Repelentes de aves aplicados a la semilla de soja: compatibilidad con el inoculante y residualidad en cotiledones

Olivera Lourdes[1], Rodríquez Ethel[2], Ceretta Sergio[3], Beyhaut Elena[3]

[1] *Técnico contratado por proyecto INIA. Avenida Millán 4703. Montevideo, Uruguay. Correo electrónico:* lourdes.m.olivera@gmail.com
[2] *Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas.*
[3] *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).*

Recibido: 14/5/15 Aceptado: 22/6/16

Resumen

Tres especies de palomas causan significativas pérdidas económicas en soja (*Glycine max* [L.] Merr), por consumo total o parcial de cotiledones durante la emergencia del cultivo. Los repelentes son una alternativa no letal para disminuir esos daños, evitando que las aves se alimenten del cultivo. Este trabajo tuvo como objetivos conocer si repelentes aplicados a las semillas poseen la capacidad de ingresar y permanecer en los cotiledones. Los ensayos evaluaron sus efectos en la sobrevivencia de rizobios sobre las semillas y la capacidad de estos de nodular y fijar nitrógeno. Se evaluó Draza® (methiocarb 50 %), Avipel® (antraquinona 50 %) y Rayén® (metil antranilato 30 %). Las semillas fueron tratadas con los repelentes y posteriormente con inoculantes formulados en soporte líquido y turba. Se evaluó el número de rizobios viables sobre semillas a los dos y siete días luego de tratadas, y se determinaron parámetros de nodulación y peso seco de parte aérea en invernáculo. Se evaluó el contenido (ppm) de antraquinona y metil antranilato en cotiledones. La sobrevivencia de rizobios disminuyó con metiocarb y antraquinona pero no con metil antranilato. La capacidad de nodular de los rizobios y la fijación biológica de nitrógeno (FBN) fueron afectadas negativamente por el uso de metiocarb y antraquinona, siendo esta última menos perjudicial. Se observó presencia del repelente en cotiledones para antraquinona aunque no para metil antranilato. Futuras investigaciones deberían estar dirigidas a incrementar la cantidad de metil antranilato presente en cotiledones, sin afectar los rizobios.

Palabras clave: repelente de aves, *Glycine max*, rizobios, fijación biológica de N_2

Summary

Bird Repellent Applied to Soybean Seed: Compatibility with Inoculant and Residuality in Cotyledons

Three species of doves cause significant economic losses in soybean (*Glycine max* [L.] Merr), for total or partial consumption of cotyledons during crop emergence. Repellents are a nonlethal alternative to reduce this damage, preventing birds from feeding on the crop. This study assessed the performance of seed-applied bird repellents. Tests involved repellents ability on reaching and staying in the cotyledons, and their effect on the survival of rhizobia on seed, nodulation and nitrogen fixation. We worked with Draza® (50 % methiocarb), Avipel® (50 % anthraquinone) and Rayén® (methyl anthranilate 30 %). Seeds were treated with the repellents and then inoculated with either liquid or peat-based formulations). The number of viable rhizobia on the seeds was measured two and seven days after treatment; and nodulation parameters and dry weight of aerial part in hothouse were determined. The content (ppm) of anthraquinone and methyl anthranilate in cotyledons was evaluated. The survival of rhizobia decreased whith methiocarb and anthraquinone but not with methyl anthranilate. Rhizobia nodulation ability and biological nitrogen fixation (BNF) were negatively affected by the use of methiocarb and anthraquinone, the latter being less harmful. Residuality of repellent on cotyledons was observed for anthraquinone but not for methyl anthranilate. Future research should be aimed at increasing the amount of methyl anthranilate present in cotyledons, without affecting the rhizobia.

Keywords: bird repellents, *Glycine max*, rhizobia, biological N_2 fixation

Introducción

Las aves causan importantes pérdidas económicas a la agricultura en Uruguay y el mundo (Centeno, 1999; Contreras *et al*., 2003; Rodríguez, 1994; Tracey y Saunders, 2010). Los daños en la emergencia de la plántula de soja (*Glycine max* [L.] Merr) son producidos por: paloma torcaza (*Zenaida auriculata*), paloma de ala manchada (*Patagioenas maculosa*) y paloma grande de monte (*Patagioenas picazuro*) (Calvi *et al.,* 1976; Canavelli, 2010; Rodríguez *et al.,* 2011). Estas especies consumen los cotiledones y pueden dañar parcial o totalmente la plántula, causando su muerte en este último caso (Rodríguez *et al.,* 2011).

Desde la década del 70' se han desarrollado técnicas enfocadas a disminuir el daño, como son los repelentes, que buscan evitar que las aves se alimenten del cultivo. En función de su mecanismo de acción, los repelentes se clasifican en primarios y secundarios. Los primarios son compuestos que producen efectos irritantes o tienen sabor desagradable, ocasionando una respuesta de evasión en las aves en su primera exposición (Clark, 1998) específicamente por las cualidades sensoriales del químico, no habiendo efectos fisiológicos adversos. Los repelentes secundarios poseen cualidades sensoriales que representan para el animal un aviso de efectos fisiológicos adversos post-ingesta, por lo que subsecuentemente este aprende a evitar el alimento tratado (aversión condicionada). En Uruguay existen dos repelentes de aplicación a la semilla: metiocarb (desde 1980) y uno a base de antraquinona registrado en el transcurso de este trabajo. Ambos ingredientes activos son repelentes secundarios. Olivera y Rodríguez (2014), analizaron un tercer ingrediente activo denominado metil antranilato, que actúa como repelente primario. El metil antranilato y la antraquinona fueron evaluados en plántulas de soja con aplicación foliar (Olivera y Rodríguez, 2014). Sin embargo, esta forma de aplicación en cultivos extensivos a veces no es viable, ya que el período de vulnerabilidad de la planta es muy corto (aproximadamente cuatro días) y luego de detectado el problema, la aplicación debe realizarse inmediatamente. Por otro lado, si la emergencia es heterogénea, gran parte de las futuras plántulas quedaría sin tratar y sería vulnerable al daño. Además, una alta cantidad de producto se desaprovecha porque las plántulas son pequeñas y están separadas. Por lo tanto, el uso de los repelentes para aves aplicados a la semilla representa una alternativa promisoria.

El nitrógeno es el nutriente más demandado por la soja, dado el alto contenido de proteínas del grano. Rendimientos de 3.000 kg ha^{-1} están asociados a requerimientos de 240 kg de nitrógeno (Hungria *et al.*, 2009). La soja puede cubrir gran parte de estos requerimientos mediante la asociación simbiótica con bacterias genéricamente llamadas «rizobios» que transforman el N_2 de la atmósfera en formas asimilables para la planta. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en comparación con los fertilizantes es más económica, tiene mayor eficiencia y causa menor impacto ambiental (Peoples y Craswell, 1992). Una FBN eficiente está asociada a la inoculación de las semillas con bacterias, de manera de proveer el máximo número de rizobios específicos vivos en la rizosfera al inicio de la nodulación. Mayor número de rizobios específicos viables sobre la semilla conduce, en general, a una mejor nodulación, altas tasas de fijación de nitrógeno y mayores rendimientos (Lupwayi *et al*., 2000).

La aplicación de agroquímicos como curasemilla busca proteger los cultivos de plagas y patógenos preexistentes en las semillas, así como de los que hubiere en el campo (Mubeen *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando son usados conjuntamente con inoculantes microbianos, pueden causarles efectos negativos de intensidad variable, según la molécula en cuestión y la formulación (Martensson, 1992; Revellin *et al*., 1993; Kyei-Boahen *et al*., 2001; Ayansina y Oso, 2006). Campo y Hungria (2000) afirman que la mayoría de los fungicidas usados como curasemilla conjuntamente con inoculantes en base a turba, reducen la nodulación y FBN. Para el caso de los productos utilizados en el presente trabajo, no se han encontrado estudios en nuestro país ni en la región que estén enfocados a analizar su compatibilidad con los rizobios. González (2013), midió el efecto tóxico por contacto del metiocarb mediante halos de inhibición, no hallando toxicidad sobre los rizobios, aunque dichos resultados no son presentados.

En el desarrollo de repelentes para aves que se apliquen a la semilla, es fundamental que, por un lado, los ingredientes activos alcancen y permanezcan en los cotiledones hasta la aparición de la primera hoja trifoliada, cubriendo el período de vulnerabilidad del cultivo; y, por otro lado, que exista compatibilidad entre estos repelentes y el inoculante.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) conocer si los repelentes alcanzan y penetran a los cotiledones y permanecen en los mismos luego de emergida la plántula, y b) evaluar los efectos de los repelentes sobre la sobrevivencia y la capacidad de nodular y de fijar nitrógeno de los rizobios del inoculante.

Materiales y métodos

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Estación Experimental INIA Las Brujas y en el Laboratorio Biológico de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).

Para los estudios se usaron las cepas U-1302 (SEMIA 5019) y U-1301 (SEMIA 587), ambas *Bradyrhizobium elkanii*, que son las recomendadas en los inoculantes comerciales para soja (MGAP, 2009).

Se utilizaron tres repelentes: metiocarb (formulado como Draza® al 50 %), metil antranilato (al 30 % bajo el nombre comercial Rayén®) y antraquinona (dos formulaciones de Avipel® al 50 % y al 95 %). Los productos fueron utilizados en su formulación comercial. Para el metiocarb, se utilizó la dosis recomendada en la etiqueta: 500 g de producto y 500 cc de agua en 100 kg de semillas. Para los repelentes no registrados para este uso, se utilizó una dosis basada en la bibliografía, la cual fue del 1 % (Avery *et al*., 1998; Addy Orduna *et al*., 2010; Werner *et al*., 2011).

Presencia de los repelentes en los cotiledones

El objetivo de esta etapa del trabajo fue conocer si la antraquinona y el metil antranilato poseen la capacidad de alcanzar los cotiledones una vez emergidos estos, así como de mantener su residualidad hasta que comience a aparecer la primera hoja unifoliada. El metiocarb, no fue incorporado en esta etapa debido a que el producto y el uso están registrados para Uruguay.

Se utilizó una partida de semillas de la línea experimental LEO 1823-07 GM 5.7. proporcionada por INIA. Primeramente, se trataron las semillas con inoculante comercial en soporte líquido, según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se seleccionaron tres submuestras de 500 g de semillas. Una de las submuestras fue tratada con metil antranilato, otra con la formulación de antraquinona de mayor concentración de ingrediente activo (95 %), y la tercer submuestra fue control (solo inoculante). Al momento de la siembra se guardaron 200 g de semillas en freezer a -20 °C por tratamiento para la medición de ppm con HPLC Agilent 1200 (Detector de Arreglo de Diodos-DAD Columna Phenomenex Luna C18 250 x 4,6 mm, 5 micras). Para cada tratamiento se sembraron 160 semillas en 16 macetas plásticas de 1 litro con una mezcla de cinco partes de arena y una de turba, a razón de 10 semillas por maceta, instalándose tres repeticiones por tratamiento. Esto permitiría obtener la cantidad de cotiledones mínima necesaria para realizar la detección mediante HPLC antes descripta.

Al observar el primordio de las primeras hojas unifoliadas, cuando los cotiledones se despliegan, se procedió al corte de las plántulas. Las muestras de semillas y de plántulas fueron llevadas al Laboratorio de Residuos de Plaguicidas de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGS SAA, MGAP), para evaluar la cantidad de ingrediente activo de cada repelente presente en los cotiledones al momento de cortarlos. Las muestras fueron analizadas con la técnica de Multiresiduos de Mini Luke (Luke *et al.,* 1981) con un límite de cuantificación de 0,05 ppm.

Compatibilidad de los repelentes con el inoculante

Se estudiaron los efectos de los repelentes sobre la viabilidad de los rizobios y la FBN. En primer término se efectuó el recuento de rizobios sobre la semilla en función del tiempo (sobrevivencia), luego de ser tratadas las semillas con repelente e inoculante. Posteriormente, se evaluó el efecto de los repelentes sobre la nodulación y la FBN. En Uruguay, los inoculantes están formulados en dos soportes diferentes: los líquidos, fabricados a base de caldo de cultivo, que poseen una consistencia acuosa y son los más comunes para nuestro país; y los formulados en soporte turba, que son señalados como los más eficientes en disminuir la muerte de los rizobios posterior a la inoculación (Labandera, 2003). Por ello se utilizaron inoculantes comerciales en ambas formulaciones (turba y líquido), conteniendo las cepas recomendadas oficialmente para soja en Uruguay (MGAP, 2009). Estos fueron utilizados según las recomendaciones del fabricante. Se evaluaron los tres repelentes: metiocarb, metil antranilato y antraquinona, esta última en la formulación menos concentrada (50 %).

El tratamiento de las semillas se realizó en forma secuencial. Primeramente se aplicó el repelente, dejando secar por unos minutos, y luego se procedió a la inoculación (Montero y Sagardoy, 2006). Se utilizó una máquina para el tratamiento de las semillas a escala experimental, con tambor rotativo Rotogard® R150 (Norogard, Suecia). Las semillas fueron almacenadas en el laboratorio, en bolsas plásticas no herméticamente cerradas a temperatura y humedad ambiente.

Recuento de rizobios sobre semillas (sobrevivencia)

Se determinó la sobrevivencia de los rizobios sobre la cubierta de las semillas, a los dos y siete días luego de ser tratadas e inoculadas con los respectivos productos. Se empleó el método de recuento en placas en medio M-79 con rojo Congo (Somasegaran y Hoben, 1994). Se contaron 90 semillas de cada tratamiento y se colocaron en

frascos con 90 ml de solución salina estéril y 360 µl de solución dispersante de Tween 80 (2,5 % p/v). Cada frasco se colocó durante 15 minutos en agitador de golpes y se extrajo 1 ml (el cual contendría la carga bacteriana de una semilla). Se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar el orden de 10^{-6}. En la elaboración de las placas se fundió medio M-79 con rojo Congo, luego fue distribuido en placas de Petri de 8,5 cm, dejándolo solidificar. Posteriormente, se agregó a cada placa 100 µl de las diluciones más altas, que fueron extendidos sobre la superficie con espátula de Drygalski. Las placas se colocaron invertidas en estufa a 28 °C ± 2 por siete días. Finalizado el período de incubación se contabilizaron aquellas diluciones que presentaron entre 25 y 250 colonias (Sutton, 2011) verificando la proporcionalidad entre diluciones y promediando los resultados. Posteriormente se calculó la carga bacteriana presente en cada semilla como:

Número de células vivas = (Número colonias en placa x inverso factor de dilución)/0,1.

Los resultados se expresaron como número de rizobios viables por semilla. Se aplicó estadística descriptiva calculando los promedios y errores estándar por tratamiento y se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para comparar la interacción tratamiento *vs*. tiempo. En los casos en que se detectaron diferencias significativas se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se trabajó con una confianza del 95 % para todos los casos ($\alpha \leq 0,05$). Se utilizó el paquete estadístico R versión 2.15.2.

Efectos sobre la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno

Para evaluar el efecto del tiempo de contacto del repelente con el inoculante sobre la nodulación y la FBN, se sembraron las semillas tratadas en el ítem anterior. Un primer experimento se sembró a los dos días de tratadas y el segundo a los siete días. Ambos experimentos fueron iguales, con los mismos tratamientos y repeticiones. Cada tratamiento resulta de la combinación de un repelente con cada formulación de inoculante (soportes turba y líquido), generando así dos tratamientos por repelente. Se sembraron dos controles positivos con semillas inoculadas con ambos soportes del inoculante pero sin repelente. La siembra se realizó en macetas plásticas de 1 l con una mezcla de cinco partes de arena y una de turba. Las macetas y sustratos fueron previamente esterilizados. Se sembraron cuatro semillas por maceta. Luego de la emergencia de la primera hoja trifoliada, fueron raleadas a dos. Se colocaron en invernáculo para evaluar los parámetros de nodulación y parte aérea de la planta con condiciones de luz y fotoperiodo natural. Se regaron las plantas con solución nutritiva (sin N) y agua destilada. El diseño fue en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Se midieron las siguientes variables:

1) Número y masa seca de nódulos: al inicio de la fase reproductiva (R1- Fehr *et al*., 1971), se extrajeron las plantas de las macetas y se lavaron las raíces. Se contabilizó el número de nódulos por maceta, se colocaron en cajas de Petri y se llevaron a estufa a temperatura constante 60 °C por siete días. Posteriormente fueron pesados en balanza de precisión (0,0001 g).

2) Peso seco de la parte aérea: al momento de procesar las plantas se cortó su parte aérea, fue colocada en sobres de papel (un sobre conteniendo la parte aérea de una maceta) y llevada a estufa a 60 °C durante siete días. Culminado este período el contenido de cada sobre fue pesado en balanza de precisión (0,01 g).

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA del número de nódulos, peso seco de los mismos y peso seco de la parte aérea, por maceta, a los dos y siete días. Asimismo, se evaluó si existe una interacción de los tratamientos en el tiempo. En los casos en que se detectaron diferencias significativas se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se trabajó con una confianza del 95 % para todos los casos ($\alpha \leq 0,05$). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el peso seco de la parte aérea y los parámetros de nodulación, ya que el peso seco de la planta es una medida indirecta de la FBN ($\alpha \leq 0,05$). Los análisis estadísticos en esta etapa se realizaron con el paquete estadístico R versión 2.15.2.

Resultados

Presencia de los repelentes en los cotiledones

Para el metil antranilato, se detectaron 1818,8 ppm de este ingrediente activo en la muestra de semillas, recuperándose en cotiledones 4,5 (±1,1) ppm en promedio. Para la antraquinona, en cambio, las semillas contenían 370,1 ppm, y en los cotiledones se recuperaron 199,8 (± 25,2) ppm. En este último caso los residuos que permanecen en los cotiledones superan la mitad de los detectados en las semillas.

Compatibilidad de los repelentes con el inoculante

Recuento de rizobios sobre semillas

No se obtuvieron rizobios viables para metiocarb ni antraquinona en ambos soportes (líquido y turba) para los tiempos estudiados. En cambio, para el metil antranilato sí se registró sobrevivencia sobre la cubierta de la semilla- con inoculante soporte turba (Figura 1).

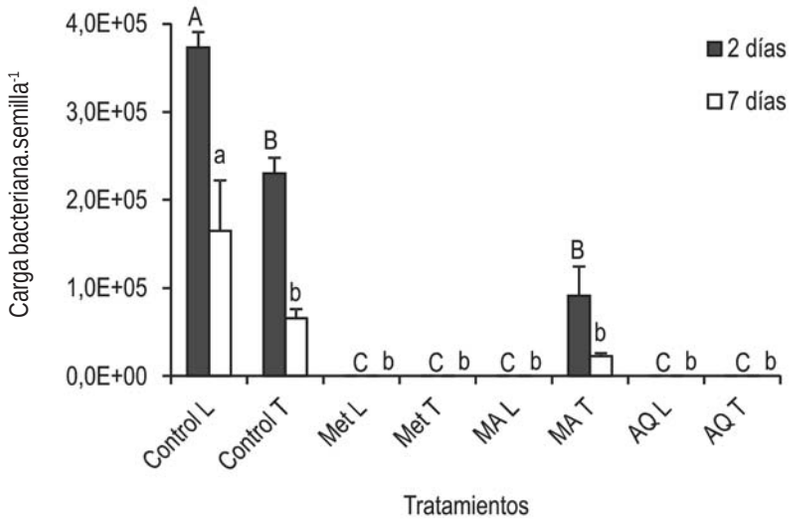

Figura 1. Recuentos de rizobios viables por semilla de soja (*Glycine max*) a los dos y siete días posterior a la aplicación de los productos. Se observa de izquierda a derecha Control L y Control T hacen referencia a Control con inoculante líquido y Control con inoculante turba respectivamente. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona. Para todos los tratamientos n = 3. Las letras indican comparaciones estadísticas dentro de la misma siembra (Tukey 95 % de confianza). Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los dos días y minúsculas de la siembra a los siete días.

Se observó una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$; $f = 92,4$) y en la interacción tratamiento por tiempo ($p < 0,05$; $f = 6,6$), por lo tanto se analizó cada tiempo por separado (Figura 1), ya que esto implica que los distintos productos evaluados variaron diferencialmente en el tiempo. La prueba de Tukey señala que la sobrevivencia de rizobios registrada para el metil antranilato en soporte turba no fue significativamente diferente a la del control a los dos días de inoculadas las semillas ($p > 0,05$; diferencia = 2,15), ni a los siete días ($p > 0,05$; diferencia = 4,3).

Efectos sobre la nodulación y la FBN

Para la variable número de nódulos (Figura 2) se observan tres grupos bien marcados a los dos días: un primer grupo con el metil antranilato en soporte turba, siendo este el que tiene significativamente el mayor número de nódulos, un segundo grupo en que incluimos los controles y la antraquinona también utilizada con soporte turba, y un tercer grupo con todos los demás tratamientos. A los siete días, podemos observar que el metil antranilato utilizado con inoculante en soporte turba es el único tratamiento que no difiere estadísticamente de los controles. Se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($f = 33,2$; $p < 0,05$), así como en la interacción tratamiento por tiempo ($f = 7,2$; $p < 0,05$).

Al analizar el peso seco de los nódulos (Figura 3), el metil antranilato, la antraquinona y el control, todos con soporte turba, son los tratamientos que poseen los valores más altos, y se alejan estadísticamente del resto de los tratamientos.

Para esta variable, se encontraron diferencias entre los tratamientos ($f = 20,4$; $p < 0,05$), así como en la interacción tratamiento por tiempo ($f = 4,0$; $p < 0,05$).

En relación al peso seco de la parte aérea de la planta (Figura 4), se registraron diferencias entre los distintos tratamientos y los controles del experimento ($f = 34,9$; $p < 0,05$), así como en la interacción tratamiento por tiempo ($f = 2,0$; $p < 0,05$).

La prueba de Tukey mostró una disminución significativa del peso de la parte aérea de la planta para todos los repelentes con la excepción del metil antranilato utilizado con turba ($p > 0,05$; diferencia: 0,59 para los dos días; $p > 0,05$; diferencia: 1,73 para los siete días).

Al correlacionar esta última variable analizada con los parámetros de nodulación (número y peso seco) (Figura 5), se obtiene que ambas correlaciones resultaron significativas ($f = 147$; $p < 0,05$, para número de nódulos y $f = 186$; $p < 0,05$ para peso seco de nódulos). Cabe destacar que con el peso de los nódulos se obtiene un mayor R^2.

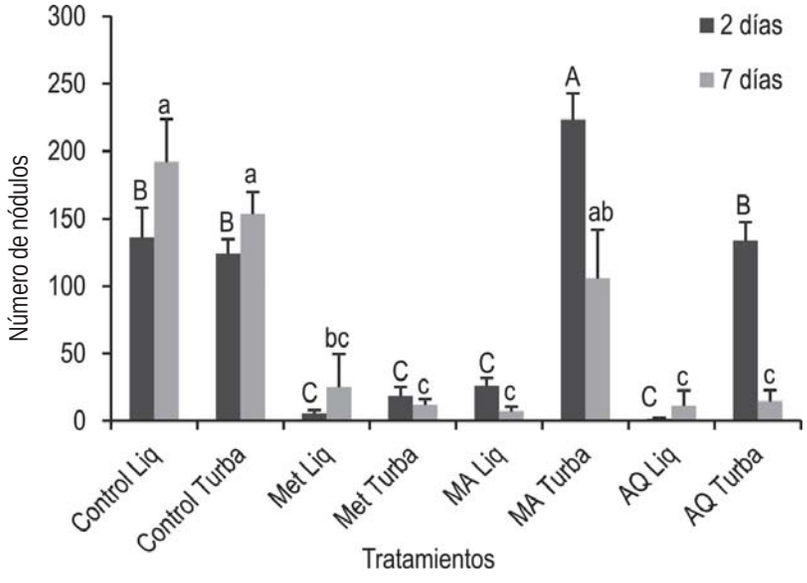

Figura 2. Número promedio de nódulos en soja (*Glycine max*) (n = 4) por maceta en invernáculo, con sus respectivos errores estándar. Se muestras dichos resultados a los dos días y a los siete días posterior a la inoculación. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona. Liq: inoculante líquido. Las letras indican comparaciones estadísticas dentro de la misma siembra (Tukey 95 % de confianza). Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los dos días y minúsculas de la siembra a los siete días.

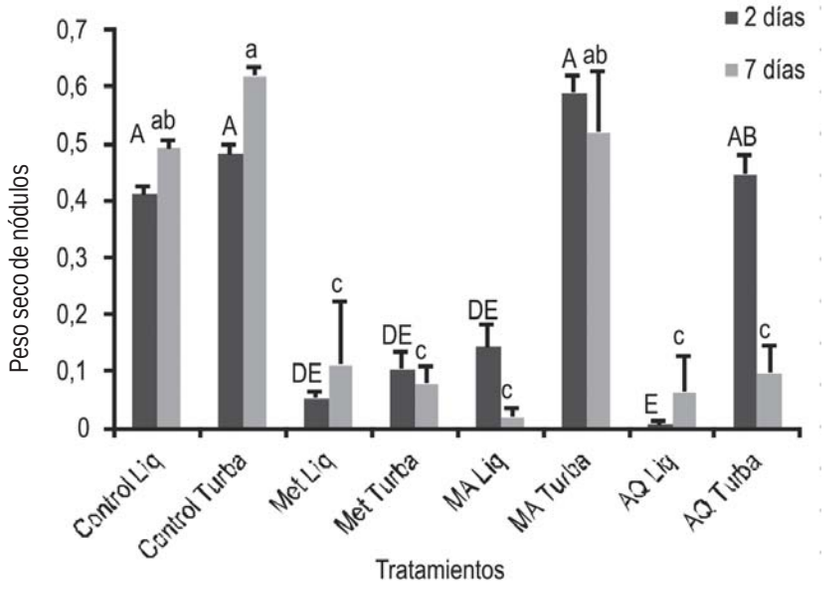

Figura 3. Peso seco promedio de nódulos en soja (*Glycine max*) (n = 4) por maceta en invernáculo, con sus respectivos errores estándar. Se muestras dichos resultados a los dos días y a los siete días posterior a la inoculación. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona. Liq: hacer referencia al inoculante líquido. Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los dos días y minúsculas de la siembra a los siete días.

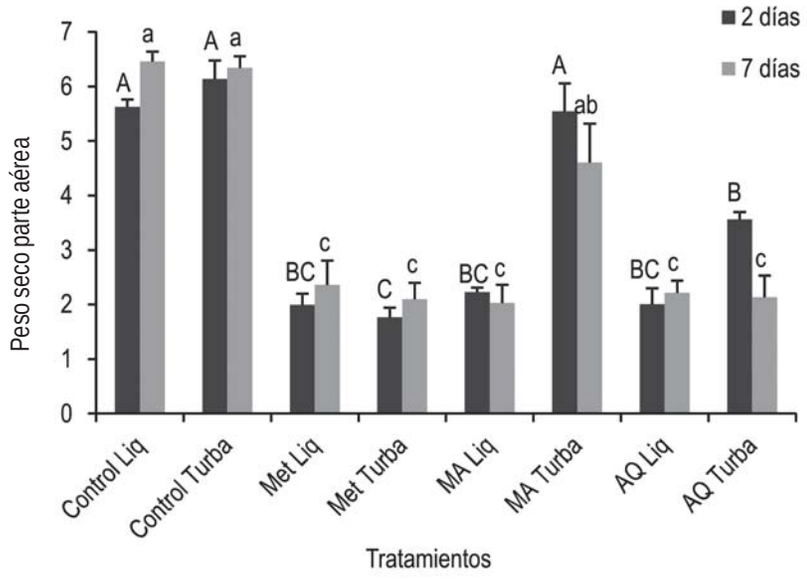

Figura 4. Peso seco promedio de la parte aérea de la planta en soja (*Glycine max*) (n = 4) por maceta en invernáculo, a los dos y siete días posterior a la inoculación. Met: metiocarb; MA: metil antranilato; AQ: antraquinona. Liq: inoculante líquido. Letras mayúsculas comparaciones de la siembra a los dos días y minúsculas de la siembra a los siete días. (Tukey 95 % de confianza).

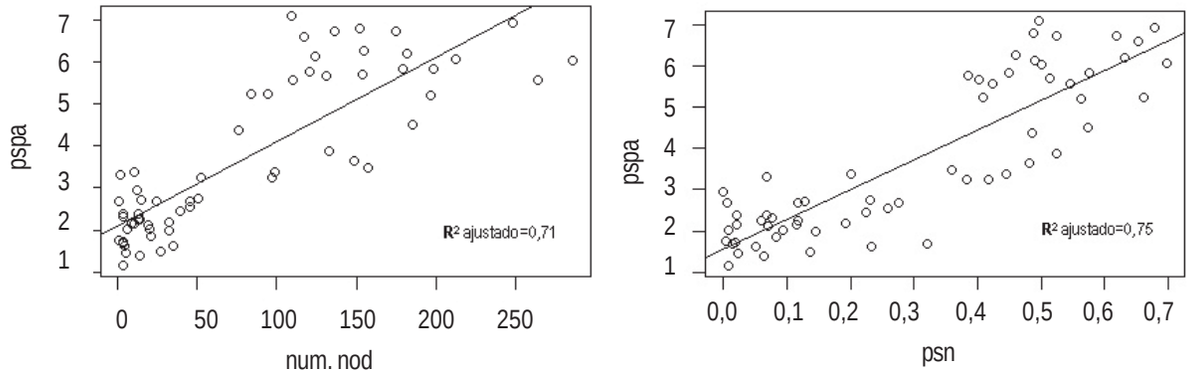

Figura 5. Correlaciones entre el peso seco de la parte aérea de plantas de soja (*Glycine max*): número de nódulos arriba y peso seco de nódulos abajo (n = 4). Num.nod: número de nodulos; psn: peso seco de nódulos; pspa: peso seco parte aérea.

Discusión

Este trabajo realiza una contribución al desarrollo de repelentes para aves que puedan ser aplicados sobre las semillas. Esta tecnología requiere, por un lado, que los repelentes estén presentes en los cotiledones y, por otro, que sean compatibles con los rizobios del inoculante. Se observaron diferencias en la presencia de los repelentes en los cotiledones debidas a diferencias en la absorción de los distintos ingredientes activos. La semilla de soja es muy higroscópica, por lo que tiende a absorber agua fácilmente, fundamentalmente a través del micrópilo (Bewley y Black, 1978), y con ella ingresaría el ingrediente activo del repelente disuelto. Consecuentemente, cuanto más soluble en agua sea el compuesto, mayor facilidad tendrá de entrar. La antraquinona es un polvo mojable, cuyo caldo tomó una consistencia líquida. En cambio, el metil antranilato es viscoso, lo cual podría enlentecer su flujo. Si bien no se

encontró evidencia de incompatibilidad con el tamaño de la molécula o diferencias de cargas que impidieran el ingreso de metil antranilato a la semilla, sería necesario realizar estudios de absorción para dilucidar este aspecto. En el mismo sentido, convendría evaluar la utilización de distintos solventes que permitieran el mejor flujo del metil antranilato y facilitaran la permanencia del ingrediente activo en los cotiledones. Para este repelente, no se encontraron antecedentes de concentraciones en cotiledones que lograran una repelencia efectiva. Se subraya que, para antraquinona, se detectó una presencia del producto en los cotiledones que supera la dosis requerida para obtener repelencia sugerida por Olivera y Rodríguez (2014). En el referido trabajo, se mencionan valores en los cotiledones tratados con antraquinona mediante asperjado foliar que oscilaban entre 27,7 y 40,8 ppm. Para metil antranilato no se encontraron antecedentes de concentraciones en cotiledones que indicaran una repelencia efectiva. El metiocarb no fue sometido a estas pruebas de residuos por las razones anteriormente mencionadas. No se encontró bibliografía que realizara este tipo de experimentos, ni de compatibilidad con el inoculante.

Respecto a la compatibilidad de los repelentes evaluados con los rizobios del inoculante, la recuperación de rizobios viables en las semillas tratadas disminuyó con el tiempo y fue variable entre productos y soportes de inoculantes utilizados, como también demostraron Revellin *et al*. (1993). Únicamente con el metil antranilato se logró una sobrevivencia de rizobios aceptable y se dio cuando el producto fue utilizado con inoculante en base turba.

Para las variables de nodulación medidas se observa que, con el inoculante en soporte turba, se mitigan los efectos negativos que estos repelentes producen sobre los rizobios. Labandera (2003) afirma que la turba, en comparación con formulaciones líquidas, brinda una mayor protección a los rizobios frente a los factores adversos del suelo, como altas temperaturas, deshidratación y biocidas sobre las semillas.

Al analizar en conjunto las variables medidas, se aprecia una coherencia entre resultados. En los recuentos, se registraron valores iguales o superiores al orden de 10^4 en los controles y en el metil antranilato utilizado con inoculante en soporte turba, no presentando diferencias significativas entre ellos. Cuando analizamos los parámetros de nodulación y el peso seco de la parte aérea se obtuvieron, con este repelente, valores similares o superiores estadísticamente al control. Por lo tanto, podemos afirmar que una mayor carga de bacterias en la semilla implicó una mejor nodulación, con nódulos más grandes y en mayor cantidad y un mejor desarrollo del follaje. Según Zilli *et al*. (2009) esto redundaría en un mayor rendimiento del grano.

Cabe mencionar que se registró presencia de nódulos en el control negativo sin inoculante. Esto indicaría una contaminación en el momento de la siembra o almacenado. Sin embargo, la nodulación registrada fue baja y presente en las raíces secundarias. Además, estas plantas presentaban sus hojas amarillentas y eran de menor tamaño comparadas con las del control, lo que indicaría que sus nódulos no resultaron efectivos en la FBN. No se dispone de bibliografía sobre la interacción entre repelentes para aves y rizobios en relación a los parámetros de nodulación. Sin embargo, en referencia a este aspecto, hay una mención en la etiqueta de Draza® (metiocarb), donde se recomienda que luego de inoculada la semilla no se espere más de dos días para su siembra (http://www.agromil.com.uy/productos-bayer-draza.html), sin mencionarse trabajos científicos que respalden esta recomendación.

El metil antranilato sería un buen candidato por su compatibilidad con el inoculante en base a turba, sin embargo, hay una baja presencia del producto en los cotiledones. Sería necesario profundizar e investigar posibles ajustes en la formulación para facilitar la entrada del producto a la semilla mediante modificaciones de la viscosidad o los coadyuvantes.

Para la antraquinona, existe una disminución significativa de los parámetros de nodulación a excepción de su utilización con inoculante turba solo a los dos días de tratadas las semillas. Para este principio activo se sugiere investigar en mejorar su compatibilidad con los rizobios mediante el uso de bioprotectores u otros coadyuvantes. En relación a la permanencia en los cotiledones, se detectaron concentraciones satisfactorias desde el punto de vista del efecto repelente.

Para el metiocarb, se observa un efecto negativo significativo sobre la nodulación. Como se mencionó anteriormente, en su etiqueta (AgroMil, 2016) se recomienda realizar el tratamiento y luego sembrar antes de cumplidos los dos días posteriores al tratamiento. No obstante, su inocuidad con los rizobios en este tiempo debería ser verificada. Resta por realizar más investigaciones en la optimización de su uso. Por ejemplo, disminuir la dosis recomendada, o probar la eficacia de sembrar a distintas proporciones de semillas tratadas con otras sin tratar. Todo ello dirigido a minimizar su toxicidad sobre los rizobios y el ambiente.

Conclusiones

Este trabajo aporta información sobre la compatibilidad de tres repelentes con los rizobios del inoculante, así como

la presencia de dos de ellos en los cotiledones. Resta por estudiar cómo sucede esta interacción en condiciones de campo. Trabajos futuros deberían enfocarse en mejorar y adaptar estas nuevas sustancias repelentes. Tanto el metil antranilato como la antraquinona son sustancias no tóxicas para el ambiente (categoría IV) y efectivas en disminuir el daño de aves (Addy Orduna y Canavelli, 2010; Olivera y Rodríguez, 2014). Asimismo, el metiocarb, con un uso optimizado, podría ser de utilidad. De esta manera, al incorporar estos repelentes al mercado, se contaría con una medida eficiente de protección del cultivo de soja, más inocua para el ambiente que algunas de las medidas actuales y para los rizobios del inoculante.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Laboratorio de Microbiología de Suelos INIA Las Brujas, Laboratorios Biológicos DGSSAA (MGAP) y a ANII por financiar la beca de posgrado de Lourdes Olivera. Además agradecen al Ing. Agr. Pablo González por su colaboración en los análisis estadísticos.

Bibliografía

Addy Orduna L, Canavelli S, Benzaquin M, Zaccagnini M.E. 2010. Repelencia de antranilato de metilo en granos de girasol para paloma mediana (*Zenaida auriculata*). En: Agricultura Sustentable 2010 : Actualización Técnica : Proyecto Regional Agrícola - 630021. Paraná : Estación Experimental Agropecuaria Paraná. (Serie Extensión ; nº 58). pp. 66 - 70.

Addy Orduna L, Canavelli S. 2010. Químicos para el manejo del daño por aves en cultivos. Paraná : Estación Experimental Agropecuaria INTA Paraná. 78p. (Serie Técnica ; N° 58).

AgroMil. 2016. Draza : Insecticida [En línea]. Consultado 17 agosto 2016. Disponible en http://www.agromil.com.uy/productos-bayer-draza.html.

Avery ML, Humphrey J, Primus T, Decker DG, McGrane A. 1998. Anthraquinone protects rice seed from birds. *Crop Protection,* 17(3): 225 - 230.

Ayansina AD, Oso BA. 2006. Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. *African Journal Biotechnology*, 5: 129 - 132.

Bewley JD, Black M. 1978. The structure of seeds and their food reserves. En: Bewley JD, Black M. [Eds.]. Physiology and Biochemistry of seeds. Vol 1. Berlin : Springer-Verlag. pp. 7 - 37.

Calvi C, Besser JF, De Geazio JW, Mott DF. 1976. Protecting Uruguayan Crops from bird damage with methiocarb and 4-aminopyridine. En: Proceedings 7th Bird Control Seminar; 30 octubre – 1 noviembre, 1979; Bowling Green, Ohio. Bowling Green State University. pp. 255 - 258.

Campo RJ, Hungria M. 2000. Compatibilidad de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja. Londrina : Embrapa Soja. 32p. (Circular Técnica ; n° 26).

Canavelli S. 2010. Consideraciones de manejo para disminuir los daños por aves en girasol. En: Información técnica de cultivos de verano : Campaña 2010. Rafaela : INTA. (Miscelánea ; 118). pp. 175 - 190.

Centeno J. 1999. Study on the Blackbird, *Agelaius ruficapillus Vieillot*, in the rice production areas of southern Rio Grande do Sul, Brazil : basis for a population control management program [Tesis Doctorado]. Wageningen : Landbouw Universiteit Wageningen. 116p.

Clark L. 1998. Physiological, ecological and evolutionary bases for the avoidance of chemical irritants by birds. *Current ornithology,* 14: 1 - 37.

Contreras AJ, Tejera AG, García JA. 2003. Las aves como plaga, control y manejo. *Ciencia UANL*, 6(1): 93 - 98.

Fehr W, Caviness C, Burmood D, Pennington J. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11: 929 - 931.

González, M. 2013. Efecto del tratamiento de semilla de soja (Glycine max L. Merr.) con agroquímicos en la sobrevivencia de *Bradyrhizobium* spp. y en la nodulación [Tesis de grado]. Montevideo : Facultad de Ciencias. Universidad de la República. 48p.

Hungria M, Franchini JC, Campo RJ, Graham PH. 2009. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. En: Werner D, Newton WE. [Eds.]. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Dordrecht : Springer. pp. 25 - 42.

Kyei-Boahen S, Slinkard AE, Walley FL. 2001. Rhizobial survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 585 - 589.

Labandera C. 2003. Soja : Inoculantes e inoculación. *Revista del Plan Agropecuario*, 107: 53 - 54.

Luke MA, Frodberg JE, Doose GM, Mosumoto HT. 1981. Improved multiresidue chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 64: 1187 - 1195.

Lupwayi NZ, Olsen PE, Sande ES. 2000. Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65: 259 - 270.

Martensson AM. 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biology y Biochemistry*, 24(5): 435 - 445.

MGAP. 2009. Colección nacional de cepas de rizobios [En línea]. Consultado 26 de febrero de 2014. Disponible: http://www.cebra.com.uy/renare/media/Coleccion-de-Rhizobium-CATALOGO.FINAL-2009.doc.

Montero F, Sagardoy M. 2006. Uso de un protector Bacteriano sobre la nodulación de plantas de soja [En línea]. Consultado 16 agosto 2016. Disponible en: http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/foros/articulo-uso-protector-bacteriano-t10331/415-p0.htm.

Mubeen F, Shiekh MA, Iqbal T, Khan QM, Malik KA, Hafeez FY. 2006. In vitro investigations to explore the toxicity of fungicides for plant growth promoting rhizobacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 38: 1261 - 1269.

Olivera L, Rodríguez E. 2014. Aumentando rendimiento cultivos extensivos disminuyendo daño de aves. Montevideo: INIA. 47p. (Serie FPTA-INIA ; 56).

Peoples MB, Craswell ET. 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations, and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, 141: 13 - 39.

Revellin C, Leterme P, Catroux P. 1993. Effect of some fungicide seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean [*Glycine max.* (L) Merr.]. *Biology and Fertility of Soils*, 16: 211 - 214.

Rodríguez E, Tiscornia G, Olivera L. 2011. Disminución del daño por aves en pequeños predios. Montevideo : INIA. 64p. (Serie FPTA-INIA ; 29).

Rodríguez E. 1994. An Integrated Strategy to decrease Eared Dove damage in Sunflowers [Tesis de doctorado]. Fort Collins : Colorado State University. 92p.

Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for Rhizobia : Methods in Legume-Rhizobium technology. NewYork : Springer-Verlag. 450p.

Sutton S. 2011. Accuracy of plates counts. *Journal of Validation Technology*, 17(3): 42 - 46.

Tracey JP, Saunders GR. 2010. A technique to estimate bird damage in wine grapes. *Crop Protection*, 29: 435 - 439.

Werner S, Linz G, Carlson J, Pettit S, Tupper S, Santer M. 2011. Anthraquinone-based bird repellent for sunflower crops. *Applied Animal Behaviour Science*, 129: 162 -169.

Zilli JE, Ribeiro KG, Campo RJ, Hungria M. 2009. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33: 917 - 923.