo ¹ P (ppm) | Materia orgánica (%) | Nitrógeno total (%) | Carbono (%) |
|-------------|------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| 0- 20 cm | 5,50 | 17,00 | 14,20 | 2,60 | 0,13 | 1,50 |
| 20- 40 cm | 5,70 | 15,30 | 10,70 | 1,90 | 0,094 | 1,08 |

¹Método Bray I

III.5.2.2. Condiciones meteorológicas

En base a los datos proporcionados por el Observatorio Agrometeorológico INTA Pergamino (Tabla 7), respecto al registro de precipitaciones y temperaturas medias mensuales, se pudo observar que el año agrícola se presentó como «normal», sin limitaciones hídricas y térmicas para el desarrollo del cultivo de soja.

El cultivo inició con un perfil recargado producto de las precipitaciones primaverales. El resto de la temporada se comportó como un año normal, con escasas precipitaciones durante el mes de enero, sometiendo al cultivo a estreses temporales y con un fin de ciclo lluvioso durante los meses de febrero y marzo. Este clima favoreció el desarrollo de enfermedades foliares que ameritaron una aplicación de fungicidas para su control.

Tabla 7. Precipitaciones (mm) y temperaturas (°C) medias mensuales registradas durante el ensayo a campo.

| Fecha | Precipitaciones (mm) | Temperaturas (°C) |
|------------------------|----------------------|-------------------|
| Julio 2012 | 9,0 | 5,8 |
| Agosto 2012 | 230,0 | 10,9 |
| Septiembre 2012 | 79,2 | 14,1 |
| Octubre 2012 | 300,5 | 16,8 |
| Noviembre 2012 | 135,9 | 20,6 |
| Diciembre 2012 | 88,6 | 22,1 |
| Enero 2013 | 28,0 | 23,1 |
| Febrero 2013 | 148,0 | 21,0 |

| | | |
|-------------------|-------|------|
| Marzo 2013 | 131,0 | 16,9 |
| Abril 2013 | 58,0 | 16,1 |
| Mayo 2013 | 53,0 | 11,9 |
| Junio 2013 | 7,0 | 9,9 |

III.5.2.3. Aplicaciones

Las aplicaciones de insecticidas, herbicidas y fungicidas realizadas a lo largo del ensayo se encuentran detalladas en las Tablas 8, 9 y 10 respectivamente.

Las aplicaciones se realizaron dependiendo del estadio fenológico del cultivo, según la escala desarrollada por Fehr y col. (1971).

Tabla 8. Registro de aplicación de insecticidas realizadas durante el ensayo a campo.

| Producto y Dosis | Estadio fenológico | Forma de aplicación/ Observaciones |
|--|---------------------------|---|
| Lambdacialotrina (100 ml/ha) + Clorpirifos 48 % (700 ml/ha) + Rizospray Extremo (250 ml/ha) | V4 | Mochila |
| Lambdacialotrina (200 ml/ha) + Clorpirifos 48 % (500 ml/ha) + Rizospray Extremo (300 ml/ha) | V5 | Pulverizadora. Aplicación compartida con herbicida. |
| Lambdacialotrina (100 ml/ha) + Clorpirifos 48 % (700 ml/ha) + Rizospray Extremo (200 ml/ha) | R2 | Mochila |
| Lambdacialotrina (200 ml/ha) + Clorpirifos 48 % (500 ml/ha) | R5 | Mochila |
| Lambdacialotrina (200 ml/ha) + Clorpirifos 48 % (500 ml/ha) + Rizospray Extremo (200 ml/ha) | R5 | Mochila |

Tabla 9. Registro de aplicación de herbicidas realizadas durante el ensayo a campo.

| Producto y Dosis | Estadio fenológico | Forma de aplicación |
|--|--------------------|--|
| Glifosato 64 % (2 L/ha) + Silwet (0,50 ml/L) | Barbecho químico | Mochila |
| Glifosato (3 L/ha) + Rizo oil (7 ml/L) + EcoRizospray (1 ml/L) | Barbecho | Pulverizadora |
| Glifosato (3,5 L/ha) + Rizo oil (1 L/ha) | Pre-Siembra | Pulverizadora |
| Glifosato 60 % (1,5 L/ha) + Rizospray Extremo (300 ml/ha) | V2 | Mochila |
| Glifosato 64 % (3 L/ha) + Rizospray Extremo (300 ml/ha) | V5 | Pulverizadora (Aplicación compartida con insecticida) |
| Glifosato 64 % (3 L/ha) + Rizospray Extremo (200 ml/ha) | R2 | Mochila (Aplicado en caminos y parcelas) |
| Glifosato 64 % (3 L/ha) + Rizospray Extremo (200 ml/ha) | R6 | Mochila. Aplicado en caminos y parcelas. |

Tabla 10. Registro de aplicación de fungicidas realizadas durante el ensayo a campo.

| Producto y Dosis | Estadio fenológico | Forma de aplicación |
|---|--------------------|---------------------|
| Amistar Xtra (250 ml/ha) + Rizospray Extremo (2 ml/L) | Fines R2 | Mochila |

III.5.3. Determinaciones agronómicas

La evaluación de los caracteres agronómicos descritos en la Tabla 11, se realizó en tres tiempos del cultivo. El número de plantas por m² (P1-B) se evaluó en el estadio V5, mientras que el número de nódulos por planta en raíz (P2-B y P3-B) y el peso seco de los mismos (P4-B y P5-B) se evaluaron en el estadio R3. Finalmente, se determinó el rendimiento de granos (P6-B) a cosecha.

Tabla 11. Parámetros agronómicos evaluados en el ensayo a campo.

| N° Parámetro | Descripción |
|--------------|--|
| P1-B | Número de plantas/m ² |
| P2-B | Número de nódulos/planta en raíz principal |
| P3-B | Número de nódulos/planta en raíz total |
| P4-B | Peso seco de nódulos/planta en raíz principal (mg) |
| P5-B | Peso seco de nódulos/planta en raíz total (mg) |
| P6-B | Rendimiento de granos (kg/ha) |

III.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cámara de crecimiento y a campo, fueron sometidos a un análisis de varianza, comprobación de supuestos y comparación múltiple de medias (Test DGC) mediante el programa estadístico Infostat, con un nivel de probabilidad del 5 % (Di Rienzo y col., 2017).

IV. RESULTADOS

IV.1. Inoculantes bacterianos experimentales

Para producción de los inoculantes experimentales bacterianos, se utilizaron 17 cepas de *Bacillus*, provenientes de suelo rizosférico de distintas localidades del país. El control de calidad de los mismos mostró un rango de recuento de células viables entre $7,40E+08$ y $3,20E+10$, y de esporas entre $5,40E+08$ y $3,17E+10$. La eficiencia de esporulación fue superior al 83 % en 13 de los inoculantes experimentales, mientras que en 4 de ellos los rangos de eficiencia fueron entre el 47 % y 73 %. Respecto a los valores de pH, todos los inoculantes mostraron valores entre 6,80 y 7,14 (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros de calidad de los inoculantes bacterianos experimentales.

| Identificación de los inoculantes experimentales | Células viables (UFC/ml) | Esporas (UFC/ml) | Eficiencia de esporulación (%) | pH |
|--|--------------------------|------------------|--------------------------------|------|
| IBE-1 | 1,73E+09 | 2,44E+09 | 141 | 6,99 |
| IBE-2 | 1,60E+09 | 2,10E+09 | 131 | 7,07 |
| IBE-3 | 7,80E+09 | 6,90E+09 | 88 | 7,11 |
| IBE-4 | 2,04E+10 | 2,40E+10 | 118 | 7,07 |
| IBE-5 | 5,80E+09 | 3,30E+09 | 57 | 7,00 |
| IBE-6 | 1,36E+10 | 1,35E+10 | 99 | 7,00 |
| IBE-7 | 3,70E+09 | 4,10E+09 | 111 | 7,04 |
| IBE-8 | 8,90E+09 | 8,70E+09 | 98 | 7,09 |
| IBE-9 | 1,32E+10 | 1,56E+10 | 118 | 6,89 |
| IBE-10 | 7,40E+08 | 5,40E+08 | 73 | 7,02 |
| IBE-11 | 8,70E+09 | 4,10E+09 | 47 | 6,97 |
| IBE-12 | 9,03E+09 | 8,70E+09 | 96 | 7,00 |
| IBE-13 | 6,40E+09 | 4,30E+09 | 67 | 6,80 |
| IBE-14 | 3,20E+10 | 3,17E+10 | 99 | 7,02 |
| IBE-15 | 2,02E+10 | 1,98E+10 | 98 | 7,14 |
| IBE-16 | 7,50E+09 | 8,60E+09 | 115 | 7,12 |

| | | | | |
|---------------|----------|----------|----|------|
| IBE-17 | 3,00E+09 | 2,50E+09 | 83 | 6,89 |
|---------------|----------|----------|----|------|

IV.2. Ensayo en cámara de crecimiento

El análisis de varianza mostró diferentes comportamientos dependiendo del parámetro a evaluar y del tratamiento realizado.

IV.2.1. Longitud de la planta

La evaluación de este parámetro mostró diferencias significativas, entre el testigo absoluto (T01) y el testigo PGPR (T02) en todas las longitudes evaluadas (aérea, radical y total). El análisis de la longitud aérea y total mostró mayores valores de T02 respecto a T01, mientras que en la longitud radical se observó un comportamiento inverso.

Respecto a la evaluación de la longitud aérea de las plantas, los resultados mostraron que los tratamientos con los inoculantes bacterianos experimentales influyeron positivamente sobre este parámetro, ya que todos los tratamientos difirieron significativamente respecto a T01, a excepción de T19 que mostró un comportamiento similar a este testigo, aunque con mayores valores de longitud radical (Figura 8).

En la evaluación de la longitud radical, se observó que T02 y el 53 % de los tratamientos con inoculantes experimentales presentaron menores valores de longitud que T01, con diferencias significativas respecto a este testigo (Figura 9).

La determinación de la longitud total presentó en general el mismo comportamiento que la longitud aérea, observándose en todos los tratamientos bacterianos, incluido el T02, mayor longitud en las plantas con diferencias estadísticamente significativas en relación al testigo absoluto (Figura 10).

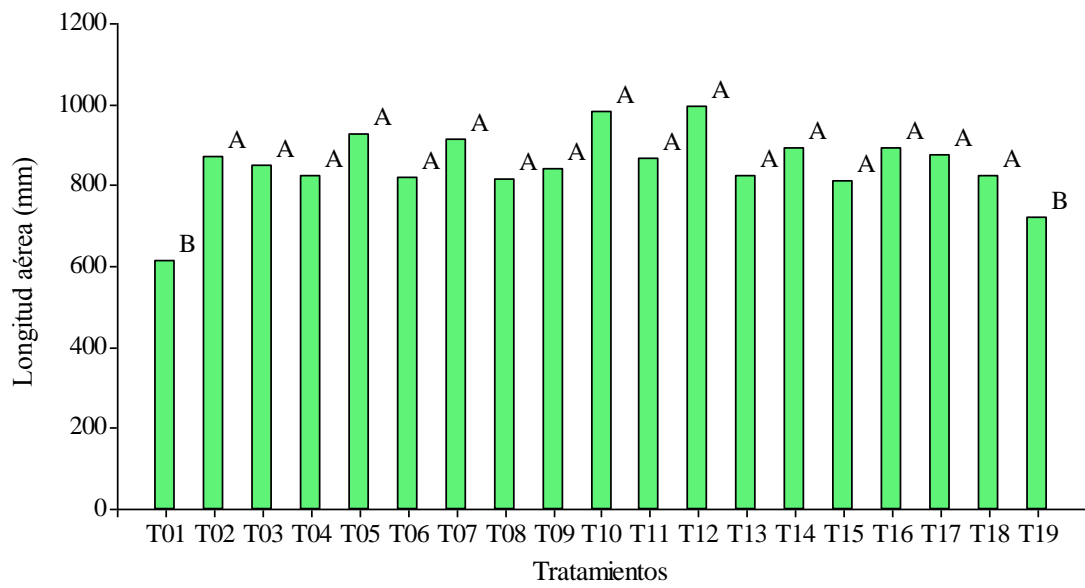


Figura 8. Longitud aérea de plantas (mm) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p>0,05$).

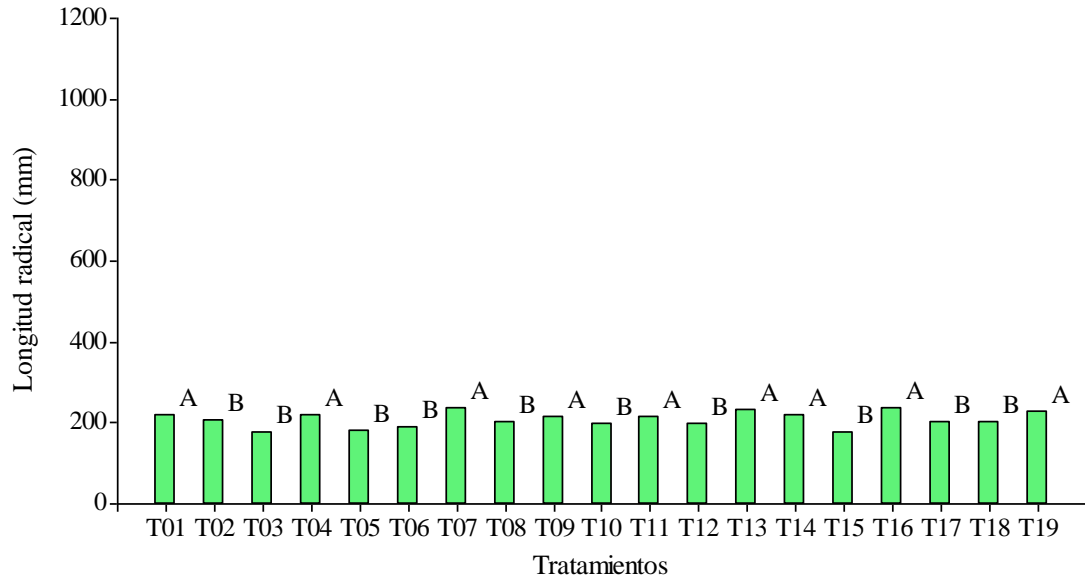


Figura 9. Longitud radical de plantas (mm) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p>0,05$).

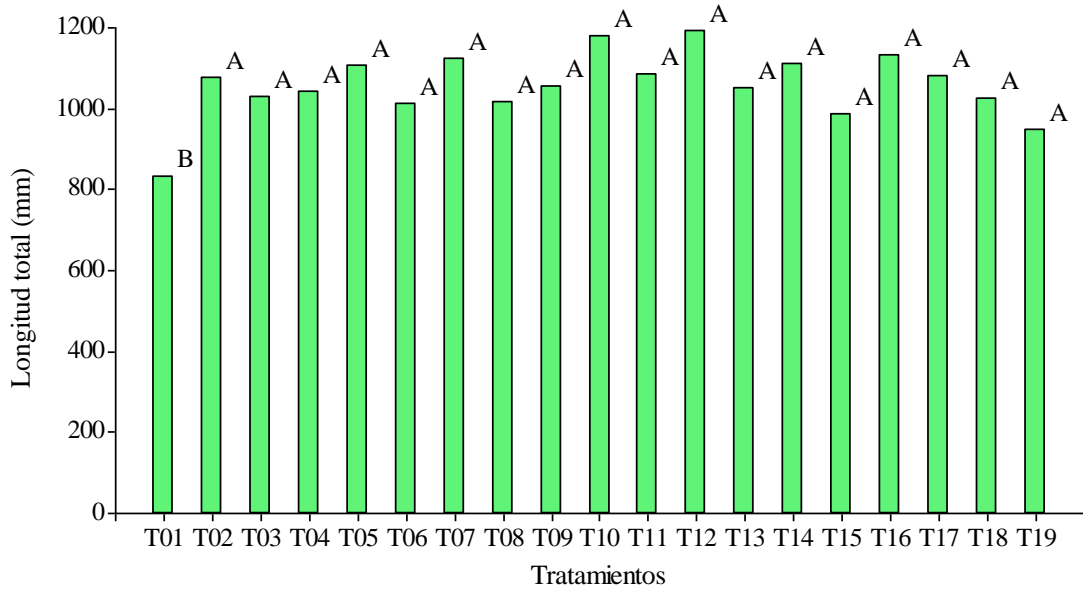


Figura 10. Longitud total de plantas (mm) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.2.2. Peso fresco de la planta

Cuando se determinó el peso fresco aéreo de las plantas, se observó que los tratamientos con inoculantes bacterianos, influyeron de manera positiva sobre este parámetro, mostrando diferencias significativas respecto a T01, el cual presentó los menores valores de peso fresco aéreo (Figura 11).

En la evaluación del peso fresco radical, se observó un comportamiento muy diferente a lo observado en el peso aéreo, ya que el testigo PGPR y el 88 % de los tratamientos experimentales mostraron diferencias significativas respecto T01, con valores inferiores de peso fresco radical. Solo 2 tratamientos experimentales (12%), T11 y T12, presentaron pesos significativamente mayores al resto de los tratamientos, y con valores similares a los observados en T01 (Figura 12).

La determinación del peso fresco total mostró un comportamiento similar en todos los tratamientos, incluidos ambos testigos, sin diferencias significativas entre ellos, y con valores inferiores a 3 tratamientos, T03, T11 y T12, en donde se observó un incremento en el peso fresco total (Figura 13).

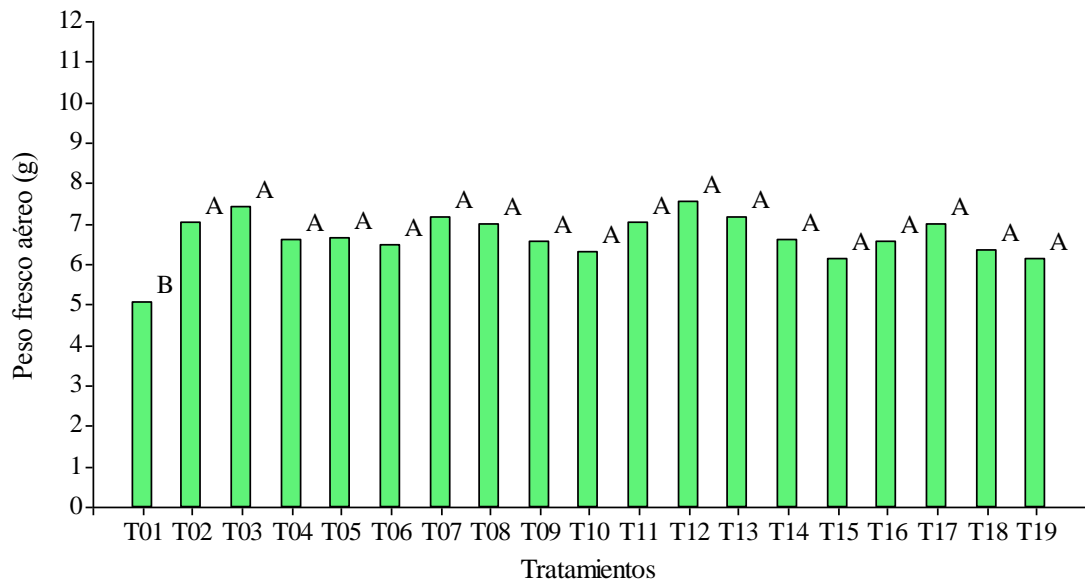


Figura 11. Peso fresco aéreo de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

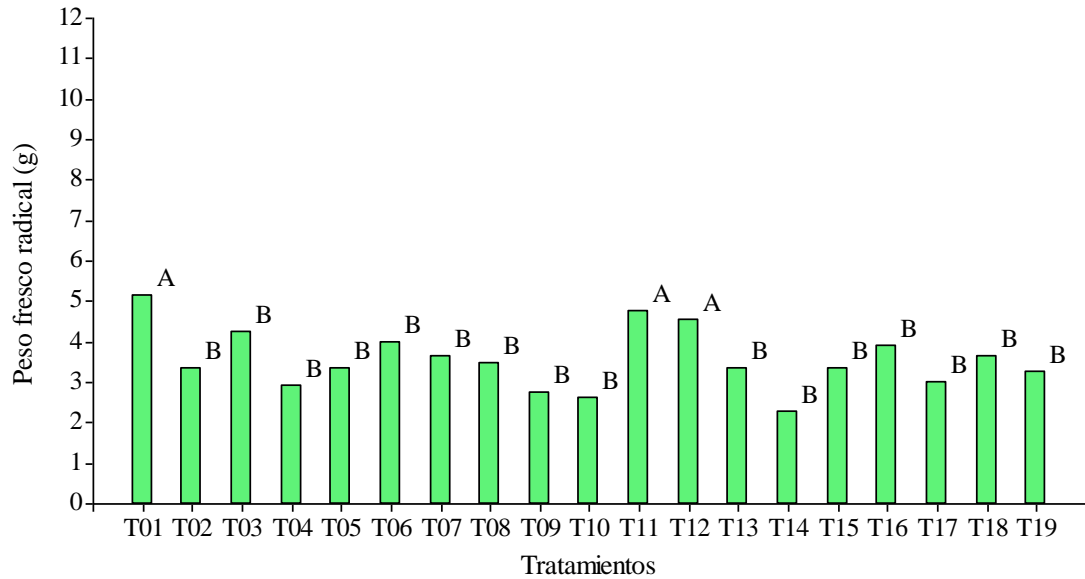


Figura 12. Peso fresco radical de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

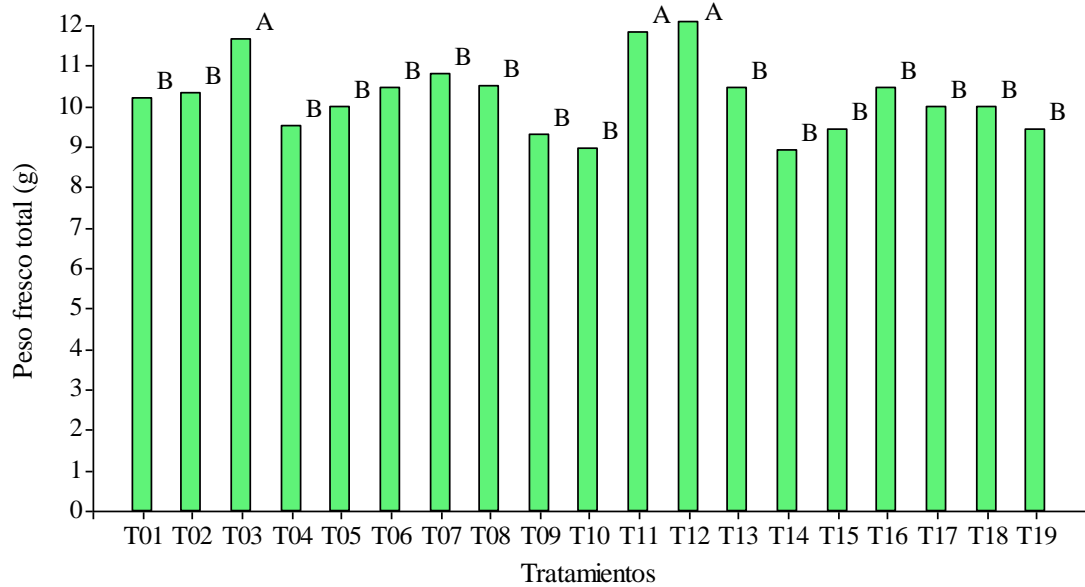


Figura 13. Peso fresco total de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.2.3. Peso seco de la planta

En este estudio, la evaluación del peso seco aéreo de las plantas mostró el mismo comportamiento que el observado en el peso fresco aéreo, donde los tratamientos con inoculantes bacterianos, presentaron un incremento en el valor respecto al testigo absoluto (Figura 14).

En la determinación del peso seco radical, se observó un efecto similar al observado en el peso fresco radical, donde los menores valores de peso se presentaron en el testigo PGPR y en el 71 % de los tratamientos experimentales, los cuales mostraron diferencias significativas respecto T01 y al 29 % de los tratamientos restantes (Figura 15).

Respecto al peso seco total, se observó que ambos testigos y el 53 % de los tratamientos con inoculantes experimentales, no mostraron diferencias significativas entre ellos, y presentaron valores inferiores al resto de los tratamientos (Figura 16).

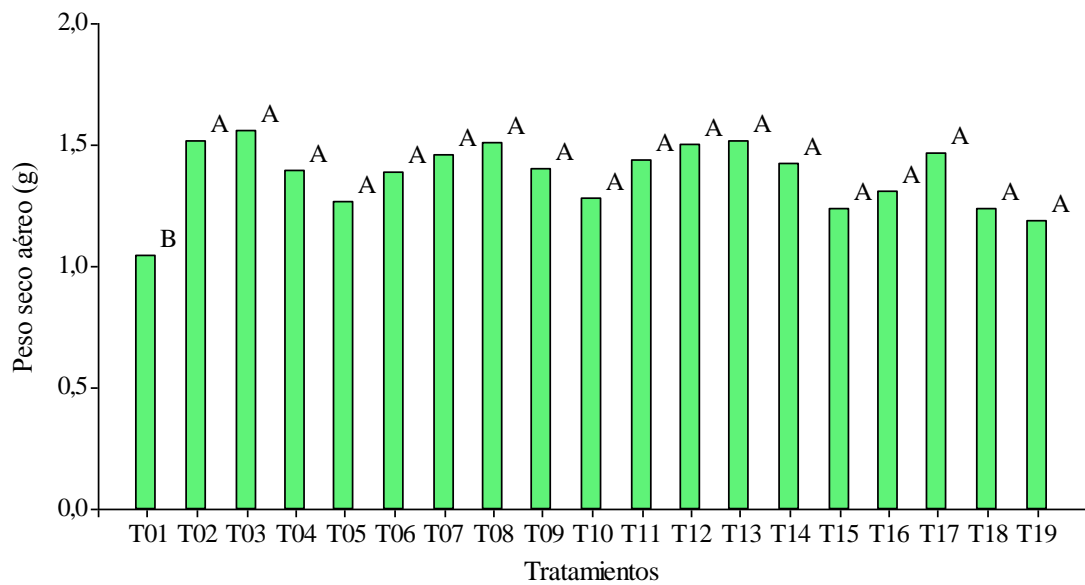


Figura 14. Peso seco aéreo de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

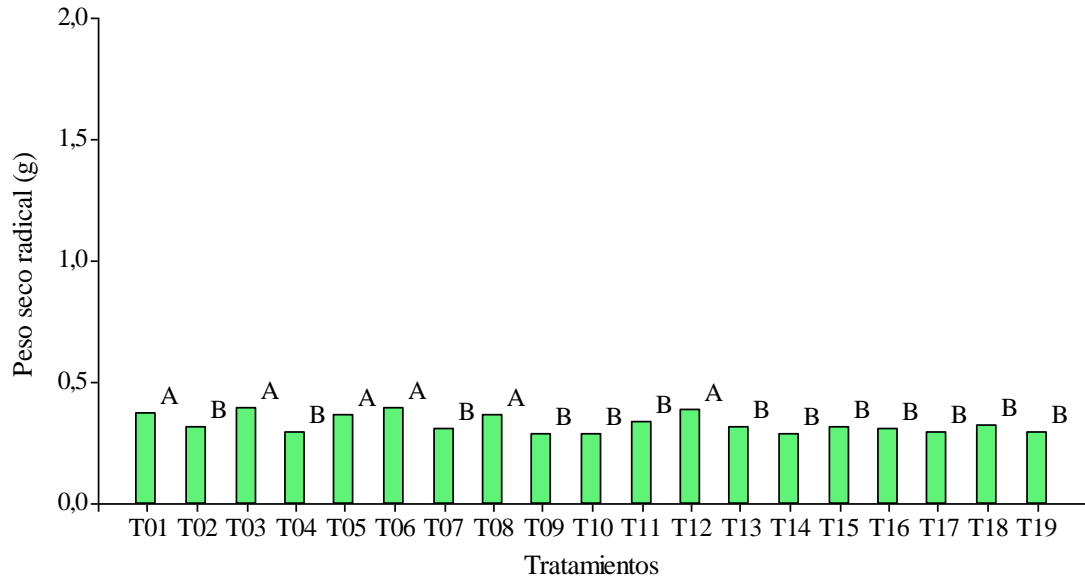


Figura 15. Peso seco radical de plantas (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

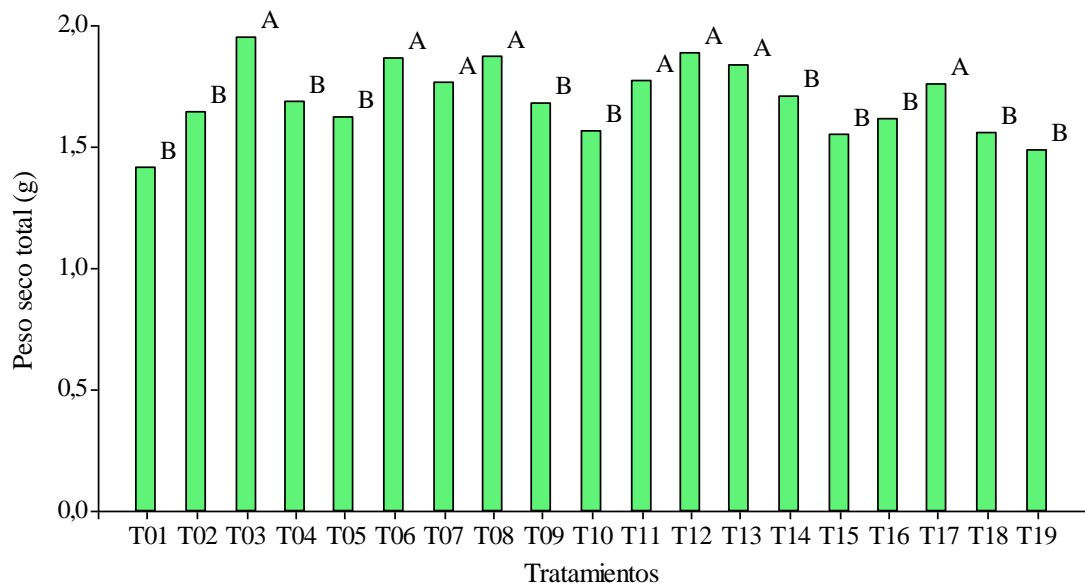


Figura 16. Peso seco total (g) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.2.4. Número de nódulos en raíz

Cuando se determinó el número de nódulos en raíz principal se observó que este parámetro no mostró diferencias significativas entre el testigo PGPR (T02) y el 83 % de los tratamientos experimentales evaluados, los cuales presentaron valores superiores al resto de los tratamientos. Sólo el 17 %, correspondiente a los tratamientos T11, T15 y T19, mostraron diferencias significativas respecto a T02, con menores números de nódulos en raíz principal (Figura 17).

La evaluación del número de nódulos en raíz total mostró un comportamiento diferente, ya que se observaron diferencias significativas entre el testigo PGPR y el 76 % de los tratamientos experimentales, mostrando estos últimos mayor número de nódulos que el testigo. El 24 % de los tratamientos, correspondiente a T7, T13, T15 y T19, no mostraron diferencias respecto al testigo, con valores inferiores en el número de nódulos en raíz total (Figura 18).

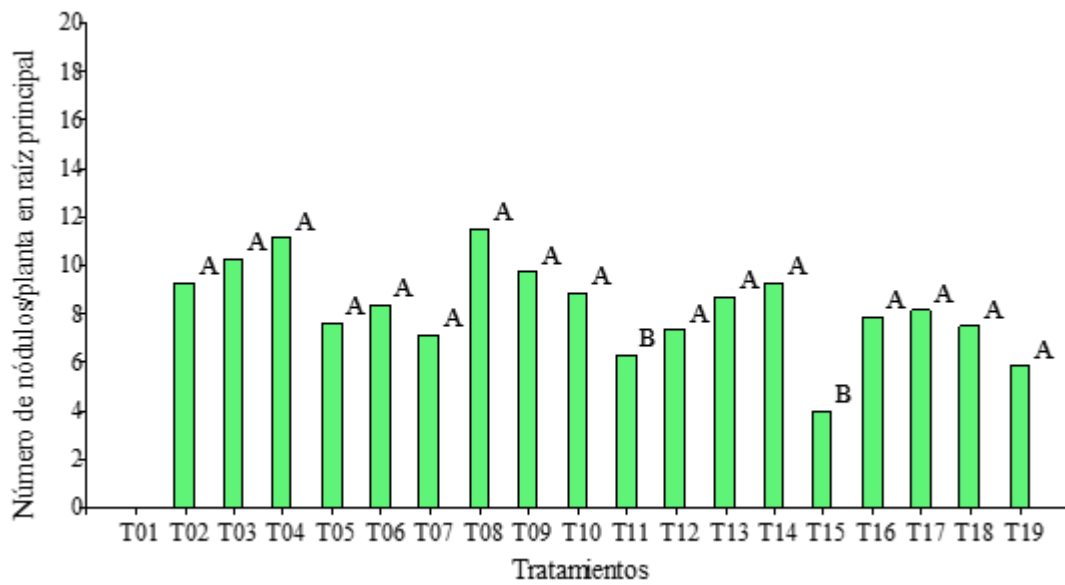


Figura 17. Número de nódulos por planta en raíz principal en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

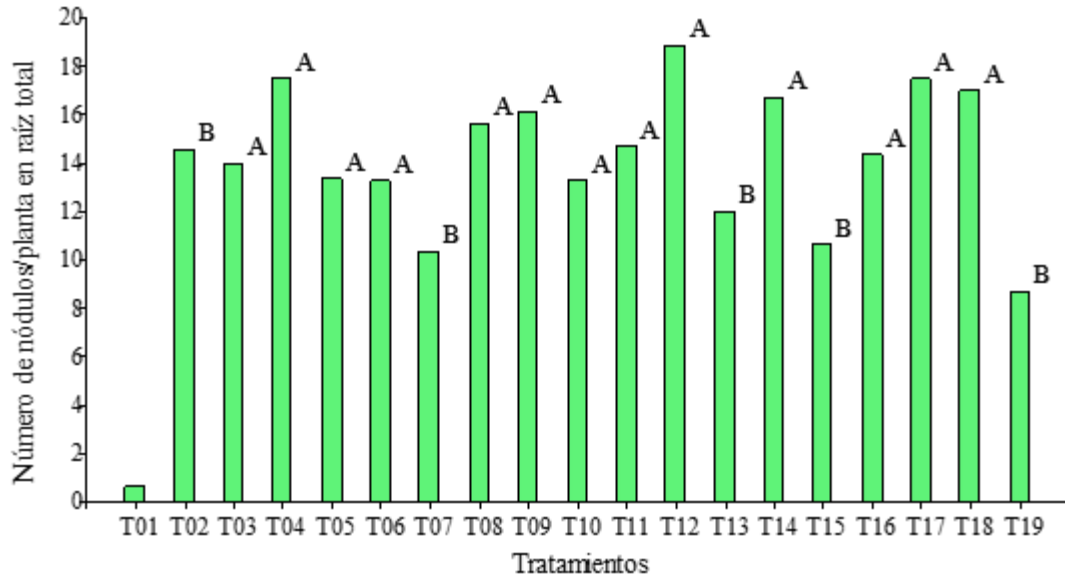


Figura 18. Número de nódulos por planta en raíz total en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.2.5. Peso seco de nódulos en raíz

La determinación del peso seco de nódulos en raíz principal mostró un comportamiento similar en todos los tratamientos, incluido el testigo PGPR, sin diferencias significativas entre ellos, y con valores superiores a 2 tratamientos, T15 y T19, en donde se observó un decremento en valor de este parámetro (Figura 19).

En la evaluación del peso seco de nódulos en raíz total, se observó que el 42 % de los tratamientos experimentales, presentaron diferencias significativas respecto al testigo PGPR y al 58 % de los tratamientos restantes, los cuales mostraron mayores pesos secos de nódulos (Figura 20).

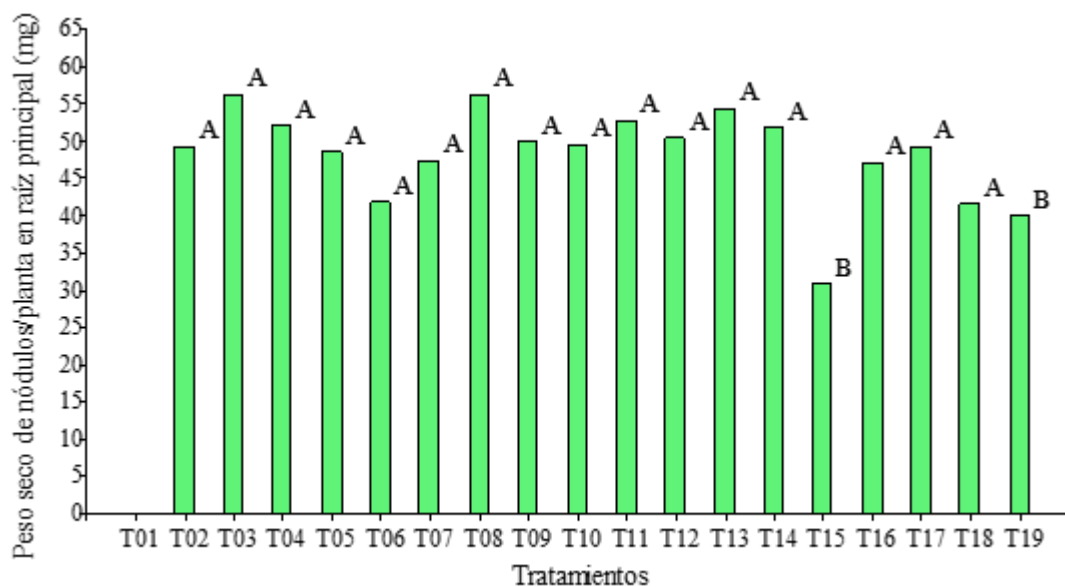


Figura 19. Peso seco de nódulos por planta en raíz principal (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

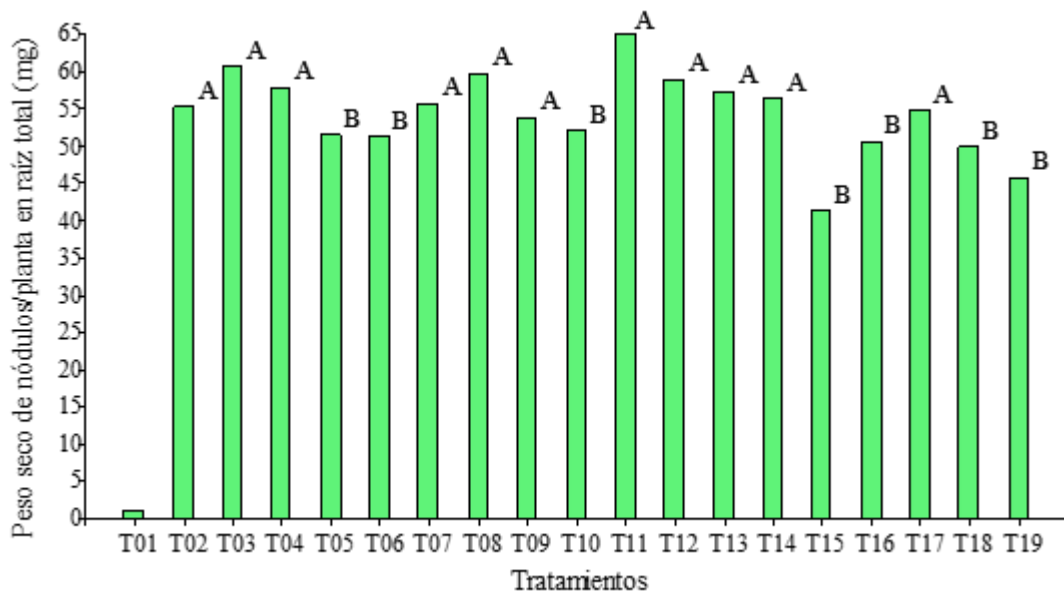


Figura 20. Peso seco de nódulos por planta en raíz total (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.3. Ensayo a campo

El análisis de varianza mostró diferentes comportamientos dependiendo del parámetro a evaluar y del tratamiento realizado. Cabe aclarar, que en el ensayo a campo se evaluaron 12 tratamientos con los inoculantes experimentales (T03-T14), a diferencia del ensayo en cámara de crecimiento donde se evaluaron 17 tratamientos.

La selección de los tratamientos se realizó analizando la respuesta de los inoculantes experimentales a cada una de las variables agronómicas respecto al testigo PGPR, ya que el análisis comparativo con el testigo absoluto no mostró diferencias. Se seleccionaron 9 tratamientos, los cuales superaron al testigo PGPR en al menos 5 de los parámetros evaluados (Tabla 13). Los otros 3 tratamientos que completan este ensayo fueron seleccionados por su capacidad de biocontrol en ensayos realizados con anterioridad (datos no mostrados).

Tabla 13. Comparación de parámetros agronómicos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento respecto al testigo absoluto y al testigo PGPR.

| Tratamiento ^a | Parámetros agronómicos ^b | | | | | | | | | | | | | N° variables > ^c | |
|--------------------------|-------------------------------------|--------|---------|-------|-------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------|-----|
| | P1-A | P2-A | P3-A | P4-A | P5-A | P6-A | P7-A | P8-A | P9-A | P10-A | P11-A | P12-A | P13-A | T01 | T02 |
| T01 | 632,14 | 222,86 | 855,00 | 0,00 | 0,71 | 5,06 | 5,22 | 10,27 | 0,00 | 0,00 | 1,04 | 0,37 | 1,41 | | |
| T02 | 870,71 | 204,29 | 1075,00 | 9,29 | 14,57 | 7,01 | 3,32 | 10,33 | 0,05 | 0,06 | 1,33 | 0,31 | 1,64 | | |
| T03 | 841,43 | 182,86 | 1024,29 | 10,57 | 14,57 | 7,44 | 4,30 | 11,74 | 0,06 | 0,06 | 1,55 | 0,40 | 1,95 | 11 | 10 |
| T04 | 830,71 | 213,57 | 1044,29 | 11,00 | 17,86 | 6,49 | 2,92 | 9,41 | 0,05 | 0,06 | 1,36 | 0,28 | 1,64 | 9 | 6 |
| T05 | 958,57 | 181,43 | 1140,00 | 8,00 | 14,14 | 6,64 | 3,41 | 10,05 | 0,05 | 0,05 | 1,25 | 0,36 | 1,61 | 9 | 4 |
| T06 | 835,71 | 195,71 | 1031,43 | 9,00 | 13,29 | 6,68 | 3,84 | 10,52 | 0,04 | 0,05 | 1,44 | 0,48 | 1,92 | 11 | 5 |
| T07 | 891,43 | 207,86 | 1099,29 | 6,57 | 10,29 | 7,29 | 3,83 | 11,13 | 0,05 | 0,06 | 1,49 | 0,32 | 1,81 | 10 | 10 |
| T08 | 830,00 | 210,00 | 1040,00 | 11,71 | 16,14 | 7,03 | 3,42 | 10,46 | 0,06 | 0,06 | 1,50 | 0,36 | 1,86 | 10 | 11 |
| T09 | 840,00 | 215,71 | 1055,71 | 9,71 | 16,14 | 6,54 | 2,75 | 9,30 | 0,05 | 0,05 | 1,40 | 0,28 | 1,68 | 9 | 6 |
| T10 | 974,29 | 194,29 | 1168,57 | 9,00 | 13,43 | 6,26 | 2,65 | 8,90 | 0,05 | 0,05 | 1,25 | 0,28 | 1,54 | 9 | 2 |
| T11 | 888,57 | 216,43 | 1105,00 | 6,14 | 14,43 | 7,05 | 4,96 | 12,01 | 0,05 | 0,07 | 1,44 | 0,34 | 1,78 | 10 | 11 |
| T12 | 978,57 | 197,86 | 1176,43 | 7,29 | 19,14 | 7,51 | 4,56 | 12,07 | 0,05 | 0,06 | 1,51 | 0,39 | 1,89 | 11 | 11 |
| T13 | 831,43 | 225,71 | 1057,14 | 8,14 | 11,86 | 7,06 | 3,26 | 10,33 | 0,05 | 0,06 | 1,49 | 0,31 | 1,80 | 11 | 7 |
| T14 | 907,14 | 210,00 | 1117,14 | 9,29 | 15,71 | 6,82 | 2,42 | 9,23 | 0,05 | 0,06 | 1,47 | 0,30 | 1,77 | 9 | 9 |
| T15 | 820,71 | 173,57 | 994,29 | 4,57 | 11,57 | 6,35 | 3,61 | 9,96 | 0,04 | 0,04 | 1,29 | 0,33 | 1,62 | 9 | 2 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--------|--------|---------|------|-------|------|------|-------|------|------|------|------|------|----|---|
| T16 | 886,43 | 242,86 | 1129,29 | 8,00 | 13,71 | 6,47 | 3,96 | 10,43 | 0,05 | 0,05 | 1,28 | 0,31 | 1,59 | 11 | 5 |
| T17 | 877,86 | 203,57 | 1081,43 | 7,86 | 18,14 | 6,89 | 2,98 | 9,87 | 0,05 | 0,06 | 1,42 | 0,28 | 1,70 | 9 | 7 |
| T18 | 814,86 | 198,57 | 1013,43 | 7,57 | 17,57 | 6,14 | 3,58 | 9,72 | 0,04 | 0,05 | 1,17 | 0,32 | 1,48 | 9 | 3 |
| T19 | 717,86 | 227,14 | 945,00 | 5,86 | 8,71 | 6,14 | 3,27 | 9,42 | 0,04 | 0,05 | 1,19 | 0,30 | 1,48 | 10 | 1 |

^a T01: Testigo absoluto; T02: Testigo PGPR; T03: IBE-1 (PAS3); T04: IBE-2 (TOR1); T05: IBE-3 (MAG1); T06: IBE-4 (MAG2); T07: IBE-6 (TNO14); T08: IBE-7 (TNO15); T09: IBE-9 (PUR1); T10: IBE-12 (PUR4); T11: IBE-14 (PUR6); T12: IBE-15 (PUR7); T13: IBE-8 (FER1); T14: IBE-16 (LNG1); T15: IBE-5 (MAG9); T16: IBE-10 (PUR2); T17: IBE-11 (PUR3); T18: IBE-13 (PUR5); T19: IBE-17 (LGR2).

^b P1-A: Longitud aérea (mm); P2-A: Longitud radical (mm); P3-A: Longitud total (mm); P4-A: Número de nódulos/ planta en raíz principal; P5-A: Número de nódulos/ planta en raíz total; P6-A: Peso fresco aéreo (g); P7-A: Peso fresco radical (g); P8-A: Peso fresco total (g); P9-A: Peso seco de nódulos/planta en raíz principal (mg); P10-A: Peso seco de nódulos/planta en raíz total (mg); P11-A: Peso seco aéreo (g); P12-A: Peso seco radical (g); P13-A: Peso seco total (g).

^c Numero de variables superiores al testigo absoluto (T01) y al testigo PGPR (T02).

IV.3.1. Número de plantas por m²

Cuando se determinó el número de plantas por m², se observó que el testigo PGPR y el 42 % de los tratamientos experimentales bacterianos mostraron diferencias significativas respecto T01, con valores inferiores en el número de plantas. El resto de los tratamientos experimentales no presentaron diferencias significativas respecto al T01 (Figura 21).

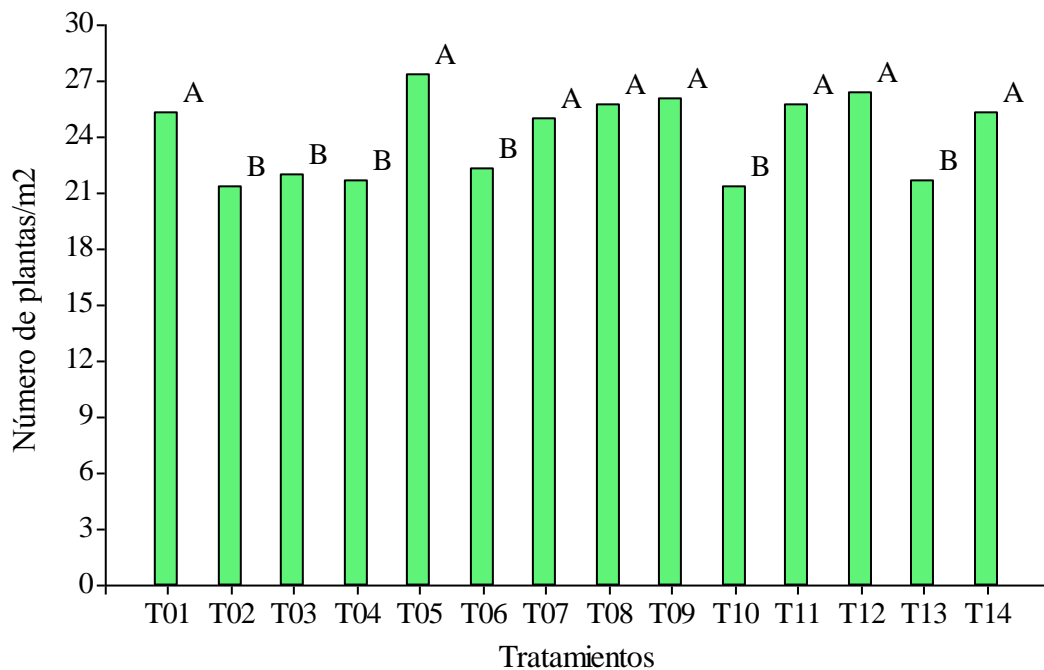


Figura 21. Número de plantas por m² en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.3.2. Número de nódulos en raíz

En la determinación del número de nódulos en raíz principal, se observó que solo 2 tratamientos experimentales, T05 y T08, presentaron valores significativamente superiores a ambos testigos y al 83 % de los tratamientos restantes (Figura 22).

La evaluación del número de nódulos en raíz total mostró un efecto similar que lo observado para raíz principal, a diferencia que 3 tratamientos experimentales (T03, T05 y T08), fueron los que presentaron valores superiores al resto de los tratamientos, incluidos ambos testigos (Figura 23).

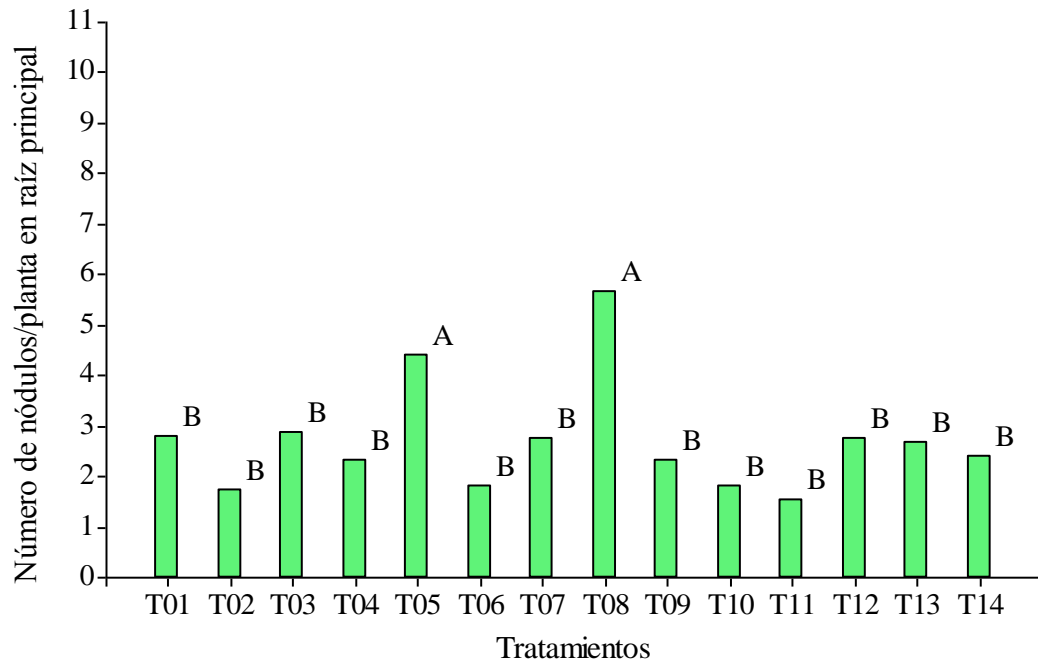


Figura 22. Número de nódulos por planta en raíz principal en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p>0,05$).

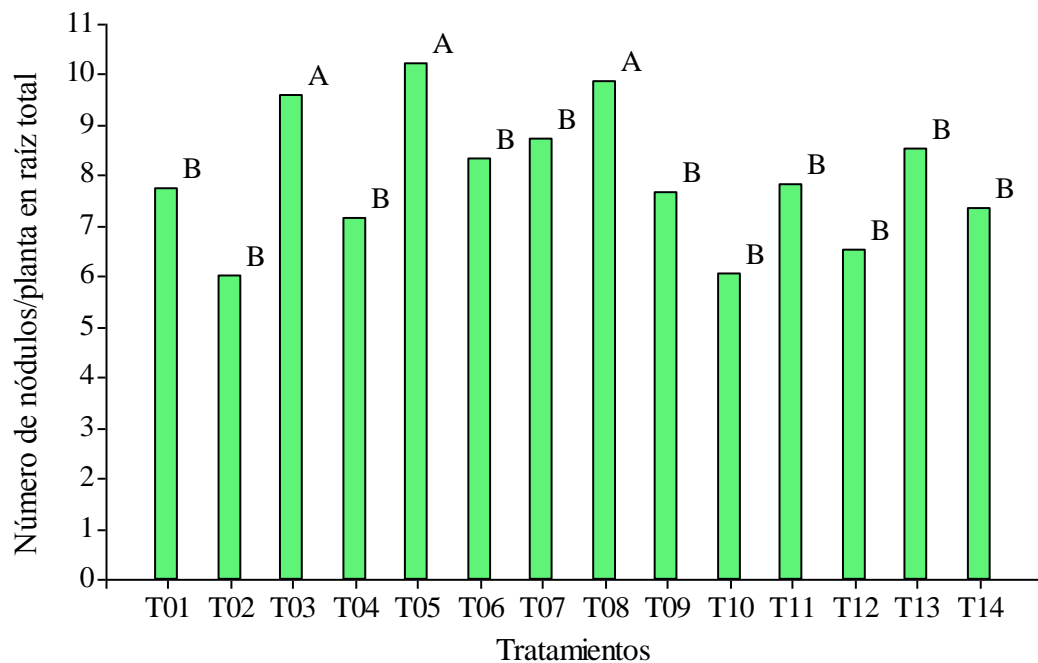


Figura 23. Número de nódulos por planta en raíz total en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p>0,05$).

IV.3.3. Peso seco de nódulos en raíz

Cuando se evaluó el peso seco de los nódulos en raíz, se observó un comportamiento similar de los tratamientos experimentales respecto a los testigos. El 93 % de los tratamientos y ambos testigos, no mostraron valores significativamente diferentes entre ellos, en ambos parámetros evaluados. Solo un tratamiento (7 %), (T08) para raíz principal y otro para raíz total (T03), mostraron valores superiores de peso seco que el resto de los tratamientos evaluados (Figuras 24 y 25).

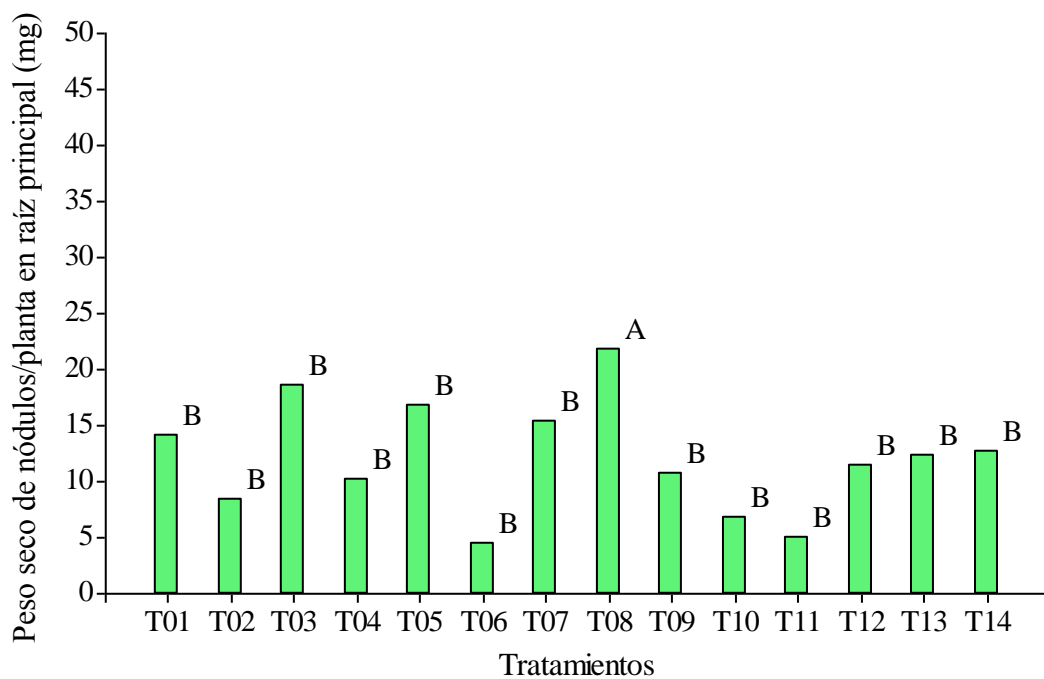


Figura 24. Peso seco de nódulos por planta en raíz principal (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

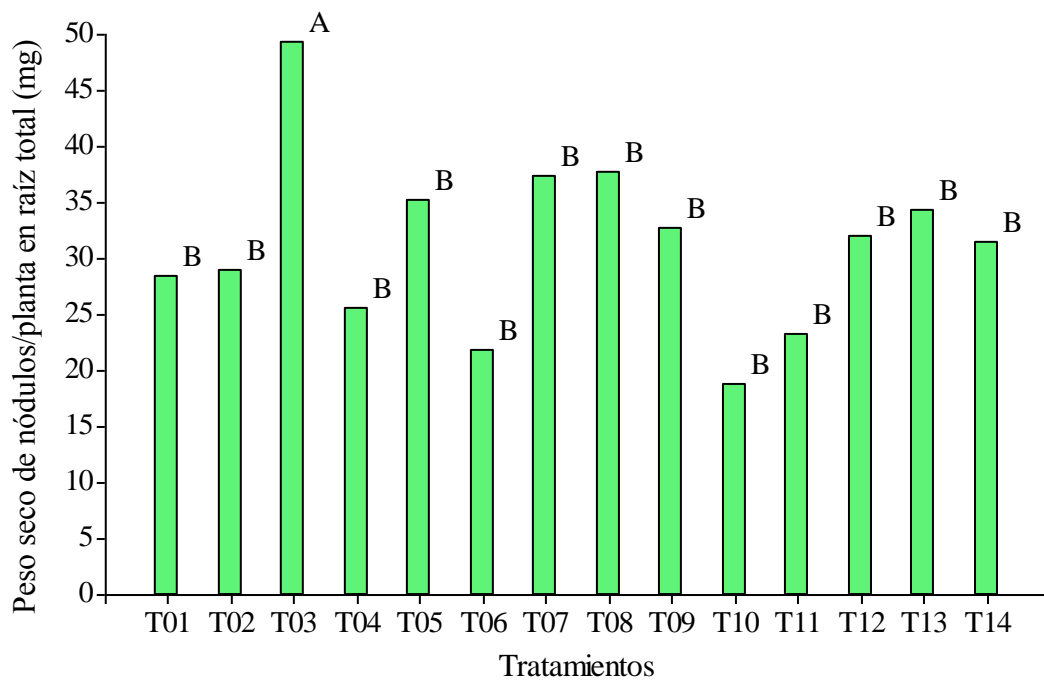


Figura 25. Peso seco de nódulos por planta en raíz total (mg) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

IV.3.4. Rendimiento de granos

Finalmente, en la variable rendimiento de granos, evaluado a cosecha, se encontró que los tratamientos T04, T09, T10, T11, T13 y T14 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo absoluto (T01), pero de manera detrimental (Figura 26).

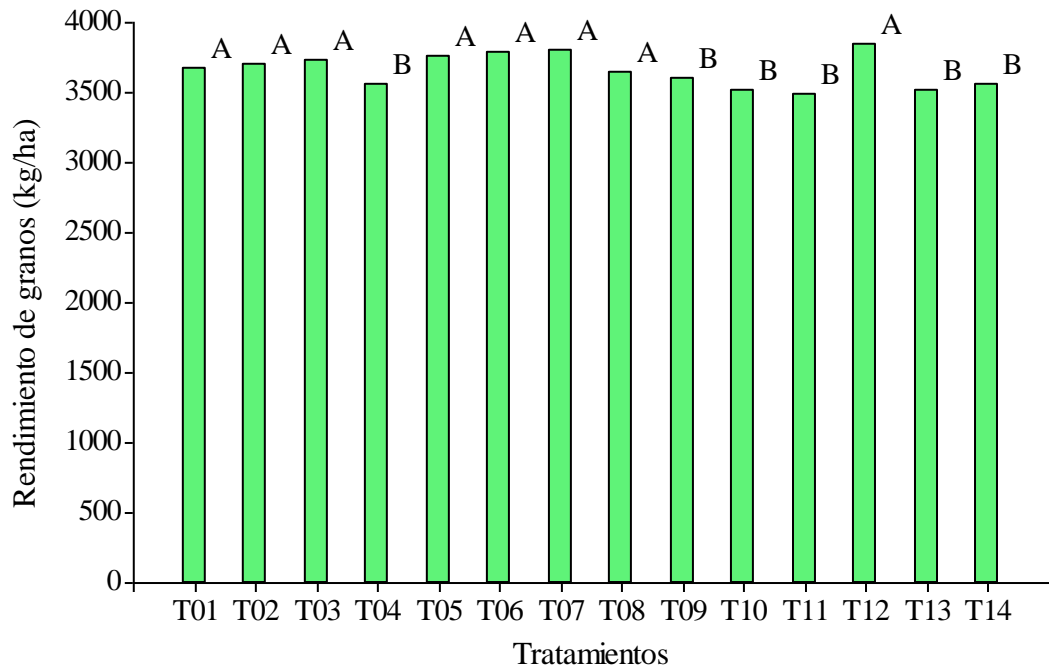


Figura 26. Rendimiento de granos (kg/ha) en los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo a campo. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

V. DISCUSIÓN

La producción de los inoculantes experimentales, a base de bacterias del género *Bacillus*, mostró que estos en general presentaron altos porcentajes de eficiencia de esporulación, superior al 83 %, en 13 de ellos, mientras que en los 4 restantes los rangos de eficiencia fueron entre el 47 % y 73 %.

El género *Bacillus* ha sido estudiado por poseer una variedad de mecanismos, entre ellos la fijación biológica del nitrógeno y la solubilización de fosfatos, que ha impulsado diferentes estudios en el sector agrícola que buscan la disminución, y en el mejor de los casos, la erradicación de los fertilizantes químicos, acción que representaría un impacto positivo sobre el medio ambiente. Sumado a estos beneficios se destaca la capacidad de degradación de sustratos de plantas y animales, la producción de antibióticos, la capacidad de sobrevivir en múltiples condiciones ambientales y la actividad antagónica e inhibidora entre otras, pone al género *Bacillus* en un lugar destacado para su uso en la agricultura sostenible (Tejera- Hernández y col., 2011).

El amplio perfil de diversidad fisiológica del género (acidofilia, alcalofilia, psicofilia, termofilia y parasitismo), virtud que es otorgada por la formación de su spora, le permite estar en diferentes hábitats tanto acuáticos como terrestres (Restrepo-Franco y col., 2015).

La capacidad de *Bacillus* spp. para formar esporas que permanecen metabólicamente inactivas pero viables bajo condiciones adversas, los hace apropiados para la formulación de productos estables que benefician los cultivos agrícolas a través de mecanismos indirectos (Portela-Dussán y col., 2013). Esta cualidad, ha llamado la atención de los investigadores por su alta aplicación biotecnológica, y el interés en usar las esporas de *Bacillus* spp. en productos probióticos, agentes biocontroladores y en la agricultura como biopesticidas, biofertilizantes o bioinoculantes (Chen y col., 2010; Tavares y col., 2013; Posada-Uribe y col., 2015). La producción de esporas otorga a la especie excepcionales ventajas ecológicas y resulta ser una característica atractiva debido a que facilita su conservación por períodos largos como producto formulado (Zhang y Dou, 2002).

Las esporas son morfológicamente diferentes a las células vegetativas y se caracterizan por ser células con baja actividad metabólica, resistentes al medio ambiente, capaces de

sobrevivir a efectores de estrés como agentes químicos, mecánicos, calor y radiaciones, o en respuesta a la falta de nutrientes (Higgins y Dworkin, 2012; Checinska y col., 2015; Posada-Uribe y col., 2015). La formación de estas estructuras ocurre sólo cuando hay una alta densidad celular y dicha población se encuentra en condiciones de estrés (Posada-Uribe y col., 2015).

La espora sobrevive largos períodos de tiempo en ausencia de nutrientes y espera condiciones de vida favorables para germinar permaneciendo mientras tanto en estado de dormición y latencia, sin actividad metabólica (Harwood y Archibald, 1990; Nicholson y Setlow, 1990).

El hecho que, las cepas de *Bacillus* utilizadas para la producción de inóculos experimentales presenten una «buena» eficiencia de esporulación permitiría una mejora en la resistencia bacteriana frente a diferentes condiciones de formulación, si se desea realizar un producto comercial a base de este microorganismo para uso agrícola. Paralelamente, resultarían ser buenos candidatos para la aplicación de estos productos a campo, ya que podrían adaptarse a ambientes extremos. Sumado a esto, la evidencia que este género presenta diversas características y versatilidad para su aplicación, lo hace un excelente candidato en el mejoramiento de la disponibilidad de nutrientes para los cultivos.

En el análisis de los 13 caracteres agronómicos evaluados en el ensayo en cámara de crecimiento se observó muy buena respuesta del cultivo cuando fue inoculado con los distintos tratamientos experimentales. Los resultados mostraron que 8 de los tratamientos fueron superiores en 9 parámetros al testigo absoluto (T04, T05, T09, T10, T14, T15, T17 y T18); 4 tratamientos en 10 parámetros (T07, T08, T11 y T19) y 5 tratamientos en 11 parámetros (T03, T06, T12, T13 y T16).

De manera general, la aplicación de los inoculantes bacterianos logro estimular la elongación y la biomasa de las plantas cuando se compara con el testigo absoluto. Esto, podría explicarse por una mejora en la nutrición de las plantas o por la acción de metabolitos estimulantes sintetizados por las bacterias, los cuales tienen un efecto directo sobre el incremento en la longitud aérea y la biomasa vegetal.

El metabolismo de los microorganismos benéficos del suelo aumenta la disponibilidad de los nutrientes, jugando un rol esencial en el reciclado de los elementos de la

naturaleza. Como consecuencia, las plantas podrían expresar un mayor crecimiento de la masa foliar y del tamaño de las raíces (Sumner y col. 1981; Monte-Vázquez y col. 1998; Ascarate y col. 2000); pero al observar el peso seco de raíces, sucedió lo contrario ya que los tratamientos T02, T04, T07, T09, T10, T11, T13, T14, T15, T16, T17, T18 y T19 se diferenciaron estadísticamente de manera negativa respecto al testigo absoluto (T01).

El crecimiento aéreo está asociado al contenido hídrico del suelo y a una serie de procesos bioquímicos y biofísicos, que a su vez están afectados por el ambiente. Krizek y col. (1985) observaron en soja que la elongación foliar disminuye cuando se restringe el crecimiento de las raíces y que este crecimiento disminuye como consecuencia del estrés al que está sometido el sistema radical. El crecimiento de las raíces depende del suministro de nutrientes del suelo (Macklon y col., 1994). A su vez, el crecimiento de la parte aérea depende del transporte de nutrientes desde las raíces. Las raíces requieren de los carbohidratos producidos en la parte aérea por la fotosíntesis, mientras que la parte aérea requiere los nutrientes y el agua absorbidos por las raíces. Los estudios que relacionan las raíces con la parte aérea (biomasa de raíz/biomasa de parte aérea) muestran que existe una interdependencia entre el sistema radical y la parte aérea de la planta y, resaltan la importancia del equilibrio funcional entre las dos partes (Van Noordwijk y Willigen, 1987). La relación raíz/parte aérea se encuentra fuertemente condicionada por las características tanto del ambiente edáfico como del climático y la ontogenia del cultivo (Campbell y de Jong, 2001).

Posiblemente existió un sinergismo entre el hospedante y los simbiontes, lo que permitió una mejor absorción de elementos esenciales, los cuales probablemente junto con las fitohormonas, provocaron el mayor desarrollo de la parte aérea del cultivo (Arshad y Frankenberger, 1991). Algunos trabajos indican que las fitohormonas de crecimiento producidas en la raíz influyen en el crecimiento de la parte aérea (Davies y Zhang, 1991). Es bien conocido el aumento del crecimiento de las plantas por las especies colonizadoras de *Bacillus* y *Paenibacillus* (Kloepper y col., 1991; Idris y col., 2007). También es muy probable que los efectos estimuladores del crecimiento de varias PGPR se deban a la producción bacteriana de reguladores del crecimiento de las plantas, como el ácido indol-3-acético (IAA), las giberelinas y las citocinas (Bloemberg y Lugtenberg 2001; Bottini y col., 2004).

La evaluación del número de nódulos totales en cámara de crecimiento mostró que excepto T07, T13, T15 y T19, el resto de los tratamientos se diferenciaron estadísticamente de ambos testigos. En el ensayo a campo, hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, ya que T03, T05 y T08 superaron a ambos testigos. Cabe destacar que el número de nódulos totales en el testigo PGPR fue inferior al testigo absoluto, contrariamente a lo que podría esperarse, evidenciándose la acción de los rizobios nativos del suelo. Según Brockwell y col. (1995), en suelos con niveles medios de rizobios naturalizados, $1E+1$ a $1E+3$ rizobios/g de suelo, la competencia entre los rizobios introducidos con el inoculante y los presentes naturalmente en el suelo, puede resultar de interés, especialmente si la población naturalizada es pobremente efectiva en la fijación del N_2 . Con valores mayores de población naturalizada, el fenómeno de competencia por la ocupación de los nódulos es muy grande, lo que trae como consecuencia menores beneficios con la inoculación. En nuestro país, los rizobios naturalizados, constituyen una población variable según la zona, que fluctúa entre $1E+2$ a $1E+5$ rizobios/g de suelo. Estudios realizados por IMYZA -INTA Castelar, donde se evaluó la capacidad simbiótica de cepas aisladas de diferentes suelos, determinaron que la gran mayoría presenta buena capacidad de nodulación, pero mediana capacidad para la fijación del N_2 (González y col., 1997).

La nodulación por rizobios se mejoró cuando los rizobios se combinaron con las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal hace bastante tiempo (Grimes y Mount 1984) y muchos estudios más recientes han demostrado que la infección simultánea con PGPR específico aumenta la nodulación y el crecimiento en una amplia variedad de leguminosas (Dileep Kumar y col., 2001; Tilak y col., 2006; Sánchez y col., 2014).

En el recuento inicial de plantas del ensayo a campo se observó que el stand de plantas logrado en todos los tratamientos fue acorde a lo recomendado por el semillero para la variedad y la zona a pesar de que los tratamientos T02, T03, T04, T06, T10 y T13 se diferenciaron estadísticamente de manera negativa del resto.

El rendimiento de un cultivo de grano queda definitivamente establecido, y puede ser medido, recién al finalizar el ciclo del cultivo. Sin embargo, el mismo se genera a lo largo de toda la ontogenia debido al aporte que van realizando las distintas estructuras

que lo componen. Entonces, dentro de este marco, es posible concebir al rendimiento como un conjunto de distintos componentes que se van generando durante el desarrollo del cultivo, quedando cada uno de ellos fijados en determinado momento (Cárcova y col., 2003).

La evaluación del rendimiento en grano en este estudio mostró que los tratamientos T04, T09, T10, T11 T13 y T14 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a ambos testigos pero de manera negativa. Sin embargo, los tratamientos T06, T07 y T12, a pesar de que no se diferenciaron estadísticamente de ambos testigos, mostraron una tendencia positiva al incremento de rendimiento de entre 3,1 y 4,5 %, lo cual se condice con lo observado por Dashti y col. (1997) quienes afirman que la aplicación de PGPR en la agricultura podría incrementar la productividad hasta un 5 % en el cultivo de soja.

Existe un interés creciente en el uso de microorganismos beneficiosos como complemento al uso de pesticidas químicos y fertilizantes sintéticos en la producción agrícola. La aplicación de microorganismos beneficiosos a las semillas es un mecanismo eficiente para la colocación de inóculos microbianos en el suelo donde estarán bien posicionados para colonizar las raíces de las plántulas y proteger contra las enfermedades y plagas transmitidas por el suelo (O'Callaghan, 2016).

Los inoculantes microbianos aplicados como tratamientos de semillas liberan microorganismos directamente a la rizósfera de la planta: la estrecha zona de suelo que rodea las raíces donde las plantas interactúan directamente con los microorganismos (Philippot y col., 2013). La competencia rizosférica es un pre-requisito necesario para las PGPR. Comprende una colonización efectiva de las raíces combinada con la capacidad de sobrevivir y proliferar a lo largo de las raíces de las plantas en crecimiento en presencia de la microbiota indígena durante un período de tiempo. Dada la importancia de la competencia rizosférica como pre-requisito, entender la comunicación microbiana vegetal como afectada por factores genéticos y ambientales en el contexto de su nicho ecológico puede contribuir significativamente a la comprensión de los mecanismos de acción (Whipps, 2001; Bais y col., 2004).

La «co-inoculación» (aplicación conjunta de *Rhizobium* y microorganismos PGPR), la detección de nuevas cepas y el desarrollo de mejores protectores bacterianos son parte de las tendencias de mediano plazo para el mejoramiento y el aprovechamiento de los

beneficios de la práctica de inoculación en post de sistemas eficientes de FBN en el cultivo de soja (Ferraris y col., 2006).

Los resultados obtenidos en este estudio incrementan el interés por este grupo de microorganismos, ya que el enfoque de promoción de crecimiento tiene varios componentes que se deberían estudiar detalladamente con ensayos exploratorios. Estos componentes deben ser desglosados y evaluados para cada cepa para poder determinar cuales tienen el mejor comportamiento y así poder llegar a formular productos para su uso comercial.

VI. CONCLUSIONES

1. Los inoculantes experimentales mostraron altas eficiencias de esporulación, superiores al 83% en la mayoría de las cepas, lo cual los coloca en una situación promisorio. La capacidad de *Bacillus* spp., para formar esporas que permanecen metabólicamente inactivas pero viables bajo condiciones adversas, los hace apropiados para la formulación de productos estables que benefician los cultivos agrícolas.
2. En el ensayo en cámara de crecimiento todos los tratamientos bacterianos experimentales no mostraron diferencias estadísticas significativas respecto al testigo absoluto, a excepción de los parámetros P3-A (longitud total de plantas), P6-A (peso fresco aéreo) y P11-A (peso seco aéreo) donde todos los tratamientos se diferenciaron estadísticamente del testigo absoluto.
3. En el ensayo a campo, ninguno de los parámetros evaluados mostró diferencias estadísticas significativas respecto a los testigos. Sin embargo, en el parámetro P6-B (rendimiento de granos), y a pesar de no tener diferencias estadísticas significativas con el testigo absoluto, se puede observar que los tratamientos experimentales T06 (MAG2), T07 (TNO14) y T12 (PUR7), presentaron incrementos de 3,1 %, 3,5 % y 4,5 %, respectivamente.
4. Por lo antes mencionado, sería interesante plantear una segunda etapa de este ensayo donde se evalúe el comportamiento de las cepas en distintas regiones agroecológicas de nuestro país. Paralelamente, se podrían realizar en el laboratorio pruebas bioquímicas y

de enfrentamiento que permitan determinar y cuantificar los efectos PGPR de cada cepa y también su capacidad de biocontrol frente a distintos patógenos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adesemoye A., Kloepper J. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**(1): 1-12.
- Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. (2007). Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology*, **10**(6): 638-643.
- Ahemad M., Kibret M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*, **26**(1): 1-20.
- Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, **163**(2): 173-81.
- Alcaraz L.D., Moreno-Hagelsieb G., Eguiarte L.E., Souza V., Herrera-Estrella L., Olmedo G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, **11**: 332.
- Alvarez R., Steinbach H.S. (2006). Factores climáticos y edáficos reguladores del nivel de materia orgánica. En: Alvarez R. (Ed.), *Materia Orgánica «Valor Agronómico y Dinámica de Suelos Pampeanos»* (pp. 31-40). Buenos Aires, Argentina: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- American Soybean Association (Soy Stats). (2018). Disponible en línea: <http://soystats.com>
- Arshad M., Frankenberger Jr. W.T. (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, **133**(1): 1-8.
- Ascarate P., Ronchi A., Rosas S., Correa N., Grassano A. (2000). Coexistence and effect of Phosphorus solubilizing bacteria and *Azospirillum* on Rhizobium-alfalfa symbiosis. Abstracts 5th Internacional PGPR Workshop, Córdoba, Argentina.
- Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, **9**(1):26-32.
- Bashan Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, **16**(4): 729-770.

- Birch P.R.J., Kamoun S. (2000). Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. *New technologies for life sciences: a trends guide*, 77-82.
- Bloemberg G.V., Lugtenberg B.F.J. (2001). Molecular Basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4): 343-350.
- Bolsa de Comercio de Buenos Aires (BCBA). (2018). Disponible en línea: <https://www.bcba.sba.com.ar>
- Bolsa de Comercio de Rosario (BCR). (2018). Disponible en línea: <https://www.bcr.com.ar>
- Borriss R. (2011). Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. En: D.K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses* (pp. 41-76). Berlín, Alemania: Springer Berlin Heidelberg.
- Bottini R., Cassan F., Picolli P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5): 497-503.
- Brockwell J., Bottomley P., Thies J.E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility. *Plant and Soil*, 174(1): 143-180.
- Calvo P., Zúñiga D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1): 31-39.
- Campbell C.A., de Jong.R. (2001). Root to straw ratios influence of moisture and rate of N fertilizer. *Canadian Journal of Soil Science*, 81(1): 39-43.
- Cárcova J., Abeledo G.L., López M. (2003). Análisis de la generación del rendimiento: Crecimiento, partición y componentes. En: H. Satorre, R. Benech, G. Slafer, E. De la Fuente, D. Miralles, M. Otegui, y R. Sávin (Eds.), *Producción de Granos. Bases Funcionales para su Manejo* (pp. 75-98). Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina.
- Cárdenas A. (2005). Efecto de la inoculación con *B. subtilis* DN y *Glomus fasciculatum* sobre la actividad nematocida y producción de cempaxuchil (*Tagetes erecta* var, *Alcosa*). Tesis de maestría. CINVESTAV-Irapuato, Irapuato, Gto., México.

- Checinska A., Paszczynski A., Burbank M. (2015). *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. *Annual review of food science and technology*, **6**: 351-369.
- Chen Z.M., Li Q., Liu H.M. (2010). Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**(5): 1353-1360.
- College of Agriculture and Life Sciences (CALS). (2016). Bacterial Endospores. Department of Microbiology. Cornell University. Ithaca, Nueva York 14850, EE.UU. Disponible en línea: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>
- Dashti N., Zhang F., Hynes R., Smith D.L. (1997). Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant Soil*, **188**(1): 33-41.
- Davies W.J., Zhang J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 55-76.
- de Souza R., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, **38**(4): 401-419.
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Bashan Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation- A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, **61**: 171-189.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Dileep Kumar B.S., Berggren I., Martensson A. (2001). Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant Soil*, **229**(1): 25-34.
- Dinesh R., Anandaraj M., Kumar A., Bini Y.K., Subila K.P., Aravind R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, **173**: 34-43.

- Errigton J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, **1**(2):117-126.
- Fehr W., Caviness C., Burmood D., Pennington J. (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, **11**(6): 929-931.
- Ferraris G. (2008). Fertilización de la soja. En: R. Melgar, M. Díaz Zorita (Eds.), *Fertilización de cultivos y pasturas*, 2^{da} edición (pp. 261-278). Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur S.A.
- Ferraris G.N., González Anta G., Díaz-Zorita M. (2006). Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el cono sur. ResearchGate: <https://www.researchgate.net/publication/237744253>
- Franco M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral (pp. 261). Universidad de Granada, España: Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Granada.
- Gally T. (2006). Enfermedades de las semillas de soja en Argentina. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 78.
- Giorda ML. (1997). El cultivo de la soja en Argentina, M.L. Giorda, H.E.J. Baigorri (Eds.). San Juan, Argentina: Editar, Agro de Córdoba.
- Glick B.R. (1995). Enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **41**(2):109-117.
- Gómez-Luna B.E., Hernández-Morales A., HerreraMéndez C.H., Arroyo- Figueroa G., Vargas-Rodríguez L., Olalde-Portugal V. (2012). Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, **8**(3): 97-102.
- González M. (2000). Efecto de fungicidas o de *Bacillus subtilis* sobre la colonización radicular del jitomate (*Lycopersicon esculentum mill*) por hongos micorrícicos. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Gto., México.
- González N., Peticari A., Stegman B., Rodríguez-Cáceres E. (1997). Nutrición nitrogenada. En: L.M. Giorda, H.E.J. Baigorri (Eds.), *El cultivo de la soja en Argentina* (pp. 188-198.). INTA Centro Regional Córdoba y EEA Marcos Juárez.

- Gray E.J., Smith D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plantbacterium signalling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**(3): 395-412.
- Grimes H.D., Mount M.S. (1984). Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry*, **16**(1): 27-30.
- Harwood C., Archibald A. (1990). Crecimiento, mantenimiento y técnicas generales. En: Harwood C., Cutting S. (Eds.), *Métodos biológicos moleculares para el bacilo* (pp. 1-21). Chichester, Inglaterra: John Wiley and Sons.
- Hermoso M. (1974). El cultivo de la soja. Hoja Divulgadora Núm. 5-6/74 H. (pp. 24). Madrid, España: Ministerio de Agricultura
- Higgins D., Dworkin J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**(1): 131-148.
- Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, **168**(2): 293-303.
- Hunter J.R., Ericson A.E. (1952). Relation of seed germination to soil moisture tension. *Agronomy Journal*, **44**(3): 107-109.
- Idris E.E.S., Iglesias D.J., Talon M., Borriss R. (2007). Tryptophan-dependent production of Indole-3Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**(6): 619-626.
- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*, **24**(1): 14-21.
- Inouye C. (1953). The effect of temperature on soybean germination. *Crop Science Society of Japan*, **21**: 276-277.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC). (2017). Disponible en línea: <https://www.indec.gob.ar>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (1966). Carta de Suelos de la República Argentina. Disponible en: <http://anterior.inta.gob.ar/suelos/cartas/series/Pergamino.htm>
- Kloepper J.W., Zablutowicz R.M., Tipping E.M., Lifshitz R. (1991). Plant growth

- promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizer. En: D.L. Keister, P.B. Cregan (Eds.), *The rhizosphere and plant growth* (pp. 315-326). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Krizek D.T., Carmi A., Mirecki R.M., Snyder F.W., Bunce J.A. (1985). Comparative effects of soil moisture stress and restricted root zone volume on morphogenetic and physiological responses of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Journal of Experimental Botany*, **36**(1): 25-38.
- Kumar A., Prakash A., Johri B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, 37-59.
- Layton C., Maldonado E., Monroy L., Corrales L.C., Sánchez L.C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, **9**: 177-187.
- López-Fernández S., Compát S., Vrhovsek U., Bianchedi P.L., Sessitsch A., Pertot I., Campisano A. (2016). Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways. *Plant and Soil*, **405**(1): 155-175.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). (2016). Genus *Bacillus*. Microbiology Society. Charles Darwin House, 12 Roger St., London WC1N 2JU, United Kingdom. Disponible en línea: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>
- Macklon A.E.S., Mackie-Dawson L.A., Sin A., Shand C.A., Lylli A. (1994). Soil P resources, plant growth and rooting characteristics in nutrient poor upland grasslands. *Plant Soil*, **163**(2): 257-266.
- Maughan H., van der Auwera G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**(5): 789- 797.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (1999). Effect of wild-type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation*, **18**(2): 49-53.
- Mc Spadden G.B.B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*, **94**(11): 1252-1258.

- Monte-Vázquez E., Grondona-España I., Prieto M.R. (1998). Control Biológico. Principios Generales y aplicación de Biofungicidas en Agricultura. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Nicholson W.L., Setlow P. (1990). Sporulation, germination and out-growth. En: Harwood C., Cutting S. (Eds.), *Métodos biológicos moleculares para el bacilo* (pp. 391-450). Chichester, Inglaterra: John Wiley and Sons.
- O'Callaghan M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**(13): 5729-5746.
- Ochoa M.S., Pedraza R.M., Trujillo M.M., Abud Y.C. (2010). Plantas, hongos micorrizicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, **12**(1): 65-71.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2009). How to Feed the World in 2050.
- Orrieta-Fernández, Larrea-Vega. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas*, **62**: 96-100.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., van der Putten W.H. (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, **11**(11):789-799.
- Portela-Dussán D.D., Chaparro-Giraldo A., López-Pazos S.A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA*, **11**(20): 87-96.
- Posada-Uribe L.F., Romero-Tabarez M., Villegas-Escobar V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and biosystems engineering*, **38**(10): 1879-1888.
- Prashar P., Shah S. (2016). Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. En: E. Lichtfouse (Ed.), *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 331-361). Canada: Springer International Publishing.
- Restrepo-Franco G.M., Marulanda-Moreno S., de la Fe-Pérez Y., Díaz-de la Osa A., Baldani-Vera L., Hernández-Rodríguez A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **46**(1): 63-76.

- Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., Santoyo G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*, **15**(2): 36-41.
- Rudrappa T., Czymme K.J., Paré P.W., Bais H.P. (2008). Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*, **148**: 1547-1556.
- Sainz-Rozas H., Echeverría H., Angelini H. (2012). Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y Extra Pampeana Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, **38**(1): 33-39.
- Sánchez A.C., Gutiérrez R.T., Santana R.C., Urrutia A.R., Fauvart M., Michiels J., Vanderleyden J. (2014). Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, **62**: 105-112.
- Selim H.M.M., Gomaa N.M., Essa A.M.M. (2016). Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: Ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Science and Technology*, **27**(1): 81-95.
- Shukla K.P., Sharma S., Singh N.K., Singh V., Tiwari K., Singh S. (2011). Nature and role of root exudates: efficacy in bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, **10**(48): 9717-9724.
- Singh A.K., Varaprasad K.S. (2008). Criteria for identification and assessment of agrobiodiversity heritage sites: Evolving sustainable agriculture. *Current Science*, **94**(9): 1131-1138.
- Stamford N.P., Stamford T.L., Andrade D.E. G.T., Michereff S.J. (2005). Microbiota dos Solos Tropicais. En: S.J. Michereff, D.E.G.T. Andrade, Menezes M. (Eds.), *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais* (pp. 61-92). Pernambuco, Brasil: Universidad Federal Rural de Pernambuco, Imprensa Universitária.
- Sumner D., Douppnik B. Jr., Boosalis M.G. (1981). Effects of reduced tillage and multiple cropping on plants diseases. *Annual Review of Phytopathology*, **19**(1): 167-187.

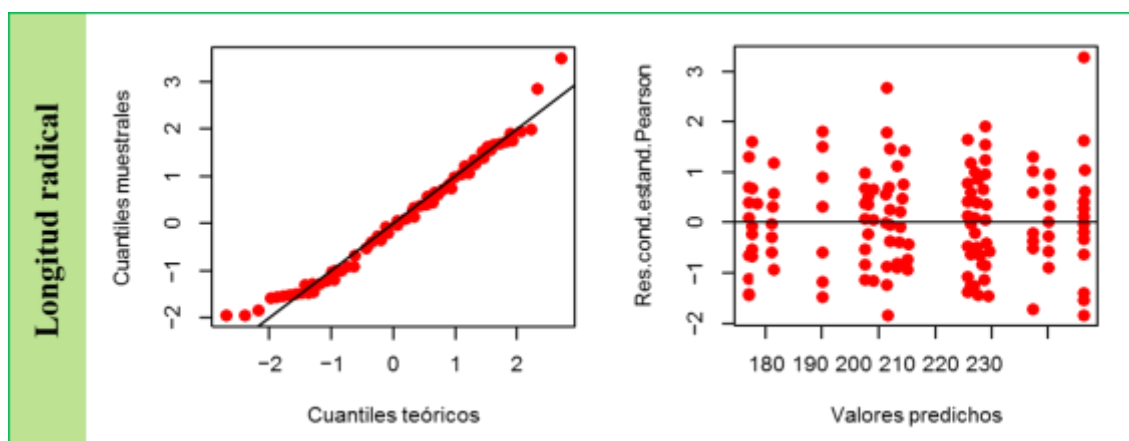
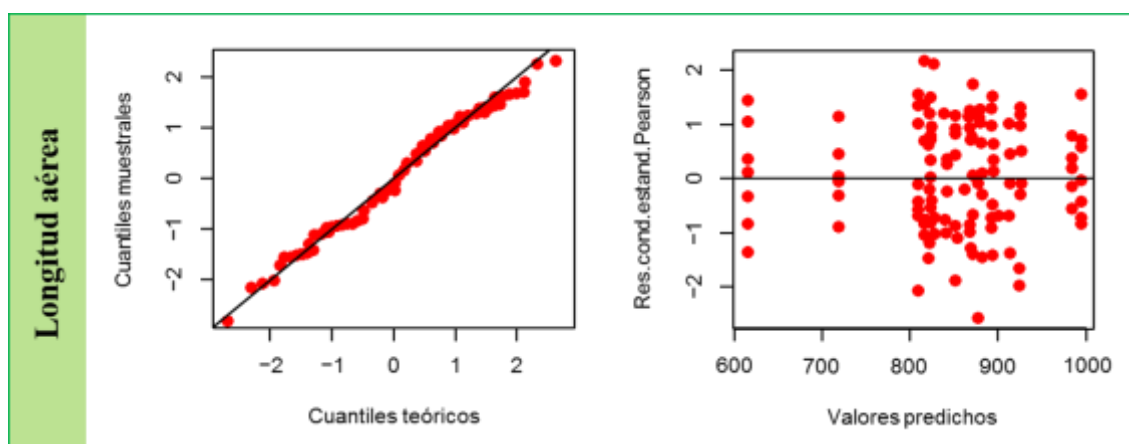
- Tavares M.B., Souza R.D., Luiz W.B. (2013). *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: Optimization of growth conditions and purification method. *Current Microbiology*, **66**(3): 279-285.
- Tejera-Hernández B., Rojas-Badía M.M., Heydrich-Pérez M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **42**(3): 131-138.
- Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Manoharachari C. (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, **57**(1): 67-71.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2006). Identification of the Taxonomic Class of a Soil. En: M.L. Golden, *Keys to Soil Taxonomy* (pp. 31-34). Washington D.C., Estados Unidos: Natural Resources Conservation Service.
- Uren N.C. (2007). Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants. En: R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri (Eds.), *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 1^{ra} edición (pp. 1-21). Italia: CRC Press.
- Van Noordwijk M., Willigen P. (1987). Agricultural concepts of roots: from morphogenetic to functional equilibrium between root and shoot growth. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, **35**: 487-496.
- Whipps J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**(1): 487-512.
- Wojciech J.J., Korsten L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 411-441.
- Zhang J., Dou H. (2002). Evaluation of *Bacillus subtilis* as potential biocontrol agent for postharvest green mold control on «valencia» orange. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 115: 60-64.

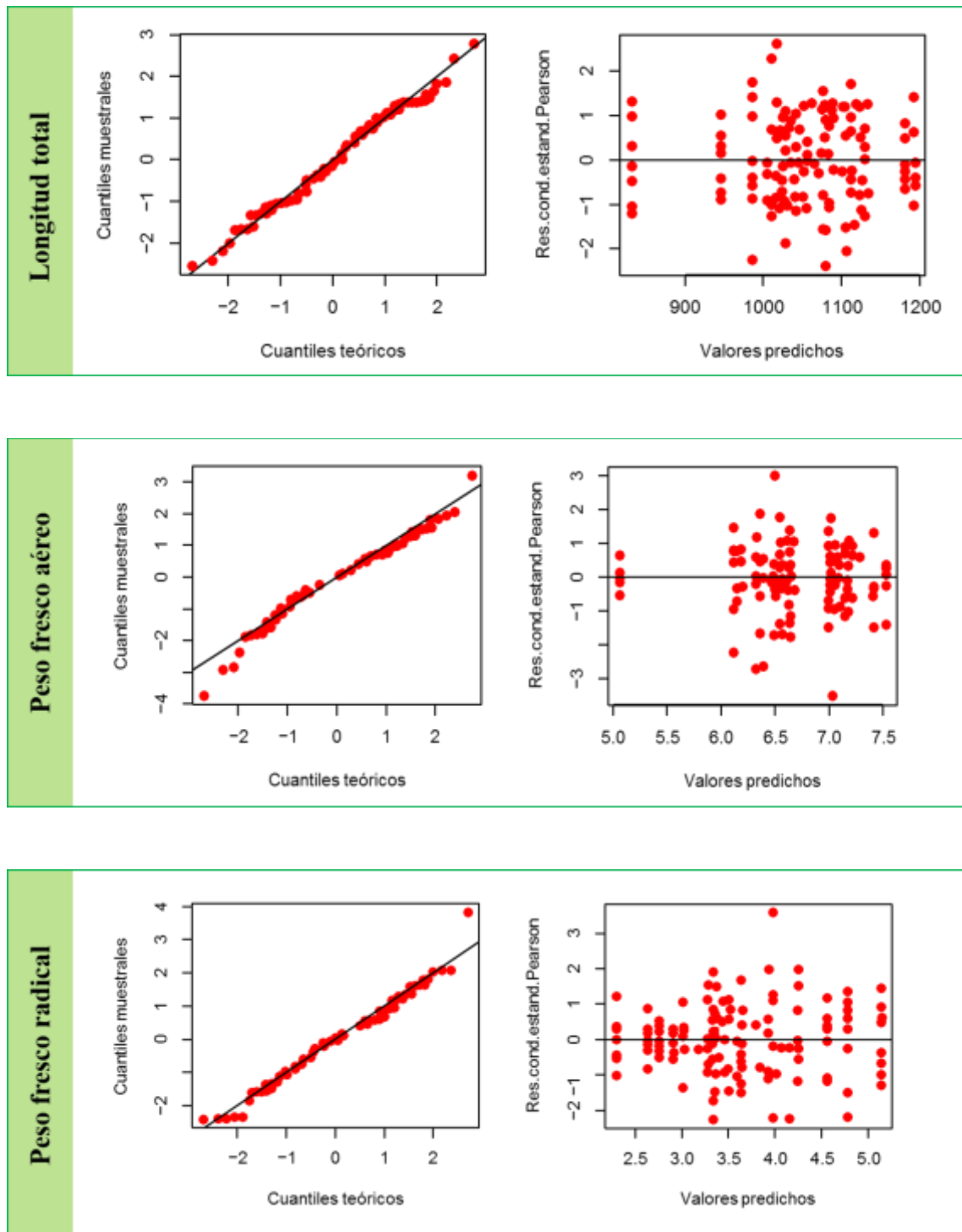
VIII. ANEXOS

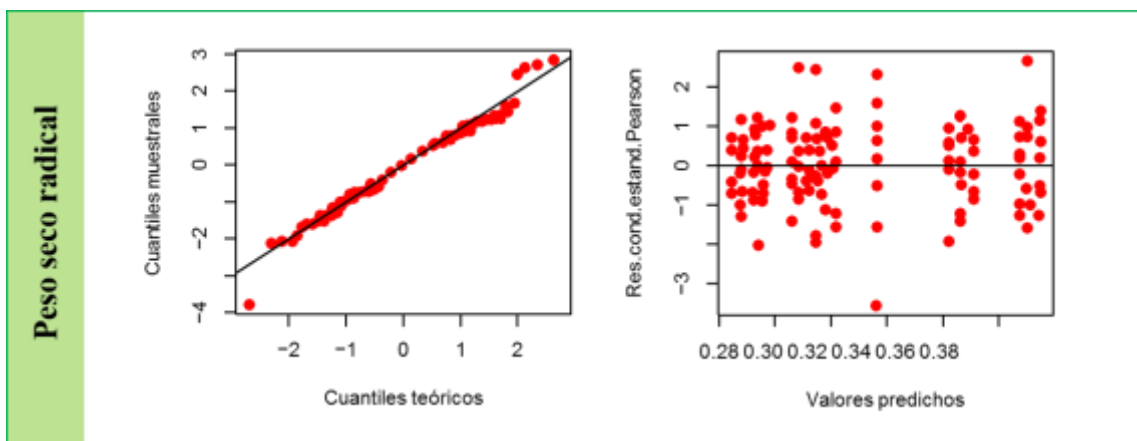
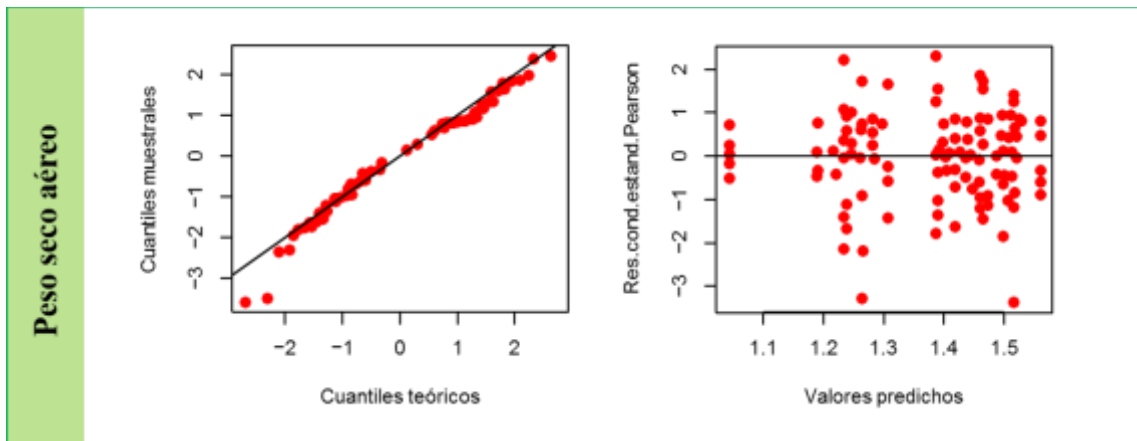
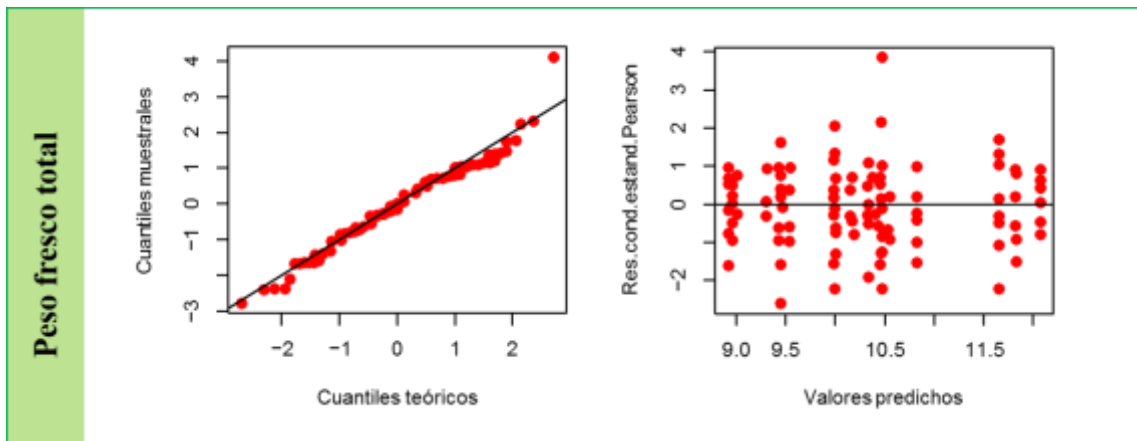
VIII.1. Comprobación de los supuestos

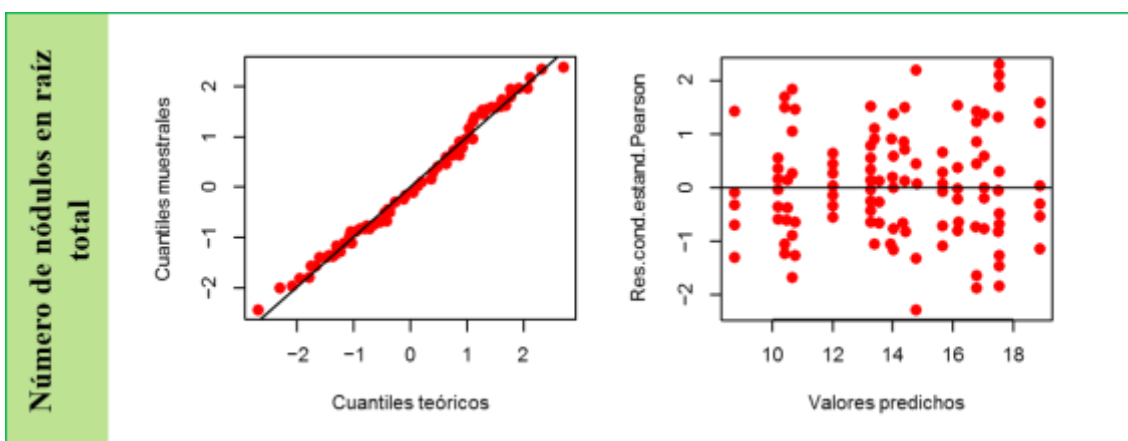
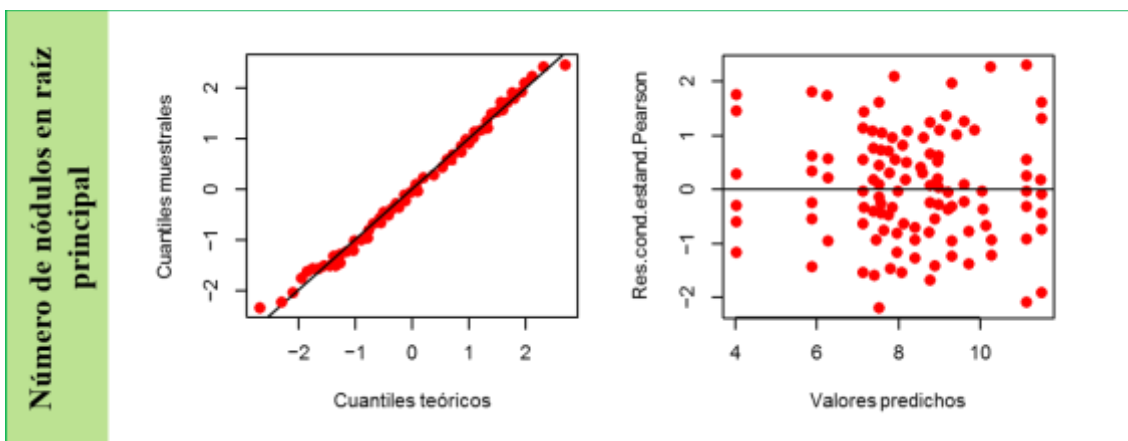
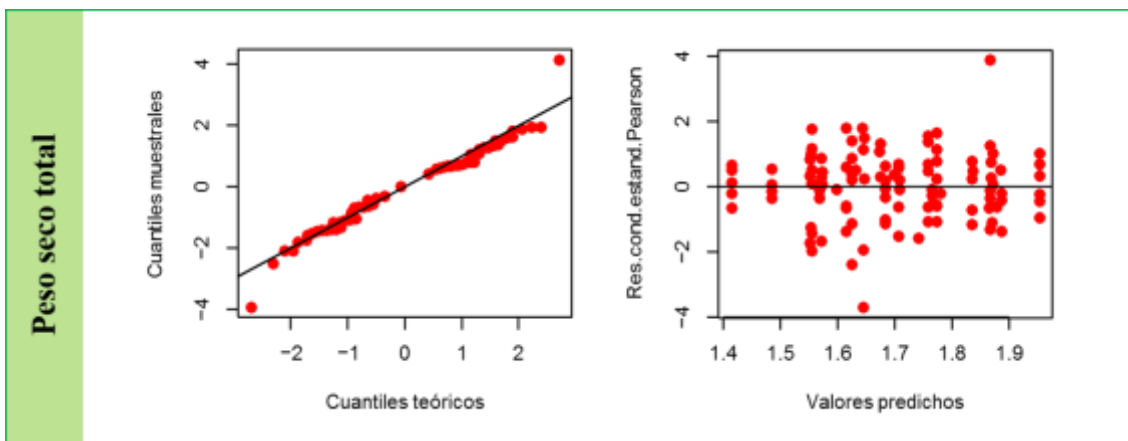
A continuación, se presenta el análisis de los supuestos de normalidad (Q-Q plot) y homocedasticidad (gráfico de residuos versus predichos), los cuales verifican que todas las variables estudiadas cumplen con los supuestos. Debido a la aleatorización de los tratamientos, los errores se asumen independientes.

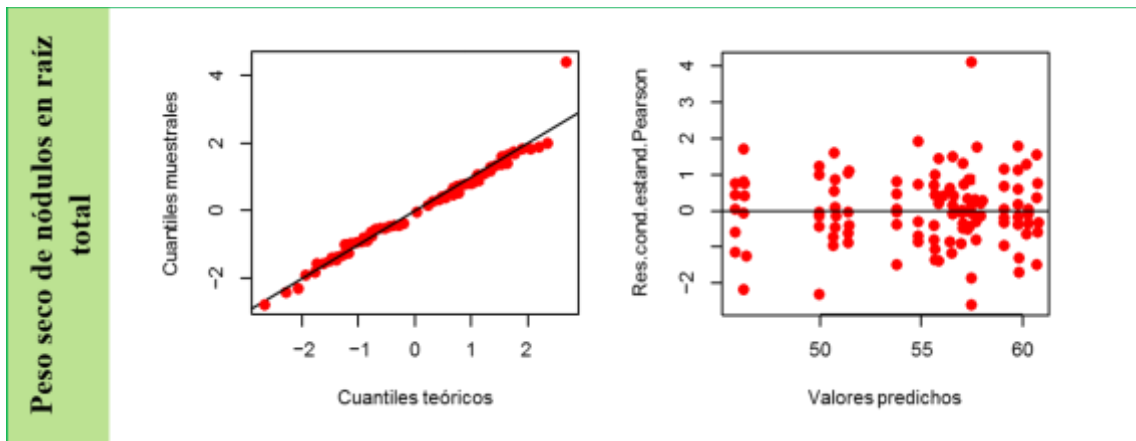
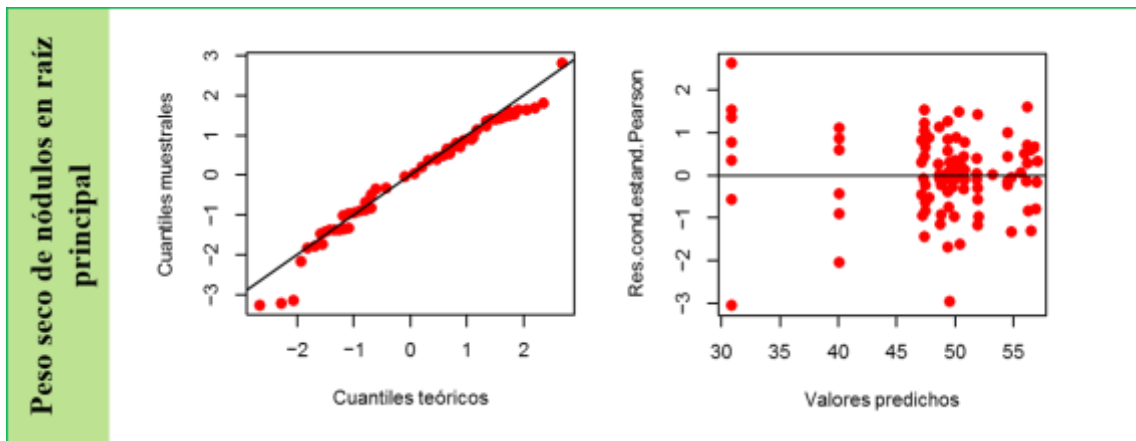
VIII.1.1. Ensayo en cámara de crecimiento



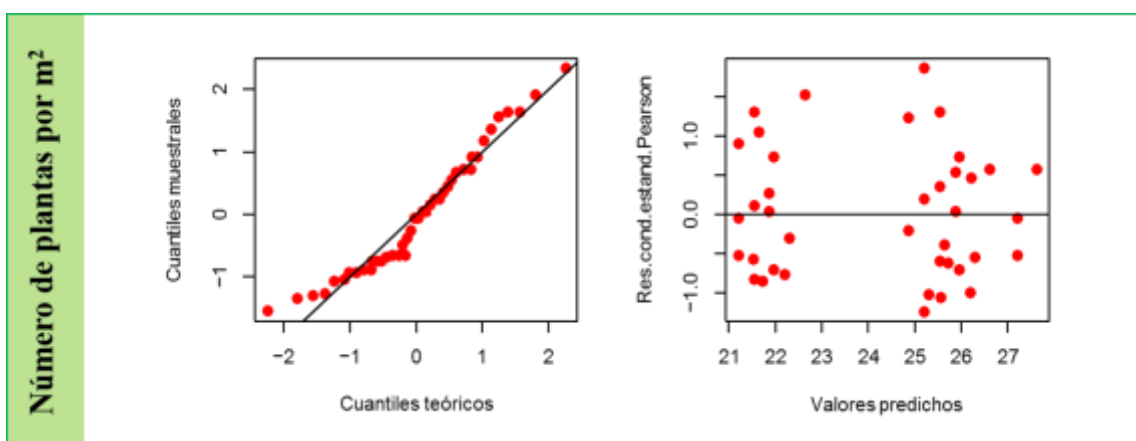




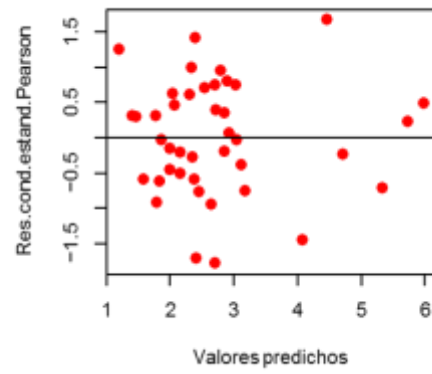
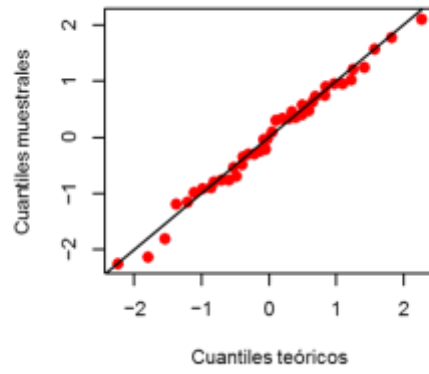




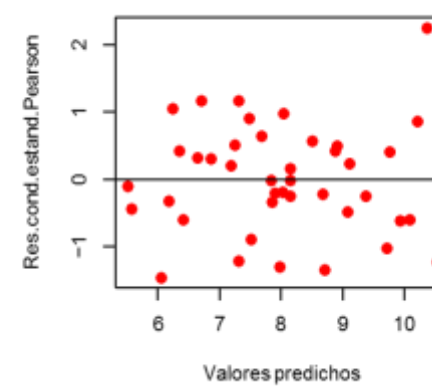
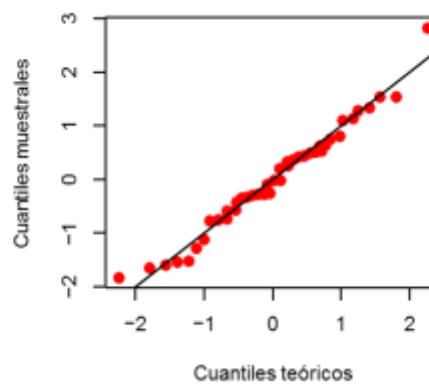
VIII.1.2. Ensayo a campo



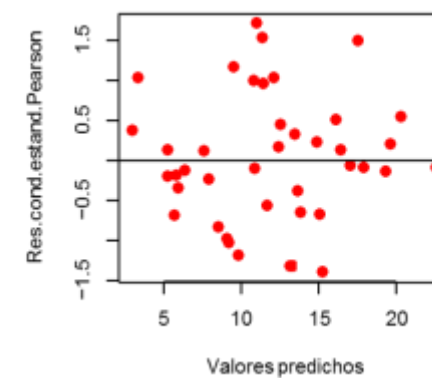
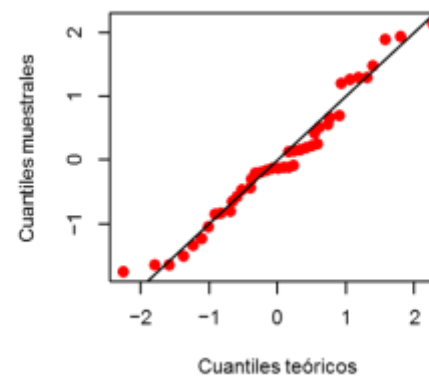
Número de nódulos en raíz principal



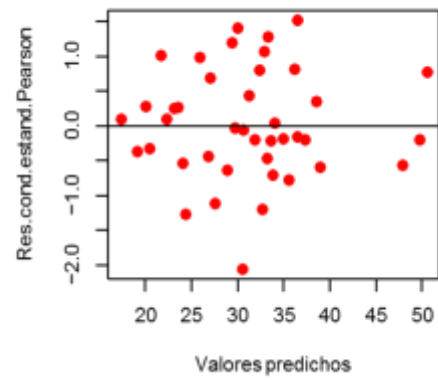
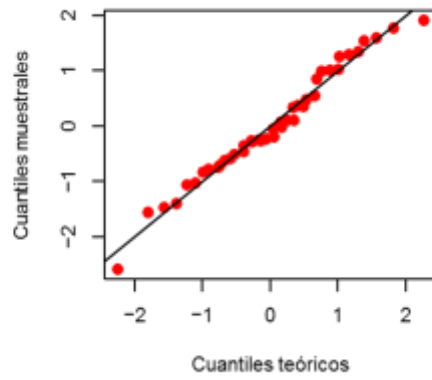
Número de nódulos en raíz total



Peso seco de nódulos en raíz principal



Peso seco de nódulos en raíz total



Rendimiento

