



Rizobacterias que promueven el desarrollo e incremento en productividad de *Glycine max* L.

Rhizobacteria promoting *Glycine max* L. development and increased productivity

Damián Antonio Cedeño Saavedra¹, °Hayron Fabricio Canchignia Martínez¹, Nicolás Javier Cruz Rosero², Feliberto Fernando Guerra Cuenca¹, Ramiro Remigio Gaibor Fernández¹, Ángel Virgilio Cedeño Moreira¹

¹Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Agronomía. Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología. Campus Manuel Haz Álvarez. Av. Quito Km 1.5 vía Santo Domingo de los Tsáchilas. EC.120301. Quevedo, Ecuador. damiancs_10@hotmail.com; °hcanchignia@uteq.edu.ec

junior.guerra93@gmail.com; rgaibor@uteq.edu.ec; anvirced125.55@hotmail.com

²Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Ambientales, Carrera de Ingeniería Forestal. Campus Manuel Haz Álvarez. Av. Quito Km 1.5 vía Santo Domingo de los Tsáchilas. EC.120301. Quevedo, Ecuador. jcruz@uteq.edu.ec

Rec.: 09.11.2016. Acept.: 27.02.2017.

Publicado el 1 de junio de 2017

Resumen

Los suelos agrícolas destinados al cultivo de especies vegetales de ciclo corto, carecen de materia orgánica por efecto del excesivo empleo de agroquímicos, estos fertilizantes edáficos de origen químico ocasionan cambios en la estructura y la biodiversidad del suelo. La incorporación de rizobacterias en la agricultura permite mejorar la productividad de cultivos de leguminosas por la formación de un complejo de simbiosis rizobio-planta que permite la fijación de nitrógeno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas veronii* R4 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 para promover el desarrollo e incremento de productividad en tres variedades de soja: ICA-P34; INIAP-308; INIAP-307. A los 7 y 30 días se evaluó el desarrollo radicular y formación de nódulos, por co-inoculación de rizobacterias y sin inoculantes, también se determinó el rendimiento en kg ha^{-1} . En condiciones *in vitro* se incrementó el tejido radicular con 5, 3 y 9 cm de largo, por *B. japonicum* en ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307. En plántulas se observó raíces de 21 y 20 cm en INIAP-307 con *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0. Inoculando las tres variedades con *B. japonicum*, se obtuvo 10, 14 y 10 nódulos por planta, cuando se aplicó *Pseudomonas* spp no existió formación de nódulos. El rendimiento de granos por hectárea fue 3700, 2890 y 3929 kg ha^{-1} , con *B. japonicum*, sin inoculo bacteriano los rendimientos disminuyen a 2006, 1611 y 1842 kg ha^{-1} . *B. japonicum* coloniza el sistema radicular influyendo con cambios morfológicos y fisiológicos, que positivamente incrementa el rendimiento en semillas de soja.

Palabras clave: *B. japonicum*, nódulos, *P. veronii* R4, *P. fluorescens* CHA0, simbiosis.

Abstract

Agricultural soils for the cultivation of short-cycle plant species, lack organic matter as a result of the excessive use of agrochemicals. These soil fertilizers of chemical origin cause changes in soil structure and biodiversity. The use of rhizobacteria in agriculture improves legume crop productivity through the formation of a rhizobia-plant symbiosis allowing nitrogen fixation. The aim of this study was to evaluate the effect of *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and *Pseudomonas veronii* R4 in promoting soybean: ICA-P34; INIAP-308; INIAP-307 development and increased productivity. At 7 and 30 days, root growth and nodule formation was evaluated, by co-inoculation of rhizobacteria and without inoculants, performance was also determined in kg ha^{-1} . Under *in vitro* conditions root tissue increases with 5, 3 and 9 cm, per *B. japonicum* in, ICA-P34, INIAP-308 and INIAP-307. In seedling, 21 and 20 cm roots were observed in INIAP-307 with *P. veronii* R4 and *P. fluorescens* CHA0. 10, 14 and 10 nodules per plant were obtained in the three varieties with *B. japonicum*. No nodule formation was observed after *Pseudomonas* spp application. Grain yield per hectare was 3700, 2890, and 3929 kg ha^{-1} , with *B. japonicum* and without bacterial inoculum yields fall to 2006, 1611 and 1842 kg ha^{-1} . *B. japonicum* colonizes the root system and generates morphological and physiological changes, which positively increase yield in soybean seeds.

Key words: *B. japonicum*, nodules, *P. veronii* R4, *P. fluorescens* CHA0, symbiosis.

Introducción

El rendimiento del cultivo de soja (*Glycine max* L.) en Los Ríos-Ecuador al 2015 fue de 2100 kg ha⁻¹, producción de semillas destinada para la elaboración de alimento balanceados para animales, variedades que requieren de mayor aportación de fertilización entre 0.7 y 0.8 qq ha⁻¹ de los principales macronutrientes (Moreno y Salvador, 2015). Por consecuencia de la expansión agrícola los suelos destinados al cultivo de especies vegetales de ciclo corto, estos aceleran los procesos de erosión con la pérdida de materia orgánica (Hernández et al., 2009). Estas labores agrícolas alteran la estructura del suelo influyendo cambios en la microbiota en consecuencia activa la degradación del mismo, con la pérdida de la diversidad genética de *Rhizobium* por causa de la fertilización química a base de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) (Caballero y Martínez, 1999).

Un mecanismo alternativo en la recuperación de suelos agrícolas, consiste en la incorporación de rizobacterias benéficas que mejoran las características morfológicas de las especies vegetales y la estructura de suelo. Los microorganismos tienen una estrecha relación desde que iniciaron su colonización en la tierra (Selosse y Le Tacon, 1998). Unido a esto, las rizobacterias son capaces de mantener la estabilidad de los ecosistemas mediante su influencia en la diversidad de especies y las comunidades vegetales (Read, 1998). El sector agropecuario ha iniciado trabajos de identificación y manipulación de PGPR, de la expresión en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Entre las rizobacterias con capacidades simbióticas se encuentran: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, capaces de colonizar la rizósfera o tejidos de raíces de pastos o leguminosas (Döbereiner et al., 1995). Además, estimulan el desarrollo en plantas y se relacionan con diferentes actividades fisiológicas: 1) La síntesis de fitohormonas, como citoquininas, giberelinas y auxinas; 2) Mejora los factores en nutrición mineral en solubilización de P; 3) Protección de plantas hacia problemas fitopatógenos (Rodríguez et al., 2007).

La aplicación de PGPR en la agricultura, incrementa la productividad del 5 al 30%, en el cultivo de *Zea mays* (maíz) (Fulchieri y Frioni, 1994) y *Glycine max* (soja) (Dashti et al., 1997). Las rizobacterias tienen la capacidad de colonizar el tejido radicular y mejorar la proliferación de raíces por la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA) (Asghar et al., 2004; Khalid et al., 2004). El empleo de *P. fluorescens* CHA0 en especies vegetales estimula el desarrollo del tejido radicular, con la síntesis de 0.02 mM de AIA *in vitro* (Oberhänsli et al., 1991) y *P. veronii* R4 coloniza e incrementa el sistema radicular en peciolas de hojas de vid "Thompson Seedless" (Peñafliel et al., 2016). La colonización por *P. fluorescens* WCS417 en raíces en *Arabidopsis thaliana*, brinda protección sistémica hacia diferentes tipos de patógenos como: *Pseudomonas*

syringae, *Xanthomonas campestris* y al hongo patógeno de raíz *Fusarium oxysporum* (Pieterse et al., 1998; van Wees et al., 1999).

La perpetuación de rizobacterias en el suelo, interaccionan a nivel rizobio-leguminosa, permitiendo a la planta captar N asimilable para sus diferentes requerimientos metabólicos y adaptarse a suelos pobres, contribuyendo al desarrollo y productividad del cultivo. La soja obtiene el N directamente del suelo o indirectamente desde la fijación simbiótica por nodulación con rizobacterias eficaces de *Bradyrhizobium japonicum* (Abbasi et al., 2008). Las primeras etapas de colonización y organogénesis de nódulos inician cuando la bacteria se adhiere a las raíces en respuesta de los exudados atrayentes principalmente flavonoides, que activa la proteína bacteriana NodD. La expresión de los genes Nod resulta en la síntesis de moléculas y permite la fijación biológica de N (Duzan et al., 2004). La co-inoculación con *Bradyrhizobium* spp. en semillas de leguminosas favorece en su germinación y estimula el desarrollo de raíces (Pena y Alexander, 1983), la combinación de *Azospirillum brasilense* Az39 y *B. japonicum* E109, promueven la germinación de semillas en maíz y soja (Cassán et al., 2009). Estudios de co-inoculación con *B. japonicum* incrementa la formación de raíces, el rendimiento de semillas, vigor, nodulación y fijación de N (Li y Alexander, 1988).

Las rizobacterias que promueven el desarrollo de raíces y fijadoras de N son motivo de estudio en este trabajo para su co-inoculación en variedades de soja cultivadas en Ecuador, con el propósito de verificar los efectos en la mejora de los caracteres morfológicos y cómo influye positivamente en el rendimiento de semillas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial *B. japonicum*, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 para promover el desarrollo de los caracteres morfológicos e incremento de la productividad de tres variedades de soja: ICA-P34; INIAP-308; INIAP-307.

Materiales y métodos

Ubicación del experimento y material genético

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Ecuador. Las rizobacterias *P. fluorescens* CHA0 y *P. veronii* R4, pertenecen al banco de Cepas de Rizobacterias del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad antes mencionada y *B. japonicum* donadas por Rizobacter S.A., Argentina. Por tanto, se utilizaron tres variedades de soja: ICA-P34 del Instituto Colombiano Agropecuario. Colombia, INIAP-307 y 308 del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Ecuador.

Desarrollo de los inoculantes bacterianos

Las rizobacterias *P. fluorescens* CHA0 y *P. veronii* R4

se incubaron en un medio de cultivo líquido King B (King *et al.*, 1947) [(gL⁻¹): peptona, 20.0; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7 H₂O, 1.5; agar, 15; glicerol, 15 mL; agua destilada (pH 7.2)], a 28 °C a 150 rpm/24 h. Se recuperó 100 mL del cultivo en su fase exponencial de crecimiento, registrado a una OD de 0.6 a 650 nm con 1.5 x 10⁹ células/mL UFC (Unidades Formadoras de Colonias), verificado por cámara Neubauer (fondo del campo central de 0.1 mm y superficie de conteo 0.0025 mm²), en microscopio Olympus BX41. El cultivo bacteriano se centrifugó a 3000 g 15 min y lavadas dos veces con un mismo volumen de tampón fosfato salino (PBS) estéril (pH 6.5) y re-suspendidas en la misma solución, para la inoculación en semillas. La aplicación de RIZO-LIQ TOP con *B. japonicum* es de 3 mLkg⁻¹ de semillas, más el protector PREMAX (1 mLkg⁻¹) se homogenizaron para la distribución en las semillas.

Evaluación *in vitro* de semillas de soja inoculadas con rizobacteria

Las semillas de soja se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% por tres minutos y luego sumergidas en agua destilada estéril para retirar restos NaClO, finalmente secadas en papel toalla estéril. Entre 7 a 10 semillas se ubicaron sobre papel filtro humedecidas con agua destilada estéril en placas petri y llevadas a una incubadora a 25 °C±1, por tres días y fotoperiodo de 24 h de oscuridad. Seleccionando las semillas pre-germinadas por la ruptura de la cubierta seminal y emergencia de radícula, procediendo a ser sumergidas en 10 mL del tampón PBS con el inoculante bacteriano de *Pseudomonas* spp por 30 min, para la aplicación *B. japonicum* con el protector PREMAX. Las semillas co-inoculadas se ubicaron en cajas petri con agar/agua al 7%, para su evaluación de siete días post inoculación (dpi), e incubadas en cámara de crecimiento, a 25 °C±1 por un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad hasta su evaluación de forma aleatoria. Se registró la longitud de raíz (LR) y el número de raicillas (NR).

Evaluación temprana al desarrollo del sistema radicular y formación de nódulos

Las semillas tratadas con los inoculantes bacterianos se ubicaron en maceteros con 140 g del sustrato, que contenía 50/50% de suelo franco arcilloso más turba (Novarbo seedling, black C1B) empleado en la producción de plantas, esterilizado por autoclave a 121 °C / 20 min. Se registró la variable longitud de raíz principal (LRP) (cm) desde la base hasta la coña de raíz, número de nódulos (NN), peso de nódulos por g (PN); evaluados a los 30 dpi. Las plántulas crecieron en invernadero a 25 °C±1 por un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Evaluación de productividad en soja

Las semillas pre-germinadas inoculadas con las rizobacterias se trasladaron a bolsas plásticas de vivero de 10x12, con 3300 g del sustrato antes mencionada, las plantas se distribuyeron en 10 m² a la intemperie. A los 18 días se aplicó el fertilizante foliar EVERGREEN 1 Lha

¹ que contenía: Citoquininas 90, Auxinas 40, Giberelina 90 ppm; N 7, P 7, K 7, B 0.024, Fe 0.013 Mn 0.05, Mg 0.018, Zn 0.0009%. Se registraron las variables: días a floración (DF), número de vainas por planta (NVP), peso de 100 semillas en gramo (PS). Los días a floración se determinó considerando el número de días desde la siembra hasta formación de 50+1 de plantas que presentó la flor abierta. El rendimiento de granos por hectárea se determinó en base al peso de 100 semillas y transformado a kilogramo por hectárea, previamente ajustados al 13% de humedad. El trabajo se realizó en época seca con una precipitación mensual promedio de 203–320 mm de agua entre los meses de septiembre a diciembre del 2015 (INAMHI, 2015).

Análisis estadístico

Los tratamientos en estudio fueron tres rizobacterias y tres variedades de soja, más el control sin inoculante bacteriano, contenían tres replicas experimentales y cada una con cuatro unidades experimentales. Se formularon 12 tratamientos. Empleando un total de 144 semillas pre-germinadas o plántulas de soja. Los valores a cada condición representan el error estándar promedio individual (±), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia (P≤0.05) con el uso de Statgraphics.

Resultados y discusión

Comportamiento *in vitro* de plántulas de sojas

La co-inoculación con *B. japonicum* en semillas pre-germinadas de soja genera un incremento en LR de 5, 3 y 9 cm, en las variedades ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307, respectivamente (Figura 1A). Esta rizobacteria excreta reguladores de crecimiento vegetal que origina cambios morfológicos y fisiológicos en los tejidos de semillas jóvenes, por efecto a la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico (Bashan y de-Bashan, 2010). Esto coincide con Boiero *et al.* (2007) que *B. japonicum* SEMIA-5080 sintetiza AIA *in vitro* de 3.8 µgmL⁻¹, donde la inoculación de *B. japonicum* E109 en semillas de soja, estimulan el sistema radicular en 9 cm de longitud a 8 días de evaluación (Cassán *et al.*, 2009).

La aplicación de *P. fluorescens* CHA0 y *P. veronii* R4 en semillas pre-germinadas de soja, tiene efecto inhibitorio en longitud y número de raíces, a diferencia de semillas no tratadas con las rizobacterias se obtiene LR de 3, 2 y 8 cm, en las variedades ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307 (Figura 1A). La alteración de la arquitectura del sistema radicular en LR de soja por aplicación de *P. fluorescens* CHA0, puede estar vinculado a la producción del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), confirmando con Brazelton *et al.* (2008) donde las aplicaciones *in vitro* de 10

uM de 2,4-DAPG reduce la formación de raicillas en plántulas de tomate a cuatro días de exposición.

La mayor formación de NR se obtiene por aplicación de *B. japonicum* en INIAP-307 con 9 raicillas, a diferencia de las ICA-P34 e INIAP-308 con 2 raicillas secundarias (Figura 1B). El grado de simbiosis que logra establecer *B. japonicum* entre las variedades en la emergencia del hipocótilo de la semilla mejora la formación en NR, donde la rizobacteria ejerce cambios morfológicos en el sistema radicular *in vitro* a 7 dpi. Este proceso de simbiosis se genera por efecto de los lipoquitinolisacáridos (LCO) producidos por los rhizobios, moléculas señal que media el reconocimiento de simbiosis rhizobium-leguminosa (Cullimore et al., 2001).

Las rizobacterias *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 son capaces de sintetizar AIA, pero su aplicación a semillas de soja pre-germinadas no incrementa el sistema radicular en su primeros estadios de crecimiento, esto coincide con Karabaghli et al. (1998) donde la aplicación de *P. fluorescens* BBC6 en *Picea abies* (L) Karst (abeto), no tiene efecto alguno en el sistema radicular aunque produce AIA. Otro efecto a considerar en la disminución en LR y NR por aplicación de *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0, es que, no llegan a penetrar la cubierta de la semilla quedando adheridas a la superficie y compitiendo por la absorción de minerales, no favoreciendo al incremento radicular *in vitro*.

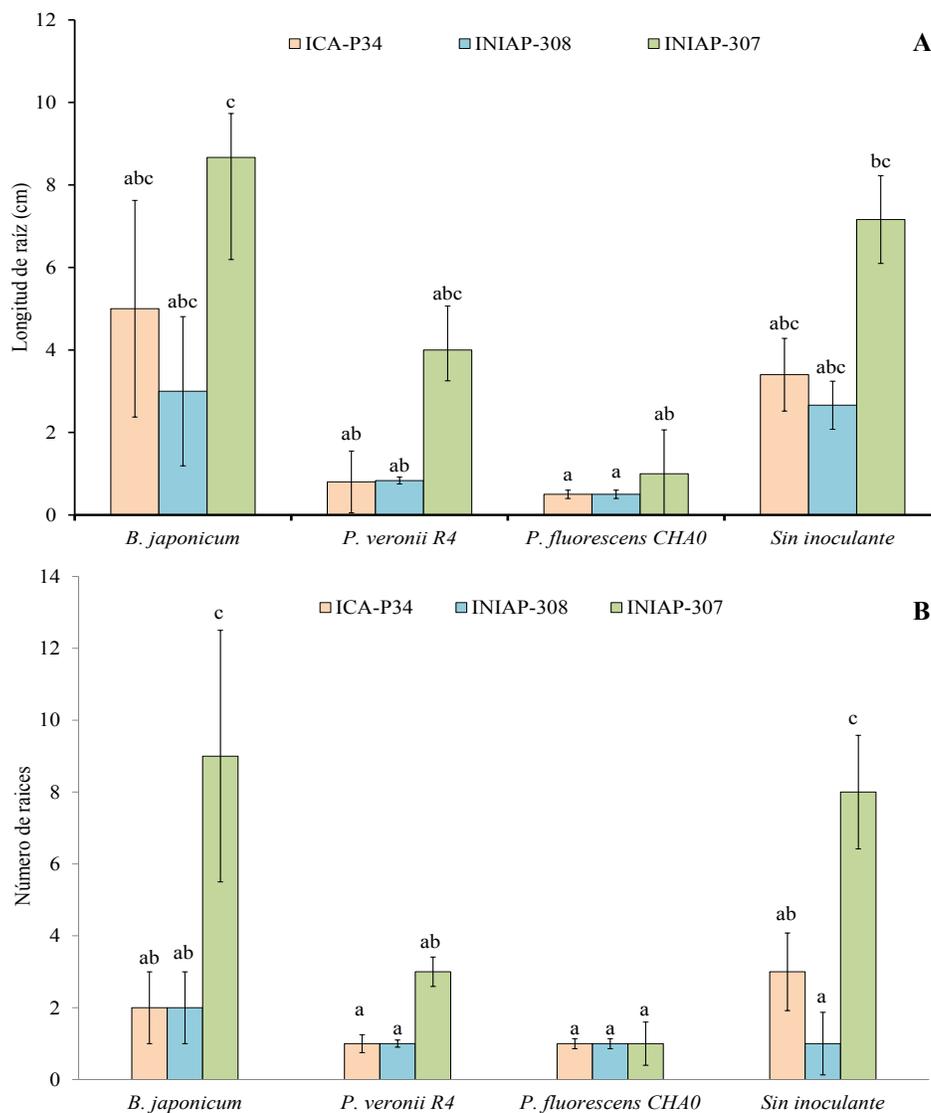


Figura 1. La co-inoculación de *B. japonicum*, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 en semillas de soja. A) Longitud de raíz (cm). B), Número de raíces evaluadas a 7 dpi. Medias con una letra común, no son significativamente diferentes (Tukey, $p > 0.05$). Las barras indican el error estándar individual (\pm)

Evaluación temprana del sistema radicular y nodulación

El incremento en LRP con 21 y 20 cm se obtiene por inoculación de *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 a los 30 dpi en plántulas de soja, en INIAP-307. Este incremento inicia en el estadio principal 1, cuando el hipocótilo se endereza y los cotiledones están desplegados totalmente en suelo, las rizobacterias llegan a colonizar el sistema radicular de la variedad INIAP-307. La aplicación de *B. japonicum* en esta variedad se observó LRP de 17 cm., sin el inoculante bacteriano, sus raíces no superan los 15 cm., por tanto, no existió diferencias entre las tres variedades (Figura 2A).

En aplicación de *P. veronii* R4, *P. fluorescens* CHA0 y *B. japonicum* en las variedades ICA-P34 y INIAP-308 se obtuvo la disminución LRP (Figura 2A), esto respondería al potencial genético de cada variedad y al grado de simbiosis que se genere con las rizobacterias. Estudios relacionados indican que la colonización de la rizósfera por una bacteria dependerá de la especie de vegetal (Beauchamp *et al.*, 1991) e incluso ésta varía entre cultivares (Weller y Cook, 1986). La colonización efectiva por *P. fluorescens* CHA0 y *P. veronii* R4, ejercen cambios morfológicos que corresponden al grado de adaptabilidad de la rizobacteria con la variedad de soja. Tripathi *et al.* (2006) observan niveles críticos en densidad poblacional de *P. fluorescens* PEn-4 en raíces de soja variedad PS-1024 a los 30 días, esto explica que las rizobacterias sean más selectivas y específicas entre variedades.

El sustrato empleado para la evaluación de LRP a 30 dpi, permitió una distribución uniforme de O₂ que favoreció al desarrollo del microorganismo y al sistema radicular de la plántula. De Leij *et al.* (2002) explican que la disponibilidad de O₂ es clave al desarrollo del sistema radicular, donde la demanda de O₂ es mayor a 21 °C debido al metabolismo requerido por la planta y las rizobacterias. En plántulas de *Pisum sativum* (guisante) inoculados con *P. fluorescens* F113 en suelo franco arenoso, mejora el desarrollo radicular con 10 cm a los 12 días (De Leij *et al.* 2002). Las rizobacterias *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 mantienen un complejo de simbiosis con la planta, como resultado el incremento de la raíz, esto coincide con Kravchenko *et al.* (2004) quienes indican que las rizobacterias captan las pequeñas cantidades de Triptofano (Trp) presente en las raíces, favorece a la síntesis de AIA por el microorganismo, estimulando el desarrollo del sistema radicular de la especie vegetal.

La co-inoculación de *B. japonicum* genera la formación de nódulos en el sistema radicular en ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307 con un promedio de 10, 14 y 10, NN, a diferencia de la co-inoculación con las *Pseudomonas* spp que no hay formación de nódulos (Figura 2B). El proceso de nodulación requiere de la presencia de los genes Nod en las rizobacterias, necesarios para iniciar con el proceso de fijación de nitrógeno (Duzan *et al.*, 2004). Las bacterias asociadas a fijación de N, son conocidas colectivamente como rizobios y pertenecen a estos miembros, cinco géneros filogenéticos: Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Sinorhizobium y

Rhizobium (Cullimore *et al.*, 2001).

La aplicación de *B. japonicum* incrementó el NN y PN, por tanto, no hubo diferencias entre las variedades de soja y *B. japonicum* (Figura 2B). Para futuras aplicaciones de rizobacterias sería necesario efectuar la co-inoculación en conjunto de *Pseudomonas* spp y Bradyrhizobium. Así, los trabajos de aplicación de rizobacterias *B. japonicum* E109 y *A. brasilense* Az39 incrementa la masa radicular y número de nódulos a diferencia de la aplicación individual con Bradyrhizobium en soja (Cassán *et al.*, 2009). También, el empleo de rizobacterias como *Pseudomonas* spp y *B. japonicum* TAL-378 en soja, incrementa significativamente en números y peso fresco de nódulos por planta (Argaw, 2012).

Evaluación al desarrollo e incremento de productividad

La formación de flores en ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307 por aplicación de *B. japonicum* estimuló la precocidad, disminuyendo sus DF entre 35, 45 y 42 días, respectivamente, mientras, las plantas sin inoculantes bacterianos se observó sus DF a los 42, 48 y 51 días, en su orden. Caso contrario, por aplicación de *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 se prolongan los días a emisiones florales en INIAP-307 con 55 y 56 días, para las variedades ICA-P34 y INIAP-308 se mantiene los DF con similar respuesta a las semillas sin el inoculante bacteriano (Figura 3A).

La aplicación *B. japonicum* disminuye en DF a 35 días para ICA-P34, esto difiere con lo observado por Garcés *et al.* (2014), ellos verifican entre 41 y 47 días para la misma variedad, este resultado destaca que la aplicación de *B. japonicum* acelera su proceso fenológico en ICA-P34, por efecto de la distribución fisiológica de N y fitohormonas, por consiguiente, las hormonas vegetales aceleran el proceso de floración por un balance adecuado entre citoquininas-auxinas, esto es explicado por Souleimanov *et al.* (2002), el proceso de simbiosis entre *B. japonicum* y soja, se atribuye a los factores Nod que estimulan la acumulación de biomasa generando cambios en la morfología en la planta. Además, los factores Nod son potentes inductores en la división celular a través de la inducción de genes en el ciclo celular, implicado en las actividades fisiológicas en soja.

El NVP no presenta diferencias entre los genotipos, pero por aplicación de *B. japonicum* en ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307 se obtiene entre 36, 31 y 38 NVP, respectivamente (Figura 3B). Esto supera a lo obtenido por Garcés *et al.* (2014) al verificar 31 NVP en ICA-P34 en temporada seca. En ICA-P34 y INIAP-307 por inoculación de *B. japonicum*, el número de NVP fluctúan entre 36±12 y 38±12, esto respondería a la variabilidad del genotipo. Estas diferencias se han observado en variedades de soja, donde no existe una estabilidad y la productividad se ve perturbada (Giménez *et al.*, 2001).

La aplicación de *B. japonicum* incrementa a 17 g el PS en ICA-P34, INIAP-307, y disminuye por aplicación de *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 con 16 y 15 g, respectivamente, en

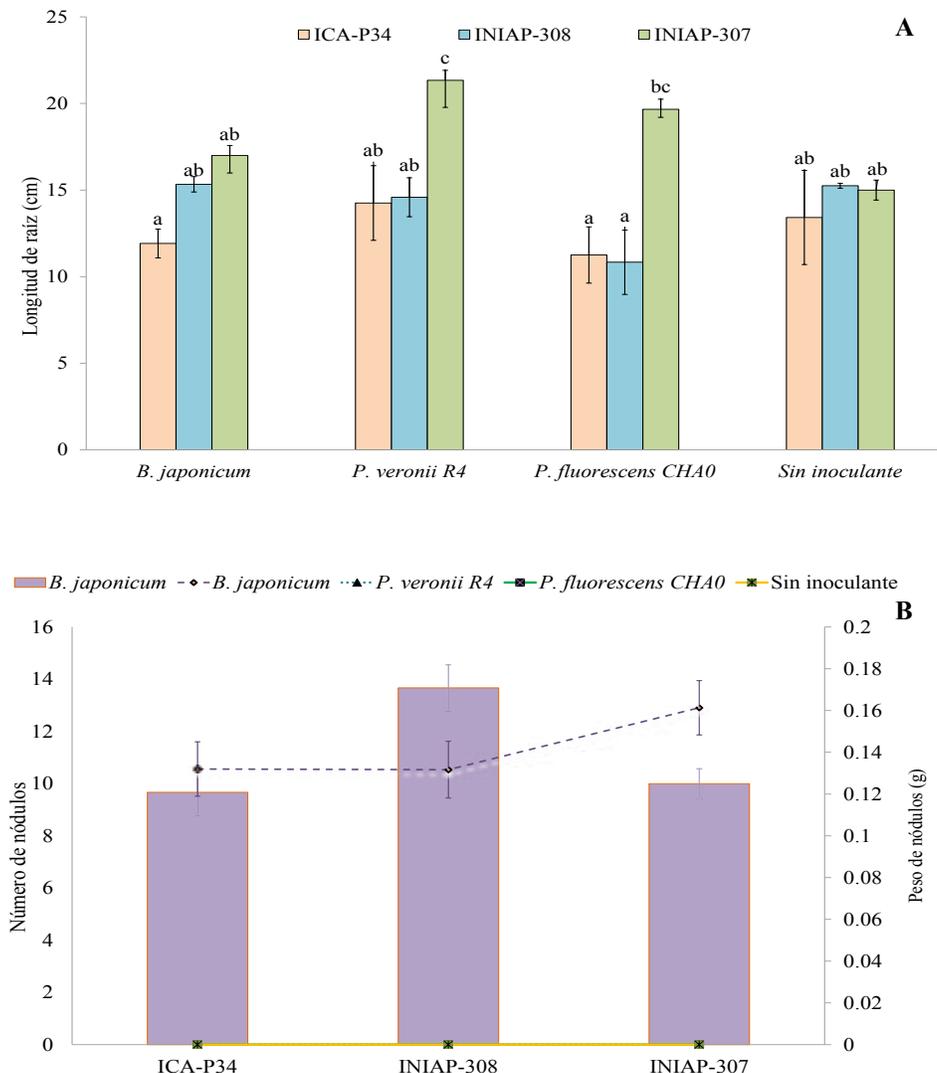


Figura 2. Co-inoculación de *B. japonicum*, *P. veronii R4* y *P. fluorescens CHA0* en plántulas de soja. A) Longitud de raíz (cm). B) Número y peso de nódulos en raíces evaluado 30 dpi. Medias con una letra común, no son significativamente diferentes (Tukey, $p > 0.05$). Las barras indican el error estándar individual (\pm)

las tres variedades. Sin inoculantes bacterianos el PS fluctúa entre 15, 11 y 12 g (Figura 3C). Se tiene que considerar que la aplicación del fertilizante foliar Evergreen contenía 7% de P y contribuyó al aumento en PS en las tres variedades. Wasike et al. (2009) definen que en variedades de soja y en aplicación de *B. japonicum* requieren cantidades mínimas de P para una nodulación óptima. Así, Tsvetkova y Georgiev (2003) demuestran que la adición de P mejora la eficiencia de *B. japonicum* en fijación de nitrógeno. Trabajos en soja con aplicaciones simultáneas de *B. japonicum* más 50 kg ha⁻¹ de P, incrementa en peso a 17 g por cada cien semillas (Abbasi et al., 2008).

El rendimiento de granos por hectárea fue 3700, 2890 y 3929 kg ha⁻¹ con *B. japonicum*, para ICA-P34, INIAP-308

y INIAP-307 respectivamente, esto evidencia una clara diferencia al tratamiento sin inoculo bacteriano, donde los rendimientos disminuyen a 2006, 1611 y 1842 kg ha⁻¹. Es importante mencionar que la aplicación de *P. veronii R4* y *P. fluorescens CHA0* incrementa su rendimiento en 3266 y 3003 kg ha⁻¹ en INIAP-307, disminuyendo para ICA-P34 y INIAP-308 (Figura 3D).

Las aplicaciones individuales de las rizobacterias *B. japonicum*, *P. veronii R4* y *P. fluorescens CHA0* incrementan la productividad por un efecto sinérgico que permite explicar un proceso de simbiosis entre soja y rizobacterias. Por tanto, Abbasi et al. (2008) reportan rendimientos en soja de 543 a 1003 kg ha⁻¹, por aplicación de *B. japonicum*. Egamberdiyeva et al. (2004) mencionan el aumento de productividad del 48%

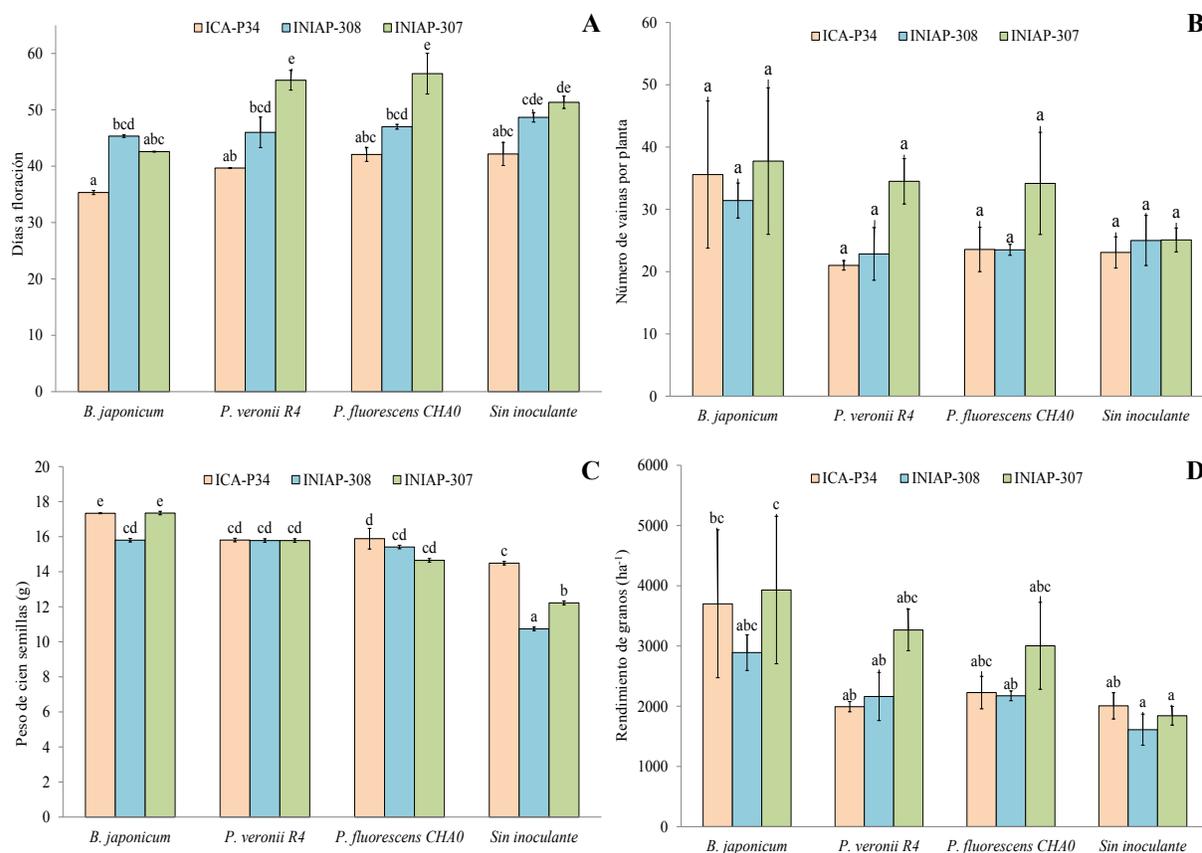


Figura 3. Evaluación de caracteres morfológicos y rendimiento de semillas por aplicación de *B. japonicum*, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 en soja. A) Días a floración. B) Número de vainas por planta. C) Peso de cien semillas (g). D) Rendimiento de granos por kg ha⁻¹. Medias con una letra común, no son significativamente diferentes (Tukey, p>0.05). Las barras indican el error estándar individual (±)

en variedades de soja con aplicación de *B. japonicum*. Okereke *et al.* (2004) reportan incrementos de semillas después de la inoculación con *Bradyrhizobium* entre 1200 y 2180 kg ha⁻¹, y sin inoculante 1050 kg ha⁻¹. Es necesario resaltar que los resultados fueron satisfactorios para la formación de nódulos por parte de *B. japonicum* observando la formación de nódulos y mejorando los aspectos morfológicos de la planta e incrementando la productividad de semillas de soja.

Conclusiones

La rizobacteria fijadora de nitrógeno *B. japonicum*, en el proceso de germinación en semillas de soja promovió la formación del tejido radicular a diferencia de *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 *in vitro*. La evaluación temprana del sistema radicular a 30 dpi con *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0 favoreció el desarrollo de las mismas, pero no contribuyó a la formación de nódulos al no contener los genes *Nod*.

mientras, la aplicación de *B. japonicum* permite la fijación de N por la presencia de nódulos en su sistema radicular en las tres variedades. El empleo del microorganismo fijador de nitrógeno *B. japonicum*, incrementó significativamente la productividad en soja con 84, 79.39 y 113.3% kg ha⁻¹ en las tres variedades (ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307), respectivamente; consecuentemente disminuye la necesidad de emplear fertilizantes minerales edáficos exógenos.

Bibliografía

Abbasi, MK., Majeed, A., Sadiq, A., & Khan, SR. (2008). Application of *Bradyrhizobium japonicum* and Phosphorus Fertilization Improved Growth, Yield and Nodulation of Soybean in the Sub-humid Hilly Region of Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *Plant Production Science*, 11(3), 368–376. <https://doi.org/10.1626/ppls.11.368>

- Argaw, A. (2012). Evaluation of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and phosphate solubilizing *Pseudomonas* spp. effect on soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) in Assosa area. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(1), 213–224.
- Asghar, HN., Zahir, ZA., & Arshad, M. (2004). Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(2), 187. <https://doi.org/10.1071/AR03112>
- Bashan, Y., & de-Bashan, LE. (2010). How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108(C), 77–136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Beauchamp, CJ., Dion, P., Klopper, JW., & Antoun, H. (1991). Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. *Plant and Soil*, 132(2), 273–279. <https://doi.org/10.1007/BF00010408>
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., & Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 874–880. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0731-9>
- Brazelton, JN., Pfeufer, EE., Sweat, TA., Gardener, BB. M., & Coenen, C. (2008). 2,4-Diacetylphloroglucinol Alters Plant Root Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(10), 1349–1358. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1349>
- Caballero, J., & Martinez, E. (1999). Soil Fertilization Limits the Genetic Diversity of Rhizobium in Bean Nodules. *Symbiosis*, 26, 111–121.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>
- Cullimore, JV., Ranjeva, R., & Bono, JJ. (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, 6(1), 24–30. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01810-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01810-0)
- Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R., & Smith, DL. (1997). Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant and Soil*, 188(1), 33–41. <https://doi.org/10.1023/A:1004295827311>
- De Leij, FAAM., Dixon-Hardy, JE., & Lynch, JM. (2002). Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing and non-producing strains of *Pseudomonas fluorescens* on root development of pea seedlings in three different soil types and its effect on nodulation by Rhizobium. *Biology and Fertility of Soils*, 35(2), 114–121. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0448-6>
- Döbereiner, J., Baldani, VLD., & Reis, VM. (1995). Endophytic Occurrence of Diazotrophic Bacteria in Non-Leguminous Crops. In *Azospirillum VI and Related Microorganisms* (pp. 3–14). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79906-8_1
- Duzan, HM., Zhou, X., Souleimanov, A., & Smith, DL. (2004). Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 55(408), 2641–2646. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh265>
- Egamberdiyeva, D., Qarshieva, D., & Davranov, K. (2004). The Use of Bradyrhizobium to Enhance Growth and Yield of Soybean in Calcareous Soil in Uzbekistan. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(1), 54–57. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0069-4>
- Fulchieri, M., & Frioni, L. (1994). Azospirillum inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(7), 921–923. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90308-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90308-5)
- Garcés-Fiallos, FR., Ampuño-Muñoz, SA., & Vásquez-Montúfar, GH. (2014). Agronomía , producción y calidad de grano de variedades de soya durante dos épocas de cultivo. *Biosci. J., Uberlandia*, 30(2), 717–729.
- Giménez, F., Lúquez, J., & Suárez, J. C. (2001). Estabilidad y adaptabilidad de variedades de soja para rendimiento en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. *Revista de La Facultad de Agronomía La Plata*, 104(2), 93–103.
- Hernández, CF., Sosa, FA., Sanzano, GA., Morandini, M., Rojas, QH., & Devani, MR. (2009). Efecto de distintas alternativas de fertilización fosfatada en la secuencia trigo-soja sobre el fósforo asimilable y los rendimientos en la provincia de Tucumán, Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 86(2), 31–36.
- INAMHI. (2015). Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología.
- Karabaghli, C., Frey-Klett, P., Sotta, B., Bonnet, M., & Le Tacon, F. (1998). *In vitro* effects of *Laccaria bicolor* S238N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. *Tree Physiology*, 18(2), 103–111. <https://doi.org/10.1093/treephys/18.2.103>
- Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, ZA. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473–80.

- King, EO., Ward, MK., Raney, DE., Burton, MO., Eagles, BA., Campbell, JJR., Eagles, BA. (1947). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>
- Kravchenko, LV., Azarova, TS., Makarova, NM., & Tikhonovich, IA. (2004). The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. *Microbiology*, 73(2), 156–158. <https://doi.org/10.1023/B:MICI.0000023982.76684.9d>
- Li, DM., & Alexander, M. (1988). Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil*, 108(2), 211–219. <https://doi.org/10.1007/BF02375651>
- Moreno, A., & Salvador, S. (2015). Rendimientos Y Características De Soya En El Ecuador Verano 2015. SINAGAP-Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura Y Pesca, 1, 1–9.
- Oberhansli, T., Défago, G., & Hass, D. (1991). Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology*, 137, 2273–2279.
- Pena-Cabriales, JJ., & Alexander, M. (1983). Growth of Rhizobium in Unamended Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 47(1), 81. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700010016x>
- Peñañiel-Jaramillo, MF., Torres-Navarrete, ED., Barrera-Álvarez, AE., Prieto-Encalada, H. G., Carriel, JM., & Canchignia-Martínez, HF. (2016). Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid “Thompson seedless” *in vitro*. *Ciencia Y Tecnología*, 9(1), 31–36.
- Pieterse, CM., van Wees, SC., van Pelt, JA., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., van Loon, LC. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(9), 1571–1580.
- Read, D. (1998). Biodiversity: Plants on the web. *Nature*, 396(6706), 22–23. <https://doi.org/10.1038/23822>
- Rodríguez, DN., Dardanelli, MS., & Ruiz-Sainz, JE. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272(2), 127–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>
- Selosse, MA., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01230-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01230-5)
- Souleimanov, A., Prithiviraj, B., & Smith, DL. (2002). The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *Journal of Experimental Botany*, 53(376), 1929–1934. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf034>
- Tripathi, M., Johri, BN., & Sharma, A. (2006). Plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. strains reduce natural occurrence of anthracnose in soybean (*Glycine max* L.) in Central Himalayan Region. *Current Microbiology*, 52(5), 390–394. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0297-2>
- Tsvetkova, GE., & Georgiev, GI. (2003). Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient-use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* – soybean (*Glycine max* L. Merr.) symbiosis. *Bulg. J. Plant Physiol., Special Is*, 331–335.
- van Wees, S. C., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, LC., & Pieterse, CM. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41(4), 537–49.
- Wasike, VW., Lesueur, D., Wachira, FN., Mungai, NW., Mumera, LM., Sanginga, N., Vanlauwe, B. (2009). Genetic diversity of indigenous *Bradyrhizobium nodulating* promiscuous soybean [*Glycine max* (L) Merr.] varieties in Kenya: Impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites. *Plant and Soil*, 322(1), 151–163. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9902-7>
- Weller, DM., & Cook, RJ. (1986). Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of Pythium control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8(3), 328–334. <https://doi.org/10.1080/07060668609501808>