



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Agrarias

Licenciatura en Recursos Naturales

**Análisis de la respuesta de defensa inducida por actinobacterias
autóctonas en plantas de soja**

Alumna: Camila Taddia

Directora: Dra. Ma. Amalia Chiesa

Co-director: Dr. Eduardo Rodríguez

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Eco-Fisiología Vegetal (LEFIVE)- Facultad de Ciencias
Agrarias UNR - IICAR CONICET/UNR.**

2023



ÍNDICE

ÍNDICE	1
AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	5
PRESENTACIÓN A CONGRESOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Crecimiento demográfico y crisis alimentaria.....	9
1.2. Producción mundial y nacional del cultivo de soja	10
1.3. Factores que afectan el rendimiento del cultivo de soja	11
1.3.a. Cancro del Tallo de la Soja	12
1.3.b. Podredumbre Carbonosa de raíz y tallo	14
1.4. Manejo actual de las enfermedades	15
1.5. Microorganismos benéficos como alternativa de manejo.....	17
1.5.a. Producción de sideróforos, antibióticos y antifúngicos.....	19
1.5.b. Resistencia sistémica inducida.....	21
1.6. Antecedentes del grupo de trabajo.....	22
OBJETIVO GENERAL	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Material biológico: microorganismos y material vegetal	25
2.2 Tratamiento de semillas con las cepas bacterianas	26
2.3 Análisis de efecto sobre la germinación	26
2.4 Análisis de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal, biocontrol frente a <i>D. aspalathi</i> e intensidad de micorrización	27

2.4.a. Estudios de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal	30
2.4.a.I. Porcentaje total de emergencia.....	30
2.4.a.II. Determinación del Estadio Fenológico.....	31
2.4.a.III. Altura de la planta.....	32
2.4.a.IV. Área foliar.....	32
2.4.a.V. Biomasa de estructuras vegetales.....	32
2.4.b. Estudios de control biológico frente <i>D. aspalathi</i>	33
2.4.b.I. Inoculación artificial del patógeno	33
2.4.b.II. Evaluación del Progreso de la Enfermedad	34
2.4.c. Análisis de colonización micorrízica.....	35
2.4.c.I) Tinción y preparación de preparados	35
2.4.c.II) Evaluación del porcentaje de micorrización.....	36
2.5 Análisis de biocontrol frente a <i>M. phaseolina</i>	37
2.5.a. Desinfección superficial de semillas	37
2.5.b. Germinación de semillas	38
2.5.c. Colonización de palillos con <i>Mp</i>	38
2.5.d. Diseño experimental.....	39
2.5.e. Evaluación del progreso de la enfermedad	41
2.6. Análisis estadístico	41
3. RESULTADOS	42
3.1. Efecto sobre el poder germinativo.....	42
3.2. Análisis del efecto sobre la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal, control biológico frente a <i>D. aspalathi</i> e intensidad de micorrización	44
3.2.a. Efecto sobre parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal	44
3.2.a.I. Efecto sobre el porcentaje de emergencia	44

3.2.a.II. Efecto sobre parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en plantas no inoculadas con <i>D. aspalathi</i>	44
3.2.a.III. Efecto sobre parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en plantas inoculadas con <i>Da</i>	47
3.2.b. Efecto sobre el control biológico del CTS.....	51
3.2.c. Efecto sobre el porcentaje de micorrización	55
3.3. Efecto sobre el control biológico de la PC.....	55
4. DISCUSIÓN.....	58
4.1. Perspectivas de trabajo.....	63
5. CONCLUSIONES	65
6. BIBLIOGRAFIA	66

AGRADECIMIENTOS

Dándole fin a una de las etapas más importante de mi vida, quiero agradecer a aquellas personas que desde distintos lugares, contribuyeron para que este camino sea menos complicado, y posible.

En primer lugar a mis directores, Amalia y Tato. Gracias por sus enseñanzas y dedicación, y por el apoyo y confianza depositada en mí desde el inicio de este proyecto. A David, por su paciencia, empatía y complicidad. Sin dudas, sin su compañía, esta instancia hubiera sido silenciosa y eterna.

A mi familia. Gracias por su amor y apoyo incondicional, por los valores inculcados, por enseñarme a nunca bajar los brazos y por acompañarme en cada una de mis decisiones. A mi novio, Lucas, por animarme, contenerme, ayudarme y brindarme su amor inmenso en todo momento.

A mis amigos de Venado, por prestar un oído, darme ánimo en las dificultades y emocionarse por mis alegrías, como si fueran propias. A todos los compañeros y amigos de la Facu, por compartir cursadas, rendidas, risas, enojos, alegrías, frustraciones, salidas a campo, viajes y experiencias únicas y enriquecedoras.

A todo el equipo docente y no docente de Fisiología Vegetal, por el excelente ambiente de trabajo y por el aporte de conocimientos teóricos y prácticos que facilitaron el desarrollo de experimentos. Gracias Dani por tu compañía, sabiduría y tus charlas filosóficas que hicieron más ameno el trabajo dentro de los calurosos invernaderos.

A los docentes de la licenciatura, por transmitirme su pasión y respecto por los recursos naturales. Finalmente, a la Facultad de Ciencias Agrarias, y a todos aquellos que hacen que siga siendo un orgullo formarse en la Universidad Pública, porque no sólo me permitieron mi formación como profesional, sino que, a lo largo de este tiempo transcurrido contribuyeron a mi crecimiento y fortalecimiento personal.

ABREVIATURAS

- ABCPE: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad
- AF: Antifúngico
- Ctrl: control
- CTS: Cancro del tallo de la soja
- Da: *Diaporthe aspalathi*
- Dc: *Diaporthe caulívola*
- Dpi: días post inoculación
- Dps: días post siembra
- Dpc: *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*
- Dpm: *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*
- Ha: hectárea
- IAA: Ácido Indol Acético
- ISR: Resistencia Sistémica Inducida
- Min: minutos
- Mp: *Macrophomina phaseolina*
- PC: Podredumbre carbonosa
- SE: *Streptomyces eurocidicus*
- SE.NP: *Streptomyces eurocidicus* no productora
- SF: *Streptomyces filipinensis*
- SF.NP: *Streptomyces filipinensis* no productora
- PGPM: microorganismos promotores del crecimiento vegetal
- PGPR: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
- PM: Planta muerta
- PS: Peso seco
- RP: Raíz principal
- TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)
- TP: Tallo principal

PRESENTACIÓN A CONGRESOS

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesina se presentaron en un congreso nacional, un congreso internacional y también fueron parte de una publicación.

- Bercovich, B.; Villafañe, D.L.; Bianchi, J.S.; Taddia, C.; Gramajo, H.; Chiesa, M.A. and Rodríguez, E. *Streptomyces eurocidicus* promotes soybean growth and protects it from fungal infections. (2022). *Biological Control* 165, 104821. (doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104821).
- Taddia, C.; Villafañe, D.L.; Bianchi, J.S.; Gramajo, H.; Rodríguez, E. & Chiesa, M.A. Effect of autochthonous isolates of *Streptomyces spp.* on growth, development and plant protection in soybean. XXXIII Argentinian meeting of Plant Physiology (Reunión Argentina de Fisiología Vegetal-RAFV) September 13-17 2021, Santa Fe, Argentina.
- Villafañe, D.L.; Taddia, C.; Gramajo, H.; Chiesa, M.A y Rodríguez, E. Aislamiento y selección de bacterias endofíticas y rizosféricas de plantas de soja para el desarrollo de agentes de control biológico. V Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Del 15 al 17 de Setiembre 2021 (virtual).

RESUMEN

Actualmente la soja [*Glycine max* (L.) Merr.] es el principal cultivo oleaginoso producido y consumido en el mundo. Sin embargo, diferentes limitaciones bióticas y abióticas amenazan su producción. El control biológico y la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal estimulados por microorganismos benéficos del suelo han demostrado ser una alternativa efectiva, y ambientalmente sostenible, para aumentar el rendimiento de diversos cultivos y asegurar una mejora en el estado sanitario vegetal. Por lo tanto, la identificación y caracterización de los integrantes de la comunidad microbiana asociados al cultivo es un primer paso fundamental para el desarrollo de nuevos bioinsumos. Nuestro grupo de trabajo viene trabajando en la caracterización de cepas del género *Streptomyces* aisladas de suelo y rizósfera de plantas de soja de la zona sojera núcleo de Argentina. En este trabajo de Tesina, inicialmente se analizó la incidencia de dos cepas rizosféricas de dicho género sobre etapas tempranas del establecimiento de la planta. Luego, se estudió el efecto generado sobre el crecimiento y desarrollo en plantas de soja pre y post inoculación con *Diaporthe aspalathi*. Por otro lado, se estudió la capacidad biocontroladora *in vivo* frente a los hongos fitopatógenos *D. aspalathi* y *Macrophomina phaseolina* analizando el progreso de las enfermedades en el tiempo a través de la aparición de síntomas típicos. Nuestra perspectiva a futuro es poder obtener un producto biológico de bajo impacto ambiental formulado a partir de cepas bacterianas rizosféricas que tenga la capacidad de reducir la incidencia de diferentes enfermedades y de promover el crecimiento y desarrollo del cultivo de soja, tendiendo a reemplazar los productos agroquímicos utilizados actualmente.

PALABRAS CLAVES: biocontrol; cancro del tallo de la soja; podredumbre carbonosa; promoción del crecimiento y desarrollo vegetal; *Streptomyces*.

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is currently the main oilseed crop produced and consumed in the world. However, different biotic and abiotic limitations threaten the production. Biological control and the promotion of plant growth and development stimulated by beneficial soil microorganisms, have proven to be an effective and environmentally sustainable alternative to increase the crops yield and ensure an improvement in plant health. Therefore, the identification and characterization of the members of the microbial community where the crop is located is a fundamental first step for the development of new bio-inputs. Our group has been working on the characterization of strains of the genus *Streptomyces* isolated from the soil and rhizosphere of soybean plants from the core soybean zone of Argentina. In this Thesis work, the incidence of two rhizospheric strains of said genus on early stages of plant establishment was initially analyzed. Then, the effect generated on growth and development in soybean plants before and after inoculation with *Diaporthe aspalathi* was studied. On the other hand, the in vivo biocontrol capacity against the phytopathogenic fungi *D. aspalathi* and *Macrophomina phaseolina* was studied, analyzing the progress of the diseases over time through the appearance of typical symptoms. Our perspective for the future is to be able to obtain a biological product with low environmental impact formulated from rhizospheric bacterial strains that has the ability to reduce the incidence of different diseases and promote the growth and development of soybean crops, tending to replace agrochemical products. currently used.

KEYWORDS: biocontrol; soybean stem canker; charcoal rot; promotion of plant growth and development; *Streptomyces*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Crecimiento demográfico y crisis alimentaria

Una de las preocupaciones más importante vigentes desde hace algunas décadas es la creciente demanda de alimentos en un contexto de incremento sostenido de la población mundial. El motivo principal de esta inquietud radica en que la tasa de incremento poblacional no es acompañada por una tasa de producción similar, generando un desbalance que pone en riesgo la provisión futura de alimentos (Miralles, 2013). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2009), se estima que para el año 2050 será necesario alimentar a una población mundial de casi 10.000 millones de personas, debiendo la producción alimentaria proveniente de la agricultura aumentar un 50% a nivel mundial en los próximos 30 años para satisfacer dicha demanda (Godfray et al., 2010). Asimismo, este aumento en la producción deberá darse en un escenario incierto debido al cambio climático (FAO, 2015).

Este escenario obliga a diseñar estrategias que nos permitan garantizar la seguridad alimentaria en un contexto donde los recursos naturales son limitados, desafiándonos a cambiar la forma en la que se producen los alimentos, por una ambientalmente sostenible (Pérez Vázquez et al., 2018). Una estrategia muy utilizada en el pasado para incrementar la producción fue aumentar el área destinada a cultivos (Godfray et al., 2010). La intervención agrícola sobre ecosistemas frágiles, como pastizales, selvas y bosques nativos, genera profundas modificaciones en los mismos, produciéndose pérdidas de funciones ecosistémicas, fragmentación de hábitats, extinción de especies, aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, alteración del clima, cambios en los ciclos del agua, carbono y nitrógeno, entre otros (Barral et al., 2020), por lo que su conversión en zonas agrícolas no parece ambientalmente sustentable. Sin embargo, siendo conscientes de las consecuencias negativas generadas por los cambios en el uso del suelo, la FAO prevé que para el 2050 la superficie de tierra cultivable aumente un 5%, valor correspondiente aproximadamente a 70 millones de hectáreas (FAO, 2015).

Considerando este panorama, el incremento en la producción de alimentos requerido probablemente deba sustentarse en (i) aumentar los rendimientos de las tierras actualmente

cultivadas y (ii) reducir las pérdidas ocasionadas por distintos tipos de estrés (Godfray, 2010; Beddington, 2010; Menendez, 2017; Newitt, 2019; Bailey-Serres, 2019).

1.2. Producción mundial y nacional del cultivo de soja

La soja [*Glycine max* (L.) Merr.] es el principal cultivo oleaginoso producido y consumido en el mundo actualmente (USDA, 2022). Si bien es una planta conocida por el hombre desde hace unos 5000 años, su cultivo y distribución estuvo durante mucho tiempo confinado en el Oriente Asiático, región donde la especie es nativa (McKie y Anderson, 1967), concentrándose principalmente en China, Indonesia, Japón y Corea. Posteriormente, la especie se introdujo en Europa (1740), América del Norte (1765) y luego en América del Sur y Central (1880) (Chang et al., 2015), convirtiéndose en el cultivo económico más importante en cada una de estas áreas productivas (USDA, 2022).

La historia de la soja en la Argentina está fuertemente condicionada por la evolución de la demanda externa de este producto. Hasta 1970 constituía un cultivo casi experimental, reducido a una pequeña porción del país, mientras que desde esa fecha y en los primeros años del siglo XXI pasó a convertirse en la producción de mayor expansión en cuanto a superficie ocupada, volumen en toneladas producido y nivel de exportación de sus derivados (Martínez Dougnac, 2004). Al principio de esta década confluyeron una serie de factores que permitieron crear condiciones favorables para el desarrollo de dicho cultivo, comenzando un período de expansión extraordinario, pasando de 37.700 ha en 1970 a 2.100.000 ha en 1979 (Zarrilli, 2020). Este aumento implicó una expansión del área sembrada, y provocó el corrimiento de la frontera agrícola hacia nuevas regiones y el reemplazo de la clásica rotación agricultura/ganadería. Al intensificarse las prácticas agrícolas y al abandonarse las prácticas anteriores (rotación agrícola/ganadera, abonos verdes, períodos de descanso), se produjo una mayor presión sobre los recursos naturales, y hacia los 80 empezaron a caer los rendimientos por el desgaste y la erosión que sufrían los suelos (Domínguez, 2006). La solución a estos problemas, que propició el despegue del cultivo de soja en los años 90, llegó de la mano de un nuevo paquete tecnológico, que permitió un aumento del rendimiento y una reducción de los costos. Éste consistió en una combinación de mejoramiento genético, semillas transgénicas resistentes a herbicidas, siembra directa, agricultura de precisión, nuevos y

mejores productos químicos (herbicidas, plaguicidas, fertilizantes) y el desarrollo de maquinaria agrícola acorde a las nuevas tecnologías (Cadenazzi, 2009).

En la actualidad, aproximadamente el 80 % de la soja del mundo se produce en Estados Unidos, Brasil y Argentina, que, en conjunto con China e India, representan más del 90% de la producción mundial. En comparación con otros cultivos importantes, la soja ha experimentado el mayor porcentaje de aumentos anuales en el área de producción durante los últimos años, pasando de 29 millones de hectáreas en 1968 a 132 millones en 2022 (USDA, 2022).

1.3. Factores que afectan el rendimiento del cultivo de soja

Debido a que la Argentina se posiciona actualmente como el tercer país productor de soja a nivel mundial (USDA, 2022), su compromiso para satisfacer parte de la demanda de alimentos anteriormente mencionada, debe ser fundamental. Por ello, es necesario comprender aquellos factores que atentan sobre la sanidad y el rendimiento de los cultivos, que ponen en peligro la seguridad alimentaria.

Existe una serie de limitaciones abióticas y bióticas que amenazan la producción de los mismos, al reducir directamente el rendimiento y/o la calidad de la semilla. Las restricciones abióticas son causadas por el ambiente físico, y se relacionan con la disponibilidad de agua y nutrientes del suelo, salinidad, temperaturas extremas, entre otras. Algunas de estas limitaciones pueden manejarse a través de prácticas agrícolas, mientras que otras como las sequías, inundaciones y heladas, no pueden ser controladas, generando considerables pérdidas (Hartman, 2011). Sin embargo, las pérdidas más importantes son ocasionadas por el estrés biótico generado por virus, bacterias y hongos (Agrios, 2005). Se considera que, a nivel mundial, las pérdidas anuales atribuibles a enfermedades son aproximadamente del 20% (Hartman et al., 2015), siendo las de origen fúngico las de mayor impacto en la producción de cultivos y la aptitud de las plantas (Bandara et al., 2020). Por su parte, a nivel nacional las pérdidas anuales atribuibles a enfermedades son aproximadamente del 11 % (Hartman et al., 2015).

En Argentina, el aumento de la superficie sembrada, el monocultivo bajo siembra directa y el empleo de germoplasma de escasa variabilidad ha favorecido el desarrollo epidémico de enfermedades, especialmente de aquellas causadas por patógenos necrótrofos. Esta situación, modifica el panorama sanitario de la soja en Argentina, pasando de ser un cultivo prácticamente libre de enfermedades en la década del 80, a uno donde estas últimas son consideradas responsables de severas reducciones en el rendimiento (Ivancovich, 2003). Dos enfermedades cuya prevalencia e intensidad han tenido un aumento significativo en los últimos 20 años son el Cancro del Tallo de la Soja y la Podredumbre Carbonosa (Carmona et al., 2015; Bandara et al., 2020).

1.3.a. Cancro del Tallo de la Soja

El Cancro del Tallo de la Soja (CTS) es una de las enfermedades más extendidas en las regiones productoras de soja del mundo (Hartman et al., 1999). Es producida por dos agentes causales fúngicos: *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (*Dpm*) (F.A. Fernández) (Pioli et al., 2003; Van Rensburg et al., 2006; Udayanga et al., 2015) y *D. phaseolorum* var. *caulivora* (*Dpc*) (K. L. Athow y R. M. Caldwell). Recientemente, los nombres de estas especies se han cambiado a *Diaporthe aspalathi* (*Da*) (E. Jansen, Castl. & Crous) y *D. caulivora* (*Dc*) (K. L. Athow & R. M. Caldwell), respectivamente (Van Rensburg et al., 2006; Udayanga et al., 2015). *Da* fue reportado por primera vez en Argentina en 1992 (Pioli et al., 1997) en la provincia de Santa Fe, mientras que *Dc*, en 1999 (Pioli et al., 2001). En la zona sojera núcleo de nuestro país, coexisten ambas especies del patógeno, complicando el manejo de la enfermedad (Pioli et al., 2003; Van Rensburg et al., 2006; Udayanga et al., 2015).

Diaporthe spp. pertenecen al grupo de los hongos hemibiótrofos, que pueden sobrevivir sobre la superficie de las semillas y en los restos de las plantas enfermas. Las semillas infectadas contribuyen a la dispersión espacial del patógeno, movilizándolo al mismo de una zona a la otra. Sin embargo, el porcentaje de transmisión de la enfermedad por semillas, es bajo, siendo la principal fuente de inóculo el rastrojo (Carmona et al., 2015). Sobre los rastrojos y durante el invierno, el patógeno produce estructuras sexuales denominadas peritecios, que al comienzo de la primavera serán capaces de desarrollar otras

estructuras reproductivas denominadas picnidios, portadoras de esporas. Estas son dispersadas a través del viento y el agua, y debido a que las temperaturas primaverales son óptimas para el desarrollo del hongo, pueden infectar a las plantas en los primeros estadios vegetativos, ocasionando daños severos (Yorinori, 1996; Grau y Koval, 2006; Distéfano, 2018).

Los síntomas del CTS se suelen visualizar aproximadamente entre los 14 y 20 días posteriores a la infección. Comienza con pequeños puntos oscuros en el tallo que van evolucionando lentamente a lesiones alargadas unilaterales de coloración castaño-rojiza, que se extienden en dirección al ápice (cancro) (Fig. 1-A). Al mismo tiempo comienza a manifestarse clorosis internerval en las hojas (Fig. 1-B) (Hartman et al. 1999). En estados avanzados de la infección, la clorosis deriva en necrosis internerval (Fig. 1-C), y finalmente, las lesiones llegan hasta la médula produciendo la muerte de la planta (Fig.1-D). Sobre los rastrojos el hongo desarrolla estructuras reproductivas denominadas picnidios, que actúan como agentes de dispersión de esporas (Fig.1-E).

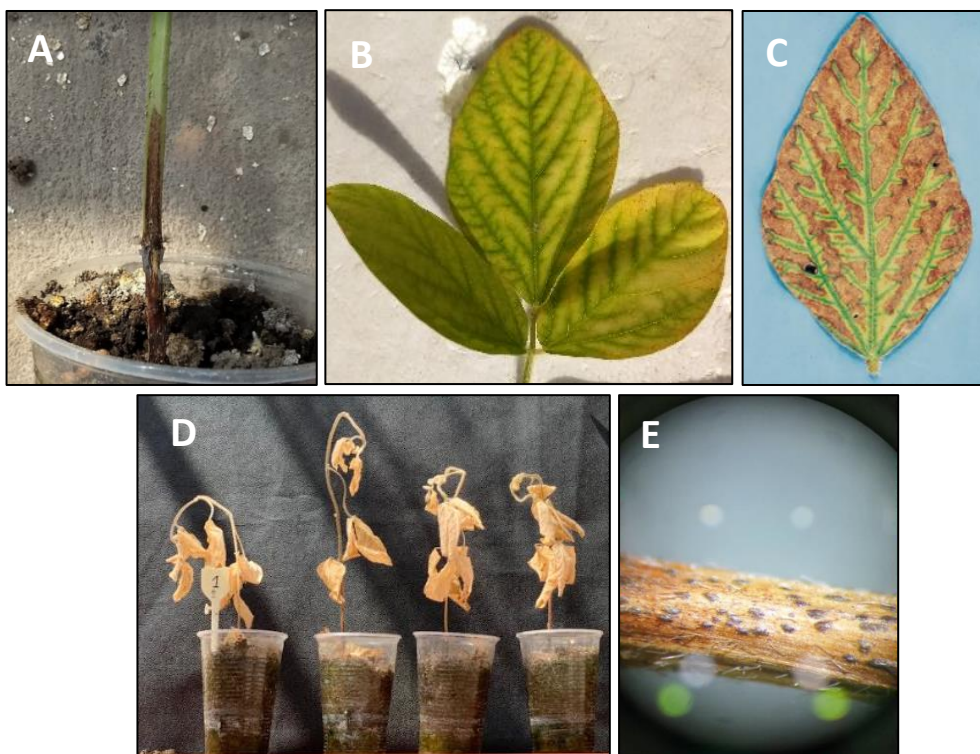


Figura 1. Síntomas típicos del Cancro del tallo de la soja causado por *Diaporthe aspalathi*. (A) Evolución unilateral del cancro sobre el tallo, formando una lesión alargada. (B) Clorosis internerval. (C) Necrosis internerval. (D) Plantas muertas con hojas necróticas adheridas. (E) Picnidios visualizados como puntos negros sobre el tallo de las plantas.

1.3.b. Podredumbre Carbonosa de raíz y tallo

La Podredumbre Carbonosa (PC) es una enfermedad potencialmente muy destructiva y con consecuencias económicas graves producida por el hongo necrotrofico *Macrophomina phaseolina* (*Mp*) (Tassi) Goid. Éste habita el suelo e infecta las raíces y base del tallo de las plantas, y muestra una amplia variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética (Reznikov et al., 2019). Esto le ha permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y tener una amplia distribución geográfica, afectando cerca de 500 especies vegetales comprendidas en más de 100 familias alrededor del mundo, incluidos cereales, legumbres, hortalizas, frutas y cultivos de fibras (Srinivasa Reddy, 2008).

De los hongos que afectan a las raíces de las plantas de soja, *Mp* es uno de los que requiere mayor atención, debido a que la PC está incrementándose progresivamente en las regiones sojeras del mundo, constituyéndose en una de las enfermedades de mayor amenaza por su difícil control (Ivancovich, 2013; Bandara et al., 2020). En Argentina la PC comenzó a cobrar importancia a partir de la campaña 2000/01 (Chiesa et al., 2016; Reznikov et al., 2019).

En la Figura 2 se esquematiza el ciclo de la enfermedad. Este hongo produce estructuras vegetativas de resistencia denominadas microesclerocios, que son capaces de sobrevivir en el interior de tejidos vegetales previamente infectados o en forma libre en el suelo (Almeida et al., 2003). Cuando estas estructuras intersectan el sistema radicular vegetal, lo infectan, desencadenando la enfermedad. Luego de la infección el hongo crece dentro de la raíz y del tallo, afectando el sistema vascular e interrumpiendo el transporte de agua y nutrientes a las partes superiores de la planta. Los síntomas aéreos de la PC comienzan con la pérdida de vigor, y en etapas más avanzadas de la enfermedad, las hojas y los pecíolos pueden ponerse cloróticos y necróticos, quedando aún conectados a la planta. Los tejidos internos del tallo presentan una coloración grisácea debido a la cantidad de microesclerocios desarrollados en ellos (Ivancovich et al., 2016). Estos producen una obstrucción en el sistema vascular del tallo, conduciendo a un marchitamiento acelerado y a la posterior muerte vegetal. La incidencia de la PC se ve favorecida por condiciones climáticas de temperaturas elevadas (28-35°C), humedad edáfica baja y condiciones de estrés hídrico (Mengistu et al., 2007).

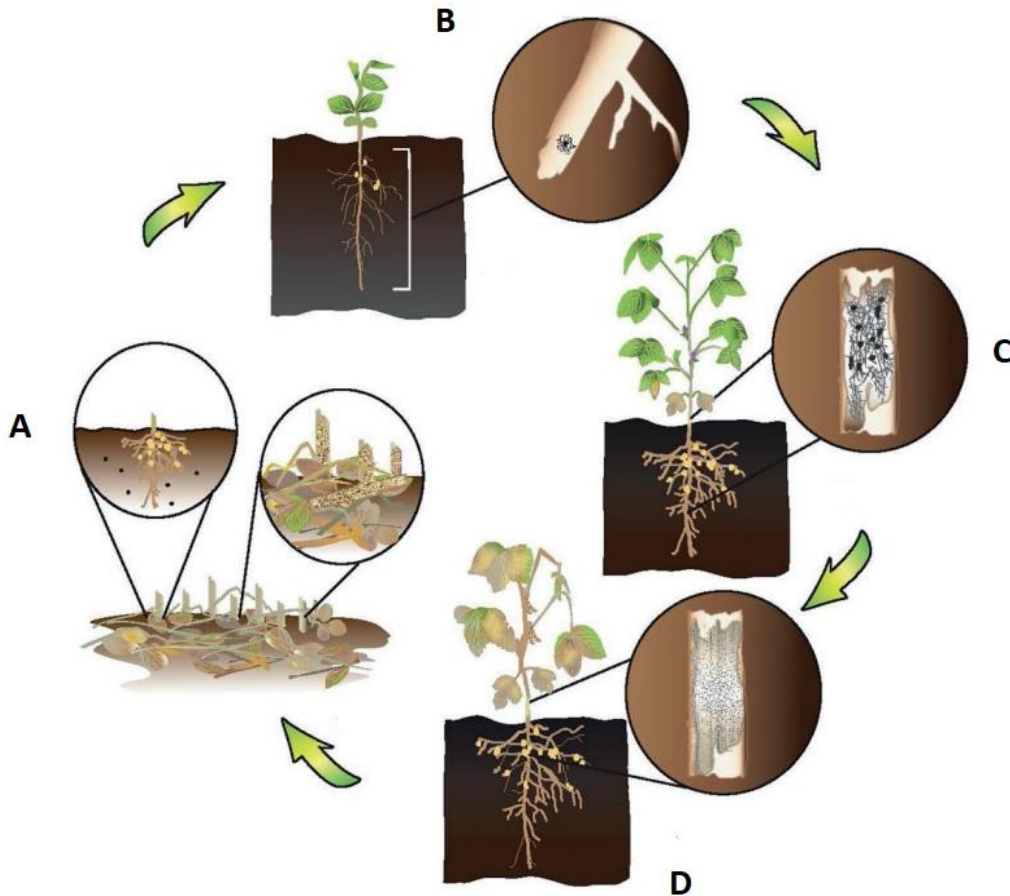


Figura 2. Ciclo de la enfermedad causada por *Mp*. (A) Microesclerocios presentes en el suelo de forma libre o sobre rastrojos infectados, actuando como fuente de inóculo. (B) Comienzo de la infección luego del contacto entre las raíces y los microesclerocios. (C) Desarrollo del hongo dentro del tallo y las raíces, afectando al sistema vascular. (D) Presencia de abundantes microesclerocios en la parte inferior del tallo y en el tejido de la raíz le confiere a los mismos un aspecto grisáceo característico. Los residuos infectados se convertirán en una fuente potencial de inóculo para el siguiente cultivo, comenzando nuevamente el ciclo. Figura extraída de Romero Luna et al. (2017).

1.4. Manejo actual de las enfermedades

A medida que la soja comenzó a establecerse como uno de los cinco cultivos principales, muchos de los estudios científicos comenzaron a enfocarse en estrategias de control de enfermedades, con el objetivo de disminuir las pérdidas en el rendimiento (Wrather et al., 2010).

Una de las formas más tradicionales de proteger a los cultivos es a través de la implementación de prácticas culturales que contribuyan a minimizar la incidencia de los patógenos. La labranza convencional permite reducir la severidad e incidencia de las

enfermedades, debido a que, al realizarla, se entierran los inóculos de los diferentes patógenos y se reduce la producción y dispersión de esporas (Tyler et al. 1983). Otra actividad cultural que disminuye la aparición y desarrollo de enfermedades es la rotación de cultivos por otro no hospedante, favoreciendo la descomposición de los rastrojos infectados y la eliminación del patógeno en el lote, de forma progresiva (Kandel et al. 2021). Sin embargo, en Argentina, el aumento del monocultivo de soja bajo siembra directa, ha favorecido la supervivencia de los patógenos y, por ende, al aumento en la cantidad de inóculo potencialmente infectivo (Wrather et al. 2010).

Otra estrategia muy eficaz para el control de microorganismos patógenos es la utilización de genotipos genéticamente resistentes a los mismos (incorporación de resistencia genética) (Savary et al. 2019). Sin embargo, la utilización de este recurso se limita a un número reducido de enfermedades, dado que sólo se conocen los determinantes genéticos o el mecanismo de acción de una pequeña cantidad de patógenos, dificultando la obtención de líneas resistentes a los mismos (Wrather et al. 2010). Particularmente, para el caso de la PC, sólo existe una variedad de soja (MunasqaRR) reportada con resistencia moderada a dicha enfermedad (Reznikov et al., 2019). Con respecto al CTS, la resistencia genética específica contra *Da* está mediada por al menos cinco genes mayores, no aleléticos y dominantes (*Rdm1*, *Rdm2*, *Rdm3*, *Rdm4* y *Rdm5*), localizados en diferentes cultivares (Pioli, 2003; Chiesa, 2009), mientras que sólo se ha reconocido un gen de resistencia a *Dc* (*Rdc1*) (Peruzzo et al., 2019). A pesar de que la resistencia genética es la forma más eficiente y sustentable para el control de enfermedades, los patógenos pueden superar los mecanismos de resistencia de la planta huésped debido a la presión de selección ejercida sobre el agente causal (Poland, 2016).

Por lo tanto, en los últimos años, la estrategia más utilizada para proteger al cultivo de soja frente a las distintas enfermedades fúngicas es el uso excesivo de productos fitosanitarios. Actualmente, la industria agroquímica produce inoculantes formulados principalmente con tres componentes, que se agregan durante el tratamiento de las semillas, generalmente previo a la siembra (Distéfano, 2018). Estos componentes son: los curasemillas (por lo general formados por una mezcla de los fungicidas metalaxil, tiram y carbendazim), un protector bacteriano (azúcares simples y complejos, glicerol y otros polímeros) y el

bioinoculante (*Bradyrhizobium japonicum*). Sin embargo, la toxicidad asociada a los curasemillas está restringiendo el uso de estos productos debido a los efectos nocivos generados sobre la salud humana, animal y el medioambiente (suelo, agua, aire). Si bien es cierto que determinados productos químicos brindan un efecto positivo en la producción, la mayoría generan, al mismo tiempo, severas consecuencias negativas. Los efectos de los agroquímicos varían debido a su composición química y a los metabolitos que éste pueda generar a partir de su degradación (Vivas Darío, 2020). Tienden a producir elevados índices de contaminación en el suelo, afectando sus propiedades físicas (estructura, porosidad, temperatura, humedad), químicas (fertilidad, ph, capacidad de intercambio, conductividad eléctrica) y biológicas (microflora, micro/mesofauna), dañando las funciones intrínsecas del mismo (Prashar, 2013; Jacobsen, 2014; Cisneros Moscol, 2016). También, pueden ser transportados por escorrentía superficial o infiltrarse, contaminando diferentes cursos de agua (Hough, 2014). Además, los agroquímicos tienen la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse en el ecosistema, por lo que persisten por mucho tiempo en el ambiente (terrestre o acuático) y sus efectos pueden llegar a ser letales (Vivas Darío, 2020). Por otro lado, el uso de estos productos también se ve obstaculizado por el desarrollo de resistencia microbiana, generando una disminución en la efectividad de los mismos y permitiendo la aparición de enfermedades resistentes que para su control requieren de otros insumos pesticidas (Lucas et al., 2015).

1.5. Microorganismos benéficos como alternativa de manejo

Considerando los efectos adversos generados por el uso indiscriminado de antifúngicos químicos, resulta fundamental encontrar nuevos esquemas productivos social, ambiental y económicamente más sustentables. Una alternativa sostenible que ha mostrado ser efectiva en un amplio número de especies vegetales es el agregado de microorganismos del suelo (Raymaekers et al., 2020), o los compuestos producidos por ellos (Chalfoun et al., 2018), para estimular el crecimiento y desarrollo vegetal y mejorar la salud de las plantas (Schlatter et al., 2017; Passari et al., 2019; Suárez-Moreno et al., 2019). Esta promoción está mediada por microorganismos promotores del crecimiento vegetal denominados PGPM (del inglés: *Plant Growth Promoting Microorganisms*). Además, debido a la problemática que

conlleva adoptar alimentos producidos por plantas genéticamente modificadas, la utilización de PGPM es una herramienta útil para disminuir la dependencia global de los productos agroquímicos (Ahemad y Kibret, 2014). Los microorganismos más estudiados y utilizados en la formulación de inoculantes comerciales pertenecen a los géneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Streptomyces* (Pieterse et al., 2014; Agostini et al., 2018; Liu et al., 2019; Mufti, 2019; Einloft et al., 2021).

Algunos de los efectos benéficos registrados generados por los mismos son: aumento de la velocidad de germinación de semillas, estimulación de formación de raíces, aumento de biomasa, fortalecimiento de los mecanismos naturales de defensa a enfermedades e insectos patógenos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico y a la salinidad, entre otros (Verma et al., 2016). En general, los PGPM promueven el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos. La promoción directa ocurre cuando los microorganismos aumentan la disponibilidad de nutrientes en el suelo (nitrógeno, hierro, fósforo y otros microelementos) requeridos para el metabolismo vegetal, o cuando sintetizan compuestos químicos (fitohormonas, como ácido indol acético (AIA) o metabolitos secundarios) aprovechables por las plantas. En cambio, la promoción indirecta se produce cuando los microorganismos disminuyen o previenen los efectos perjudiciales generados por distintos organismos patógenos, actuando como agentes de control biológico (Ahemad y Kibret, 2014). Es importante destacar que un PGPM puede promover el crecimiento y desarrollo mediante el uso de uno o más de estos mecanismos (Beneduzi et al., 2012).

Frente a la necesidad de reducir el uso de fungicidas químicos, en los últimos años se intensificó la búsqueda de nuevas tecnologías orientadas al control biológico de enfermedades (Amerio, 2020). Éstas utilizan PGPM que, principalmente a través de métodos indirectos como la producción de sideróforos y antimicrobianos y la resistencia sistémica inducida (ISR, del inglés *Induced Systemic Resistance*), contribuyen a mejorar el estado fisiológico y sanitario de las plantas y a favorecer el rendimiento de los cultivos (Benjumeda Muñoz, 2017). Sin embargo, es importante corroborar que aquellos microorganismos PGPM que se utilicen como agentes de biocontrol, no generen efectos negativos sobre las comunidades microbianas no blanco, como las micorrizas (Correa et al., 2011), las cuales

brindan múltiples beneficios a las plantas, favoreciendo la sanidad y rendimiento de los cultivos.

1.5.a. Producción de sideróforos, antibióticos y antifúngicos

La síntesis de sideróforos y de sustancias antimicrobianas son dos de los mecanismos más efectivos conocidos que un microorganismo antagonista puede emplear para minimizar o impedir la proliferación de fitopatógenos (Beneduzzi et al., 2012).

Para satisfacer los requerimientos nutricionales de hierro, los microorganismos han desarrollado vías altamente específicas que emplean compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular denominados sideróforos. En condiciones aeróbicas, este elemento se presenta en su forma oxidada (Fe^{+3}) formando parte de compuestos insolubles, haciendo que se encuentre inaccesible tanto para las plantas como para los microorganismos (Rajkumar et al., 2010). Comúnmente las bacterias adquieren hierro mediante la producción de estos compuestos, que solubilizan y extraen el hierro insoluble de los complejos minerales u orgánicos (Wandersman y Delepelaire, 2004). Además, debido a que la mayoría de los sideróforos son solubles en agua, las plantas pueden asimilar el hierro presente en los sideróforos bacterianos.

La producción de sideróforos juega un papel central en la capacidad de los diferentes PGPM para mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las cepas microbianas capaces de producir grandes cantidades de sideróforos con alta afinidad por el hierro, desempeñan un rol muy importante en la supresión de enfermedades, pudiendo seleccionarse para el control biológico de otros patógenos que no producen sideróforos o que producen en menor cantidad, debido a que la obtención de hierro en grandes cantidades les brinda una ventaja competitiva que les permite colonizar las raíces y excluir a dichos microorganismos de este nicho ecológico (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Además de la producción de sideróforos, la capacidad de los PGPM de ejercer control biológico depende en gran medida de la producción de antimicrobianos (Haas y Keel, 2003). Los antibióticos y antifúngicos abarcan un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que interfieren en el crecimiento o en las actividades metabólicas de

otros microorganismos. Se han aislado numerosos tipos a partir de cepas fúngicas y bacterianas, y esta diversidad incluye, principalmente, mecanismos de acción que inhiben la síntesis de las paredes celulares de los patógenos, influyen en las estructuras de membrana de las células e inhiben la formación de complejos de iniciación en la subunidad pequeña del ribosoma (Maksimov et al., 2011).

Para cuantificar el efecto inhibitorio de estos metabolitos, históricamente se han realizado ensayos *in vitro* donde se enfrentan diferentes patógenos con el microorganismo productor de compuestos antimicrobianos, midiéndose fácilmente el efecto antagonista a través de los halos de inhibición. Si bien la antibiosis ha sido reportada como un mecanismo de biocontrol efectivo en un amplio número de microorganismos (*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Trichoderma*), a menudo se utiliza para explicar los principios del control biológico, sobrestimando la importancia de este modo de acción en comparación con otros mecanismos que no pueden detectarse a través de ensayos *in vitro*, como la resistencia sistémica inducida (Kohl et al., 2019). En este sentido, nuestro grupo comenzó trabajando con dos cepas de *Streptomyces* del suelo productoras de antifúngicos (*S. filipinensis* y *S. eurocidicus*) (Bercovich et al., 2022). A pesar de que estas cepas no tenían una historia previa de interacción con plantas de soja, ejercieron un control biológico efectivo frente a infecciones con *Da* y *Mp* (Bercovich et al., 2022). En las plantas que fueron tratadas con estas bacterias productoras de antifúngicos se observó una disminución significativa de los síntomas típicos de las enfermedades (Fig. 3-A y B) y del porcentaje de plantas muertas (% PM), en comparación con aquellas plantas infectadas sin tratar (Control). Sorprendentemente, cepas mutantes de *S. filipinensis* (SF.NP) y *S. eurocidicus* (SE.NP) no productoras de antifúngicos también mostraron efectos de protección similares a los obtenidos por las cepas productoras de antifúngicos, sugiriendo que habría otro/s mecanismo/s de protección involucrados, además del efecto directo de los antifúngicos secretados, como podría ser la inducción de la resistencia sistémica (ISR).

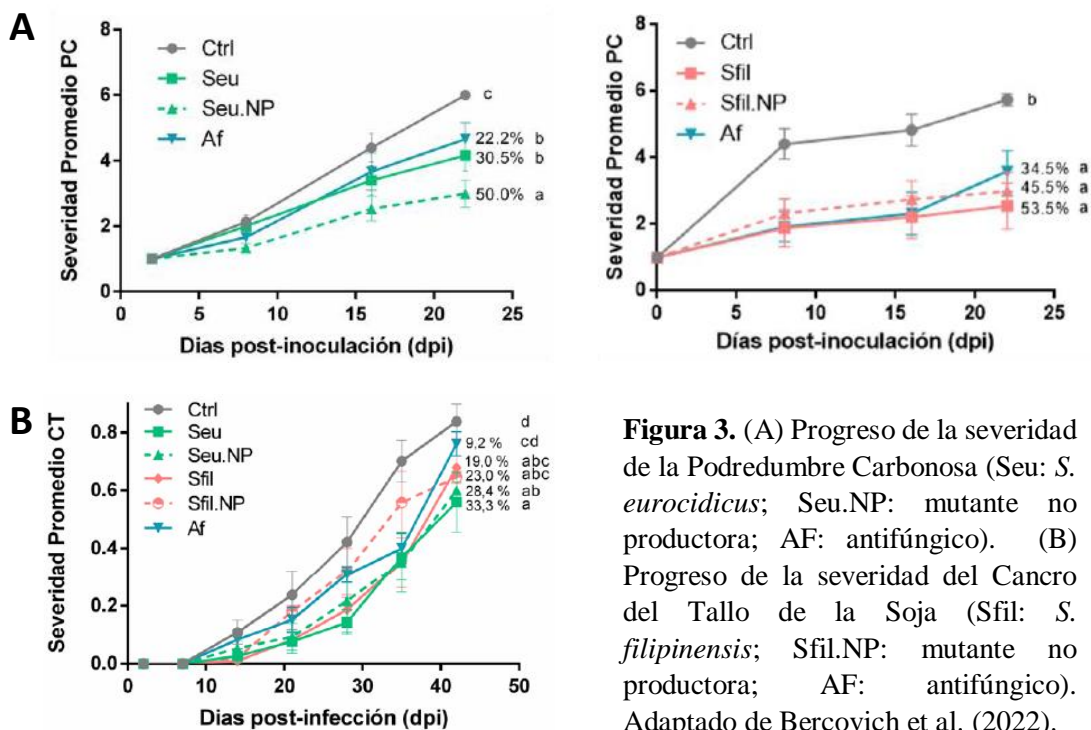


Figura 3. (A) Progreso de la severidad de la Podredumbre Carbonosa (Seu: *S. euroticidicus*; Seu.NP: mutante no productora; AF: antifúngico). (B) Progreso de la severidad del Cancro del Tallo de la Soja (Sfil: *S. filipinensis*; Sfil.NP: mutante no productora; AF: antifúngico). Adaptado de Bercovich et al. (2022).

1.5.b. Resistencia sistémica inducida

Las plantas están constantemente expuestas a situaciones de estrés debido a las condiciones ambientales cambiantes o por su contacto con numerosas plagas y microorganismos patógenos que evolucionan rápidamente para evadir las defensas del hospedante (Balmer et al, 2015). Los mecanismos de defensa físicos y químicos constitutivos (cutículas cerosas, paredes celulares, lignina, fenoles, terpenos), son mecanismos inespecíficos que contribuyen a la supervivencia vegetal. Sin embargo, las plantas también pueden defenderse de manera específica a través de diferentes mecanismos. Los mecanismos de defensa inducidos son activados por inductores biológicos o químicos que son reconocidos por receptores vegetales específicos. Las plantas pueden desarrollar resistencia inducida como resultado de la infección por un patógeno (SAR, del inglés *Systemic Acquired Resistance*), en respuesta a la herbivoría de insectos (HIR, del inglés *Herbivore induced resistance*) o tras la colonización de las raíces por microbios beneficiosos específicos (ISR, del inglés *Induced systemic resistance*), expresándose no sólo localmente en el sitio de inducción, sino también sistémicamente en las partes de la planta que están separadas espacialmente del inductor (Pieterse et al., 2014).

Los PGPM estimulan el sistema inmune de las plantas, generando una capacidad defensiva mejorada frente a múltiples patógenos, promoviendo en última instancia, la buena sanidad vegetal (Conrath et al., 2015). Esta preparación de la planta para combatir mejor el futuro ataque de patógenos, se denomina *priming* o *estado cebado*, y comienza con el reconocimiento de un estímulo inicial. Muchos componentes bacterianos actúan como inductores o estímulos, entre ellos encontramos a lipopolisacáridos, flagelos, sideróforos, antibióticos, lipopéptidos cíclicos, 2,4-diacetilfloroglucinol, homoserina lactonas y compuestos volátiles como acetoina y 2,3-butanodiol (Bonilla Buitrago et al., 2021). Durante esta fase los niveles de varios metabolitos primarios y secundarios, enzimas, hormonas y otras moléculas se alteran ligeramente, poniendo a la planta en un estado de prealerta que le permitirá reaccionar más rápidamente y/o más eficientemente frente a un futuro estrés (Balmer et al., 2015). Posteriormente, cuando la planta se enfrenta al estrés desafiante, despliega una respuesta defensiva más rápida, intensa y contundente, minimizando los daños causados por el mismo, afectando en menor grado la salud de la planta y, teniendo, por tanto, una menor repercusión en el rendimiento del cultivo. El *priming* puede ser duradero y mantenerse durante todo el ciclo de vida de la planta e incluso puede transmitirse a generaciones posteriores, por lo que representa un tipo de memoria inmunológica que le permite a las plantas recordar situaciones estresantes (Mauch-Mani et al., 2017).

1.6. Antecedentes del grupo de trabajo

Desde hace unos años nuestro grupo de trabajo se enfocó en la caracterización de cepas del género *Streptomyces* aisladas de la rizósfera de plantas de soja pertenecientes a la zona sojera núcleo con el fin de desarrollar nuevos agentes de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal y biocontrol.

Inicialmente se analizaron cepas de colección (Bercovich 2022; Bercovich et al., 2022) y luego se aislaron 78 actinobacterias provenientes de suelo rizosférico de plantas de soja de la zona sojera núcleo, las cuales fueron caracterizadas en base a la producción de antifúngicos, compatibilidad con *B. japonicum*, capacidad de producir sideróforos y ácido indolacético y de solubilizar fosfato tricálcico, *in vitro*. Ésto permitió seleccionar tres (3) cepas del género *Streptomyces*, que presentan muy buenas cualidades como posibles PGPR

(Tabla 1) (Villafañe, 2020). La cepa N3, resultó ser no productora de compuestos con actividad antifúngica detectable *in vitro*, a diferencia de las cepas N2A y N9 que sí mostraron inhibición de los hongos *Mp* y *Da* en las condiciones ensayadas. Estas cepas fueron las elegidas para continuar con los estudios que aquí se detallan.

Tabla 1. Caracterización de las propiedades de PGPM *in vitro*

Cepa	Solubilización fosfato tricálcico	Producción IAA	Producción sideróforos	Inhibición <i>Mp</i>	Inhibición <i>Da</i>	Inhibición <i>B. japonicum</i>
N2A	++	+	++	++++	+++++	-
N9	++	+	++	++++	+++++	-
N3	+	+	++	-	-	-

(++) >2,5 mg/ml
(+) 2-2.5 mg/ml
(-) <2 mg/ml

(+) banda TLC

(++) >50%
(+) <50%
(-) =0%

(+++++) 20-25 mm halo; (++++) 15-20 mm halo;
(++) 10-15 mm halo; (+) 5-10 mm halo
(-) Sin inhibición observable

Por lo tanto, en este contexto, planteamos las siguientes hipótesis (H) de trabajo: H1) el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* promueve el crecimiento y desarrollo desde estadios iniciales del ciclo de vida de las plantas de soja; H2) el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* promueve el crecimiento y desarrollo aún en plantas infectadas con un patógeno fúngico; H3) el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* induce un mecanismo de defensa que mejora el desempeño de la planta en la resistencia contra patógenos fúngicos; H4) existe compatibilidad entre las cepas de *Streptomyces* de interés y las micorrizas arbusculares (HFMA) que contribuye a la nutrición de las plantas de soja.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto consistió en analizar el impacto sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de soja y la respuesta de defensa contra distintos patógenos fúngicos, inducidos por tres cepas de *Streptomyces*. El objetivo a largo plazo es reducir el impacto ambiental del uso actual de fungicidas químicos y utilizar el potencial adicional que tienen estas bacterias como promotoras del crecimiento y desarrollo vegetal que hasta la fecha no ha sido explotado en la producción agrícola local.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de las cepas sobre el establecimiento de las plantas, evaluando el impacto en etapas tempranas como germinación y emergencia.
2. Evaluar el efecto producido por las cepas de *Streptomyces* sobre el crecimiento y desarrollo vegetal en plantas sanas y en plantas inoculadas con *D. aspalathi*.
3. Estudiar la capacidad biocontroladora *in vivo* de las distintas cepas frente a los hongos fitopatógenos de soja: *Diaporthe aspalathi* y *Macrophomina phaseolina*.
4. Evaluar la micorrización de plantas de soja previamente inoculadas con las cepas de *Streptomyces*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico: microorganismos y material vegetal

En la Tabla 2 se detallan los microorganismos (hongos y bacterias) utilizados durante el desarrollo de este trabajo de tesina. Los patógenos fúngicos *M. phaseolina* y *D. aspalathi* se sembraron en placas con medio de cultivo sólido APG (39 mg/L) (agar papa glucosado: extracto de papa 4 g/L; dextrosa 20 g/L; agar 15 g/L) suplementado con ácido láctico (2 mg/L). Se llevaron a estufa a 27°C durante siete días y posteriormente se conservaron en heladera a 4°C hasta su utilización. Las cepas de *Streptomyces* (N2A, N3, N9, SE y SE.NP) se crecieron en medio líquido (ISP2) (International Streptomyces Project 2: extracto de levadura 4 g/L; extracto de malta 10 g/L; glucosa 4 g/L; agar 15 g/L) (Osato et al., 1955; Kieser et al., 2000), con agitación constante a 180 rpm en baños termostatzados a 30°C, partiendo de esporas guardadas a -80°C para la obtención de micelio (Bercovich et al., 2022).

Tabla 2. Microorganismos utilizados.

MICROORGANISMO	FUENTE
<i>Diaporthe aspalathi</i> (CCC 123-09)	Bercovich et al., 2022
<i>Macrophomina phaseolina</i> (Mp17)	Reznikov et al., 2019
<i>Streptomyces</i> sp.: <i>S. eurocidicus</i> (SE) y <i>S. eurocidicus</i> mutante (SE.NP)	Bercovich et al., 2022
<i>Streptomyces</i> sp. rizosféricas: N2A, N3 y N9	Villafañe, 2020.

Todos los ensayos *en planta* se realizaron usando dos genotipos de soja diferentes: RA702 y DM 6.2i RR, previamente caracterizados como susceptibles a *D. aspalathi* (Chiesa et al., 2013) y a *M. phaseolina* (Reznikov et al., 2019), respectivamente.

2.2 Tratamiento de semillas con las cepas bacterianas

Para el tratamiento de semillas se utilizaron cultivos líquidos de 48 hs de crecimiento de cada cepa de *Streptomyces* en conjunto con el protector bacteriano PROTEGE TS® (100ml/50kg-semilla de protector), en proporción 1:1, alcanzando un volumen final de 1,5 µl/semilla, de acuerdo a protocolo publicado en Bercovich et al. (2022). En los tratamientos control, las semillas se trataron con agua destilada y protector (1:1), mientras que en los tratamientos con antifúngico (mezcla de metalaxil, tiram y carbendazim) las semillas se trataron con agua destilada, protector bacteriano y antifúngico (AF) (6µl AF/30 semillas).

Para el análisis de efecto sobre la germinación y el ensayo en invernadero (promoción de crecimiento, biocontrol frente *Da* y micorrización), las semillas se colocaron en diferentes bolsas de nylon junto con el inóculo correspondiente para cada tratamiento. Se mezclaron por aproximadamente 1 min y se dejaron secar al menos 30 min antes de su uso. En cambio, para el análisis de biocontrol frente *Mp*, el inóculo correspondiente a cada tratamiento se colocó de manera individual directamente sobre la superficie de la radícula germinada utilizando micropipeta (Bercovich et al., 2022).

2.3 Análisis de efecto sobre la germinación

Con el objetivo de estudiar el impacto de los tratamientos bacterianos sobre las etapas tempranas del crecimiento y desarrollo de plantas de soja, se estudió el efecto sobre la germinación de las semillas.

El análisis de germinación de semillas se realizó siguiendo las condiciones estandarizadas establecidas por el ISTA (ISTA, 2021). Se analizaron cinco tratamientos: (1) Control Absoluto (sin tratar), (2) AF, (3) *Streptomyces* N2A, (4) *Streptomyces* N3, y (5) *Streptomyces* N9, dispuestos en un diseño completamente al azar. Para cada tratamiento, se tomaron 150 semillas al azar y se las distribuyeron en tres repeticiones, representadas por tres bandejas plásticas. En cada bandeja (repetición) se utilizó arena estéril humedecida con 0,350 ml de agua destilada. Sobre este sustrato, se dispusieron 50 semillas en cinco filas de diez semillas cada una, y se cubrieron con 1-2 cm de sustrato húmedo sin compactar (Fig. 4-A). Luego, las bandejas fueron cubiertas con bolsas de nylon y llevadas a cámara de

crecimiento por cinco días bajo condiciones controladas de luz (fotoperiodo 16:8h luz:oscuridad) y temperatura (27-30°C) (Fig. 4-B).

Para la evaluación de semillas germinadas, se utilizaron las tres categorías establecidas por el ISTA: plántulas normales (intactas, con defectos leves, con infección secundaria), plántulas anormales (dañadas, deformadas o desbalanceadas, podridas) y semillas no germinadas (duras, frescas y muertas) (Fig. 4-C). El porcentaje de germinación (% G) de cada tratamiento se determinó contabilizando la cantidad de ‘plántulas normales’ con respecto a la cantidad total de semillas sembradas inicialmente.

Posterior a la determinación del % G, se colocaron las plántulas normales de cada repetición en bolsas de papel madera (1 bolsa/repetición; 3 bolsas/tratamiento) y se llevaron 48 hs a estufa a 70°C, para determinar el peso seco (PS) promedio por plántula (mg). Se realizaron tres pesadas consecutivas hasta obtener un valor constante.

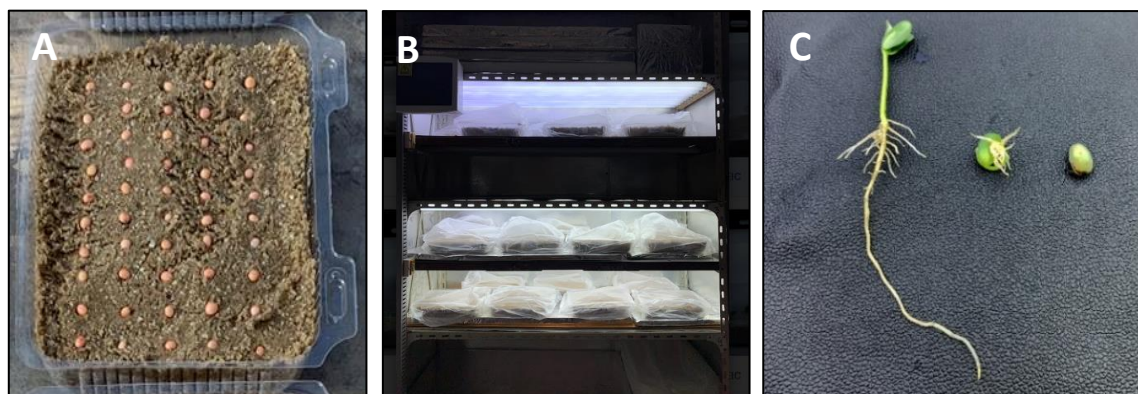


Figura 4. (A) Disposición de las semillas por repetición. (B) Repeticiones de cada tratamiento cubiertas con bolsas de nylon, distribuidas dentro de la cámara de crecimiento. (C) A la izquierda plántula normal intacta, en el centro plántula anormal deformada y a la derecha semilla no germinada, según reglas ISTA (ISTA, 2021)

2.4 Análisis de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal, biocontrol frente a *D. aspalathi* e intensidad de micorrización

Para realizar este ensayo se usaron semillas del genotipo RA702, caracterizado previamente como altamente susceptible a *Da* (Chiesa et al., 2013). Se plantearon siete tratamientos: (1) Control absoluto, (2) Control de infección, (3) AF comercial, (4) *Streptomyces* N2A, (5) *Streptomyces* N9, (6) *Streptomyces* SE y (7) *Streptomyces* SE.NP,

dispuestos en un diseño completamente al azar, con nueve repeticiones cada uno (Fig. 5-A). En cada repetición (bandeja plástica), se colocaron seis vasos plásticos de 330 cm³ con una mezcla de tierra y perlita (3:1). Con el objetivo de analizar la nodulación con inóculo naturalizado y micorrización, se utilizó tierra no estéril. En cada vaso se sembraron dos semillas previamente tratadas con las cepas de *Streptomyces* (12 semillas/repetición; 108 semillas/tratamiento) (Fig. 5-B). Los mismos fueron regados por subirrigación con agua. A los siete días post siembra (dps) se ralearon las plántulas con tijera para evitar daños en el sistema radicular, dejando solo una planta por vaso (Fig. 5-C), y a los 21 dps se realizó la inoculación con *Da*. El ensayo se evaluó hasta los 50 días post inoculación (dpi) con el patógeno.

Las nueve bandejas de cada tratamiento se sembraron de manera simultánea y se clasificaron en tres categorías diferentes: *GRUPO 1* o “G1” (dos repeticiones: 12 plantas totales), *GRUPO 2* o “G2” (dos repeticiones: 12 plantas totales) y *GRUPO 3* o “G3” (cinco repeticiones: 30 plantas totales) (Fig. 6). Las plantas incluidas dentro del G1 no fueron inoculadas con *Da*, y se destinaron a la evaluación de parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en plantas no inoculadas con el patógeno. Las plantas pertenecientes al G2 se utilizaron para la medición de los mismos parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal luego de la inoculación con el hongo, mientras que las incluidas dentro del G3 se utilizaron para estudiar el progreso de la enfermedad (capacidad biocontroladora de las distintas cepas de *Streptomyces* frente a *Da*) y medir el porcentaje de micorrización al final del ensayo en plantas vivas.

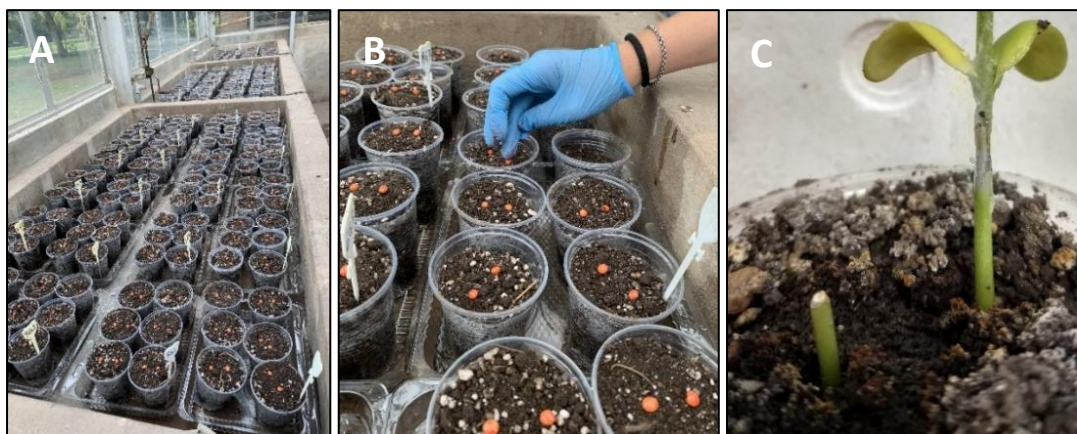


Figura 5. (A) Repeticiones de todos los tratamientos ensayados dispuestos aleatoriamente dentro del invernadero. (B) Siembra de dos semillas previamente tratadas por vaso. (C) Raleo de plántulas.

En la Figura 6 se esquematiza el desarrollo del ensayo ejemplificado con las nueve repeticiones de un único tratamiento, y se detalla cronológicamente las mediciones realizadas durante la extensión del mismo. Éste se realizó dos veces (réplicas biológicas) en épocas diferentes del año: marzo/mayo (réplica 1) y septiembre/noviembre (réplica 2), con una duración total de 70 días cada uno (70 dps).

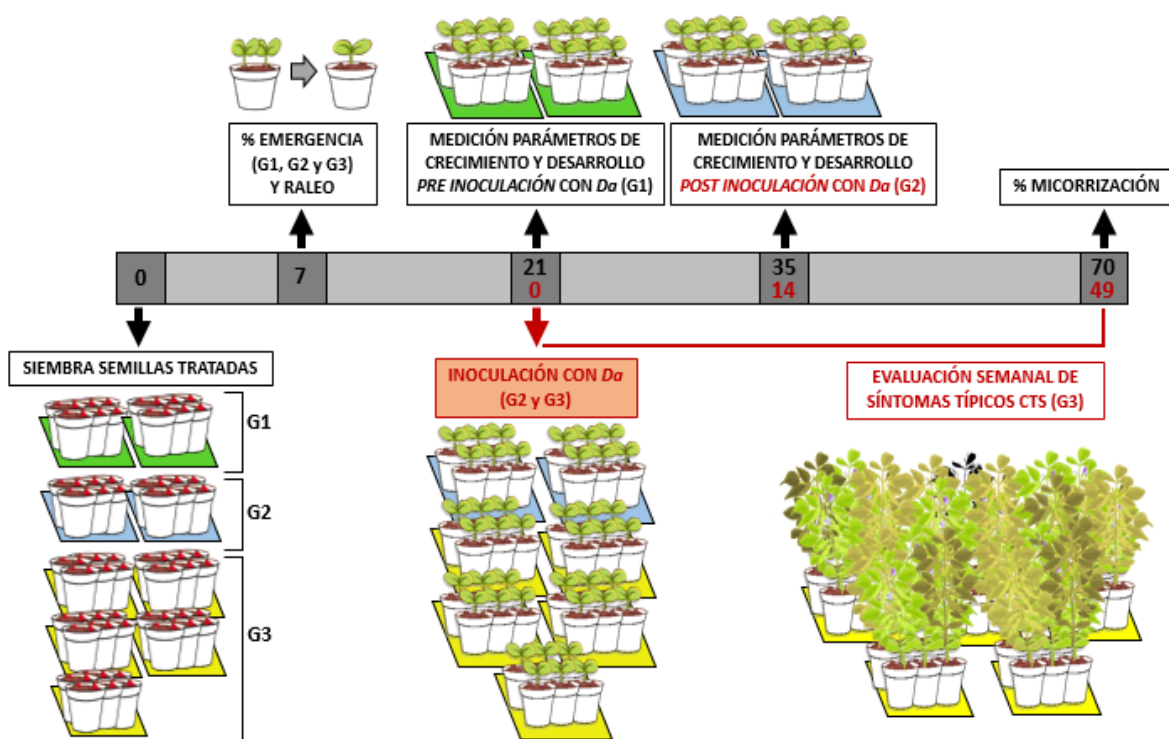


Figura 6. Esquema representativo del desarrollo experimental del ensayo, ejemplificado para un único tratamiento. La escala numérica negra representa los días post siembra (dps), mientras que la escala roja, los días post inoculación (dpi) con *Da*. Las semillas tratadas con las cepas de *Streptomyces* se dispusieron en nueve repeticiones esquematizadas en color verde (G1), celeste (G2) y amarillo (G3). A los siete dps se midió el porcentaje de emergencia en todas las repeticiones y posteriormente se raleó. A los 21 dps se midieron parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en las plantas del G1, y posteriormente se inocularon con *Da* las del G2 y G3. A los 14 dpi (o 35 dps) se midieron los mismos parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en las plantas inoculadas con el patógeno del G2. A partir del día de la inoculación (21 dps) y hasta el final del ensayo (70 dps o 49 dpi), se evaluó semanalmente los síntomas típicos del Cancro del Tallo de la Soja (CTS) en las plantas del G3. Por último, a los 49 dpi se midió el porcentaje de micorrización en plantas vivas del G3.

2.4.a. Estudios de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal

Para evaluar el efecto generado por las cepas de *Streptomyces* sobre el *fitness* de las plantas de soja se evaluaron parámetros destructivos asociados al crecimiento y desarrollo vegetal. Los mismos se midieron en dos tiempos diferentes: a los 21 dps en plantas no inoculadas con *Da*, y a los 14 dpi en plantas inoculadas con el patógeno fúngico. Para la primera situación se utilizaron las plantas del G1 (12 plantas/tratamiento), mientras que para la segunda, las plantas pertenecientes al G2 (12 plantas/tratamiento).

Se analizaron 13 parámetros diferentes:

- Porcentaje total de emergencia (G1, G2 y G3)
- Estadio fenológico
- Altura (cm)
- Número de nudos en el tallo principal
- Número de ramificaciones
- Área foliar (cm²)
- Número de nódulos en raíz principal
- Número de nódulos en raíces secundarias
- Peso seco (g) de tallos, folíolos, pecíolos, raíces y nódulos.

Debido a que en la primera réplica biológica algunos parámetros analizados (estadio fenológico, altura, N° de ramificaciones y N° de nódulos en raíces secundarias) no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles (datos no mostrados), se decidió no evaluarlos en la segunda réplica. Cabe aclarar que los mismos tampoco se vieron afectados negativamente. Por lo tanto, en la sección Resultados sólo se desarrollan aquellos parámetros medidos en ambas réplicas (N° de nudos TP, área foliar, N° de nódulos en RP y PS de partes aéreas y radicales).

2.4.a.I. Porcentaje total de emergencia

El porcentaje de emergencia (% E) es el único parámetro analizado para el cual se consideraron las nueve repeticiones de cada tratamiento (G1, G2 y G3; 108 semillas), y no implicó mediciones destructivas.

El % E de cada tratamiento se midió a los siete dps, previo al raleo de plántulas. Este parámetro se calculó cuantificando la cantidad de plántulas que pudieron emerger a la superficie con respecto al total de semillas sembradas inicialmente. Se consideró como plántula emergida a aquella cuyos cotiledones se encontraban por encima del nivel del sustrato (Fig. 7).



Figura 7. Plántula emergida con los cotiledones por encima del nivel del sustrato. A la derecha se observa una semilla germinada, pero con sus cotiledones sumergidos, no considerándose como emergida.

2.4.a.II. Determinación del Estadio Fenológico

Para la determinación de los diferentes estadios fenológicos de las plantas de soja se utilizó la escala propuesta por Fehr y Caviness en 1971 (Fehr et al., 1971), basada en determinaciones macroscópicas fácilmente observables. La etapa vegetativa se indica con la letra V y comprende varios estadios: V_E (Fig. 8-A), V_C (Fig.8-B) y V_N .

Cada estadio V_N se determina contando el número de nudos sobre el tallo principal (TP) que tienen o han tenido hojas completamente desplegadas, comenzando por el nudo que porta el primer par de hojas unifoliadas. Se considera que una hoja está completamente desplegada cuando los bordes de los folíolos de la hoja situada en el nudo inmediatamente superior, no se tocan. De esta manera, se identifica el estadio V_n , donde la hoja trifoliada del nudo n está desenrollada (Fig. 8-C).

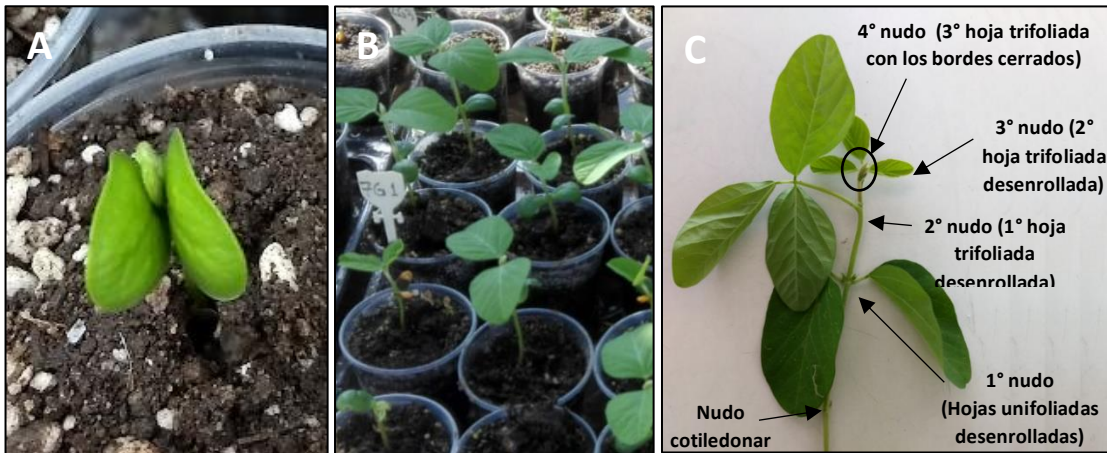


Figura 8. (A) Plántula *emergida* con los cotiledones por encima de la superficie, con el primer par de hojas unifoliadas sin abrir. (B) Planta en estado *cotiledonar* con el primer par de hojas unifoliadas desenrolladas y la primera hoja trifoliada con los folíolos cerrados. (C) Planta en estadio V2. La primera hoja trifoliada se encuentra totalmente expandida y los bordes de los folíolos de la segunda hoja trifoliada ubicada en el nudo inmediato superior, no se tocan.

2.4.a.III. Altura de la planta

Cada planta se dispuso sobre una superficie lisa, y con cinta métrica se midió la longitud (cm) entre el nudo cotiledonar y el ápice de la misma.

2.4.a.IV. Área foliar

Se utilizó un medidor de área foliar LI-COR LI-3.100C perteneciente al LEFIVE (Laboratorio de EcoFisiología Vegetal). A cada hoja se le extrajo el peciolo, y a cada folíolo se le retiró el peciolulo. Las láminas de cada planta se depositaron sobre cintas transportadoras transparentes, evitando el solapamiento entre ellas para no subestimar la medición.

2.4.a.V. Biomasa de estructuras vegetales

Se separaron los tallos, ramificaciones, peciolo/peciólulo, folíolos, raíces y nódulos totales de cada una de las 12 plantas por tratamiento (Fig. 9). Las estructuras de cada planta se colocaron en seis bolsas individuales de papel madera y se llevaron 48 hs a estufa a 70°C.

Luego, se realizaron pesadas consecutivas con balanza analítica hasta obtener un valor constante de peso seco (PS) de cada estructura.

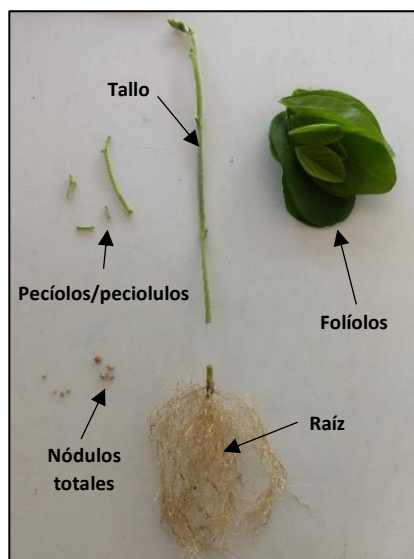


Figura 9. Separación de las distintas estructuras vegetativas por planta.

2.4.b. Estudios de control biológico frente *D. asphalathi*

Para evaluar la capacidad biocontroladora de las cepas de *Streptomyces* frente al hongo fitopatógeno *Da*, se utilizaron las cinco repeticiones incluidas dentro del G3 de cada tratamiento (6 plantas/repetición; 30 plantas totales/tratamiento). La inoculación artificial del patógeno y la evaluación del progreso de la enfermedad, se realizaron siguiendo los protocolos descritos en Chiesa et al. (2009).

2.4.b.I. Inoculación artificial del patógeno

Como se describió anteriormente, tanto las plantas del G2 como las del G3 de cada tratamiento, fueron inoculadas artificialmente con *Da* a los 21 dps (Fig. 10-A), con un aislamiento local de *Da* (CCC 123-09, Tabla II), a excepción de las incluidas dentro del tratamiento control absoluto. Se realizó una herida longitudinal cortando la capa epidérmica externa del tallo con un bisturí estéril por debajo del nudo cotiledonar. El corte se realizó paralelo al eje del hipocótilo desde arriba hacia abajo, manteniendo la parte inferior de la porción cortada unida al tallo (Fig. 10-B). En la herida se insertó una porción (1.5 x 1.5 mm aproximadamente) de APG (15 g/L agar, extracto de papa 4 g/L y glucosa 20 g/L) colonizado

con micelio fúngico de *Da*, e inmediatamente se cubrió con vaselina sólida para evitar la deshidratación (Fig. 10-C). Todas las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero hasta los 49 dpi (70 dps).

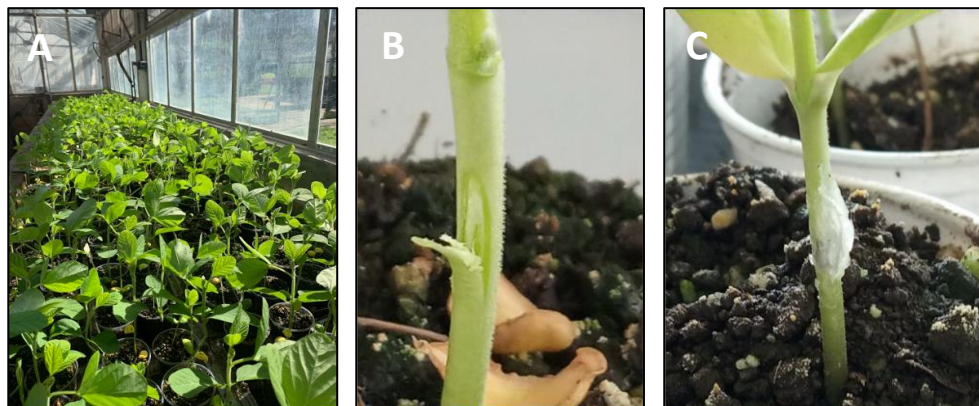


Figura 10. (A) G2 y G3 de los diferentes tratamientos a los 21 dpi (estadio V2). (B) Incisión longitudinal por debajo del nudo cotiledonar. (C) Inoculación con *Da* y cobertura de la herida con vaselina.

2.4.b.II. Evaluación del Progreso de la Enfermedad

Para estudiar la capacidad biocontroladora de las cepas de *Streptomyces* frente al hongo se utilizaron las cinco repeticiones del G3. Para medir este efecto, se evaluó el progreso de la enfermedad siguiendo el avance de los síntomas típicos del CTS de manera semanal, desde el momento de la inoculación con el hongo hasta el final del ensayo (0 a 49 dpi).

Se utilizó una escala con cuatro categorías que permitieron medir la severidad de la enfermedad (Pioli et al., 2003). Se asignó un *valor de 0* a aquellas plantas que no presentaban síntomas (Fig. 11-A), *0,3* a las plantas que presentaban sólo síntomas de clorosis foliar internerval (Fig. 11-B) o aparición de una coloración pardo-rojiza por encima de la zona de inoculación (cancro) (Fig. 11-C), *0,6* a las plantas con síntomas de necrosis foliar y cancro en el tallo (Fig. 11-D) y un valor de *1* a las plantas muertas (PM) (Fig. 11-E).

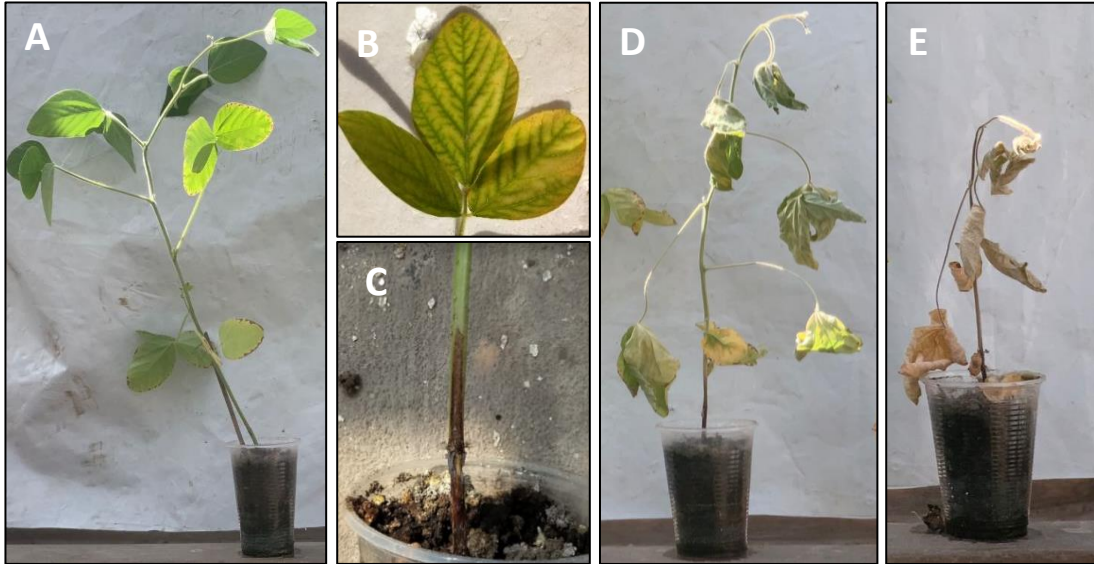


Figura 11. (A) Planta infectada con *Da* sin síntomas de la enfermedad, a la cual le corresponde un valor de 0 en la escala de severidad. (B) Síntomas foliares; valor de 0,3. (C) Avance del cancro en el tallo; valor de 0,3. (D) Planta con síntomas avanzados; valor de 0,6. (E) Planta muerta; valor de 1 en la escala de severidad.

2.4.c. Análisis de colonización micorrízica

Para evaluar la compatibilidad *in vivo* entre las cepas de *Streptomyces* y los hongos formadores de micorrizas presentes naturalmente en el suelo se utilizaron plantas pertenecientes al G3, que al final del ensayo (70 dps o 49 dpi) se encontraban vivas, sin síntomas o con síntomas leves (valores 0 o 0,3 en la escala de severidad de la enfermedad). Se analizó el porcentaje de micorrización de los tratamientos: (1) Control de infección, (2) *Streptomyces* N2A, (3) *Streptomyces* N9 y (4) *Streptomyces* SE.

Para cada tratamiento, se cortaron los sistemas radiculares completos de tres plantas y se enjuagaron con agua de la canilla para retirar el exceso de sustrato. Posteriormente, se colocaron de manera individual en tres bolsas de papel madera rotuladas, y se llevaron a estufa a 70°C durante 48 hs para su deshidratación y posterior conservación.

2.4.c.I) Tinción y preparación de preparados

Las raíces deshidratadas se colocaron de manera individual en tubos Falcon de 50 ml, y se las dejó completamente sumergidas en agua destilada durante 48 hs para su

rehidratación. Transcurrido el tiempo, se descartó el agua y se agregó a cada tubo 50 ml de KOH al 10 % (v/v) para permitir la decoloración de las raíces. Las mismas se incubaron durante 20 min en baño termostatzado a 80°C. Posteriormente se lavaron con abundante agua de la canilla, desechando previamente la solución básica. Luego se añadió 50 ml de HCl al 1 %, y se dejó actuar por 20 min a temperatura ambiente. Las raíces acidificadas sin lavar se colocaron nuevamente en tubos, y se añadió solución de glicerina ácida con colorante azul de metilo al 0,05 % hasta lograr una cobertura completa de las mismas. Los tubos se incubaron durante 20 min en baño termostatzado a 90°C. Luego, se descartó la solución con colorante, y sin enjuagar las raíces, se le agregó a cada uno 30 ml de glicerina ácida (Fig. 16-A), y se los incubó durante una hora a 90°C.

Finalizada la tinción, se procedió a montar un único preparado por tratamiento, formado por 20 porciones radiculares previamente teñidas de aproximadamente 1 cm de longitud, provenientes de los tres individuos (Fig. 16-B).

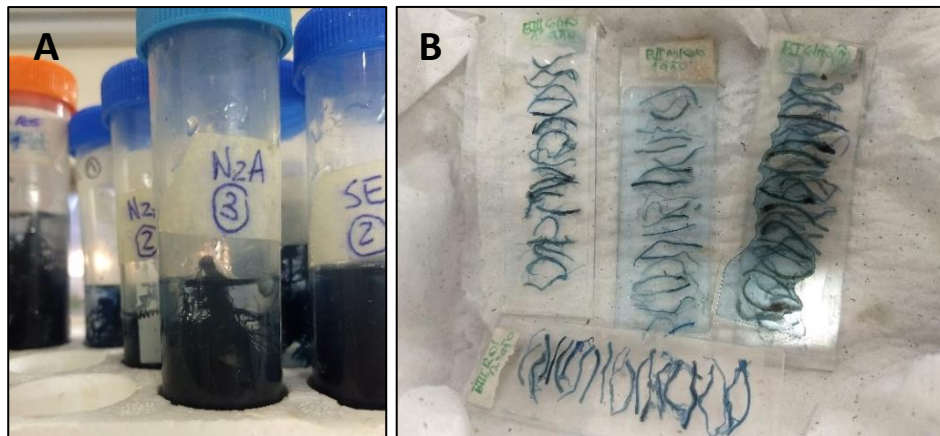


Figura 16. (A) Raíces de los distintos tratamientos conservadas en glicerina ácida. (B) Porciones de raíces montadas en portaobjeto para su posterior observación en microscopio. Cada preparado corresponde a un tratamiento.

2.4.c.II) Evaluación del porcentaje de micorrización

Para determinar la intensidad de la infección micorrízica se utilizó una escala de evaluación cuantitativa conformada por seis categorías definidas en función del porcentaje de infección radicular (Trouvelot et al., 1986). Se asignó un *valor de 0* a aquellas raíces cuya superficie no se encontraba colonizada por micorrizas; un *valor de 1* a las que presentaban

entre 0 a 1 % de la superficie radicular infectada; un *valor de 2* a las que presentaban entre un 1 a 10 %; un *valor de 3* a las raíces con un 10 a 50 % de su superficie colonizada; un *valor de 4* a las que presentaban un valor comprendido entre 50 a 90 % y un *valor de 5* a las raíces cuya superficie se encontraba 100 % colonizada por micorrizas.

A cada una de las porciones radiculares montadas se las observó con microscopio utilizando aumento 10x o 20x, y se le asignó una categoría. Luego, utilizando los 20 valores establecidos dentro del mismo preparado, se calculó la intensidad de micorrización (% I) para cada tratamiento, a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{(N^{\circ} 5 * 95) + (N^{\circ} 4 * 70) + (N^{\circ} 3 * 30) + (N^{\circ} 2 * 5) + (N^{\circ} 1)}{N \text{ total preparado}}$$

Donde “N” representa la cantidad de porciones radiculares dentro del preparado incluidas dentro de cada categoría.

2.5 Análisis de biocontrol frente a *M. phaseolina*

Para evaluar la capacidad biocontroladora de las cepas de *Streptomyces* frente al hongo *Mp*, se realizó un ensayo de inoculación radicular *in vitro* siguiendo el protocolo descrito en Reznikov et al. (2019), utilizando semillas del genotipo DM 6.2i RR, previamente caracterizado como susceptible a dicho fitopatógeno (Reznikov et al., 2019).

2.5.a. Desinfección superficial de semillas

Las semillas se colocaron en un recipiente de vidrio y se desinfectaron superficialmente con una solución de NaOCl al 5% (v/v) durante 1 min con agitación constante. Posteriormente se lavaron con tres cambios de agua destilada y se secaron a temperatura ambiente con papel absorbente.

2.5.b. Germinación de semillas

Las semillas del genotipo DM6.2i RR desinfectadas se colocaron en placas de Petri de 14 cm de diámetro con dos capas de papel absorbente humedecido y se distribuyeron sobre la superficie evitando el contacto entre las mismas. Las placas se llevaron a estufa a 28 °C durante 48 hs en la oscuridad, para inducir la germinación. Posteriormente, se seleccionaron aquellas semillas germinadas sanas que presentaban mayor longitud radicular y se les extrajeron cuidadosamente los tegumentos, evitando daños sobre la superficie de las mismas (Fig. 12-A).

2.5.c. Colonización de palillos con *Mp*

En placas con medio de cultivo APG se distribuyeron entre 20 a 25 palillos de madera estériles de aproximadamente 2 cm de longitud. En el espacio comprendido entre palillos se insertó una porción (1,5 x 1,5 mm aproximadamente) de APG colonizada con micelio fúngico del aislamiento *Mp 17* (micelio previamente crecido y conservado a 4°C en heladera) (Fig. 12-B), y se llevaron a estufa a 27°C durante cinco días (Fig. 12-C).

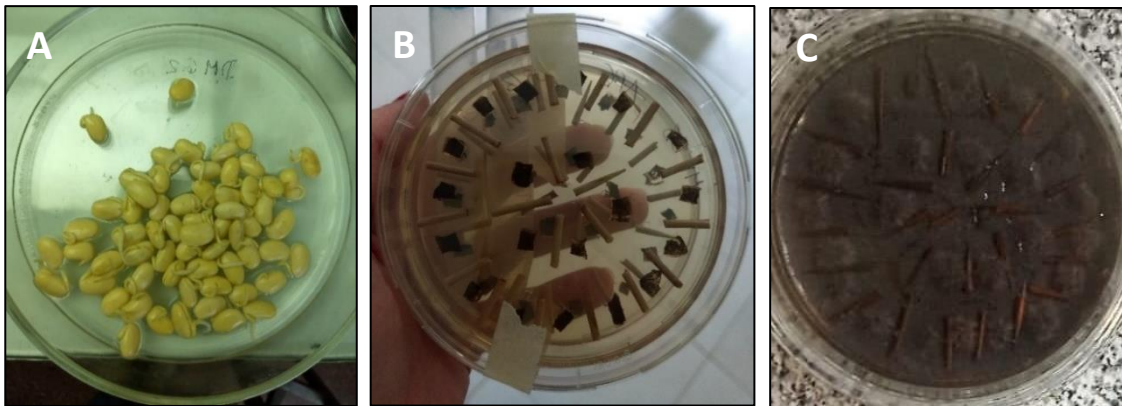


Figura 12. (A) Semillas germinadas sanas con la radícula expandida y sin tegumento. (B) Distribución de palillos estériles y porciones de micelio de *M. phaseolina* sobre placa de APG. (C) Palillos completamente colonizados por *M. phaseolina*.

2.5.d. Diseño experimental

Se plantearon 6 tratamientos diferentes: (1) Control absoluto, (2) Control de infección, (3) AF comercial, (4) *Streptomyces* N2A, (5) *Streptomyces* N3 y (6) *Streptomyces* N9, dispuestos en un diseño completamente al azar, con 4 repeticiones cada uno (Fig. 13-A). Las mismas estaban constituidas por frascos de vidrio estériles de 15 cm de alto y 10 cm de diámetro. En cada frasco se pusieron ocho capas de papel absorbente estéril y 18 ml de agua destilada estéril. A continuación, se colocaron tres semillas germinadas con las radículas en contacto con el papel humedecido, y se inocularon con las cepas de *Streptomyces* agregando los cultivos bacterianos directamente sobre las radículas con micropipeta. Posteriormente se colocó un palillo de aproximadamente 2 cm colonizado con *Mp* (Fig. 13-B) y se tapó con film para evitar la deshidratación. Los cuatro frascos de cada tratamiento se colocaron aleatoriamente sobre un estante en cámara de crecimiento en condiciones controladas de luz (fotoperiodo 16:8h luz:oscuridad) y temperatura (30 °C) (Fig. 13-C).

El diseño del ensayo se esquematiza en la Figura 14, ejemplificado con las cuatro repeticiones (frascos) correspondientes a un único tratamiento. En total se realizaron tres réplicas biológicas, con una duración total de 21 días cada uno.

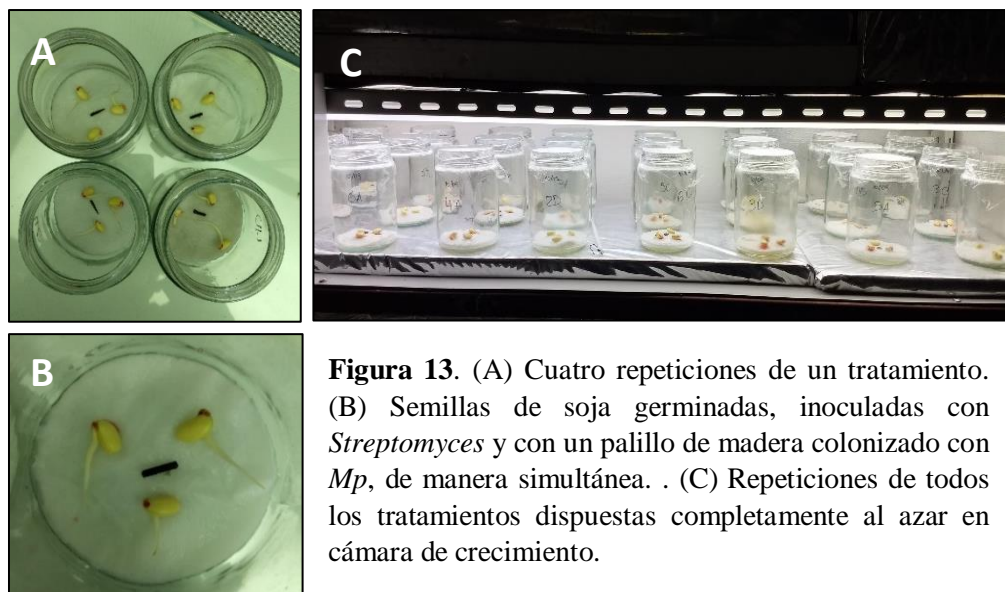


Figura 13. (A) Cuatro repeticiones de un tratamiento. (B) Semillas de soja germinadas, inoculadas con *Streptomyces* y con un palillo de madera colonizado con *Mp*, de manera simultánea. (C) Repeticiones de todos los tratamientos dispuestas completamente al azar en cámara de crecimiento.

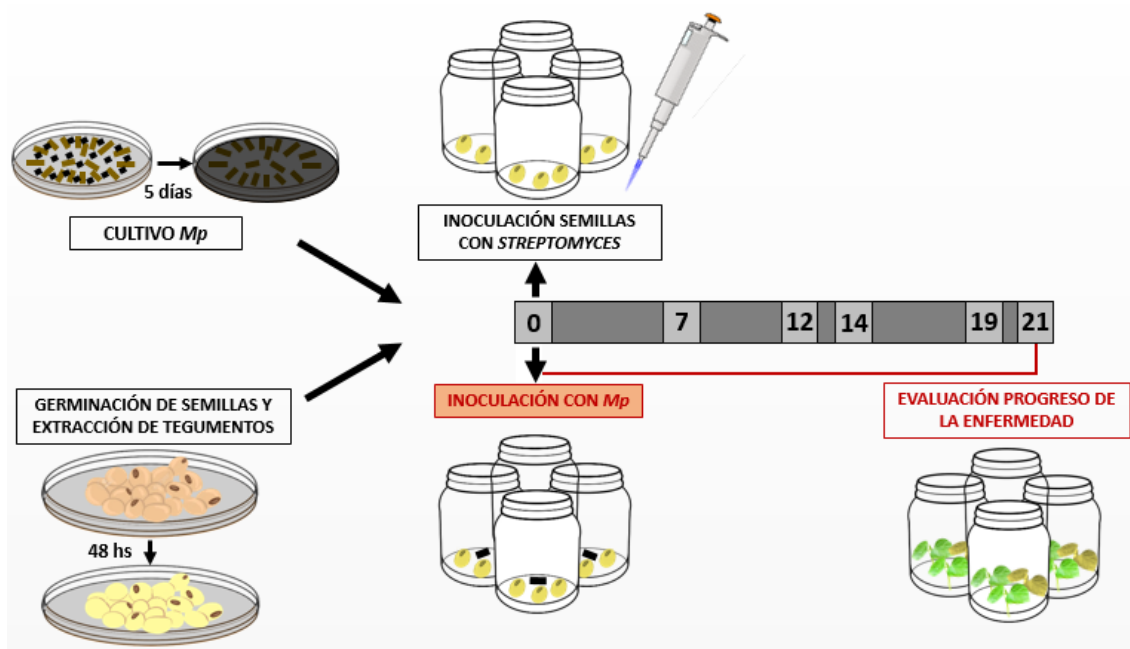


Figura 14. Esquema representativo del desarrollo experimental del ensayo, ejemplificado para un único tratamiento. La escala numérica negra representa tanto los días post siembra (dps) como los días post inoculación (dpi) con *Mp*, ya que ambas inoculaciones se realizaron en simultáneo. Cinco días previos al comienzo del ensayo se iniciaron cultivos de *Mp* en placa para contar con inóculo infeccioso, y dos días previos, se pusieron a germinar semillas de soja desinfectadas. Luego se seleccionaron 12 semillas germinadas sanas, se las distribuyeron de a tres en las cuatro repeticiones, y se las inocularon con la cepa de *Streptomyces*. Posteriormente se adicionó a cada frasco un palillo de madera colonizado con *Mp*, se cubrió con film y se distribuyeron aleatoriamente en cámara de crecimiento. Se realizaron evaluaciones del progreso de la enfermedad a los 7, 12, 14, 19 y 21 dpi.

A diferencia del ensayo anterior en el cual hubo una separación espacio-temporal entre el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* y la infección con *Da*, en éste ensayo, el tratamiento de las semillas germinadas con las suspensiones bacterianas y la inoculación artificial con *Mp* se realizaron de manera simultánea. Dado que los daños ocasionados en los primeros estadios del cultivo generan importantes pérdidas (implantación), se planteó evaluar la capacidad de las cepas de *Streptomyces* para controlar la infección desde estadios tempranos. Además, también se decidió incluir la cepa N3 no productora de compuestos con actividad antifúngica detectable *in vitro* para evaluar si induce una respuesta de defensa como se observó previamente con la cepa mutante SE.NP no productora de AF (Bercovich et al., 2022).

2.5.e. Evaluación del progreso de la enfermedad

La evolución de los síntomas típicos de la enfermedad se evaluó siguiendo la escala de desarrollo de necrosis en el sistema radicular propuesta por Reznikov et al., (2019), formada por seis categorías cualitativas que permiten medir la severidad de la misma. Se asignó un valor de 1 a aquellas plantas cuyo sistema radicular se encontraba sano (0 % necrosis) y sin síntomas foliares (Fig. 15-A); un valor de 2 a aquellas con menos del 25 % de su sistema radicular necrosado; 3 a aquellas con menos del 50 % de su sistema radicular necrosado (Fig. 15-B); 4 a las que presentaban menos de un 75 % de su sistema radicular necrosado; 5 a aquellas con 75-100% de su sistema radicular necrosado y un valor de 6 las plantas con crecimiento detenido o muertas (Fig. 15-C).



Figura 15. (A) Plantas con 0% de necrosis radicular. (B) Planta superior con un 25-50% de su sistema radicular necrosado. (C) Plantas muertas por *Mp*.

2.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada ensayo, se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA paramétrico), y las medias obtenidas para cada tratamiento se compararon mediante el método de la diferencia menos significativa (LSD), con un nivel de significación de 0,05 ($p < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo et al., 2020) y los datos experimentales se graficaron con el programa Graphpad Prism (Versión 6.01).

3. RESULTADOS

3.1. Efecto sobre el poder germinativo.

El análisis de los parámetros evaluados se desarrolla en la Figura 17. En la Figura 17-A se observa que los tratamientos con cada una de las tres cepas de *Streptomyces* presentaron un % G significativamente mayor respecto al del tratamiento convencional con AF y el control absoluto. Los tratamientos con las cepas N2A y N9 presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a ambos, aumentando un 19 y 13,7 % respectivamente el % G en comparación con el AF, y un 21,1 y 15,8 % con respecto al control absoluto. Estos aumentos son representados en las Figuras 17-C, D y E, donde se visualizan repeticiones representativas de dichos tratamientos. Por su parte, el tratamiento con la cepa N3 no mostró diferencias significativas con respecto a los tratamientos controles, pero tampoco evidenció efectos negativos sobre el % G (Fig. 17- A).

En cuanto a la biomasa promedio por plántula (mg) (Fig. 17- B), los resultados son semejantes para las plántulas provenientes de los tratamientos con las cepas N2A y N9, mostrando un incremento numérico con respecto a ambos controles. Si bien para este parámetro no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento con AF, sí presentaron diferencias significativas frente al control absoluto, generando un aumento promedio relativo de biomasa de 17,49 y 17,43 mg, respectivamente. En la Figura 17-F se observa que las plántulas provenientes de semillas previamente tratadas con la cepa N2A son más altas y más robustas que las plántulas control, mientras que las derivadas de las semillas pretratadas con la cepa N9 son claramente más altas (Fig. 17-G). Por su parte, la cepa N3 presentó una biomasa promedio similar a ambos controles.

Dado a que el tratamiento con la cepa N3 no presentó diferencias significativas con respecto a los controles en ambos parámetros, se decidió continuar los ensayos de promoción del crecimiento y desarrollo vegetal con las cepas N2A y N9.

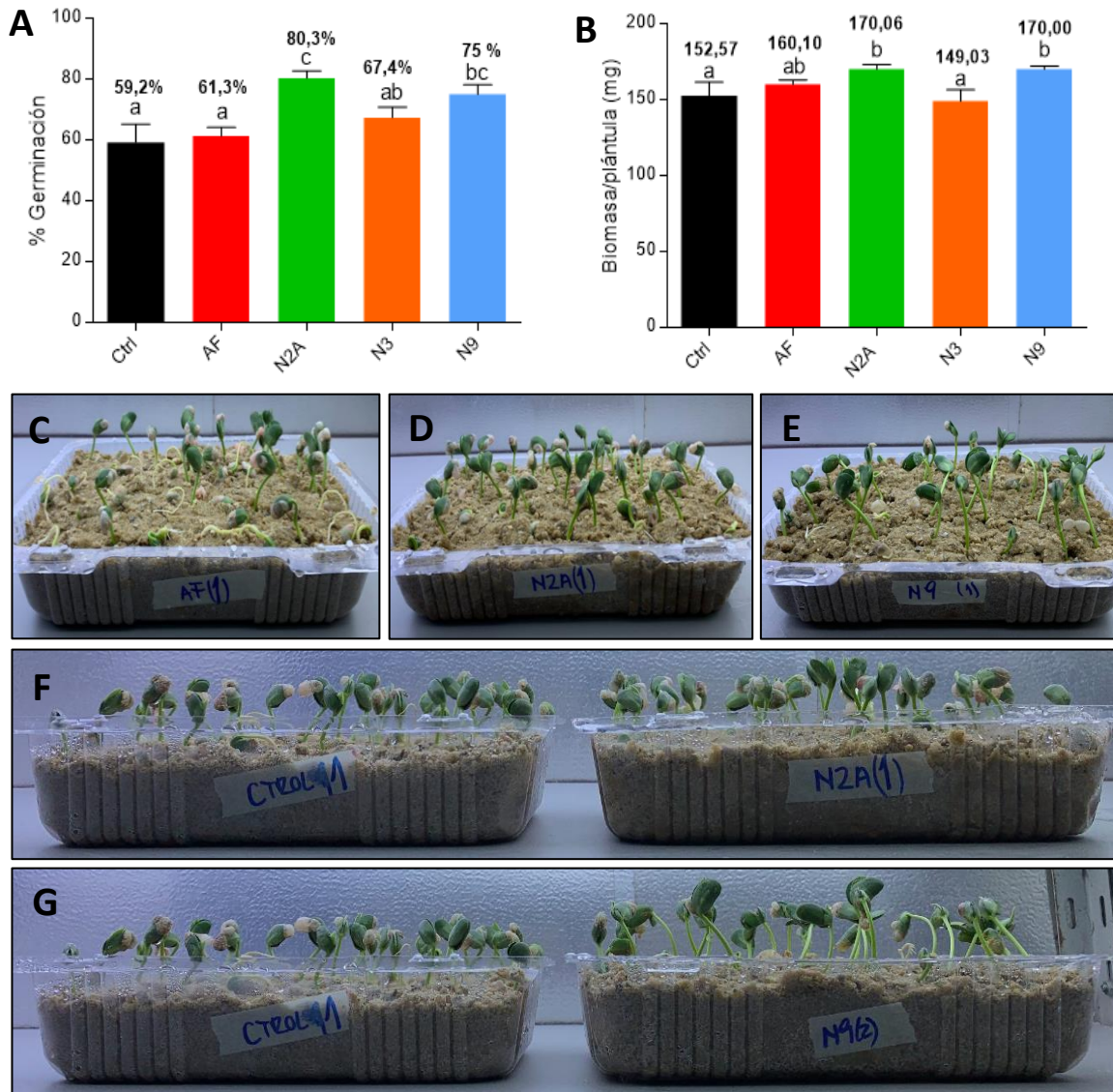


Figura 17. (A) Porcentaje de germinación a cinco días post siembra. Los valores representan el promedio de tres réplicas biológicas, y se expresan como media \pm SEM. Las letras diferentes indican diferencias significativas según test de Fisher ($p < 0,05$). (B) Biomasa promedio por plántula (mg) a cinco días post siembra. (C, D, E) Repeticiones representativas del porcentaje de germinación de los tratamientos AF, *Streptomyces* N2A y *Streptomyces* N9 respectivamente. (F, G) Comparación de los tratamientos N2A y N9 con el tratamiento control, visualizándose diferencias en altura y grosor de hipocótilo de las plántulas.

3.2. Análisis del efecto sobre la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal, control biológico frente a *D. aspalathi* e intensidad de micorrización

3.2.a. Efecto sobre parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal

3.2.a.I. Efecto sobre el porcentaje de emergencia

En la Figura 18 se muestran los porcentajes de emergencia (% E) a 7 dps. Al analizar los resultados, se observa que el tratamiento con AF químico presentó el % E más bajo de los seis tratamientos ensayados (60,65 %). Por su parte, los tratamientos con las cepas de *Streptomyces* presentaron valores promedios mayores que el control absoluto, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, estas diferencias sí fueron significativas respecto del tratamiento convencional con AF, logrando aumentos de más del 12 %, alcanzando porcentajes muy similares a los valores previamente publicados para los tratamientos con cepas de referencia (Bercovich et al., 2022).

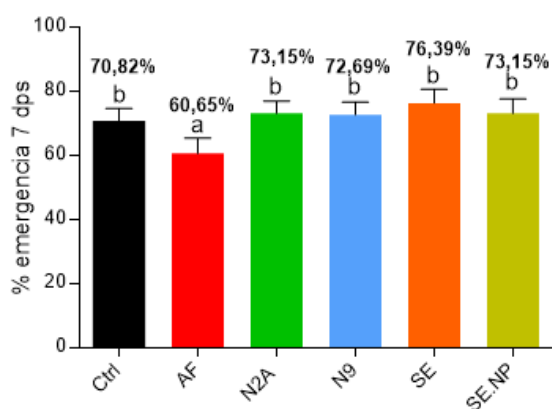


Figura 18. Porcentaje de emergencia a siete dps. Los valores representan el promedio de dos réplicas, y se expresan como media \pm SEM. Las letras diferentes indican diferencias significativas según test de Fisher ($p < 0,05$).

3.2.a.II. Efecto sobre parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en plantas no inoculadas con *D. aspalathi*

En la Figura 19 se muestran los resultados y el análisis estadístico de los parámetros de crecimiento medidos en plantas no inoculadas con *Da* (resumidos en la Tabla 3). Se observa que en estadios tempranos del crecimiento y desarrollo de la planta (21 días), todos los tratamientos bacterianos lograron valores similares o superiores a los alcanzados por el

control absoluto. En esta instancia, la cepa SE.NP de referencia se destaca como el tratamiento que mayor efecto generó en la promoción vegetal, visualizándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control absoluto en tres de los cinco parámetros analizados (PS porción aérea, PS porción radicular y biomasa total). Por su parte, las dos cepas de *Streptomyces* rizosféricas (N2A y N9) no mostraron en este tiempo una promoción del crecimiento estadísticamente significativa respecto del control en ninguno de los parámetros analizados. Sin embargo, si se observa un efecto positivo en el N° de nudos en el TP y área foliar, cuando se las compara con el tratamiento convencional con AF.

La Figura 19-A muestra el promedio del N° de nudos totales en el TP por planta. En todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con SE.NP, se visualizaron diferencias significativas con respecto al tratamiento con AF. Los tratamientos con las cepas N2A y N9 lograron valores de 4,92 y 4,91, respectivamente, asemejándose al control absoluto el cual obtuvo 4,95. Por otro lado, e íntimamente relacionado con este parámetro, se encuentra el estadio fenológico. De esta manera, las plantas del tratamiento con AF, que poseen en promedio cuatro nudos totales, alcanzaron un estadio V2 mientras que, las plantas del control absoluto y las de los tratamientos con las cepas rizosféricas, un estadio V3, ya que tenían en promedio cinco nudos totales en el TP.

Efectos similares a los observados sobre el N° de nudos en el TP también se vieron reflejados al analizar el área foliar por planta (Fig. 19-B). El tratamiento con AF fue el que obtuvo la menor superficie con capacidad fotosintética, logrando 85,42 cm² por planta. En este caso, de los dos tratamientos con cepas rizosféricas, sólo las plantas tratadas con N2A lograron diferencias estadísticamente significativas con respecto al AF, alcanzando un valor de 102,58 cm², aumentando un 20,09 % la superficie fotosintética. Sin embargo, si bien el tratamiento con N9 no alcanzó diferencias significativas con respecto al tratamiento convencional con AF, logró aumentar un 16,65 % el valor promedio a 99,64 cm², asemejándose al control absoluto.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar si existe una partición diferencial de fotoasimilados en la planta, se midió el PS individual de cada estructura de la porción aérea (tallos, folíolos y pecíolos) y de la porción radicular (raíces y nódulos). El análisis del PS de cada estructura por separado, no mostró diferencias significativas entre los distintos

tratamientos, sugiriendo que no hay una partición diferencial de los fotoasimilados. Es por esto que se decidió, sumar el PS de los tallos, folíolos y pecíolos para obtener el PS de la porción aérea, y el PS de las raíces y nódulos para obtener el PS de la porción radicular.

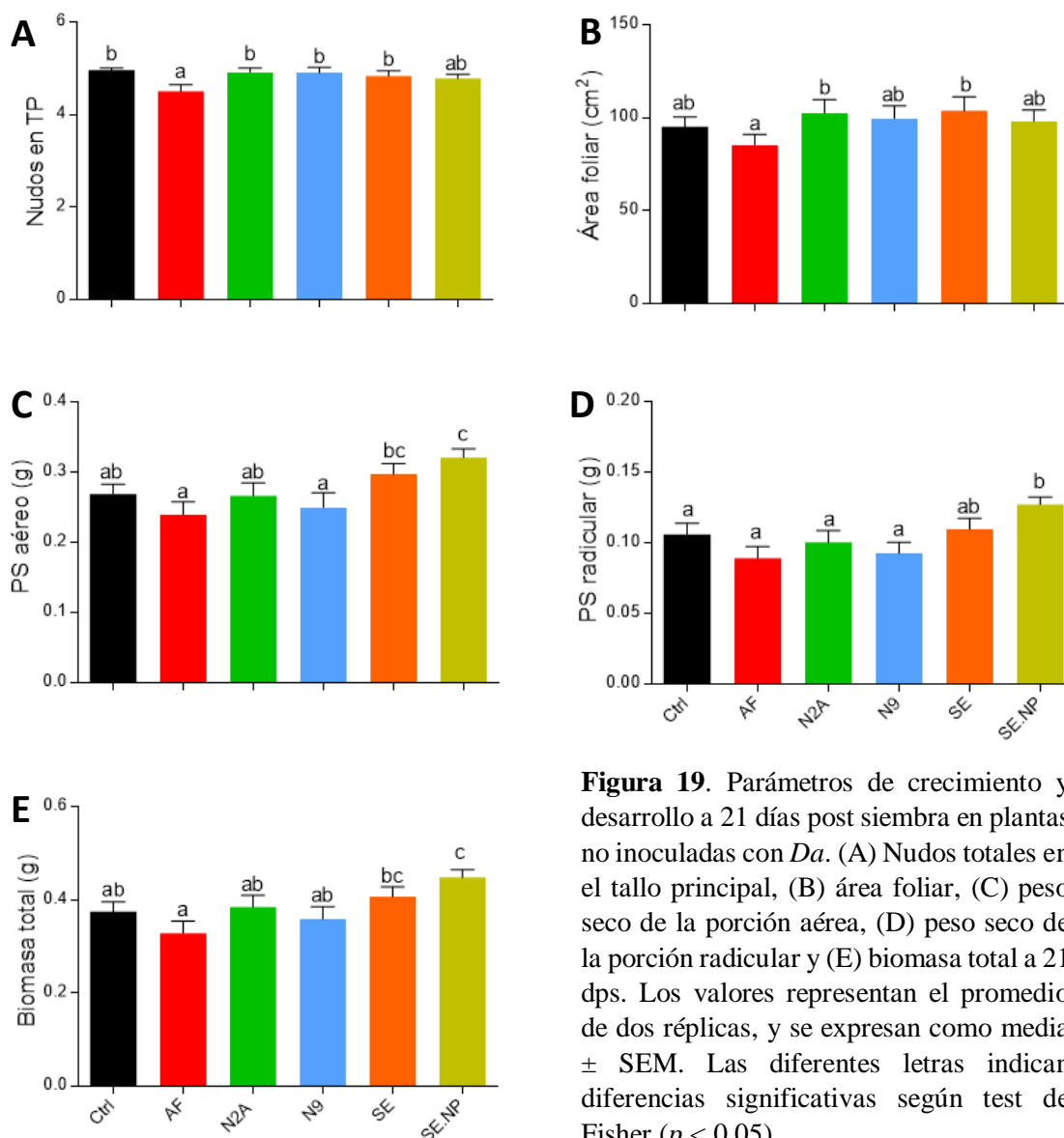


Figura 19. Parámetros de crecimiento y desarrollo a 21 días post siembra en plantas no inoculadas con *Da*. (A) Nodos totales en el tallo principal, (B) área foliar, (C) peso seco de la porción aérea, (D) peso seco de la porción radicular y (E) biomasa total a 21 dps. Los valores representan el promedio de dos réplicas, y se expresan como media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas según test de Fisher ($p < 0,05$).

La Figura 19-C,D muestran el PS promedio de la porción aérea y radicular por planta, respectivamente. En ambas gráficas se observa que las plantas pretratadas con las cepas rizosféricas alcanzaron un valor superior al de las plantas provenientes de semillas tratadas con AF, siendo más notorio este aumento en el tratamiento con la cepa N2A. Sin embargo,

estos incrementos no representan diferencias significativas desde el punto de vista estadístico. En cuanto a las cepas de referencia, ambas lograron diferencias significativas en el PS de la porción aérea en comparación con el AF, mientras que, sólo la cepa SE.NP mostró diferencias en el PS de la porción radicular. El efecto de los tratamientos sobre la biomasa promedio por planta (Fig. 19-E), sigue el mismo patrón que el PS aéreo y radicular, debido a que este parámetro surge de sumar ambos pesos. Las plantas tratadas con AF son las que obtuvieron menores valores de biomasa, alcanzando 0,3284 g. Los tratamientos con N2A y N9 superan dicho valor (0,3844 y 0,3588 g), pero no logran diferencias significativas con respecto al mismo.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento y desarrollo obtenidos en plantas a los 21 días post siembra

	N° nudos TP	Área foliar (cm ²)	PS aéreo (g)	PS radicular (g)	Biomasa total (g)
Ctrl	4,95 ^b	95,06 ^{a b}	0,27 ^{a b}	0,11 ^a	0,38 ^{a b}
AF	4,42 ^a	85,42 ^a	0,24 ^a	0,09 ^a	0,33 ^a
N2A	4,92 ^b	102,58 ^b	0,27 ^{a b}	0,10 ^a	0,38 ^{a b}
N9	4,91 ^b	99,64 ^{a b}	0,25 ^a	0,09 ^a	0,36 ^{a b}
SE	4,83 ^b	103,75 ^b	0,30 ^{b c}	0,11 ^{a b}	0,41 ^{b c}
SE.NP	4,78 ^b	98,10 ^{a b}	0,32 ^c	0,13 ^b	0,45 ^c

Las letras en cada columna indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

3.2.a.III. Efecto sobre parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en plantas inoculadas con *Da*

En este caso, además de evaluar el N° nudos en el TP, área foliar, PS de partes aéreas (tallo, folíolos, pecíolos), PS del sistema radicular (raíz y nódulos) y biomasa total, se evaluó un parámetro adicional: N° de nódulos en la raíz principal (RP).

En la Figura 20 se muestran los resultados y el análisis estadístico de los mismos parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal medidos luego de la inoculación con *Da* (resumidos en la Tabla 4). En esta instancia se observa que ambas cepas de *Streptomyces* rizosféricas generaron un efecto positivo y superior al alcanzado por las cepas del suelo, logrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en dos de los seis parámetros medidos. Además, es importante destacar que todos los tratamientos bacterianos lograron diferenciarse de manera significativa con respecto al tratamiento convencional con AF, siendo este último el tratamiento que obtuvo los valores más bajos en todos los parámetros.

El N° de nudos en el TP fue uno de los parámetros analizados donde se visualizó una promoción del crecimiento y desarrollo generado por el tratamiento con las cepas rizosféricas, con respecto al control. En la Figura 20-A se observa que el tratamiento control logró en promedio 6,33 nudos por planta, mientras que aquellas plantas derivadas de semillas pretratadas con las cepas rizosféricas alcanzaron en promedio 7 y 7,08 nudos por planta. Estos aumentos significativos generados por el tratamiento con las cepas N2A y N9 representan incrementos del 10,58 y 11,85 %, respectivamente. Estos aumentos son aún más notorios cuando se los compara con el tratamiento convencional con AF, el cual obtuvo en promedio 6,14 nudos por planta.

El otro parámetro donde se visualizaron diferencias significativas con respecto al control fue la superficie foliar por planta (Fig. 20-B). La misma alcanzó valores promedio de 225,05 y 212,31 cm² en los tratamientos con N2A y N9, aumentando un 20,26 y 13,45 % los valores de área foliar respecto del tratamiento control. Además, lograron aumentar en promedio un 43,08 y 34,98 % la superficie fotosintética en comparación con el tratamiento con AF. Al analizar ambos parámetros en conjunto, se observa que aquellas plantas pretratadas con las bacterias rizosféricas presentan en promedio un nudo más en el TP, lo que implica una hoja trifoliada adicional por planta, aumentando significativamente la superficie fotosintéticamente activa total.

En relación al PS de la porción aérea (Fig. 20-D), PS de la porción radicular (Fig. 20-E) y la biomasa total (Fig. 20-F), no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en ninguno de los tratamientos bacterianos, pero todos lograron

diferenciarse del tratamiento con AF. El PS de la porción aérea presentó aumentos del 45,88 % para N2A y del 42,53 % para N9, mientras que, para el PS de la porción radicular, los valores promedio aumentaron 35,09 y 19,62 % respectivamente. En concordancia con estos dos últimos parámetros, se encuentran los incrementos en la biomasa total. El tratamiento con AF fue el único tratamiento que obtuvo valores promedio de biomasa por debajo de un gramo (0,921 g/planta). Las plantas pretratadas con la cepa N2A presentaron valores promedio de 1,315 g por planta, generando aumentos del 42,78 %. Por su parte, las plantas provenientes del tratamiento con N9 aumentaron un 34,09 % el valor obtenido con el AF, alcanzando 1,235 g/planta.

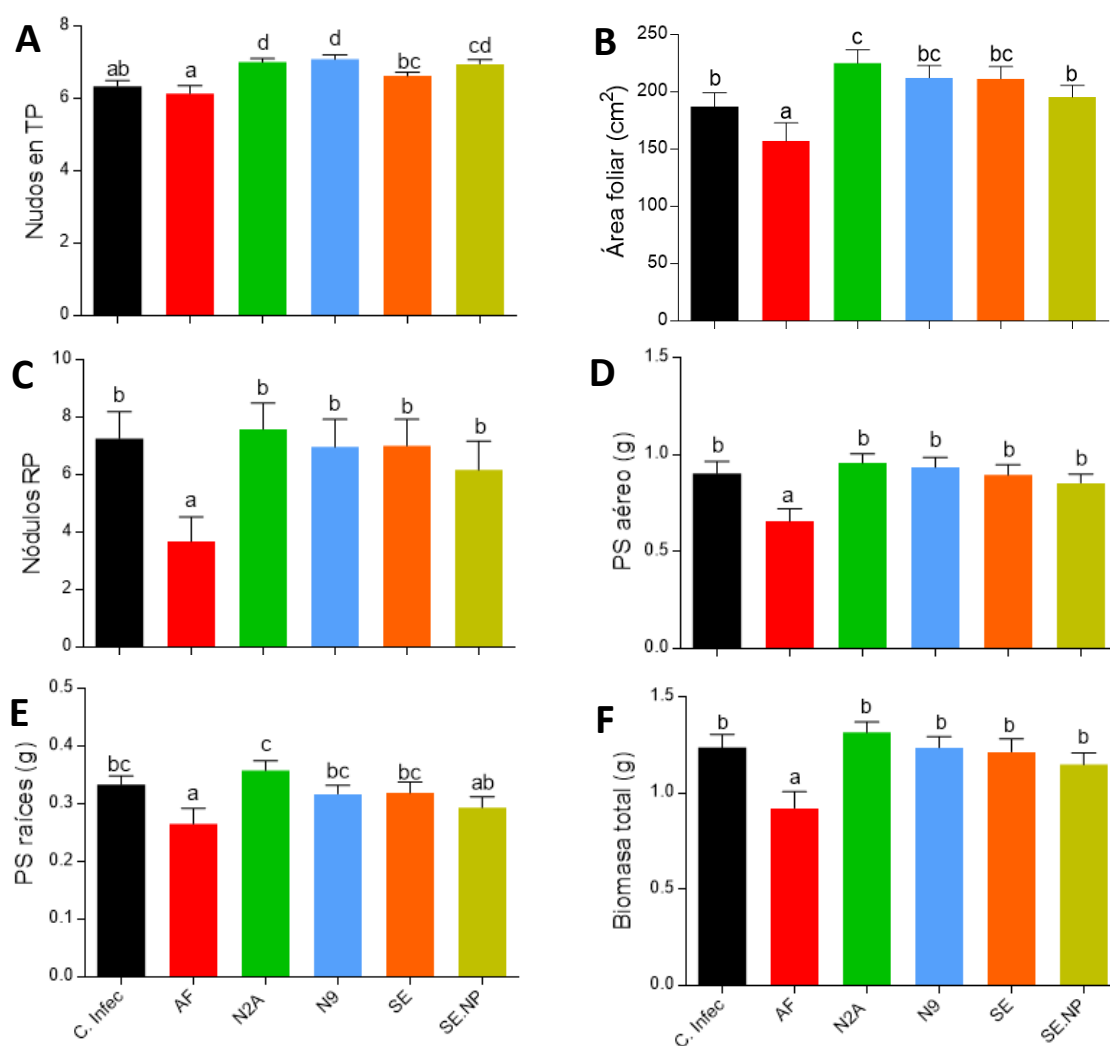


Figura 20. Parámetros de crecimiento y desarrollo a 14 días post inoculación con *Da*. (A) Nodos totales en el tallo principal, (B) área foliar, (C) número de nódulos en la raíz principal, (D) peso seco de la porción aérea, (E) peso seco de la porción radicular y (F) biomasa total a 14 dpi (35 dps). Los valores representan el promedio de dos réplicas, y se expresan como media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas según Fisher ($p < 0,05$).

Por otro lado, y dada la compatibilidad de las cepas rizosféricas con *B. japonicum* (Villafañe, 2020), se analizó el parámetro *N° de nódulos en la RP* con el objetivo de evaluar la nodulación natural en tierra no estéril (*B. japonicum* nativo). Este parámetro se midió luego de la infección con *Da* (35 dps), y no de manera previa (21 dps), brindando tiempo para garantizar el establecimiento de una simbiosis efectiva entre las plantas de soja y los rizobios. En la Figura 20-C se observa claramente el efecto negativo generado por los AF químicos ensayados sobre este parámetro. Las plantas previamente tratadas con la mezcla de antifúngicos, obtuvieron en promedio 3,68 nódulos en la RP por planta, un 51,45 y 47,13 % menos que los valores promedios alcanzados con los tratamientos con N2A y N9, cuyas plantas obtuvieron en promedio 7,58 y 6,96 nódulos/RP.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento y desarrollo en plantas a los 14 días post inoculación con *D. aspalathi*

	N° nudos TP	Área foliar (cm ²)	PS aéreo (g)	N° nódulos RP	PS radicular (g)	Biomasa total (g)
Ctrl	6,33 ^{ab}	187,14 ^b	0,90 ^b	7,25 ^b	0,33 ^{bc}	1,24 ^b
AF	6,14 ^a	157,29 ^a	0,66 ^a	3,68 ^a	0,27 ^a	0,92 ^a
N2A	7,00 ^d	225,05 ^c	0,97 ^b	7,58 ^b	0,36 ^c	1,32 ^b
N9	7,08 ^d	212,31 ^{bc}	0,94 ^b	6,96 ^b	0,32 ^{bc}	1,24 ^b
SE	6,63 ^{bc}	211,53 ^{bc}	0,91 ^b	7 ^b	0,312 ^{bc}	1,21 ^b
SE.NP	6,96 ^{cd}	195,42 ^b	0,85 ^b	6,17 ^b	0,29 ^{ab}	1,15 ^b

Las letras en cada columna indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

3.2.b. Efecto sobre el control biológico del CTS

En la Figura 22 se muestran los resultados y el análisis estadístico de las variables utilizadas para evaluar el efecto producido por las cepas de *Streptomyces* sobre el control biológico de *Da*.

En la Figura 22-A se muestra el progreso de la severidad de la enfermedad por semana para cada tratamiento. Se observa que las curvas de progreso de todos los tratamientos bacterianos permanecieron por debajo de las curvas de progreso de los tratamientos Ctrl y AF durante toda la extensión del ensayo, logrando al final del mismo (49 dpi) diferencias estadísticamente significativas con respecto a ambos. Este resultado demuestra la capacidad que tienen estas cepas de disminuir en el tiempo la severidad de la infección por *Da*. La cepa que pudo controlar la severidad del CTS con mayor efectividad fue N2A, disminuyendo a los 49 dpi un 38,38 % la severidad de la misma en comparación con el tratamiento con AF. Le siguen las cepas SE.NP, SE y N9, reduciendo un 37,52, 35,94 y 29,34 %, respectivamente, la severidad de la infección. Además, se observa que los tratamientos N2A, N9 y SE presentaron un retraso de una semana en la aparición de síntomas típicos de la enfermedad en comparación con los tratamientos Ctrl, AF y SE.NP, surgiendo a los 21 y 14 dpi, respectivamente. También se destaca que la protección ejercida por la mezcla de AF fue significativa y similar a la brindada por las distintas cepas hasta los 35 dpi. A partir de ese momento, la protección química disminuye considerablemente y alcanza valores muy similares a los obtenidos en el tratamiento control, no visualizándose diferencias significativas entre ellos al final del ensayo. Este comportamiento puede observarse con mayor claridad en la Figura 22-B, donde se muestra la distribución de frecuencias de síntomas en el tiempo para cada tratamiento. A los 35 dpi, el tratamiento control presentó un 71 % de plantas sanas o con sintomatología leve (estadios 0 y 0,3) y un 29 % de plantas muertas o con síntomas avanzados (estadios 1 y 0,6). En cambio, el tratamiento con AF obtuvo un 85 % de plantas en estadios 0 y 0,3 y un 15% en 0,6 y 1, logrando porcentajes semejantes a los obtenidos por las cepas SE.NP y N9 (80 y 89% de plantas sanas o con síntomas leves, respectivamente). A los 42 dpi, se produce un incremento considerable del % PM o con sintomatología avanzada en el tratamiento con AF, logrando un 57 % de plantas en dichos estadios. Este porcentaje se asemeja al obtenido por el tratamiento control (58 %)

en el mismo momento, y se diferencia de los valores alcanzados por todas las cepas, que oscilan entre 22 a 33%.

La Figura 22-C muestra el porcentaje de plantas que a los 49 dpi alcanzaron un estadio de 1 o 0,6. Se observa que los tratamientos control y AF se distinguen del resto de los tratamientos debido al elevado % PM al final del ensayo (83,33 y 81,39 % respectivamente), no visualizándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En contraposición, las plantas cuyas semillas fueron tratadas con las cepas de *Streptomyces* mostraron una reducción considerable y significativa en dicho porcentaje, alcanzando valores de 45,83, 46,66, 47,61 y 47,78 % PM para N2A, SE.NP, SE y N9, logrando disminuir dicho parámetro un 35,56, 34,73, 33,78 y 33,61% respectivamente, en comparación con el tratamiento químico. Esto demuestra el efecto positivo generado por los tratamientos bacterianos para proteger a las plantas frente a la infección ocasionada por el patógeno inoculado, logrando disminuir significativamente la incidencia de la enfermedad. En la Figura 21 se puede visualizar dicha reducción al analizar el estado sanitario de las plantas a los 49 dpi. En cada imagen se compara una bandeja representativa de cada tratamiento con una del tratamiento control. Se observa que las bandejas del tratamiento control y del AF presentan en promedio 4-5 plantas en estadio 0,6 o 1, mientras que las de los tratamientos bacterianos, entre 2-3.

Para comparar las diferencias que generan los distintos tratamientos a partir de los valores de severidad, se realizó el cálculo del ABCPE de cada repetición de cada tratamiento (5 valores de ABCPE/tratamiento; 10 valores ABCPE totales/tratamiento), y posteriormente se las promedió para obtener el gráfico de barra de la Figura 22-D. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y AF, siendo estos los tratamientos con mayores valores de ABCPE. Tampoco se observan diferencias significativas entre el tratamiento con AF y con la cepa SE.NP, a pesar de que en la severidad de la enfermedad a 49 dpi (Fig. 22-A) y en el % PM a 49 dpi (Fig. 22-C) haya habido diferencias en las plantas que recibieron dichos tratamientos. Ésto puede deberse a la similitud que hubo en la severidad de la enfermedad desde el comienzo de la infección hasta los 35 dpi en ambos tratamientos. Luego, en el caso de las plantas provenientes de semillas pretratadas con AF se ve un aumento considerable, que a tiempos tardíos se separa de la curva SE.NP, produciendo una diferencia en la pendiente de las curvas en los tramos 35/42 dpi y 42/49 dpi. Esta diferencia se refleja

en la longitud de las barras del ABCPE de ambos tratamientos, siendo más grande la correspondiente al AF. Cabe destacar que la disminución de la pendiente de la curva entre los 35/49 dpi lograda por SE.NP, permitió asemejarse estadísticamente al resto de las cepas de *Streptomyces*, no evidenciándose diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos bacterianos. Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas que recibieron el tratamiento con AF y las plantas tratadas con las cepas N2A, N9 y SE, confirmando el efecto positivo ejercido por las mismas en el control del CTS.

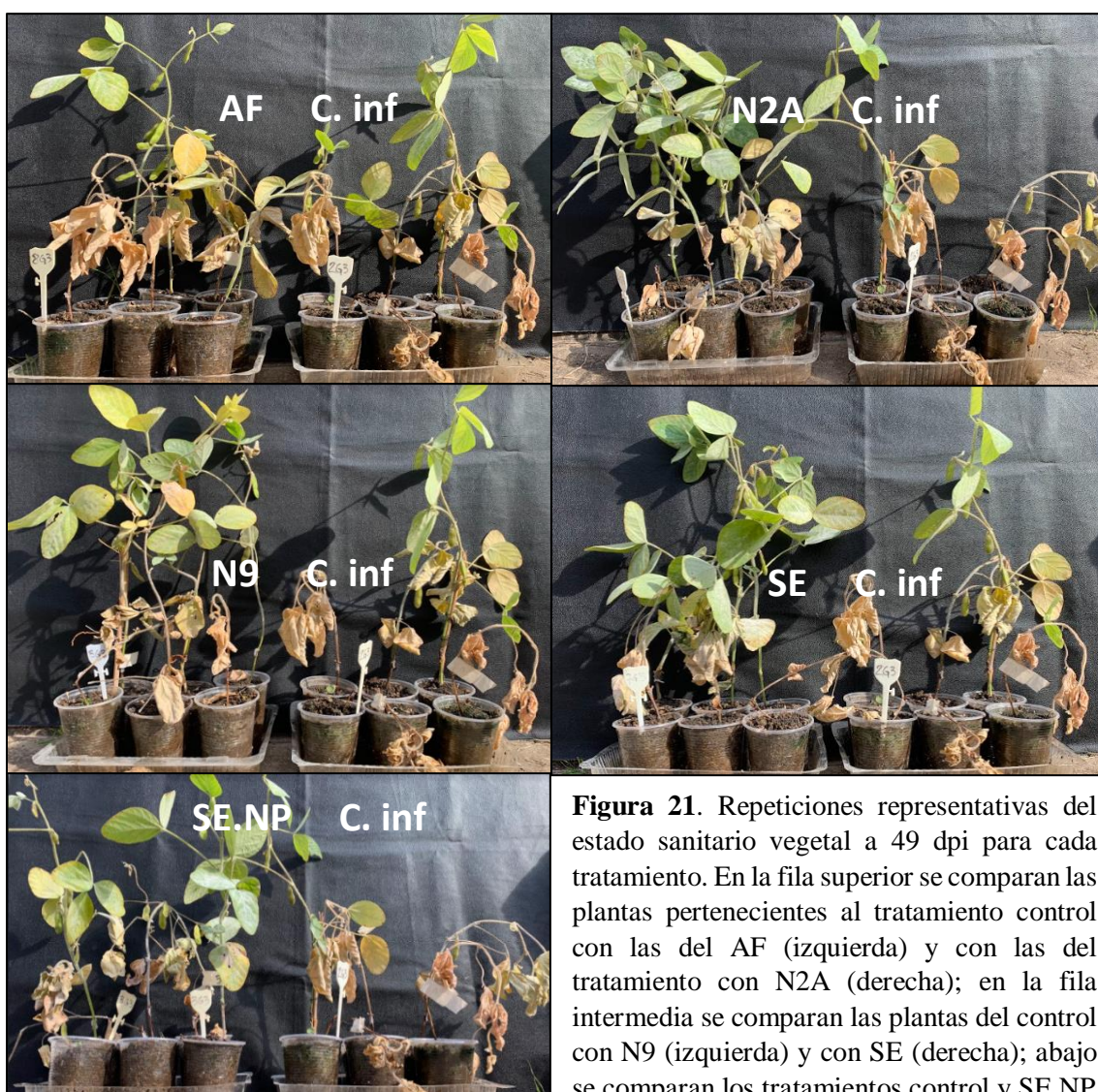


Figura 21. Repeticiones representativas del estado sanitario vegetal a 49 dpi para cada tratamiento. En la fila superior se comparan las plantas pertenecientes al tratamiento control con las del AF (izquierda) y con las del tratamiento con N2A (derecha); en la fila intermedia se comparan las plantas del control con N9 (izquierda) y con SE (derecha); abajo se comparan los tratamientos control y SE.NP

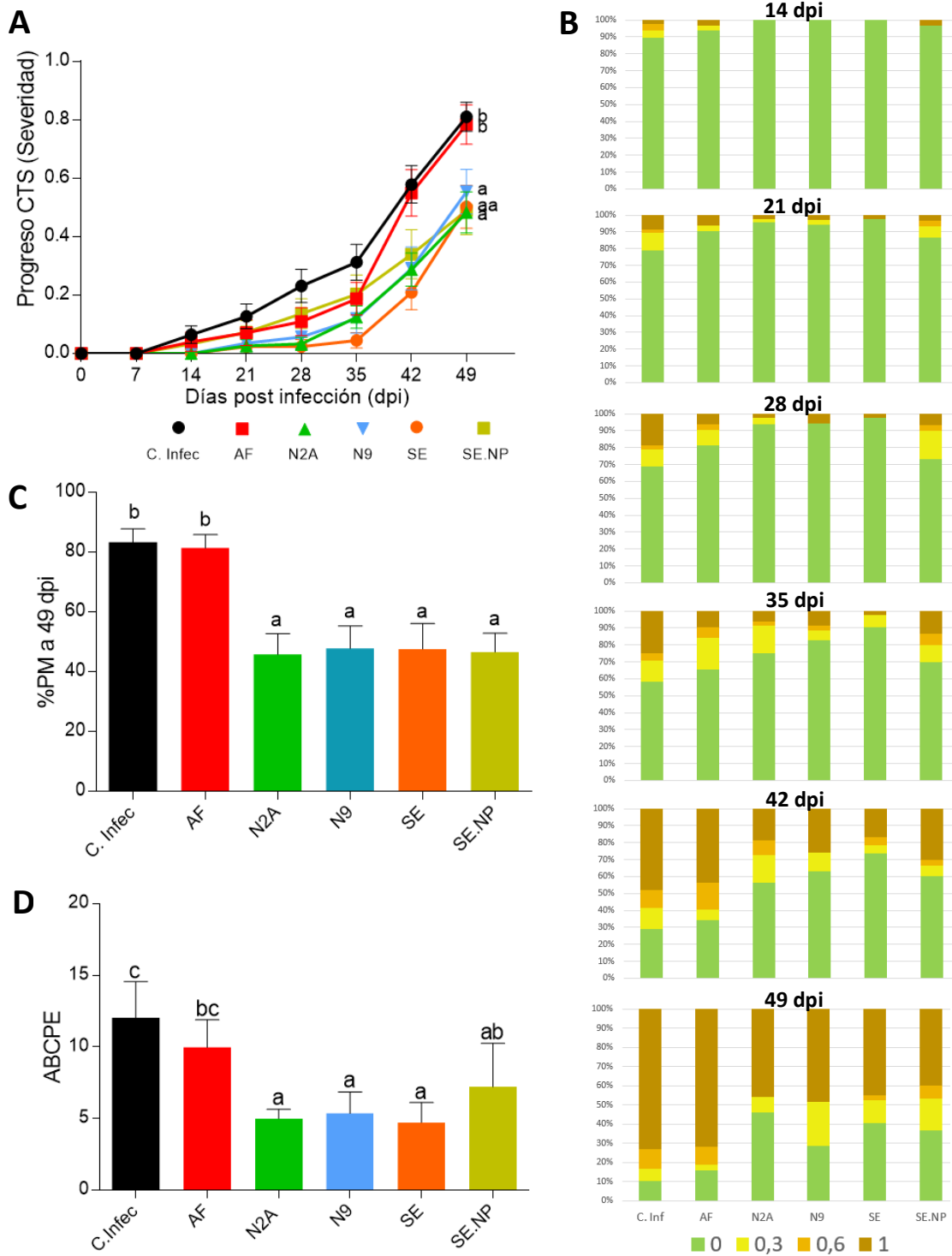


Figura 22. (A) Curva de progreso de la severidad de la enfermedad (CTS) hasta los 49 dpi. (B) Distribución de frecuencias de síntomas típicos en el tiempo. (C) Porcentaje de planta muerta a 49 dpi. (D) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). Los valores representan el promedio de dos réplicas, y se expresan como media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas según test de Fisher ($p < 0,05$).

3.2.c. Efecto sobre el porcentaje de micorrización

En los cuatro tratamientos evaluados se observaron estructuras fúngicas compatibles con un establecimiento micorrízico efectivo, como vesículas en el interior de las células radiculares (Fig. 23-A) y micelio externo recubriendo la epidermis de las raíces (Fig. 23-B). Sin embargo, la intensidad de micorrización de todos los tratamientos fue baja (%I = 1), correspondiéndole a las porciones radiculares de cada preparado valores de 2, 1 y 0. No obstante, la utilización de las cepas de *Streptomyces* no produjo efectos negativos sobre este parámetro, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos evaluados y el control.

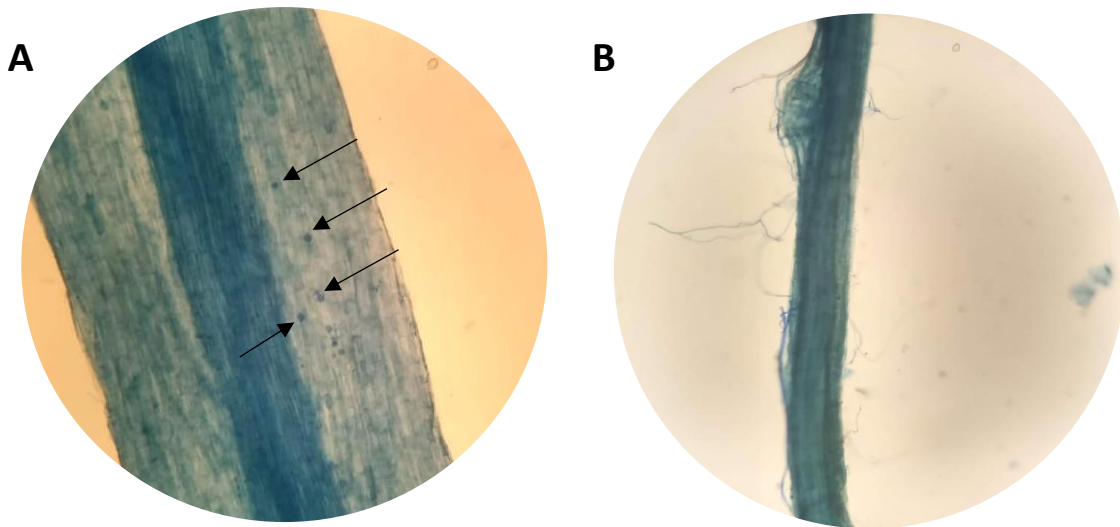


Figura 23. (A) Vesículas alimenticias en el interior de las células corticales radiculares, observadas con aumento 20x. (B) Micelio fúngico externo recubriendo la porción radicular, observado con aumento 10x.

3.3. Efecto sobre el control biológico de la PC

En la Figura 24 se muestra el análisis estadístico de las variables utilizadas para evaluar el efecto producido por las cepas de *Streptomyces* sobre el control biológico de *Mp*.

En la Figura 24-A se muestra el análisis del avance de los síntomas típicos de la PC, expresado como progreso de la severidad de la enfermedad. En este caso, la curva de progreso de las plantas que recibieron el tratamiento convencional con AF se mantuvo por debajo de

las curvas de progreso de las plantas de los restantes tratamientos, durante toda la extensión del ensayo, mostrando ser el tratamiento que mejor logró controlar la severidad de la infección. Entre las plantas que recibieron los tratamientos bacterianos no se observaron diferencias estadísticamente significativas, alcanzando valores de severidad promedio a los 21 dpi de 4,33 para N2A, 4,14 para N3 y 4,05 para N9. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas al comparar las mismas con respecto a las del tratamiento con AF y control de infección, logrando valores promedio de severidad de 3,04 y 6 respectivamente. Éstas pueden observarse en la Figura 25, donde se visualizan repeticiones representativas y el estado sanitario a 21 dpi de las plantas pertenecientes a los tratamientos control de infección, AF y N9. A pesar de estas diferencias en la severidad de la enfermedad al final del ensayo, cuando se analiza el % PM a 21 dpi (Fig 23-B), no se observan diferencias significativas entre las plantas tratadas con las cepas de *Streptomyces* y las del tratamiento con AF, pero sí entre éstas y las pertenecientes al tratamiento control de infección, el cual obtuvo un 100 % PM. Esto pone en evidencia el efecto de las cepas ensayadas para disminuir la incidencia de la enfermedad, reduciendo el número de planta muerta o con sintomatología avanzada.

En cuanto al ABCPE (Fig. 24-C), las plantas de los tratamientos control y AF obtuvieron el mayor y el menor valor acumulado, observando valores de 66,92 y 34,19 respectivamente, mientras que las de los tratamientos bacterianos alcanzaron valores intermedios. De las plantas tratadas con las cepas rizosféricas, solo las inoculadas con las cepas N9 y N2A no presentaron diferencias significativas con respecto al AF, alcanzando valores de 44,68 y 48,33 respectivamente, mientras que las del tratamiento con la N3 lograron diferenciarse estadísticamente del mismo. Ésta resultó ser la cepa que obtuvo el mayor valor acumulado de ABCPE, no presentando diferencias significativas con respecto al control de infección. Sin embargo, tampoco presentó diferencias con respecto a los demás tratamientos bacterianos.

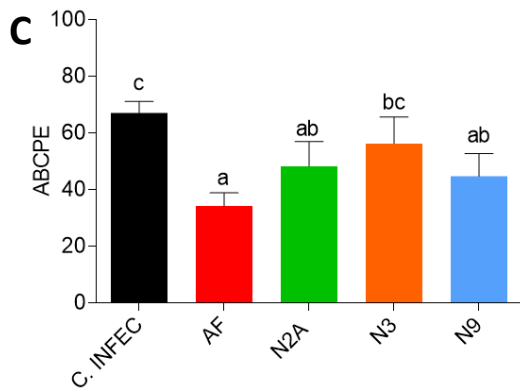
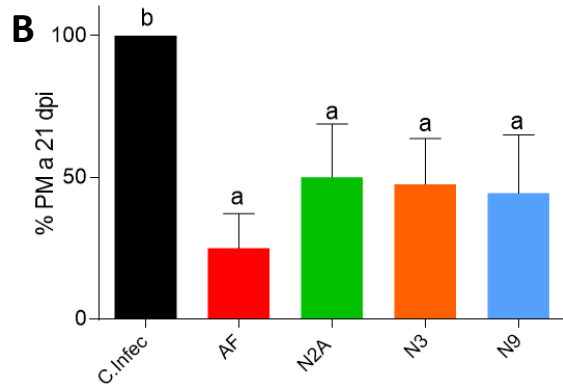
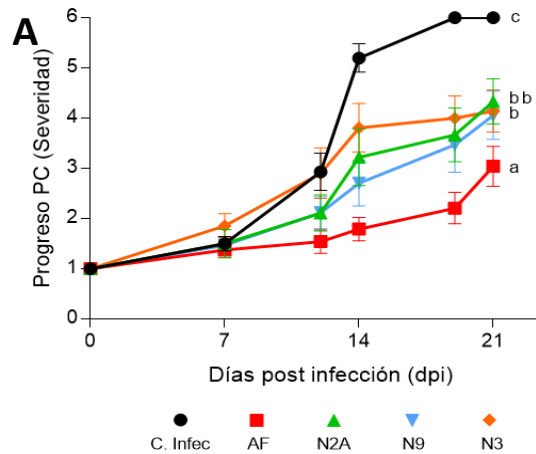


Figura 24. (A) Curva de progreso de la enfermedad (PC) en términos de severidad hasta los 21 dpi. (B) Porcentaje de planta muerta (% PM) a los 21 dpi. (D) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). Los valores representan el promedio de tres réplicas, y se expresan como media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas según test de Fisher ($p < 0,05$).

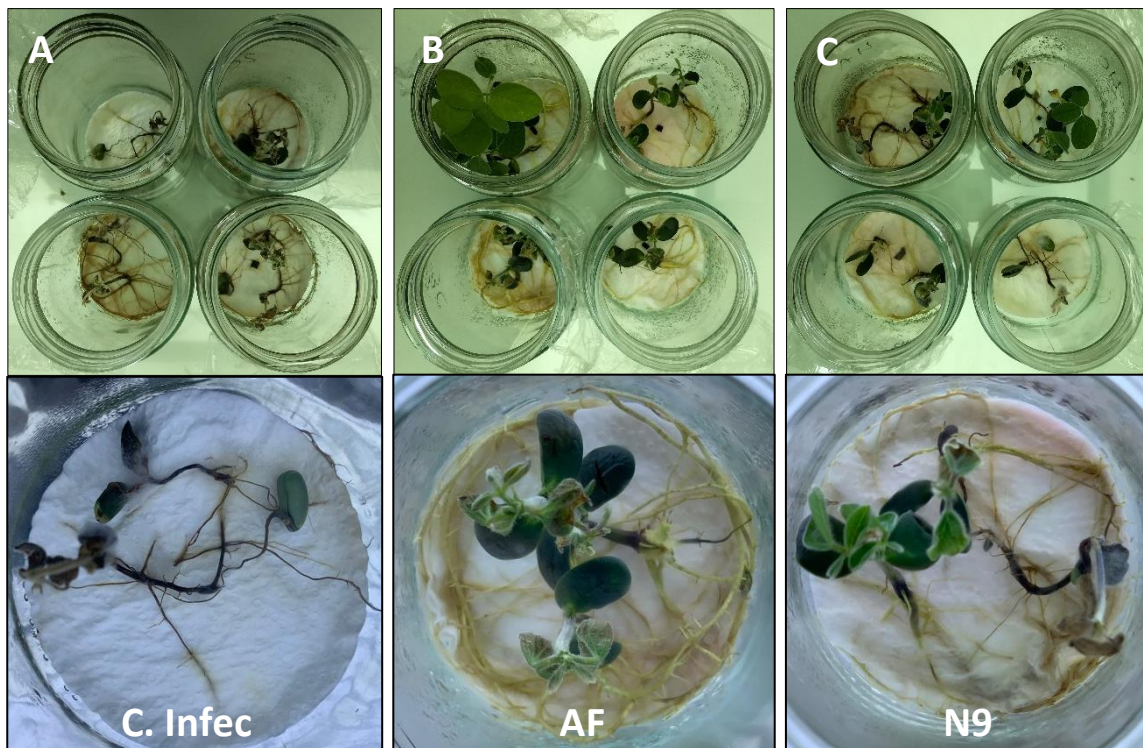


Figura 25. Repeticiones representativas del estado sanitario a 21 dpi para los tratamientos Control de infección, AF y *Streptomyces* N9.

4. DISCUSIÓN

En las últimas décadas la producción agrícola mundial se ha visto perjudicada en gran medida por enfermedades causadas por numerosos fitopatógenos, las cuales son controladas principalmente a través de la utilización de insumos químicos (Distéfano, 2018). Si bien el uso de productos agroquímicos ha contribuido a mejorar la producción de alimentos suministrando nutrientes o controlando numerosas plagas, su uso excesivo o indebido ha provocado severas consecuencias negativas sobre el ambiente y la salud humana, y la generación de resistencia en los mismos patógenos que debería controlar (Aguirre, 2017). La posibilidad de utilizar tecnologías basadas en el uso de microorganismos que habitualmente viven asociados a las plantas, son herramientas alternativas al uso de pesticidas y fertilizantes que debemos potenciar. Por lo tanto, el aislamiento y estudio de la composición microbiana de la rizósfera vegetal y su interacción con las plantas, proporcionará microorganismos candidatos que pueden ser utilizados como inoculantes, adaptándose al medio ambiente sin perjudicar al mismo (Palaniyandi et al., 2013). En este contexto, nuestro grupo comenzó el aislamiento de bacterias provenientes del suelo rizosférico de plantas de soja de la zona productora núcleo, pertenecientes en su mayoría al género *Streptomyces*. El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, y sus especies integrantes son consideradas promotoras del crecimiento vegetal a través de mecanismos directos e indirectos. Varios estudios señalan que los actinomicetos del género *Streptomyces* son considerados principalmente promotores del crecimiento vegetal indirecto, debido a la capacidad de producir sideróforos, antibióticos/antifúngicos y metabolitos secundarios que potencialmente pueden inducir una respuesta de defensa vegetal (Tokala et al., 2002; Persello et al., 2003; Franco, 2008). Nuestro grupo observó en estudios previos con cepas de *Streptomyces* productoras y no productoras de compuestos antifúngicos, y sin previa historia de interacción con plantas de soja, una disminución de la incidencia de diferentes enfermedades fúngicas y una promoción de ciertos parámetros asociados al crecimiento y desarrollo vegetal (Bercovich et al., 2022).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesina se enfocaron al estudio de cepas de *Streptomyces* que fueron aisladas de la rizósfera de plantas de soja. Como se observa en los resultados anteriormente presentados, se obtuvo una reducción en la severidad del CTS y de

la PC y en la cantidad de plantas muertas al final de los ensayos, además de una mejora en el estado fitosanitario de aquellas plantas derivadas de semillas pretratadas con las cepas de *Streptomyces* en comparación con las plantas pertenecientes a los tratamientos control. En la interacción Soja – *D. aspalathi*, el tratamiento con las cepas redujo la intensidad de la infección al reducir la severidad del CTS, haciendo que un genotipo altamente susceptible a *Da*, como el RA702, logre comportarse como uno moderadamente resistente a una infección con dicho hongo debido a que el % PM alcanzado al final del ensayo fue menor al 50% (Yorinori et al., 1996). Este resultado confirma la hipótesis de que el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* induce un mecanismo de defensa que mejora el desempeño de la planta en la resistencia contra patógenos fúngicos. Por otro lado, la protección brindada por la mezcla de AF fue significativa y similar a la lograda con las cepas bacterianas hasta los 35 dpi, pero luego disminuye considerablemente asemejándose al control de infección. Al final del ensayo, no hubo diferencias significativas entre las plantas tratadas con AF y las plantas no tratadas del control de infección, comportándose dicho genotipo (RA702) en ambos tratamientos como altamente susceptibles a *Da* (% PM > 80). Esto deja en evidencia que los productos químicos ensayados (metalaxil, carbendazim y thiram), además de generar graves consecuencias ambientales, sólo resultan efectivos para el fin por el cual se los aplica en una ventana corta de tiempo, no pudiendo reducir la severidad de la infección del patógeno en todo el ciclo de vida de la planta. Es importante destacar que las cepas rizosféricas N2A y N9 tienen la capacidad de controlar de manera *in vitro* a *Da* (Villafañe, 2020) a través de la producción de sustancias con actividad antifúngica. Sin embargo, la cepa SE.NP no productora de polieno, que no había mostrado inhibición fúngica *in vitro* (Bercovich et al., 2022), también resultó efectiva para controlar a dicho patógeno, por lo que no consideramos que la antibiosis sea el mecanismo principal por medio del cual se generan estas mejoras en la sanidad vegetal, sino que se podría estar induciendo un mecanismo de defensa (ISR) de tipo “*priming*” (Pieterse et al., 2014; Abbasi et al., 2019).

Una forma de demostrar la inducción de este mecanismo de resistencia es evaluar si existe una mejora en el *fitness* de las plantas luego de ser inoculadas con el patógeno (Martínez-Medina et al., 2016). Al analizar los parámetros medidos asociados al crecimiento y desarrollo vegetal en plantas no inoculadas con *Da* (G1), ninguno de los tratamientos con las cepas rizoféricas presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al

tratamiento control, aunque tampoco evidenciaron efectos negativos sobre los mismos. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el N° de nudos en el TP y área foliar en plantas inoculadas con *Da*. Estos resultados podrían contribuir a demostrar que las cepas de *Streptomyces* ensayadas inducen una respuesta de defensa en las plantas, que le permite seguir creciendo y desarrollándose. Sin embargo, esta mejora en el *fitness* también podría estar promovida o potenciada por los mecanismos PGPR directos caracterizados para estas cepas (solubilización de fosfato tricálcico y producción de IAA), ya que la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas mediada por microorganismos benéficos puede ser deberse a uno o más mecanismos actuando en simultáneo (Beneduzi et al., 2012). Independientemente del o los mecanismos a través del cual se produce la promoción, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas de soja, y que éste se mantiene aún si existe una infección con un patógeno. Es importante observar que los parámetros promovidos (N° de nudos en el TP y área foliar) se relacionan directamente con el rendimiento del cultivo, generando potencialmente incrementos en el mismo. Dado que en las plantas de soja, las estructuras reproductivas crecen en racimos axilares ubicados en los nudos, un aumento en este parámetro durante la etapa vegetativa podría tener un impacto positivo en el número de vainas y, por ende, en el rendimiento final. Esta situación fue observada por Bercovich et al. (2022) en plantas tratadas con *S. euroclicus*, en las cuales se evidenció un incremento significativo del número de vaina por planta en comparación con el tratamiento control y antifúngico. Al mismo tiempo, un incremento en el área foliar implicaría una mayor captura de radiación fotosintética que se traduciría en aumentos de fotoasimilados destinados al llenado de granos. También es importante destacar el efecto negativo generado por la mezcla de AF químicos sobre el *fitness* vegetal. Esta situación es particularmente evidente en las plantas inoculadas con *Da* (G2), donde se observa que aquellas tratadas con las cepas de *Streptomyces* presentaron diferencias significativas y positivas con respecto al AF, en todos los parámetros analizados. Estos resultados nos permiten cuestionar el tratamiento convencional que se usa para el control de patógenos fúngicos, ya que, además de generar graves consecuencias ambientales y de resultar efectivos en una ventana corta de tiempo, también produce un deterioro general en el *fitness* de las mismas. A su vez, al analizar el parámetro N° de nódulos en la RP, queda en evidencia el

efecto antagonista generado por estos productos sobre los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo. Esta situación avala los resultados previamente obtenidos por el grupo de trabajo de incompatibilidad en placa entre *B. japonicum* y la mezcla de AF ensayada, y expone más evidencias negativas asociadas a la utilización AF de origen químicos (Bercovich et al. 2022).

Dentro del mismo ensayo, y en relación a la compatibilidad entre las cepas rizosféricas del género *Streptomyces* de interés y los hongos micorrízicos presentes naturalmente en el suelo, no se observaron efectos inhibitorios sobre los mismos por parte de los tratamientos bacterianos, dado que no se visualizaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ensayados. La baja intensidad de micorrización observada pudo haberse debido a una escasa cantidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en el sustrato utilizado, ya que el mismo fue obtenido de parcelas del campo experimental Villarino con aplicaciones previas de productos fungicidas, los cuales suelen resultar tóxicos para los mismos (Faggioli et al., 2011). A su vez, como las plantas utilizadas para evaluar este parámetro fueron cultivadas en vasos plásticos de 330 cm³, y su sustrato fue previamente labrado y preparado, el laboreo del mismo pudo haber afectado negativamente la red de hifas de HFMA e inducir una mayor producción de esporas (Bucking et al., 2012), las cuales necesitan condiciones óptimas para germinar y colonizar las raíces. Según el INVAM (2022), la esporulación ocurre abundantemente en cultivos en maceta, y requieren de dos a tres meses como mínimo para que se establezca una interacción efectiva entre ambos simbioses. En nuestro caso la evaluación se realizó en plantas de 70 días (más de 2 meses), por lo que, la baja intensidad de micorrización observada puede deberse al tiempo. Independientemente del motivo por el cual hubo una baja intensidad de micorrización, en este ensayo preliminar no se observó una incompatibilidad entre las cepas de *Streptomyces* y las micorrizas arbusculares, apoyando de manera parcial nuestra hipótesis planteada.

En la otra interacción ensayada (Soja – *M. phaseolina*) la inoculación de las semillas con las cepas rizosféricas también redujo la intensidad de la infección al reducir la severidad de la PC, en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, en este ensayo, el tratamiento con AF químico obtuvo mejores resultados, logrando reducir la severidad de la

enfermedad aún más que las cepas de interés. En este caso, un genotipo altamente susceptible a *M. phaseolina*, como el DM 6.2i RR, logró comportarse como un genotipo moderadamente resistente a una infección con *Mp* en el caso de los tratamientos bacterianos (% PM < 50%), y como altamente resistente (% PM < 25%) para el tratamiento con AF (Yorinori et al., 1996). A diferencia del patosistema anterior, donde hubo una separación espacio - temporal entre el tratamiento de las semillas con las cepas de *Streptomyces* y la posterior inoculación con el patógeno, en este patosistema ambos procesos se realizaron en simultáneo. Por este motivo consideramos que en ésta interacción la producción de metabolitos con acción antifúngica es un mecanismo importante a través del cual las cepas bacterianas inhiben o retardan el crecimiento de *Mp*. Sin embargo, al igual que lo ocurrido con la cepa SE.NP en el patosistema *Da* - soja, la cepa N3 que no es capaz de producir dichos metabolitos (Villafañe, 2020), alcanzó un nivel de protección similar al de las otras dos cepas que sí son productoras. Estos resultados permiten inferir que la protección de las plántulas de soja mediada por estas cepas podría deberse también a una respuesta de defensa inducida (ISR) de tipo *priming* (Pieterse et al., 2014; Abbasi et al., 2019). También es importante resaltar que el efecto de biocontrol mediado por las distintas cepas rizosféricas fue similar en los dos cultivares de soja argentinos distintos, DM6.2i RR y RA702, lo que sugiere un mecanismo común, independientemente del genotipo de la especie.

Finalmente, poder descubrir el o los mecanismos implicados a través de los cuales estas bacterias proporcionan su efecto biocontrolador y estimulan el crecimiento y desarrollo vegetal, es fundamental para tratar de dilucidar cuales son las moléculas elicitoras que inducen dichas mejoras. Así, la identificación de los elicitores involucrados, aportará el conocimiento necesario para el desarrollo a futuro de bioinsumos a base de estas biomoléculas y permitirá su potencial transferencia tecnológica para suplir la actual necesidad de reemplazar los antifúngicos químicos, por una herramienta de control biológico más sustentable y con beneficios reales para los cultivos.

4.1. Perspectivas de trabajo

Si bien resultan evidentes los efectos positivos visualizados sobre la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal y el control biológico de los patógenos estudiados, aún deben realizarse numerosos ensayos para tratar de dilucidar algunas incógnitas importantes y necesarias para el desarrollo de un producto efectivo:

- Los resultados obtenidos en condiciones controladas en cámara de crecimiento y semicontroladas en invernadero, se deberán validar realizando ensayos a campo, evaluando que los efectos deseados de biocontrol y promoción persistan en los agroecosistemas. Con respecto a este punto en la campaña 2021/22 se realizó el primer ensayo a campo, obteniéndose resultados preliminares positivos (resultados no mostrados).
- Para corroborar la existencia de un mecanismo de defensa (ISR) en plantas de soja de tipo “*priming*” inducido por las cepas de *Streptomyces*, se deberán analizar diferentes marcadores típicos de la respuesta de defensa como acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), compuestos fenólicos, fortalecimiento de la pared celular por depósitos de calosa, acumulación de hormonas típicas como ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y ácido abscísico (ABA), y perfiles de expresión de genes marcadores de la respuesta de defensa (Abassi et al., 2019; Balmer et al., 2015; Martínez-Medina et al., 2016), a partir de muestras foliares (*Da*) y radicales (*Mp*).
- Para los futuros ensayos de micorrización, se deberá preparar un sustrato óptimo a partir de muestras de suelo tomadas de diversos puntos para aumentar las probabilidades de contar con la presencia de hongos formadores de micorrizas arbusculares, y extender el ensayo en el tiempo para garantizar una mayor colonización. Otra alternativa es la incorporación de los mismos al sustrato a través de la aplicación de productos comerciales formulados a base de micorrizas.
- Se deberán diseñar ensayos con posibles formulaciones donde se combinen dos o más cepas (consorcios bacterianos) para evaluar si existe un sinergismo entre ellas y se logra

una mayor protección y promoción, cuidando la compatibilidad con *B. japonicum* y los hongos micorrízicos.

- También se deberá evaluar si los efectos observados en la promoción de crecimiento y desarrollo vegetal en estado vegetativo, podrían generar un impacto significativo y positivo en el rendimiento de plantas de soja en condiciones de invernadero y posteriormente a campo.
- Además, para complementar estos resultados, se deberán realizar ensayos utilizando otros patosistemas para evaluar la capacidad de controlar un espectro más amplio de patógenos, no sólo fúngicos sino bacterianos y virales, e incluso, utilizar otros cultivos de interés agronómico para evaluar su efectividad en ellos.

5. CONCLUSIONES

- El tratamiento de semillas de soja con las cepas rizosféricas N2A y N9 generó incrementos significativos en el porcentaje de germinación en comparación con el tratamiento control y AF.
- Se observó también un incremento significativo de la emergencia de las plántulas en suelo, contribuyendo positivamente en el establecimiento de la planta.
- Al evaluar el número de nudos en el tallo principal, área foliar, peso seco de la porción aérea, peso seco de la porción radicular y la biomasa total en plantas no inoculadas con *Da*, se comprobó que ninguna de las dos cepas rizosféricas generaron efectos negativos sobre dichos parámetros.
- La evaluación de los mismos parámetros luego de la inoculación con *Da* demostró un incremento significativo en el número de nudos en el tallo principal y en el área foliar en plantas de 35 días y bajo condiciones de invernadero.
- La utilización de productos fungicidas químicos produjo efectos negativos en todos los parámetros medidos asociados al crecimiento y desarrollo de plantas de soja en estadios vegetativos.
- Utilizando el patosistema *Da*-Soja se demostró que ambas cepas rizosféricas protegieron significativamente a las plantas de soja en comparación con el tratamiento con AF, logrando retrasar la aparición temporal de síntomas, disminuir su velocidad de avance y la severidad (ABCPE) y reducir el porcentaje de planta muerta al final del ensayo.
- En el patosistema *Mp*-Soja las cepas rizosféricas lograron reducir la severidad de la enfermedad en comparación con el tratamiento control, alcanzando valores similares al tratamiento con AF en el porcentaje de planta muerta y ABCPE.
- Las cepas de *Streptomyces* inducirían una respuesta de defensa sistémica en las plantas de soja contra los patógenos fúngicos evaluados.
- El tratamiento con las cepas de *Streptomyces* sería compatible con la formación de micorrizas en el sistema radicular de las plantas de soja.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbasi S, Safaie N, Sadeghi A, Shamsbakhsh M. 2019. Streptomyces strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato through different molecular mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 10. 10.3389/fmicb.2019.01505

Agrios GN. 2005. Plant diseases caused by fungi. *Plant pathology*, 4.

Agostini RB, Postigo A, Rius SP, Rech GE, Campos-Bermudez VA, Vargas WA. 2018. Long-lasting primed state in maize plants: salicylic acid and steroid signaling pathways as key players in the early activation of immune responses in silks. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32 (1), 95–106. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0208-R>.

Aguirre, RE. 2017. Agroquímicos en la provincia de Chaco. IV Congreso Nacional De Derecho Agrario Provincial – Salta.

Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and Applications of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Current Perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26, 1-20.

Almeida AMR, Abdelnoor RV, Arrabal-Arias CA, Calvalho VP, Jacoud-Filho SS, Marín SRR, Benato LC, Pinto MC, Carvalho CGP. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatología Brasileira* 28:279-285.

Amerio NS, Castrillo ML, Bich GA, Zapata PD, Villalba LL. 2020. Trichoderma en la Argentina: Estado del arte. *Ecología austral*, 30 (1), 113-124.

Bailey-Serres J, Parker JE, Ainsworth EA, Oldroyd G, Schroeder JI. 2019. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575(7781), 109–118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>.

Balmer A, Pastor V, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B. 2015. The 'prime-ome': Towards a holistic approach to priming. *Trends in Plant Science*. 20 (7). 10.1016/j.tplants.2015.04.002.

Bandara AY, Weerasooriya DK, Bradley CA, Allen TW, Esker PD, Sahu BB. 2020. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. PLoS ONE 15 (4), e0231141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>

Barral MP, Villarino S, Levers C, Baumann M, Kuemmerle T, Mastrangelo M. 2020. Widespread and major losses in multiple ecosystem services as a result of agricultural expansion in the Argentine Chaco. Journal of Applied Ecology. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13740>

Beddington, J. 2010. Food security: contributions from science to a new and greener revolution. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 365(1537), 61–71. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0201>.

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and molecular biology. 35 (4). 10.1590/S1415-47572012000600020.

Benjumeda Muñoz D. 2017. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones.

Bercovich BA. 2022. Aplicaciones biotecnológicas de bacterias del género *Streptomyces*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Rosario, Argentina.

Bercovich BA, Villafañe DL, Bianchi JS, Taddia C, Gramajo H, Chiesa MA, Rodríguez EJ. 2022. *Streptomyces eurocidicus* promotes soybean growth and protects it from fungal infections. Biological Control. 165. 104821. 10.1016/j.biocontrol.2021.104821.

Berdugo SEB. 2009. El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 7(1), 123-132.

Bonilla Buitrago R, González de Bashan LE, Pedraza RO. 2021. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

Bucking H, Liepold E, Ambilwade P. 2012. The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. *Plant Science*. Capítulo 4. p. 107-138.

Cadenazzi G. 2009. La historia de la soja en Argentina. De los inicios al boom de los 90. In Ponencia presentada en el XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociología, VIII Jornadas de Sociología de la Universidad de Buenos Aires, Asociación Latinoamericana de Sociología, Buenos Aires, Argentina (Vol. 31, pp. 000-062).

Carmona MA, Gally ME, Grijalba PE, Sautua FJ. 2015. Evolución de las enfermedades de la soja en la Argentina: pasado, y presente. Aportes de la FAUBA al manejo integrado. *Agronomía & Ambiente. Rev. Facultad de Agronomía UBA* 35(1): 37-52.

Chalfoun NR, Durman SB, Budeguer, Florencia, Caro MP, Bertani RP, Di Peto P, Stenglein SA, Filippone MP, Moretti E, Diaz Ricci JC, Wellin B, Castagnaro AP. 2018. Development of PSP1, a Biostimulant Based on the Elicitor AsES for Disease Management in Monocot and Dicot Crops. *Front. Plant Sci.* 9:844

Chang WS, Lee HI, Hungria M. 2015. Soybean Production in the Americas. B. Lugtenberg (ed.). *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing Switzerland. P.393-400. DOI 10.1007/978-3-319-08575-3_41.

Chiesa MA, Pioli RN, Cambursano MV, Morandi EN. 2013. Differential expression of distinct soybean resistance genes interacting with Argentinean isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *European Journal of Plant Pathology* 135: 351–362. DOI 10.1007/s10658-012-0091-5

Chiesa MA, Pioli RN, Morandi EN. 2009. Specific resistance to soybean stem canker conferred by the Rdm4 locus. *Plant Pathology* 58 (6): 1032–1038. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02145.x

Chiesa MA, Reznikov S, Cambursano MV, Fiorito N, Firpo NK, Acerbo A, Martínez GE, Morandi EN. 2016. Problemática de la podredumbre carbonosa en soja (*Glycine max*). *Agromensajes* 44: 30-35.

Cisneros Moscol, JE. 2016. Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Solanum tuberosum* sp. andigena (Papa). Tesis de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú.

Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR. 2015. Priming for Enhanced Defense. *Annual Review Phytopathology*. 53. pp. 97–119.

Correa OS, Montecchia MS, Soria MA, Kerber NL, Pucheu NL, García AF. 2011. Una alternativa biológica para el control de patógenos de soja. Doi:10.13140/2.1.1643.8726

Distéfano S. 2018. Con el sol se reactivó la cosecha de soja y los resultados son cada vez peores. *AgroVoz*. 15/05/18.

Domínguez D, Sabatino P. 2006. Con la soja al cuello: crónica de un país hambriento productor de divisas. En: *Los tormentos de la materia. Aportes para una ecología política latinoamericana*. CLACSO (Ed.), Buenos Aires. Pág. 256.

Einloft TC, Bolzan de Oliveira P, Radünz LL, Dionello RG. 2021. Biocontrol capabilities of three *Bacillus* isolates towards aflatoxin B1 producer *A. flavus* in vitro and on maize grains. *Food Control* 125, 107978. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107978>.

Faggioli V, Freytes G, Galarza C. 2011. Las micorrizas en trigo y su relación con la absorción de fósforo del suelo. INTA. Estación Experimental Marcos Juárez.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. How to feed the world in 2050. FAO. Roma.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2015. Climate change and food security: risks and responses. FAO. Roma. 35 p.

Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS. 1971. Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11: 929–931.

Franco M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis para optar el Grado de Doctor. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Granada, España.

Gardezi AK, Berber SRM, Garay AVA. 2015. Los usos y beneficios de las micorrizas en la agricultura. *Desarrollo y tecnología*. pp. 243-265.

Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence L, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 327(5967):812-818.

Grau CR, Koval NC. 2006. Potential for soybean stem canker resurgence in Wisconsin. In Proceedings of the 2006 Wisconsin Fertilizer, Agrilime and Pest Management Conference (Vol. 45, p. 104).

Haas D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 41(1), 117–153. doi:10.1146/annurev.phyto.41.0520

Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC. 1999. Compendium of soybean diseases (4th ed.). Soybean Disease Compendium. p. 37-39

Hartman GL, West E, Herman T. 2011. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*. 3. 5-17. 10.1007/s12571-010-0108-x.

Hartman GL, Rupe JC, Sikora EJ, Domier LL, Davis JA, Steffey KL. 2015. Compendium of soybean diseases and pests. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Hough P. 2014. Sustainable food production includes human and environmental health (Vol. 3). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7454-4>

INVAM (International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2022. <https://invam.ku.edu/>

ISTA. 2015. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland. International Seed Testing Association. p. 113-168.

Ivancovich A. 2003. Soybean Rust situation in Argentina. Annual Meeting of the American Phytopathological Society. Charlotte, North Carolina.

Ivancovich A. 2013. Enfermedades de soja: diagnóstico y manejo. INTA Ediciones. Pergamino, Argentina.

Ivancovich A, Flores C, Lavilla M. 2016. Podredumbre carbonosa de la soja, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., un hongo oportunista muy dependiente del estrés hídrico y térmico. INTA.

Jacobsen CS, Hjelmsø MH. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. Current opinion in biotechnology, 27, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003>.

Kandel YR, Phillips XA, Gaska JM, Conley SP, Mueller DS. 2021. Effect of Planting Population on Stem Diseases of Soybean in Iowa and Wisconsin. Plant Health Progress, 22 (2), 108-112.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, UK.

Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019 Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. Frontiers in Plant Science. Vol 10, art. 845. doi: 10.3389/fpls.2019.00845

Liu D, Yan R, Fu Y, Wang X, Zhang J, Xiang W. 2019. Antifungal, plant growth-promoting, and genomic properties of an endophytic actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. Front. Microbiol. 10 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02077>.

Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. 2015. The evolution of fungicide resistance. Advances in applied microbiology, 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>.

Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annual Review of Microbiology. 63. 541-56. 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.

Maksimov IV, Abizgil'dina RR, Pusenkova LI. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens. Applied Biochemistry and Microbiology. 47 (4). pp. 333-345. 10.1134/S0003683811040090.

Martínez Dognac G. 2004. Apuntes acerca de la historia de la soja en la Argentina: elementos para delinear experiencias comparadas. Doc. CIEA Vol. Nro. 02.

- Martínez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse C, Pozo M, Ton J, Dam N, Conrath U.** 2016. Recognizing Plant Defense Priming. *Trends in Plant Science*. 21. 10.1016/j.tplants.2016.07.009.
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V.** 2017. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*. 68. pp. 485–512.
- McKie JW, Anderson KL.** 1967. *The soybean book*. W.R. Thompson, State College, MS.
- Menendez, E, Garcia-Fraile, P.** 2017. Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. *AIMS microbiology*, 3(3), 502–524. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.502>
- Mengistu A, Ray JD, Smith JR, Paris RL.** 2007. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science*. 47 (6), pp. 2453–2461. 10.2135/cropsci2007.04.0186.
- Miralles, DJ.** 2013. Estrategias para aumentar la producción de alimentos. *Asociación Civil Ciencia Hoy*. Ed Ciencia Hoy 23 (134): 29-33.
- Mufti R, Bano A.** 2019. PGPR-induced defense responses in the soybean plant against charcoal rot disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 155 (3), 983–1000. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01828-6>.
- Newitt JT, Prudence S, Hutchings MI, Worsley SF.** 2019. Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using Streptomycetes. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 8(2), 78. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020078>.
- Osato T, Ueda M, Fukuyama S, Yagishita K, Okami Y, Umezawa H.** 1955. Production of tertiomycin (a new antibiotic substance), azomycin and eurocidin by *S. eurocidicus*. *J. Antibiot.* (Tokyo) 8 (4), 105–109.
- Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh JW.** 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (22), 9621–9636. doi:10.1007/s00253-013-5206-1
- Passari A, Upadhyaya K, Singh G, Abdel-Azeem A, Thankappan S, Uthandi S, Hashem A, Abd Allah EF, Malik J, Alqarawi A, Gupta VK, Ranjan S, Singh B.** 2019.

Enhancement of disease resistance, growth potential, and photosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by inoculation with an endophytic actinobacterium, *Streptomyces thermocarboxydus* strain BPSAC147. PLOS ONE. 14. e0219014. 10.1371/journal.pone.0219014.

Pérez Vázquez A, Leyva T, Doris A, Gómez Merino FC. 2018. Desafíos y propuestas para lograr la seguridad alimentaria hacia el año 2050. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 9 (1): 175-189. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.857>

Persello F, Nussaume L, Robaglia C. 2003. Tales from the underground: molecular plant – rhizobacteria interactions. Plant, Cell and Environment. Vol. 26, pp.189-199.

Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annual Review Phytopathology. 52 (1). pp. 347–375.

Pioli RN, Gattuso S, Prado DE, Borghi A. 1997. Recent Outbreak of Stem Canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) of Soybean in Santa Fe, Argentina. Plant Disease. 81 (10). pp.1215-1215. 10.1094/PDIS.1997.81.10.1215A

Pioli RN, Morandi EN, Bisaro V. 2001. First report of Soybean Stem Canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. Plant Disease. 85 (1). pp. 98.

Pioli RN, Morandi EN, Martínez MC, Lucca F, Tozzini A, Bisaro V, Hopp E. 2003. Morphologic, Molecular, and Pathogenic Characterization of *Diaporthe phaseolorum* Variability in the Core Soybean-Producing Area of Argentina. Phytopathology vol 93, No 2: 136-146.

Poland J, Rutkoski J. 2016. Advances and Challenges in Genomic Selection for Disease Resistance. Annual review of phytopathology, 54, 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100056>.

Prashar P, Shah S. 2013. Impact off fertilizers and pesticides on soil icroflora in agriculture, vol. 12. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9>.

Rajkumar M, Ae N, Majeti P, Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*. 28. 142-9. 10.1016/j.tibtech.2009.12.002.

Raymaekers K, Ponet L, Holtappels D, Berckmans B, Cammue B. 2020. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control*. 144. 104240. 10.1016/j.biocontrol.2020.104240.

Reznikov S, Chiesa MA, Pardo EM, De Lisi V, Bogado N, Gonzalez V, Ledesma F, Morandi EN, Ploper LD, Castagnaro AP. 2019. Soybean-*Macrophomina phaseolina* Specific Interactions and Identification of a Novel Source of Resistance. *Phytopathology* 109: 63–73. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0287-R>.

Romero Luna MP, Mueller D, Mengistu A, Singh AK, Hartman GL, Wise KA. 2017. Advancing Our Understanding of Charcoal Rot in Soybeans. *Journal of Integrated Pest Management* (2017) 8(1): 8; 1–8. doi:10.1093/jipm/pmw020

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & Evolution*, 3 (3), 430-439. doi:10.1038/s41559-018-0793-y

Schlatter D, Kinkel L, Thomashow L, Weller D, Paulitz T. 2017. Disease Suppressive Soils: New Insights from the Soil Microbiome. *Phytopathology*, 107(11), 1284–1297. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0111-RVW>.

Srinivasa Reddy P. 2008. Molecular mapping of genomic regions harboring QTLs for stalk rot resistance in *sorghum*. *Euphytica*, vol. 159, no. 1–2, pp. 191–198.

Suárez-Moreno ZR, Vinchira-Villarraga DM, Vergara-Morales DI, Castellanos L, Ramos FA, Guarnaccia C, Degrassi G, Venturi V, Moreno-Sarmiento N. 2019. Plant-growth promotion and biocontrol properties of three *Streptomyces spp.* isolates to control bacterial rice pathogens. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00290>.

Terry E, Leyva A, Hernández A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 7, n° 2, pp. 47-54.

Tokala KR, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied Environmental Microbiology* 68 (5): 2161-2171. doi: 10.1128/AEM.68.5.2161-2171.2002.

Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.

Tyler DD, Overton JR, Chambers AY. 1983. Tillage effects on soil properties, diseases, cyst nematodes, and soybean yields. *Journal of soil and water conservation*, 38(4), 374-376.

Udayanga D, Castlebury LA, Rossman AY, Chukeatirote E, Hyde KD. 2015. The *Diaporthe sojae* species complex: phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. *Fungal Biol.* 119 (5), 383–407. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.10.009>.

USDA (United States Department of Agriculture). 2022. World Agricultural Production. World Production, Markets, and Trade Report.

Van Rensburg JC, Lamprecht SC, Groenewald JZ, Castlebury LA, Crous PW. 2006. Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Stud. Mycol.* 55, 65-75. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.65>.

Villafañe DL. 2020. Búsqueda de actinobacterias como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos de soja. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Rosario, Argentina.

Verma P, Yadav AN, Khannam KS, Kumar S, Saxena AK, Suman A. 2016. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J Basic Microbiol* 56(1): 44-58.

Vívas Darío, DG. 2020. Efectos de la contaminación por agroquímicos en agua y suelo. Tesis de grado. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. Annual Review of Microbiology, 58, 611-647. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>

Wrather A, Shannon G, Balardin R, Carregal L, Escobar R, Gupta G, Ma Z, Morel W, Ploper L, Tenuta A. 2010. Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006. Plant Health Progress. 11. 10.1094/PHP-2010-0125-01-RS.

Yorinori JT. 1996. Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle.

Zarrilli A. 2020. La Naturaleza puesta en Jaque: La Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Socio-Ambiental (1980-2017). Historia Ambiental Latinoamericana y Caribeña (HALAC) revista de la Solcha. 10. 125-149. 10.32991/2237-2717.2020v10i1.p125-149.