Ciencia del Suelo 15: 28-32 1997

NATURALIZACION Y SUPERVIVENCIA SAPROFITICA DE DOS CEPAS DE *Bradyrhizobium japonicum* EN SUELOS ARGIUDOLES DE BALCARCE

L TRINGALI[1], N GONZALEZ,[2] Y ANDREOLI[2]

[1]FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina [2]Unidad Integrada INTA-FCA Balcarce. CC 276, (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina

NATURALIZATION AND SAPROPHYTIC SURVIVAL OF TWO STRAINS OF *Bradyrhizobium japonicum* IN ARGIUDOLLS FROM BALCARCE

Bradyrhizobium japonicum is naturally absent in soils from the south east of Buenos Aires Province; so, to assess its naturalization and saprophytic survival ability is meaningful. The recovery of *B. japonicum* USDA 110 and CB 1809 that had been inoculated in 1980, 1982 and 1991 was performed. Inoculants had originally contained four strains which included USDA 110 for fields 1980 and 1982 and only CB 1809 for 1991. A fourth field which had been inoculated with a mixture of both strains in 1988, was being cropped to soybeans inoculated with *B. japonicum* SEMIA 587 and USDA 138 at the moment of sampling. From this 1988 field, nodules were randomly collected from 55 plants. MPN counts of naturalized *B. japonicum* were assessed in soil samples from fields 1980, 1982 and 1991. Soybean sterilized seeds were planted in plastic pots containing soil from all fields, except 1988. At R6 stage all spontaneous nodules were collected, counted and deep frozen until analysis. Nodule occupancy was determined by the immunodifussion gel assay. MPN of *B. japonicum* was 25.2×10^4; 14.1×10^3 and 18.2×10^2 for fields 1980, 1982 and 1991. Mean spontaneous nodule number per plant was 190; 135 and 209 for the same sites. For 1988 field, mean nodule number per plant was 69. USDA 110 occupancy in spontaneous nodules 13 and 11 years after inoculation was 14.7% and 0.2%. Relative occupancy by USDA 110 and CB 1809 in nodules from the plants cropped at 1988 field was 6.9% and 26.4%. Fifty seven percent of tested nodules from 1991 field gave homologous reaction to anti CB 1809 antiserum. Both strains showed to naturalize and survive saprophytically, even when USDA 110 was recovered in variable proportions. CB 1809, when naturalized in the soil, seemed to be more competitive than USDA 110 and competed with success against the recently inoculated strains.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum* - Nodulation - Saprophytic survival - Competitive ability

INTRODUCCION

La simbiosis *Glycine max* - *Bradyrhizobium japonicum* proporciona entre el 25% y el 84% del nitrógeno que el cultivo de soja acumula en su biomasa total, según sean las características del ecosistema en el que se desarrolla (Khol *et al.* 1980, Patterson, La Rue 1983). El nitrógeno acumulado en el rendimiento biológico condiciona, a su vez, el nivel de productividad (Venturi, Amaducci 1984) y la concentración proteica del grano (Leffel *et al.* 1992). Por esta razón, en los suelos donde *B. japonicum* no está presente se inocula la semilla, a los efectos de asegurar la simbiosis. Prácticamente todos los suelos del mundo que han sido dedicados al cultivo de soja, han sido objeto de la introducción de diversas cepas de *B. japonicum*, sin que la práctica estuviera respaldada por estudios concluyentes respecto de su eficiencia en la fijación de N_2. Una vez incorporadas al suelo, las cepas se naturalizan y comienza a operar el fenómeno de competencia entre las naturalizadas y las inoculadas. La competitividad consiste en la habilidad relativa que posee una cepa con respecto a otras para formar nódulos en una planta con un genotipo dado (Amarger, Lobreau 1982). Es una cualidad intrínseca de cada una de ellas, pero depende también de la magnitud relativa de las poblaciones del resto de las cepas presentes, de factores ambientales e incluso de la planta huésped (Amarger, Lobreau 1982, Dreyfus *et al.* 1988, Hicks, Loynachan 1988). Es este fenómeno el que impide la expresión de las potencialidades de cepas de *B. japonicum* seleccionadas o incluso mejoradas por técnicas de bioingeniería, cuando se las intenta asociar a un cultivo de soja en un suelo con población naturalizada (Barnet 1991). Ello implica que se debe tener mucho cuidado respecto de qué materiales se introducen en suelos vírgenes de *B. japonicum*. En vista de la competencia, es necesario incorporarar solamente cepas de calidad reconocida y si es posible muy pocas o una sola, a fin de no aumentar la variabilidad de la población del suelo. El empleo de esta estrategia brinda, eventualmente, la oportunidad de superar la competitividad de una sola cepa, si en el futuro se obtiene otra mejor. En

este marco, resulta imprescindible verificar la capacidad de supervivencia saprofítica de cepas seleccionadas de *B. japonicum* y su posibilidad de generar nodulación espontánea desde la población naturalizada del suelo. Esto implicaría aprovechar ventajosamente el fenómeno de competencia.

B. japonicum se encuentra ausente en los suelos del Sudeste Bonaerense (González 1988) excepto en aquellos lotes en los que se ha sembrado soja inoculada, que representan actualmente sólo una proporción pequeña de las tierras aptas para el cultivo. Constituye una responsabilidad, desde el punto de vista ecológico, incorporar solamente razas de *B. japonicum* cuyo comportamiento, a nivel regional, esté avalado por investigación sólida. González (1994) ha demostrado, en términos de rendimiento y acumulación de nitrógeno en grano, las ventajas de inocular suelos desprovistos de *B. japonicum* con las cepas USDA 110 y CB 1809. Es necesario, entonces, confirmar la capacidad de adaptación, naturalización y supervivencia en el suelo, a través del tiempo, de las dos razas y definir la naturaleza de la competencia entre ambas, una vez naturalizadas. En consecuencia, se hipotetiza que *B. japonicum* se naturaliza en los Argiudoles del Sudeste Bonaerense y puede generar nodulación en una magnitud similar a la conseguida por inoculación en suelos libres de esta bacteria. Asimismo, se propone que las cepas USDA 110 y CB 1809 sobreviven saprofíticamente en el suelo y al cabo de un lapso que va entre dos y catorce años pueden generar nódulos espontaneos. Los objetivos del presente trabajo son 1) estimar el número de *B. japonicum* totales, naturalizados en Argiudoles, francos, ilíticos, térmicos entre dos y trece años después de haber sido incorporadas a los mismos. 2) establecer la proporción de nódulos espontaneos generados por las cepas USDA 110 y CB 1809, naturalizadas en el suelo durante un período de dos a trece años, en plantas de soja desarrolladas a partir de semilla esterilizada y 3) determinar la competitividad relativa de USDA 110 y CB 1809, entre sí y frente a otras cepas inoculadas, tras cinco años de supervivencia saprofítica en ausencia del cultivo homólogo.

MATERIALES Y METODOS

En diciembre de 1993 se extrajeron muestras de suelo procedentes de tres lotes del campo Experimental de la Unidad Integrada EEA INTA Balcarce - FCA, UNMdP, los cuales habían sido sembrados con soja en los años 1980, 1982 y 1991, de aquí en más reconocidos como lotes 1980, 1982 y 1991. Los cultivos sembrados en 1980 y 1982 habían sido inoculados con inoculante experimental, formulado en base a cepas de *B. japonicum* de los serogrupos C1 y C3, USDA 110 y 61 AC 101. El cultivo de 1991 había sido inoculado con la cepa CB 1809. Asimismo, se muestrearon directamente nódulos de un cuarto lote que en el año 1988 había sido cultivado con soja inoculada con las razas USDA 110, CB 1809 y 29 W. Este cultivo, muestreado en marzo de 1994, había sido inoculado en noviembre de 1993 con inoculante formulado con USDA 138 y Semia 587, serológicamente diferenciables de CB 1809 y USDA 110. Las muestras de suelo, compuestas por 65 submuestras para el lote 1980, 151 submuestras para el lote 1982 y 90 para el lote 1991, fueron analizadas en cuanto a sus propiedades químicas más relevantes (Tabla 1). Las historias de cultivo de los mismos lotes, desde la siembra de soja que se toma como punto de partida, se consignan en la Tabla 2.

Tabla 1. Características químicas de los lotes muestreados

Lote	pH	Fósforo * (ppm)	Materia Orgánica (%)
1980	5,5	42,22	5,79
1982	5,8	25,40	5,93
1988	6,0	17,64	4,97
1991	5,7	111,13	5,45

* Método de Bray y Kurtz I

En una alícuota del suelo muestreado, para cada uno de los tres lotes, se analizó el número más probable (NMP) de *B. japonicum* (Brockwell 1980). El resto fue homogeneizado y fraccionado en macetas que contenían aproximadamente 9 kg de suelo, respetando la identificación por año. Para 1980 se utilizaron catorce macetas; para 1982, veintiséis y para 1991, trece. Fueron ubicadas en el campo, en hileras separadas entre sí a 0,70 m, para simular un cultivo convencional de soja. Se las enterró a una profundidad aproximada de 0,50 m, para evitar alteraciones en la temperatura de las raíces. Cada maceta fue sembrada con semillas esterilizadas de soja del cultivar Asgrow 3127. Se lograron 36 plantas para 1980, 58 para 1982 y 55 para 1991. Se

Tabla 2. Historia de cultivo de los lotes muestreados

Año	Lote 1980	Lote 1982	Lote 1988	Lote 1991
1980	soja			
1981	hist. desc.*			
1982	trigo	soja		
1983	trigo papa maíz	trigo		
1984	trigo papa maíz	hist. desc.*		
1985	girasol	trigo		
1986	girasol	trigo		
1987	hist. desc.*	girasol		
1988	avena	trigo avena	soja	
1989	avena	avena	trigo	
1990	maíz	maíz	girasol	
1991	trigo-soja**	maíz	papa	soja
1992	zapallo	maíz	trigo	maíz
1993	zapallo	trigo	soja***	papa

soja: cultivo de referencia; inoculado con las cepas de *B. japonicum* descriptas. soja**: Cultivo con inoculación comprobada, pero se desconocen los componentes del inoculante. soja***: Cultivo con inoculación conocida, del cual se muestrearon nódulos. hist. desc*: No se puede precisar el uso del suelo, pero se excluye la soja.

este marco, resulta imprescindible verificar la capacidad de supervivencia saprofítica de cepas seleccionadas de *B. japonicum* y su posibilidad de generar nodulación espontánea desde la población naturalizada del suelo. Esto implicaría aprovechar ventajosamente el fenómeno de competencia.

B. japonicum se encuentra ausente en los suelos del Sudeste Bonaerense (González 1988) excepto en aquellos lotes en los que se ha sembrado soja inoculada, que representan actualmente sólo una proporción pequeña de las tierras aptas para el cultivo. Constituye una responsabilidad, desde el punto de vista ecológico, incorporar solamente razas de *B. japonicum* cuyo comportamiento, a nivel regional, esté avalado por investigación sólida. González (1994) ha demostrado, en términos de rendimiento y acumulación de nitrógeno en grano, las ventajas de inocular suelos desprovistos de *B. japonicum* con las cepas USDA 110 y CB 1809. Es necesario, entonces, confirmar la capacidad de adaptación, naturalización y supervivencia en el suelo, a través del tiempo, de las dos razas y definir la naturaleza de la competencia entre ambas, una vez naturalizadas. En consecuencia, se hipotetiza que *B. japonicum* se naturaliza en los Argiudoles del Sudeste Bonaerense y puede generar nodulación en una magnitud similar a la conseguida por inoculación en suelos libres de esta bacteria. Asimismo, se propone que las cepas USDA 110 y CB 1809 sobreviven saprofíticamente en el suelo y al cabo de un lapso que va entre dos y catorce años pueden generar nódulos espontaneos. Los objetivos del presente trabajo son 1) estimar el número de *B. japonicum* totales, naturalizados en Argiudoles, francos, ilíticos, térmicos entre dos y trece años después de haber sido incorporadas a los mismos. 2) establecer la proporción de nódulos espontaneos generados por las cepas USDA 110 y CB 1809, naturalizadas en el suelo durante un período de dos a trece años, en plantas de soja desarrolladas a partir de semilla esterilizada y 3) determinar la competitividad relativa de USDA 110 y CB 1809, entre sí y frente a otras cepas inoculadas, tras cinco años de supervivencia saprofítica en ausencia del cultivo homólogo.

MATERIALES Y METODOS

En diciembre de 1993 se extrajeron muestras de suelo procedentes de tres lotes del campo Experimental de la Unidad Integrada EEA INTA Balcarce - FCA, UNMdP, los cuales habían sido sembrados con soja en los años 1980, 1982 y 1991, de aquí en más reconocidos como lotes 1980, 1982 y 1991. Los cultivos sembrados en 1980 y 1982 habían sido inoculados con inoculante experimental, formulado en base a cepas de *B. japonicum* de los serogrupos C1 y C3, USDA 110 y 61 AC 101. El cultivo de 1991 había sido inoculado con la cepa CB 1809. Asimismo, se muestrearon directamente nódulos de un cuarto lote que en el año 1988 había sido cultivado con soja inoculada con las razas USDA 110, CB 1809 y 29 W. Este cultivo, muestreado en marzo de 1994, había sido inoculado en noviembre de 1993 con inoculante formulado con USDA 138 y Semia 587, serológicamente diferenciables de CB 1809 y USDA 110. Las muestras de suelo, compuestas por 65 submuestras para el lote 1980, 151 submuestras para el lote 1982 y 90 para el lote 1991, fueron analizadas en cuanto a sus propiedades químicas más relevantes (Tabla 1). Las historias de cultivo de los mismos lotes, desde la siembra de soja que se toma como punto de partida, se consignan en la Tabla 2.

Tabla 1. Características químicas de los lotes muestreados

Lote	pH	Fósforo * (ppm)	Materia Orgánica (%)
1980	5,5	42,22	5,79
1982	5,8	25,40	5,93
1988	6,0	17,64	4,97
1991	5,7	111,13	5,45

* Método de Bray y Kurtz I

En una alícuota del suelo muestreado, para cada uno de los tres lotes, se analizó el número más probable (NMP) de *B. japonicum* (Brockwell 1980). El resto fue homogeneizado y fraccionado en macetas que contenían aproximadamente 9 kg de suelo, respetando la identificación por año. Para 1980 se utilizaron catorce macetas; para 1982, veintiséis y para 1991, trece. Fueron ubicadas en el campo, en hileras separadas entre sí a 0,70 m, para simular un cultivo convencional de soja. Se las enterró a una profundidad aproximada de 0,50 m, para evitar alteraciones en la temperatura de las raíces. Cada maceta fue sembrada con semillas esterilizadas de soja del cultivar Asgrow 3127. Se lograron 36 plantas para 1980, 58 para 1982 y 55 para 1991. Se

Tabla 2. Historia de cultivo de los lotes muestreados

Año	Lote 1980	Lote 1982	Lote 1988	Lote 1991
1980	soja			
1981	hist. desc.*			
1982	trigo	soja		
1983	trigo papa maíz	trigo		
1984	trigo papa maíz	hist. desc.*		
1985	girasol	trigo		
1986	girasol	trigo		
1987	hist. desc.*	girasol		
1988	avena	trigo avena	soja	
1989	avena	avena	trigo	
1990	maíz	maíz	girasol	
1991	trigo-soja**	maíz	papa	soja
1992	zapallo	maíz	trigo	maíz
1993	zapallo	trigo	soja***	papa

soja: cultivo de referencia; inoculado con las cepas de *B. japonicum* descriptas. soja**: Cultivo con inoculación comprobada, pero se desconocen los componentes del inoculante. soja***: Cultivo con inoculación conocida, del cual se muestrearon nódulos. hist. desc*: No se puede precisar el uso del suelo, pero se excluye la soja.

las mantuvo libres de déficit hídrico mediante riego. En R6, llenado de granos (Fehr, Caviness 1977), fueron descalzadas de las macetas y se extrajo la totalidad de los nódulos espontaneos crecidos en las raíces. Una vez lavados, se los contó y se los conservó a -18 °C. Del lote identificado como 1988, sembrado con soja, se muestrearon 55 plantas, de las cuales se extrajeron todos los nódulos que fueron lavados y conservados como se detalló.

Por cada lote se analizaron aproximadamente 500 nódulos, mediante inmunodifusión en gel de agar (Zablotowicz, Focht 1981). Los antisueros anti USDA 110 y anti CB 1809 se prepararon según Vincent (1970). Los cultivos procedentes de nódulos seropositivos a USDA 110 y CB 1809 se purificaron y se reservaron para estudios ulteriores.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 3 se presentan las estimaciones del NMP de *Bradyrhizobium japonicum* para los tres lotes analizados. La población detectada en el lote 1980 es mayor que la de los subsiguientes. Esto puede ser debido a que en el año 1991 se cultivó soja inoculada en ese lote (Tabla 2), generándose, o bien una incorporación de *B. japonicum* o una estimulación de las cepas ya naturalizados, por efecto de las plantas. La diferencia que se registra entre los lotes 1982 y 1990, cuya historia no indica un cultivo de soja adicional pasado el año 1982, podría explicarse por la variabilidad espacial en la distribución de las bacterias, por efectos estimulatorios de malezas o cultivos diferentes de la soja (Hicks, Loynachan 1989). En la Tabla 4 se resumen los valores de nodulación espontánea correspondientes a las muestras obtenidas de los lotes 1980, 1982 y 1991, y el número medio de nódulos por planta registrado en el lote 1988.

Tabla 3. Número más orobable (NMP) de *B. japonicum* por g de suelo en los tres lotes analizados.

Lote	NMP de *B. japonicum*	Intervalo de confianza
1980	$25,2 \times 10^4$	$8,6 - 74,0 \times 10^4$
1982	$14,1 \times 10^3$	$5,4 - 36,7 \times 10^3$
1991	$18,2 \times 10^2$	$6,9 - 48,4 \times 10^2$

Tabla 4. Variables asociadas a la nodulación

Lote	Número de plantas muestreadas	Nódulos por planta Promedio
1980	36	190
1982	58	135
1988	55*	69
1991	32	209

* Plantas muestreadas directamente de campo. Los nódulos proceden de la población naturalizada del suelo y del inoculante utilizado a la siembra

El promedio de nódulos por planta correspondiente al lote 1988 es sensiblemente menor que el resto, hecho que se explica porque los nódulos fueron muestreados de un cultivo de soja conducido a campo, donde el déficit hídrico, la presencia de malezas y otras limitantes ambientales no controladas influyeron en la definición de la nodulación. Los valores de los lotes 1980, 1982 y 1991, surgen de plantas crecidas en macetas, sin limitaciones hídricas y con un control total sobre el desarrollo de malezas. Es probable que el ambiente restringido de la maceta, conducente a una limitación en la oferta de nitrógeno combinado por parte del suelo haya contribuído, asimismo, a estimular la nodulación.

En todas las plantas cultivadas en suelos de los tres lotes muestreados se registró nodulación a 3 cm por debajo del cuello, fundamentalmente sobre la raíz principal. Esto demuestra que la entrada de *B. japonicum* ocurrió en los primeros estadios del crecimiento de la raíz, ya que a medida que ésta se desarrolla pierde rápidamente la capacidad de formar nódulos y finalmente éstos sólo pueden formarse en las raíces laterales (Zdor, Pueppke 1988). Existen dos posibles explicaciones para la nodulación en la raíz principal con las características mencionadas anteriormente: 1) que las semillas contengan una alta concentración de inóculo; planteo que se descarta porque en el experimento a campo se utilizó únicamente semillas esterilizadas y 2) que la concentración de *B japonicum* naturalizadas sea alta, hasta el punto de poder generar nodulación cuantitativamente exitosa.

Experimentos conducidos en los mismos suelos de Balcarce, vírgenes de *B. japonicum* han producido, en condiciones de campo y tras una densa inoculación, valores de nodulación del orden de 40 nódulos por planta (González y colaboradores, datos no publicados). La comparación de esta información con los resultados expuestos en la Tabla 4 indica que la población naturalizada, cuando es expuesta a condiciones favorables, puede exceder ampliamente la capacidad de nodulación de una inoculación exitosa.

Se ha puesto en evidencia el éxito de la adaptación de *B. japonicum* a la vida saprofítica en los suelos del Sudeste Bonaerense, hecho nada sorprendente a la luz de la profusa bibliografía que ilustra este fenómeno en el mundo (Ozawa, Yamaguchi 1986, Brunel *et al.* 1988, Hicks, Loynachan 1989). Además, se ha corroborado que el atributo fenotípico de nodulación no fue perdido durante la etapa saprofítica (Tabla 4). Esto confirma los resultados de Brunel *et al.* (1988) y de Lochner *et al.* (1989) que han comprobado la estabilidad de *B. japonicum* después de un período de trece años de vida saprofítica. Sin embargo, al utilizarse en este trabajo el atributo de nodulación para capturar y valorar las pobla-

ciones, se reconoce que pudo no haberse detectado una porción desconocida, de la carga total de *B. japonicum* que hubiera perdido tal atributo. En base a los ensayos efectuados, no se puede afirmar si hubo variación en las características genotípicas de las cepas recuperadas.

En la Tabla 5 se presenta la información correspondiente a la ocupación relativa de las cepas USDA 110 y CB 1809, en los nódulos generados a partir de la población naturalizada de *B. japonicum*.

Se advierte la irregularidad en la recuperación de USDA 110 naturalizada, principalmente cuando se confrontan los lotes 1980 y 1982. Una estimulación específica por el cultivo de soja efectuado en 1991 (Tabla 2) sobre la población total de *B. japonicum*, de la cual USDA 110 era parte, puede aportar una explicación; no debe descartarse, sin embargo la incorporación de la propia USDA 110 en el inóculo del que no se tienen referencias. Otro aspecto que debe destacarse es la competencia relativa de 33,3 % de dos cepas naturalizadas durante cinco años en el lote 1988, frente a una inoculación reciente. Respecto de la competencia intercepas, CB 1809 se recupera en un 382% en relación a USDA 110.

Las cepas USDA 110 y CB 1809, cuya naturalización y capacidad competitiva se ha demostrado, son reconocidas en el mundo por su eficiencia (Moawad 1988) y también en el caso particular de los suelos del Sudeste Bonaerense (González 1994). Los resultados obtenidos tienen, por lo tanto, derivaciones de orden ecológico y práctico. Para Johnson (1965), Kamicker, Brill (1986) y Weber *et al.* (1989), con una concentración de *B. japonicum* naturalizadas del orden de 10^4 ufc g^{-1} de suelo, la nodulación con otras cepas recién inoculadas se ve muy disminuída, lográndose con estas últimas una participación del 5 al 20% de la nodulación total.

Si la intención es incorporar nuevas cepas con atributos cada vez más relevantes, a medida que vayan siendo identificadas o aún sintetizadas por técnicas biomoleculares, sería deseable que las naturalizadas tuvieran una sobrevivencia efímera. De este modo se lograría contrarrestar el efecto competitivo ya que se dejaría un nicho que podría ser ocupado por cepas más eficientes, con mayor impacto sobre la definición del rendimiento del cultivo. No obstante, se ha demostrado que las cepas se naturalizan, sobreviven y compiten. Según Kamicker y Brill (1986) las cepas naturalizadas persisten en los suelos, aún sin cultivos de soja, durante por lo menos 30 años. En el experimento que se informa las bacterias han sobrevivido entre dos y trece años y se han manifestado capaces de generar una nodulación equivalente a la producida por inoculación. Esto lleva a la reflexión de que en zonas vírgenes de *B. japonicum* es esencial incorporar solamente cepas reconocidas como eficientes para que una vez naturalizadas puedan producir una nodulación espontanea pero de la misma eficiencia que esos mismos materiales inoculados. Hasta que haya resultados concluyentes respecto de la estabilidad genética de las cepas de *B. japonicum* que se naturalizan en el suelo, que con seguridad se obtendrán con las técnicas de fingerprinting en los próximos años, no hay evidencias para suponer que *B. japonicum* pierde, en el proceso de naturalización, atributos relacionados a la capacidad de nodulación o a la eficiencia de fijación de nitrógeno (Van Rensburg, Stridjom 1985, Brunel *et al.* 1988, Lochner *et al.* 1989).

Como conclusión se este trabajo se puede afirmar que *B. japonicum* se naturaliza y sobrevive saprofíticamente en los suelos del Sudeste Bonaerense. La nodulación espontanea producida por las cepas naturalizadas es de una magnitud comparable a la obtenida a partir de una inoculación exitosa efectuada en el mismo tipo de suelo, pero libre de estas bacterias. Los nódulos generados espontáneamente por ellas demuestran que, al menos una porción de la población naturalizada ha mantenido su capacidad de nodulación. USDA 110 se recupera en proporciones variables después de trece, once y cinco años de haber sido incorporada al suelo. CB 1809 también se recupera, después de cinco y dos años de su inoculación. La competitividad relativa de USDA 110 y CB 1809 juntas es del 33,3% con respecto a otras cepas, sean éstas recientemente inoculadas y/o naturalizadas. CB 1809 muestra una capacidad competitiva 3,82 veces superior a la exhibida por USDA 110, cuando se evalúa la competencia entre ambas a partir de la población naturalizada desde cinco años atrás.

Tabla 5. Análisis serológico de las muestras

Lote	Cepas rastreadas	Número de nódulos procesados	Número de nódulos positivos	Porcentaje de nódulos positivos
1980	USDA 110	497	73	14,7
1982	USDA 110	500	1	0,2
1988	USDA 110	492	34	6,9
1988	CB 1809	492	130	26,4
1991	CB 1809	472	267	56,6

REFERENCIAS

Amarger N, Lobreau JP. 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. Applied Environm. Microbiol 44:583 - 588

Barnet YM. 1991. Ecology of legume root - nodule bacteria. En *M.J. Dilworth and A.R. Glenn (Eds.), Biology and*

biochemistry of nitrogen fixation. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp.199 - 228

Brockwell J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes - principles and practice. En F. Bergersen (Ed.), Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley, Chichester, U K. pp. 417 - 488

Brunel B, Cleyet-Marel J, Normand P, Bardin, R 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. Applied Environm. Microbiol. 54:2636 - 2642

Dreyfus BL, Diem HG, Dommergues YR. 1988. Future directions for biological nitrogen fixation research. Plant Soil 108:191 - 199

Fehr WR, Caviness CE. 1977. Stages of soybean development. Iowa Agric. Exp. Stn. SR-80. 11 pp

González N. 1988. La simbiosis soja - *Rhizobium japonicum* en el Sudeste Bonaerense. En Jornadas de Actualización Técnica en Producción y Comercialización del Cultivo de Soja en el Sudeste Bonaerense, 2as. Mar del Plata, Agosto 18-19. EEA INTA Balcarce; FCA, UNMdP; MAA; CIAM; AIAB; AIAGA. pp. 60 - 64

González N. 1994. Dinámica de la fijación de nitrógeno en soja, en suelos con alta fertilidad nitrogenada. Tesis Magister Science. Escuela de Postgrado en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. 62 pp

Hicks PM, Loynachan TE. 1988. Bacteria of the soybean rhizosfere and their effect on growth of *Bradyrhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem. 21:561 - 566

Johnson HW, Means UM, Weber CR. 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. Agron. J. 57:179 - 185

Kamicker BJ, Brill W. 1986. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodules isolated from Wisconsin soybean farms. Applied Environm. Microbiol. 51: 487 - 492

Khol DH, Shearer G, Harper JE. 1980. Estimates of N_2 fixation based on differences in the natural abundance of ^{15}N in nodulating and non nodulating isolines of soybeans. Plant Physiol. 66: 61 - 65

Leffel RC, Cregan PB, Bolgiano AP, Thibeau DJ. 1992. Nitrogen metabolism of normal and high seed protein soybean. Crop Sci. 32:747 - 750

Lochner HH, Strijdom BW, Law IJ. 1989. Unaltered nodulation competitiveness of a strain of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) after a decade in soil. Applied Environm. Microbiol. 55:3000 - 3008

Moawad H, Badr El Din SMS, Khalafallah MA. 1988. Persistence and competitiveness of three *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains in clay loam Nile valley soil. Plant Soil 108:137 - 141

Ozawa T, Yamaguchi M. 1986. Fractionation and estimation of particle - attached and unattached *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. Applied Environm. Microbiol. 52:911 - 914

Patterson TG, La Rue TA. 1983. Nitrogen fixation by soybeans: seasonal and cultivar effects, and comparison of estimates. Crop Sci 23: 488 - 492

Van Rensberg H, Strijdom B W. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. Applied Environm. Microbiol. 49:127 - 131

Venturi G, Amaducci MT. 1984. La soja. Edagricola, Bologna., Italia. 255 pp.

Vincent JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. (IBP handbook 5). Blackwell Scientific publications, Oxford. 164 pp

Vincent JM. 1974. Root-nodule symbioses with Rhizobium japonicum. En A. Quispel (Ed.). The Biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing & Co., Amsterdam. pp. 265 - 332

Weber DF, Keiser HH, Uratsu SL. 1989. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from U.S. soybean production areas. Agron. J. 81:786 - 789

Zablotowicz RM, Focht DD. 1981. Physiological characteristics of cowpea rhizobia. Evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Applied Environm Microbiol 41:679 - 685

Zdor RP, Pueppke SG 1988. Early infection and competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138. Applied Environm Microbiol 54:1996 - 2002