

NODULACION Y NUTRICION NITROGENADA EN SOJAS CONVENCIONALES Y RESISTENTES A GLIFOSATO INOCULADAS CON *Bradyrhizobium japonicum*

FA MONTERO, KM FILIPPI, MA SAGARDOY

Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina

Recibido 21 de septiembre de 2001, aceptado 5 de diciembre de 2001

NODULATION AND NITROGEN NUTRITION IN CONVENTIONAL AND GLYPHOSATE RESISTANT SOYBEAN INOCULATED WITH *Bradyrhizobium japonicum*

Numerous glyphosate resistant soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars are cropped in Argentina, though sufficient information about the symbiosis capacity of *B. japonicum* with each cultivar is lacking. Therefore, our objective was to evaluate different parameters of nodulation and nitrogen nutrition in four conventional and fifteen glyphosate resistant soybean cultivars originated from seeds inoculated with liquid inoculant containing *B. japonicum* E109. The assay was conducted in a growth chamber under controlled conditions (22-25 °C, 16 h of light, 8 h of dark, soil at field capacity). The soil used was *B. japonicum* free. After six weeks (V3 soybean growing stage) different parameters related to nodulation were measured. When all cultivars were tested together significant differences were found in nodule number per plant, nodule dry mass per plant, shoot and root dry mass per plant, dry mass per nodule, and total nitrogen concentration and content. The number of nodule per plant was similar in glyphosate resistant and conventional soybean cultivars. However, the nodule dry mass per plant, shoot and root dry mass per plant, dry mass per nodule, and total nitrogen concentration and content was 4.8 to 14.2 % higher in conventional than in glyphosate resistant cultivars. Considering all resistant and non resistant cultivars together, significant relationships between nodule dry mass and shoot accumulated total nitrogen, between nodule dry mass and shoot dry mass, and between shoot dry mass and shoot accumulated total nitrogen were determined. Under the conditions of this assay the compatibility between *B. japonicum* E109 and each conventional or glyphosate resistant soybean cultivar was different because a wide range of nodulation and nitrogen nutrition were observed.

Key words: liquid inoculant, nodulation, glyphosate resistant soybean, symbiosis.

INTRODUCCION

La producción de granos de soja (*Glycine max* L. Merrill) depende de un adecuado suplemento de nitrógeno y para ello es esencial que se practique una inoculación infectiva y efectiva con su microsimbionte específico. La inoculación de soja con *B. japonicum*, en suelos donde se la cultivó por primera vez como los del sudeste bonaerense, incrementó la producción de semillas de esa leguminosa (Ham *et al.* 1971). Sin embargo, es más difícil el aumento de la producción de semilla de soja por la inoculación cuando existen en el suelo cepas naturalizadas de *B. japonicum* (Streeter 1994). En Iowa, USA, se demostró que el recobre de cepas de *B. japonicum* en nódulos de soja estaba influenciado por la cantidad de inoculante aplicado, por el tipo de cepa utilizada en el inoculante y por la población de

rizobios del suelo (Weaver, Frederick 1974).

Los inoculantes comerciales disponibles pueden variar en su número y en la efectividad de los rizobios que los componen y en ciertos casos, transportar organismos contaminantes capaces de inhibir a los microsimbiontes que forman parte de esos inoculantes (Olsen *et al.* 1996). El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta a la inoculación con *B. japonicum* en cultivares de soja, convencionales y resistentes a glifosato.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron quince variedades de soja (A 3901 RG, A 4423 RG, A 4456 RG, A 4657 RG, A 5409 RG, A 5435 RG, A 5634 RG, A 5818 RG, A 5901 RG, A 6401 RG, A 6445 RG, A 8000 RG, A 9000 RG, XP 4404 RG, XP 7636 RG) resistentes a glifosato (RG) y cuatro variedades (A 4422, A 4656, A 5409, A 7986) no resistentes a glifosato (NRG).

Para cada cultivar se inocularon 100 g de semillas con 0,1 mL de un biofertilizante líquido comercial, libre de contaminantes bacterianos, mezclado con 0,3 mL de agua destilada estéril. El biofertilizante era portador de $7,8 \times 10^9$ ufc de *B. japonicum* E109 mL⁻¹, valor determinado mediante el método de la dilución última en series de orden décuple, y utilizando el medio agar manitol extracto de levadura (Vincent 1970).

Luego de inoculadas se sembraron dos semillas por maceta de plástico (18 cm de diámetro por 17 cm de altura) conteniendo suelo no estéril recogido del horizonte A de un Ustipsammet (textura= franco arenoso, C orgánico= 13,7 g kg⁻¹; N total=1,43 g kg⁻¹; N-NO₃ = 7,5 mg kg⁻¹; P extractable=15,2 mg kg⁻¹; pH 7,3; arena= 720 g kg⁻¹ y limo 190 g kg⁻¹) libre de *B. japonicum*. A los siete días se ajustaron las plantas a una por maceta, por lo tanto se trabajó hasta el final del ensayo con una planta por unidad experimental. Todos los estudios se realizaron por cuadruplicado. Con el objeto de verificar que el suelo estaba libre de bradyrizobios y que no existió contaminación con *B. japonicum* durante el desarrollo del estudio, se utilizó un control sembrado con semillas de soja no inoculadas. Las plantas desarrollaron en cámara de crecimiento, a 22-25 °C, con 16 h de luz (originada de 15 tubos TLT de luz día, con una potencia de 150 W cada uno) y 8 h de oscuridad. El riego se realizó diariamente con agua destilada estéril, utilizando un pulverizador durante los primeros diez días y el resto de los días agregando 25 mL de agua destilada estéril por maceta.

Seis semanas después de la siembra, en el estadio V3 (Fehr *et al.* 1971), fueron procesadas las plantas con el objeto de estudiar los parámetros siguientes: número y masa seca de nódulos, masa seca aérea y radical y concentración de nitrógeno total en la parte aérea de las plantas de soja. La masa seca se determinó después de secar el material a 55 °C durante cinco días. Para analizar el contenido de nitrógeno total fue empleado el método semimicro Kjeldahl (Bremner 1996).

Se utilizó un diseño completamente aleatorio y balanceado. Los datos se analizaron mediante un Anova simple para cada variable de los 19 cultivares. Las medias se compararon mediante LSD (a dos colas). Con el objeto de comparar el grupo de variedades NRG con el grupo RG, para cada característica medida, se realizaron comparaciones de los valores medios utilizando contrastes *a priori* mediante la prueba F, lo cual permitió determinar o no la existencia de diferencias significativas entre los promedios de cada grupo (Steel, Torrie 1997). Los análisis estadísticos se realizaron usando, en los casos en que fuera necesario, las transformaciones adecuadas de los datos para homogeneizar varianzas según Box y Cox (1964).

RESULTADOS Y DISCUSION

El número medio de nódulos por planta osciló entre 47,7 (A 4657 RG) y 17,5 (A 8000 RG) lo que demuestra que existió una alta variación entre cultivares (cociente= 2,7). Simultáneamente, las plantas procedentes de semillas no inoculadas (control) no presentaron nodulación. La masa seca nodular por planta varió entre 62,2 (A 5409) y 27,7 (A 8000 RG) mg (cociente= 1,87) y la masa seca por nódulo mostró un rango de 2,36 (A 5409) a 0,89 (A 4456 RG) mg (cociente= 2,65). Las masas secas aéreas y radicales por planta, presentaron valores entre 1,36 y 0,74 g (cociente= 1,84) y entre 0,65 y 0,35 g (cociente= 1,86), respectivamente. El tenor de nitrógeno total en la parte aérea osciló entre 2,03 (A 7986) y 1,43 (XP 4404 RG) % (cociente= 1,42) y entre 25,0 (A 5409) y 14,2 (A 8000 RG) mg por planta (cociente= 1,76). La utilización de un inoculante líquido en semillas de soja promovió la nodulación de las variedades estudiadas; sin embargo, existieron variaciones de la respuesta a la inoculación entre distintos cultivares de soja y una misma cepa de *B. japonicum*, resultados que coincidieron con lo observado por Israel (1981). Los valores de nitrógeno acumulado (concentración y cantidad absoluta) en la parte aérea de las plantas fueron significativamente diferentes entre los cultivares. Esos datos indican que, de acuerdo a lo observado por Zeiher *et al.* (1982), existieron formas fisiológicas diferentes para acumular y distribuir nitrógeno entre las variedades de soja inoculadas.

Mediante el análisis de contrastes fueron detectados valores promedios significativamente superiores, expresados como porcentajes, en el grupo de sojas NRG respecto al de sojas RG de los siguientes parámetros: 1) masa seca de nódulos por planta (8,4 %), 2) masa seca por nódulo (10,2 %), 3) masa seca aérea por planta (8,3 %), 4) masa seca radical por planta (13,2 %), 5) concentración de nitrógeno total en parte aérea (4,8 %) y 6) nitrógeno total absoluto de parte aérea por planta (14,2 %). Considerando todos los cultivares, se calcularon regresiones lineales, observándose que: 1) por cada incremento de 1 mg de masa seca nodular por planta aumentó 0,225 mg la cantidad de nitrógeno total en la parte aérea, y 12 mg la masa seca aérea por

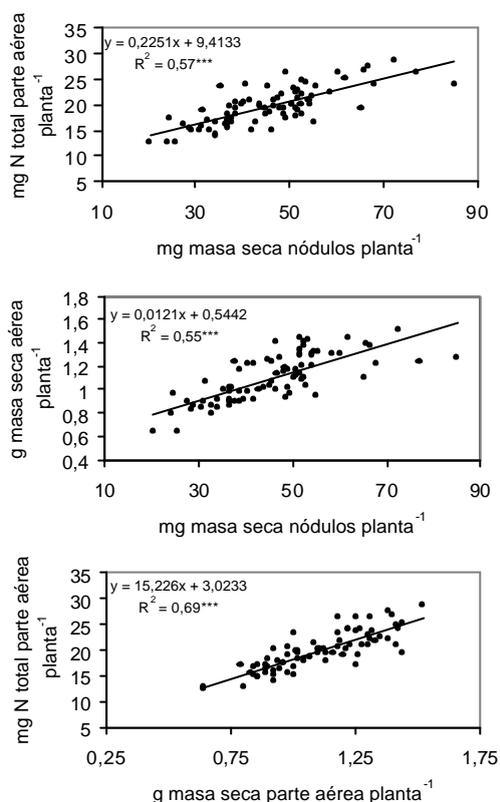


Figura 1. Relación entre la masa seca nodular y el nitrógeno total acumulado de la parte aérea (a), entre la masa seca nodular y la masa seca de la parte aérea (b), y entre la masa seca de la parte aérea y el nitrógeno total acumulado de la parte aérea (c) en 19 cultivares de soja inoculados con un inoculante líquido (*B. japonicum* E109) (N= 76).

Figure 1. Relationship between nodule dry mass and shoot accumulated total nitrogen (a), between nodule dry mass and shoot dry mass (b), and between shoot dry mass and shoot accumulated total nitrogen (c) from 19 soybean cultivars inoculated with a liquid inoculant (*B. japonicum* E109) (N= 76).

planta de soja, y 2) en la parte aérea de las plantas, por cada g adicional de masa seca se acumularon 15,2 mg de nitrógeno total (Figura 1). En consecuencia, se comprobó que la cantidad acumulada de nitrógeno total por planta estaba significativamente relacionada con la masa seca de los nódulos y con la masa seca de la parte aérea de las plantas de soja ($R^2=0,57^{***}$ y $R^2=0,69^{***}$, respectivamente). Estos resultados confirman datos de experimen-

tos tempranos realizados por Döbereiner (1966) en Brasil. Además, se observó una relación altamente significativa entre las masas secas de los nódulos y de la parte aérea de las plantas ($R^2=0,55^{***}$).

En conclusión, la inoculación de semillas de soja de los grupos NRG y RG, con un inoculante líquido formulado con *B. japonicum* E109 en un suelo libre de bradyrhizobios, indicó la existencia de distintos niveles de compatibilidad entre la cepa comercial y los cultivares de soja ensayados, provocando diferencias significativas en la nodulación (número y masa seca de nódulos) y la nutrición nitrogenada (masas secas aérea y radical, y contenido de nitrógeno en parte aérea) de las plantas. Simultáneamente, el número de nódulos por planta fue similar en los cultivares convencionales y resistentes a glifosato. Sin embargo, las masas secas nodular, aérea y radical por planta, la masa seca por nódulo, y la concentración y contenido de nitrógeno fueron 4,8 a 14,2 % mayores en los cultivares NRG respecto a los RG.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado parcialmente a través del PIP 0909/98 (CONICET). Los autores agradecen a las empresas Rizobacter Argentina S.A (Pergamino) y a Nidera Semillas (Vena-do Tuerto) que facilitaron el inoculante líquido y las variedades de semillas de soja para realizar este estudio.

REFERENCIAS

- Box GEP, Cox DR. 1964. An analysis of transformations. J. Roy. Statist. Soc. Series B 26: 211-252.
- Bremner JM. 1996. Total nitrogen. En: Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Sparks D. L. (Ed.), SSSA Book Series No. 5, Madison, p. 1085-1121.
- Döbereiner J. 1966. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. Nature 210: 850-852.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington J S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans *Glycine max.* L. Merrill. Crop Sci. 11: 929-931.
- Ham GE, Cardwell VB, Johnson HW. 1971. Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculants in soils containing naturalized populations of rhizobia. Agron. J. 63: 301-303.
- Israel DW. 1981. Cultivar and *Rhizobium* strain

- effects on nitrogen fixation and remobilization by soybeans. *Agron. J.* 73: 509-516.
- Olsen PE, Rice WA, Bordeleau LM, Demidoff AH, Collins MM. 1996. Levels and identities of nonrhizobial microorganisms found in commercial legume inoculant made with nonsterile peat carrier. *Can. J. Microbiol.* 42: 72-75
- Steel RGD, Torrie JH. 1997. Bioestadística. Principios y procedimientos. Segunda edición. McGraw Hill. México, 622 p.
- Streeter JG. 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can. J. Microbiol.* 40: 513-522.
- Vincent JM. 1970. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 164 p.
- Weaver RW, Frederick LR. 1974. Effect of inoculation rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field studies. *Agron. J.* 66: 229-232.
- Zeiger C, Egli DB, Leggett JE, Reicosky DA. 1982. Cultivar differences in N redistribution in soybeans. *Agron. J.* 74: 375-379.