

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

“Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN EN SOJA  
CON *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* BAJO DISTINTAS DOSIS**

**LUIS ALBERTO REPEZZA  
D.N.I 26.855.388**

**DIRECTORA: DRA. CARMEN OLMEDO**

**Río Cuarto - Córdoba  
Noviembre 2009**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**



**CERTIFICADO DE APROBACIÓN**

**Evaluación del Efecto de la Inoculación en Soja con *Bradyrhizobium japonicum* Bajo Distintas Dosis**

**Tesista: Luis Repezza – D.N.I: 26.855.388**

**Directora: Dra. Carmen Olmedo**

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Jurado Evaluador:

MSc Ing. Agr. Susana Viale .....

Dr. Javier Andrés .....

Dra. Carmen Olmedo .....

Fecha de presentación: ..../...../.....

Aprobado por Secretaría Académica: ...../...../.....

.....

**Secretario Académico**

## INDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
1. Características y requerimientos del cultivo de soja.....	4
1.1 Etapas fenológicas del cultivo de soja.....	5
1.1.1 Etapa vegetativa.....	5
1.1.2 Etapa reproductiva.....	7
1.2 Requerimientos nutricionales del cultivo de soja. El Nitrógeno y la FBN.....	8
1.3 Método del nitrógeno mineral.....	9
2. Inoculación en soja.....	10
3. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	12
Objetivos.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos.....	12
Hipótesis.....	12
Materiales y Métodos.....	13
1. Evaluaciones.....	15
Resultados y Discusión.....	17
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	25
Anexos.....	28

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Formato de planilla para recolección de datos.....	16
---	----

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Grafico 1.</b> Modelo de unidad experimental utilizado.....	14
<b>Grafico 2.</b> Valores decádicos de temperatura media del aire y precipitaciones durante el período Octubre 2004 – Mayo 2005 en el campo experimental de UNRC.....	17
<b>Grafico 3.</b> Número de nódulos en raíz principal.....	18
<b>Grafico 4.</b> Número de nódulos en raíz lateral.....	19
<b>Grafico 5.</b> Número de nódulos totales.....	20
<b>Grafico 6.</b> Peso seco de nódulos según tratamiento aplicado.....	21
<b>Grafico 7.</b> Peso seco de biomasa aérea en gramos según cada tratamiento aplicado.....	21
<b>Grafico 8.</b> Peso seco de raíz en gramos según cada tratamiento aplicado.....	22
<b>Grafico 9.</b> Rendimiento de la planta según cada tratamiento aplicado.....	23

## RESUMEN

El proceso de inoculación de la soja es una práctica que permite optimizar la nutrición del cultivo, mediante la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN). Este mecanismo natural incorpora  $N_2$  atmosférico a la planta y es a la vez una herramienta muy útil que permite disminuir la extracción de este nutriente del suelo. El nitrógeno (N) es el elemento más requerido por todos los cultivos. Deficiencias de este nutriente se manifiestan a través de una reducción de la superficie foliar y del crecimiento de la planta en general desde las primeras etapas del ciclo. La soja, un cultivo proteico por excelencia, necesita acumular grandes cantidades de N para su normal crecimiento. Para cubrir esas demandas, además de absorber N del suelo, realiza la de FBN a partir de la asociación con bacterias del suelo de la familia de las Rhizobiáceas, en este caso *Bradyrhizobium japonicum*. La práctica más recomendable para lograr que la FBN sea una fuente importante de N para el cultivo, es la inoculación de la semilla con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* incorporadas por medio de inoculantes de alta calidad y en distintas formulaciones. El objetivo de esta experiencia fue determinar las nodulaciones radicales y el crecimiento de las plantas de soja cuando sus semillas fueron inoculadas con distintas dosis y formulaciones de *Bradyrhizobium japonicum* y su influencia en el rendimiento y sus componentes. El presente trabajo, se desarrolló en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), Córdoba. Se utilizó un diseño factorial de bloques aleatorizados con tres repeticiones, en donde cada bloque fue una réplica completa del experimento y los grupos dentro de cada bloque se formaron al azar. La unidad experimental consistió en 4 surcos de 6 m de largo y 52 cm entre hileras. Los resultados indicaron que el empleo de diferentes dosis de inoculante con *Bradyrhizobium japonicum* no aumentó el número de nódulos en raíz principal y que las diferentes dosis de inoculante produjeron un aumento significativo en la cantidad de nódulos en raíz lateral con respecto al testigo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la cantidad de nódulos totales en los tratamientos de inoculación pero si entre ellos y el testigo. El peso seco de los nódulos totales fue significativamente diferente en el tratamiento número 5 con respecto al resto de los tratamientos y al testigo.

**Palabras claves:** inoculación - *Bradyrhizobium japonicum* – soja – Fijación Biológica del Nitrógeno – Nitró

## ABSTRACT

Soybean inoculation process is a very known practice that allows optimizing nutrition of the culture by Biological Nitrogen Fixation (BNF). This one, is a natural mechanism that it incorporates N from the soil to the plant, therefore, is a useful tool to decrease this nutrient extraction from the soil. Nitrogen (N) is required by crops in large quantities. Deficiencies of this nutrient are seen through a reduction of the leaf area and plant growth since first stages of the cycle. Soybean crops, needs to accumulate large amounts of N for his normal growth. To reach these demands, in addition to absorb N of the soil, BNF is use from the association with soil bacteria of the family Rhizobiáceas, *Bradyrhizobium japonicum*. The most recommended practice to ensure BNF like an important source of N for crop is seed inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants built by high quality and in different formulations. The aim of this experiment was to determine root nodules and growth of soybean plants when seeds were inoculated with different doses and formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and its influence on yield and its components. This work was developed at the experimental field of Agronomy and Veterinary Faculty of Rio Cuarto State University (UNRC), Córdoba. We used a factorial randomized block design with three replications, where each block was a full replica of the experiment and the groups within each block were formed at random. The experimental unit consisted of 4 rows of 6 m long and 52 cm between rows. The results indicated that the use of different doses of inoculant with *Bradyrhizobium japonicum* did not increase the number of nodules on the taproot and different doses of inoculum produced a significant increase in the amount of lateral root nodules compared with the control. However, no significant differences in the amount of total nodule inoculation treatments but between them and the witness. The dry weight of nodules was significantly different in total treatment number 5 for the rest of the treatments and the control.

**Key words:** seed inoculation - *Bradyrhizobium japonicum* - soybean - Biological Nitrogen Fixation - mineral Nitrogen.



## INTRODUCCION

Cuando a fines de la década del 50 se comenzaron a realizar las primeras experiencias con soja en la Argentina, nada hacía preveer el crecimiento exponencial que tendría el cultivo pocos años más tarde.

Fue durante la década del 70 que el cultivo se estableció como una verdadera alternativa de producción comenzando a utilizarse en espacios anteriormente sembrados con sorgo, girasol o maíz, y más tarde, expandiendo la frontera agrícola a lugares donde sólo se realizaba ganadería, muchas veces en forma precaria.

Al incorporar el cultivo de una especie capaz de fijar Nitrógeno ( $N_2$ ) del aire se iniciaba una era revolucionaria en la agricultura argentina. Se discutía en su momento alternativas que iban desde una soja visualizada como fuente de “recuperación” de fertilidad de suelos hasta posiciones antagónicas.

Durante este largo período, muchos y muy profundos cambios, se han incorporado a la producción de la soja. La explosión tecnológica de la mano de los enormes avances en genética, la tecnología RR (Resistencia al glifosato), la siembra directa y los conocimientos en materia de nutrición vegetal y de suelos, hacen que el cultivo actual tenga poco que ver con aquel sembrado con entusiasmo en las etapas iniciales.

Se comenzó sembrando en suelos bien rotados, bien provistos de nutrientes y con adecuados tenores de materia orgánica; hoy muchas de estas condiciones han cambiado y se escuchan con insistencia algunas críticas al “modelo” que se sustentan en el temor a la expansión de la siembra de soja más allá de lo conveniente poniendo en riesgo la sustentabilidad del sistema.

El nitrógeno mineral (Nm) es de importancia agronómica por ser uno de los elementos más requeridos por las plantas y su disponibilidad condiciona en gran medida la productividad de los cultivos. Es indispensable para el crecimiento de todo organismo vivo.

Este elemento forma parte de la clorofila e interviene en su síntesis, por lo que está involucrado en la fotosíntesis (captación y eficiencia de la radiación). Sin Nm y clorofila, el cultivo no utilizará la luz del sol como fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones esenciales para la planta como la absorción de nutrientes.

Mejoras en la disponibilidad de Nm no solo permiten el logro de altos rendimientos sino también de mayores concentraciones de proteínas en los forrajes y granos producidos.

La práctica biotecnológica de la inoculación ha abierto nuevos horizontes en cuanto a la aplicación de microorganismos que favorecen la promoción del crecimiento de las plantas. Inocular es incorporar en la rizosfera (con la semilla u otro método) bacterias seleccionadas, en alta concentración, capaces de formar simbiosis con la leguminosa cultivada (Fernández Canigia, 2003).

La terminología “inoculación de leguminosas” es comúnmente empleada para describir la aplicación de cepas de rizobio (usualmente *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* o *Mesorhizobium*) a las semillas o al medio empleado para el crecimiento de las plantas.

La palabra “inoculación” es empleada para describir el proceso que culmina con la asociación simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias capaces de fijar N<sub>2</sub> atmosférico. La nodulación es la aparición de estructuras en la raíz de la planta conteniendo los rizobios como resultado de una inoculación.

El proceso de inoculación es una práctica muy empleada cuando un cultivo crece por primera vez en un determinado suelo, incluso varios años de inoculación pueden ser necesarios antes de que una población naturalizada de rizobios pueda establecerse en el suelo (Peterson y Loynachan, 1981).

Autores como Vincent (1970) y Date (1976), presentan la metodología básica para los ensayos en la que se determina la necesidad de inoculación. La misma incluye los siguientes pasos:

- Realizar análisis de suelo a fin de determinar la cantidad y disponibilidad de nutrientes para el cultivo.
- Aplicar junto a la inoculación un fertilizante nitrogenado, a fin de asegurar que el Nitrógeno no sea nutriente limitante.
- Asegurar que la especie a ensayar u otro cultivo de leguminosa pueda crecer en el suelo a emplear.
- Aplicar fertilizantes (excepto Nitrógeno) a fin de compensar la limitación de algún nutriente, como el Fósforo, Azufre, Molibdeno, entre otros.
- Determinar el número de rizobio específico en el suelo antes de la siembra de una leguminosa determinada.

La producción de cultivos de leguminosas suceden satisfactoriamente cuando la mejor combinación leguminosa – rizobio está creciendo bajo manejo intensivo y correcto. No obstante, algunas complicaciones pueden tener lugar y un problema serio es la presencia en el suelo de cepas (corrientemente denominadas nativas) altamente competitivas e infectivas, capaces de nodular a la planta pero con una capacidad de fijación de N<sub>2</sub> (eficiencia) pobre o nula.

Otro problema es obtener una buena nodulación en condiciones ambientales

adversas siendo las más comunes un exceso o deficiencia de humedad en el suelo.

De tal manera, la elección de la mejor combinación planta – bacteria para un área determinada, la selección de cepas de rizobio efectivas en la fijación de N<sub>2</sub> y capaces de vencer en la competencia a las nativas, y la posibilidad de poder establecer simbiosis en condiciones ambientales adversas (estresantes), constituyen metas de un programa que contemple la selección de los mejores microorganismos que beneficien a la agricultura y conserven el medio ambiente.

Un sustento importante para estos estudios es el creciente conocimiento del proceso de la asociación simbiótica en sus aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. Se destacan en particular los notables hallazgos sobre las tempranas interacciones genético – molecular con intercambios de señales que conducen a ambos simbioses a la infección de la raíz e iniciación del nódulo, y determinan su selectividad simbiótica (Long, 1989; Denarie y Cullimore, 1993; Van Rhijn y Vanderleyden, 1995).

El propósito del presente proyecto fue determinar el número y el peso de las nodulaciones radicales de la planta de soja, y su biomasa radical y aérea, cuando sus semillas fueron inoculadas con distintas dosis y formulaciones de *Bradyrhizobium japonicum*.

## ANTECEDENTES

Los cultivos poseen requerimientos específicos y concretos que deben ser satisfechos cuando el objetivo perseguido es la búsqueda de altos rendimientos. Entre los principales requisitos figuran la radiación, agua, y nutrición. Para el caso de la soja, lo que se pretende es desarrollar un cultivo con óptimo estado de floración que intercepte toda la radiación incidente de manera eficiente, y maximizar la tasa de acumulación de materia seca durante el período de llenado de granos (García, 2000).

Para Kantolic (2004), el conocimiento y la comprensión de los principales procesos que regulan la generación del rendimiento de soja, conforma la base fundamental y el primer paso para la planificación racional del manejo del cultivo. La adopción del tipo de tecnología empleada y el análisis de sus respuestas deben sustentarse en las características funcionales del cultivo.

El rendimiento que un cultivo alcance, en este caso la soja, es resultado de la interacción que cada variedad tiene con el ambiente en el que se desarrolla y crece.

### 1. CARACTERÍSTICAS Y REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO DE SOJA

La soja (*Glycine max*) es una especie de la familia de las leguminosas, que se cultiva por el alto contenido que sus semillas poseen en aceites y proteínas. Es una especie originaria de China que se comercializa en todo el mundo debido a su importancia en la alimentación humana y animal; siendo Argentina, junto con Brasil, China y Estados Unidos los países que concentran el 95 % de su producción mundial (Díaz Zorita y Duarte, 2004).

Considerado un cultivo nitrógeno dependiente, la soja, aumenta el rendimiento del grano cuanto más nitrógeno pueda incorporar en el rendimiento biológico. Esto concuerda con investigaciones llevadas a cabo por Ventura y Amaducci (1985) citados por Ventimiglia y Carta (2000), quienes señalan que de no mediar ninguna carencia nutricional, y las condiciones del ambiente sean las óptimas para el desarrollo del cultivo, el rendimiento que alcance la soja será explicado en un 96 % por la cantidad de nitrógeno que la misma pueda incorporar (Ventimiglia y Carta, 2000).

En cuanto a los nutrientes secundarios, la soja presenta requerimientos de azufre (S) superiores a los de trigo y maíz, y para una eficiente fijación biológica de nitrógeno (FBN) requiere de micronutrientes tales como molibdeno (Mo), cobalto (Co), níquel (Ni), boro (Bo), hierro (Fe) y manganeso (Mn). Dado que en general, los suelos de la región pampeana presentan deficiencias de N y P, los análisis previos de suelo y climáticos de la zona constituyen herramientas básicas y fundamentales para determinar los niveles de fertilidad de cada lote y diagnosticar un plan de fertilización óptimo a seguir (García, 2000).

El crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta de soja, son resultado de un determinado potencial genético varietal en interacción con el ambiente. El potencial de rendimiento máximo se logra cuando las condiciones ambientales son perfectas, dado que tales condiciones de crecimiento no existen naturalmente, los productores de este cultivo pueden manipular el ambiente con prácticas de manejo probadas, a los fines de conseguir mayores rendimientos y beneficios (Ritchie *et al*, 2000).

## **1.1 ETAPAS FENOLÓGICAS DEL CULTIVO DE SOJA**

La escala más utilizada para la descripción de los estadios fenológicos externos del cultivo de soja, fue la desarrollada por Fehr *et al.*(1971) citado por Toledo (2006). En ella se distinguen dos etapas principales, una vinculada a los estados vegetativos y la otra relacionada a los estados reproductivos. Esta escala se basa en determinaciones macroscópicas fácilmente observables a campo

### **1.1.1 ETAPA VEGETATIVA**

La definición de cada estadio vegetativo está indicada por la letra (V) y una descripción abreviada. La numeración del estado vegetativo se determina mediante el recuento de los nudos sobre el tallo principal que tiene o han tenido hojas completamente desarrolladas.

Se considera que una hoja está completamente desarrollada cuando los bordes de los folíolos de la hoja inmediatamente superior no se tocan.

En condiciones ambientales adecuadas, la germinación comienza cuando la semilla absorbe el 50%, aproximadamente, de su peso en agua.

Los 2 primeros estados vegetativos se los identifican con letras.

- VE – Emergencia: Se observa el hipocótilo<sup>1</sup> en forma de arco, empujando al epicótilo<sup>2</sup> y a los cotiledones, haciéndolos emerger sobre la superficie del suelo.
- VC - Etapa cotiledonar: El hipocótilo se endereza, los cotiledones se despliegan totalmente y en el nudo inmediato superior los bordes de las hojas unifoliadas no se tocan.

A partir de aquí el resto de los estados vegetativos se los identifican con el número de nudos.

- V1 - (1<sup>er</sup> nudo): El par de hojas opuestas unifoliadas están expandida totalmente, y en el nudo inmediato superior se observa que los bordes de cada uno de los foliolos de la 1er hoja trifoliada no se tocan.
- V2 - (2<sup>do</sup> nudo): La 1er hoja trifoliada está totalmente desplegada, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los foliolos de la 2da hoja trifoliada no se están tocando.
- V3 - (3<sup>er</sup> nudo): La 2da hoja trifoliada está completamente desarrollada, y en la 3er hoja trifoliada los bordes de cada uno de sus foliolos no se tocan.
- V5 - (5<sup>to</sup> nudo): La 4ta hoja trifoliada está completamente desarrollada, y en la 5ta hoja trifoliada los bordes de cada uno de sus foliolos no se tocan.
- Vn - (n: número de nudos): La hoja trifoliada del nudo (n) está expandida totalmente, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los foliolos no se tocan

Normalmente, se observa el amarillamiento de los cotiledones a partir de V2, esto es indicativo de que la planta presenta un mínimo de hojas y raíces para su normal crecimiento.

---

<sup>1</sup> En el embrión vegetal, parte del talluelo situado bajo los cotiledones

<sup>2</sup> En el embrión vegetal, parte que se encuentra por encima de los cotiledones

### 1.1.2 ETAPA REPRODUCTIVA

Las etapas reproductivas se basan en la floración, en el crecimiento de vainas y semillas y en la madurez de las plantas. La designación de cada fase se indica con la letra R seguida de un número y por una explicación abreviada de cada fase.

- R1 - Inicio de Floración: Se observa una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal. La floración comienza en la parte media de la planta progresando hacia la parte superior e inferior. La aparición de nuevas flores alcanza su máximo entre R2, R3 y culmina en R5.

- R2 - Floración completa: Se observa una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas. Esta etapa indica el comienzo de un período de acumulación diaria y constante de materia seca y nutrientes que continuará hasta poco después de R6, asimismo el ritmo de fijación de los nódulos aumenta rápidamente.

- R3 - Inicio de formación de vainas: Una vaina de 5 milímetros de largo en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, y con hojas totalmente desplegadas. La formación de vainas se inicia en los nudos inferiores, en este momento en la misma planta se encuentran vainas formándose, flores marchitas flores abiertas y pimpollos.

- R4 - Vainas completamente desarrolladas: Una vaina de 2 cm en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas. Alguna de las vainas de los nudos inferiores del tallo principal han alcanzado su máximo tamaño, pero en general la mayoría lo logra en R5 En esta etapa comienza el periodo crítico del cultivo; entre R4,5 y R5,5 es el momento más sensible, ya que ha finalizado la floración y cualquier situación de stress: déficit hídrico, de nutrientes, defoliación por orugas, enfermedades foliares, ataque de chinches, granizo, etc, afectará el número final de vainas y de granos, provocando la reducción de rendimiento. Esta situación puede ser compensada en parte con el peso de los granos, pero esta compensación esta limitada genéticamente.

- R5 - Inicio de formación de semillas: Una vaina, ubicada en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla de 3 mm de largo. Entre las etapas R5-R6 ocurren eventos importantes:

- La planta logra la máxima altura, número de nudos y área foliar.
- Se incrementa el ritmo de fijación de Nitrógeno, llegando al máximo, para luego disminuir marcadamente.
- Las semillas inician un período rápido de acumulación de materia seca y nutrientes.

- R6 - Semilla completamente desarrollada: Una vaina, en cualquiera de los cuatro

nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla verde que llena la cavidad de dicha vaina, con hojas totalmente desplegadas. Poco después de R6 decae el ritmo de acumulación de peso seco y nutriente de toda la planta y en las semillas poco después de R 6,5. A partir de esta etapa, las hojas de toda la planta comienzan a ponerse amarillas, el envejecimiento de las mismas y su caída comienzan en los nudos inferiores y continúa hacia arriba.

- R7 - Inicio de maduración: Una vaina normal en cualquier nudo del tallo principal ha alcanzado su color de madurez. La semilla alcanza la madurez fisiológica cuando ésta finaliza la acumulación de peso seco, y generalmente, junto con la vaina, van perdiendo su coloración verde. La semilla en este momento contiene el 60 % de humedad.
- R8 - Maduración completa: El 95 % de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez. Luego de R8, se necesitan cinco a diez días de tiempo seco, para que las semillas reduzcan su humedad por debajo del 15 %.

## **1.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DEL CULTIVO DE SOJA. EL NITRÓGENO Y LA FBN**

El Nm es el elemento requerido en mayor cuantía por todos los cultivos. Las deficiencias de este nutriente reducen severamente los rendimientos, restringiendo la expansión foliar durante las primeras etapas del ciclo, afectando la fijación de granos durante el período reproductivo. La soja es una de las especies que mayores cantidades de Nm necesita acumular durante su ciclo, al tratarse de un cultivo proteico por excelencia (Ferraris y Couretot, 2007).

La soja esta genéticamente diseñada para acumular proteínas en sus granos, alrededor de 38 – 40 %; si no satisface un determinado nivel de acumulación de proteínas, disminuye el rendimiento. Las proteínas de soja tienen un 5,75 % de Nm en su composición, por lo cual el cultivo debe acumular alrededor de 80 Kg de este nutriente en su biomasa vegetal para producir cada tonelada de grano (González, 2003).

El Nm que abastece a la planta de soja puede derivar de la mineralización de la materia orgánica, provenir de la fijación biológica – proceso que recibe el nombre de fijación biológica del nitrógeno – puede ser aportado por las descargas eléctricas y las lluvias, el que integran las deyecciones sólidas y líquidas de los animales o bien puede ser incorporado a través de fertilizantes.

De las cinco fuentes mencionadas, las dos primeras son las más importantes, sin embargo la FBN es la que se privilegia, dado que es más económica para los productores agropecuarios, es abundante en la naturaleza y no es contaminante, como

pueden ser otras fuentes nitrogenadas (Ventimiglia y Carta, 2000).

Pero no todo el Nm acumulado en el cultivo de soja proviene de la FBN. Mientras se genera el sistema nodular, la planta utiliza nitrógeno del suelo. Si hay mucho Nm en el ambiente de la raíz, derivado de un suelo naturalmente rico, o bien agregado de fertilizante nitrogenado, la planta “dará órdenes” para que el número de nódulos formados sea menor o nulo (González, 2003).

Entre el 25 y el 75 % de las necesidades de Nm son logrados por FBN. Este proceso es energéticamente costoso para la planta requiriendo entre 6 y 12 g de carbohidratos por g de Nm fijado, lo que explica las estrechas relaciones entre el crecimiento del cultivo y la FBN. Factores que restrinjan el crecimiento limitarán la FBN y reducirán su eficiencia (Fontanetto y Keller, 2006).

La fijación de nitrógeno se da a través de la simbiosis establecida entre ciertas bacterias específicas y la propia planta, a través de los órganos llamados nódulos (González, 2003).

### **1.3 MÉTODO DEL NITRÓGENO MINERAL**

Fue probablemente Russel, en 1914, el primero en observar que el contenido de Nm del suelo afecta a los requerimientos de fertilizantes nitrogenados de los cultivos. Pero fue recién en la década de los setenta, cuando los investigadores comienzan a prestarle seria atención a estos planteamientos, desarrollando sistemas de recomendación de nitrógeno, basados en el contenido de nitrógeno mineral del suelo.

El  $\text{NO}_3^-$  (Nitrato) y  $\text{NH}_4^+$  (Amonio) disuelto en la solución del suelo, puede ser tomado directamente por las raíces de la planta (Diez López, 1999). El Nitrato, dado su elevada movilidad en el suelo, y debido a que no es absorbido por los coloides y a que sus sales son solubles, se transporta hasta alcanzar los pelos radicales por medio de mecanismos de flujo de masal o por difusión. En tanto el Amonio, presente en la solución del suelo, se transporta por difusión solamente (Diez López, 1999).

Según estudios realizados por Wehrmann en 1979, se determino que el procedimiento del nitrógeno mineral esta basado en la extracción de la muestra de suelo fresco, a los fines de obtener el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{NH}_4^+$  no específicamente combinados, a la profundidad radicular del suelo al comienzo de la estación de crecimiento del cultivo (Diez López, 1999).

En función de lo explicado precedentemente, cabe mencionar que existen procedimientos que permitan determinar el nitrógeno potencialmente mineralizable, es decir, el nitrógeno orgánico que se mineralizará durante el período de cultivo, que con toda

probabilidad interviene en la nutrición de la planta.

En la reposición de nitrógeno para los cultivos, el nitrógeno orgánico que se mineraliza durante el período de cultivo es todavía más importante que el N mineral (Diez López, 1999).

Las proteínas y péptidos adsorbidos a los coloides del suelo, constituyen una importante fuente de nitrógeno orgánico fácilmente mineralizable y, de acuerdo a diversos autores (Diez López, 1999), la fuerza de adsorción de estos compuestos, es de naturaleza electrostática<sup>3</sup>. Se considera también que, la textura del suelo, puede tener alguna influencia sobre los mecanismos que intervienen en la disponibilidad del nitrógeno. Por ejemplo, los suelos arenosos se caracterizan porque en ellos tiene lugar una rápida mineralización del nitrógeno proteico transformándose en nitratos, preferentemente durante los meses de verano, pudiendo ser lixiviado posteriormente con las lluvias de invierno, mientras que en los suelos arcillosos, este proceso es mucho más lento. En consecuencia, la medida del nitrógeno potencialmente asimilable previa al cultivo, tiene dos componentes: la fracción de nitrógeno mineral y la de nitrógeno orgánico fácilmente mineralizable.

## **2. INOCULACIÓN EN SOJA**

La simbiosis puede ser definida como la respuesta fisiológica de dos o más organismos frente a medios deficitarios. La simbiosis rizobios - leguminosa es la adaptación al desequilibrio de nitrógeno, por esa razón los suelos ricos en N dificultan la simbiosis y los suelos pobres en N la facilitan.

La inoculación es el proceso de incorporación de bacterias seleccionadas por su eficiencia de fijación del N<sub>2</sub> en el sistema cultivo – suelo. El producto inoculante es adicionado a la semilla, la cual llevará en su exterior una carga bacteriana. Serán estas bacterias las encargadas en primer lugar de infectar las raíces de soja y posteriormente, una vez alcanzado un desarrollo específico en el interior de una estructura denominada nódulo, comenzar la FBN (Ventimiglia y Carta, 2000).

Para Ballone (2000), en el proceso formación del nódulo se encuentra el secreto de todo el manejo posterior que debe hacerse, no sólo con los nutrientes, sino también con el suelo, para que el proceso de fijación sea eficiente.

Al ser la simbiosis un fenómeno tan complejo, la nodulación de las leguminosas se ve influida, tanto por los factores ambientales como por las características genéticas propias de ambos simbioses, y la escasez de nódulos, su tamaño y momento de aparición, entre otros,

---

<sup>3</sup> Vinculados a las distribuciones de cargas estáticas de un cuerpo cargado

son caracteres que dependen de la planta o de la bacteria. La mayor tasa de fijación biológica en soja se produce a partir del comienzo de las etapas reproductivas (fin de floración y comienzo de llenado de granos) y que coincide con el momento de mayor demanda de nitrógeno por parte de la planta. Este fenómeno ocurre por que la planta destina gran cantidad de hidratos de carbono, (fuente de energía para el rizobio) hacia los granos, desactivando así la actividad de la fijación biológica del nitrógeno (Punos e Iglesias , 2005).

La bacteria específica utilizada para la inoculación de la semilla de soja es conocida con el nombre de *Bradyrhizobium japonicum*.

### **3. BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM**

Cuando en el suelo no se dispone de los rizobios adecuados, al inocular se agregan artificialmente rizobios seleccionados sobre la semilla o el suelo. El producto biológico desarrollado para este fin se denomina inoculante.

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amoníaco. De acuerdo con la definición aceptada de especie en bacteriología, cada especie de rizobios consta de un grupo de cepas que comparten características que las distinguen como grupo, de otros grupos de bacterias. Hasta la fecha se han propuesto 6 géneros, que son: Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium y Sinorhizobium (Ferlini, 2006).

En la década del 70, cuando se produjo la expansión del cultivo de soja en Argentina y dado la inexistencia en nuestros suelos de *Bradyrhizobium japonicum* o *B. elkanii*, se consideró necesaria la incorporación de estas bacterias a las semillas por intermedio de la inoculación (Perticari, 2008).

*Bradyrhizobium japonicum* es una bacteria gram negativa, con forma de bastón, que fija el nitrógeno, mediante una relación simbiótica, a la planta de soja. Se localiza en las puntas de la raíz y coloniza en los nódulos de la misma. En esta relación simbiótica, la planta proporciona un ambiente seguro y un suministro constante de alimentos como fuente carbonada, que es usado para el crecimiento y la energía. La bacteria provee a la planta del nitrógeno fijo.

El genoma de *Bradyrhizobium japonicum*, fue ordenado y manipulado, de un nódulo de soja en Florida (EE.UU.) en 1957, para producir rasgos beneficiosos y deseables, que pueden mejorar la producción del cultivo de soja (Godoy, 2008)

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las nodulaciones radiales y el crecimiento de plantas de soja cuando sus semillas fueron inoculadas con distintas dosis y formulaciones de *Bradyrhizobium japonicum*

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el número y el peso de los nódulos de las raíces de la planta de soja en estado vegetativo, cuando sus semilla fueron inoculadas con dosis crecientes de *Bradyrhizobium japonicum*

2. Determinar la biomasa aérea y radical en plantas de soja en estado vegetativo cuando sus semillas fueron inoculadas con dosis crecientes de *Bradyrhizobium japonicum* y su efecto sobre el rendimiento.

### **HIPÓTESIS**

El empleo de dosis crecientes y formulaciones múltiples de *Bradyrhizobium japonicum* incrementa el número de nódulos en las raíces de las plantas en estado vegetativo consecuentemente aumenta la biomasa aérea, radical y sus rendimientos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC, Río Cuarto, Córdoba. Siendo sus coordenadas geográficas los 33° 06' LS y los 64° 17' LO, en líneas generales el área de estudio pertenece a la denominada provincia geomorfológica Llanura Chacopampeana, en la región fluvial subhúmeda, subambiente aluvial del río Cuarto (Puigdomenech, 2006).

El ensayo se llevó a cabo sobre un suelo Haplustol típico, de textura franco arenoso fino. Este tipo de suelo se caracteriza por que su capacidad de retención de agua útil es tal que los rendimientos de los cultivos merman frecuentemente por falta de humedad durante los períodos anuales normales de sequía. Son suelos aptos para cultivos, pasturas, campo natural de pastoreo, forestación, etcétera.

Metodológicamente se utilizó un diseño factorial de bloques aleatorizados, con tres repeticiones. De acuerdo con esta estrategia cada bloque es una réplica completa del experimento, y los grupos dentro de cada bloque se forman al azar.

Se utilizaron además, datos de temperaturas ambiente y precipitaciones diarias registradas en la estación meteorológica de la FAV-UNRC.

Las semillas de soja (cv 4613 de Nidera) fueron inoculadas con diferentes dosis de inoculante estableciéndose nueve tratamientos distintos, a saber:

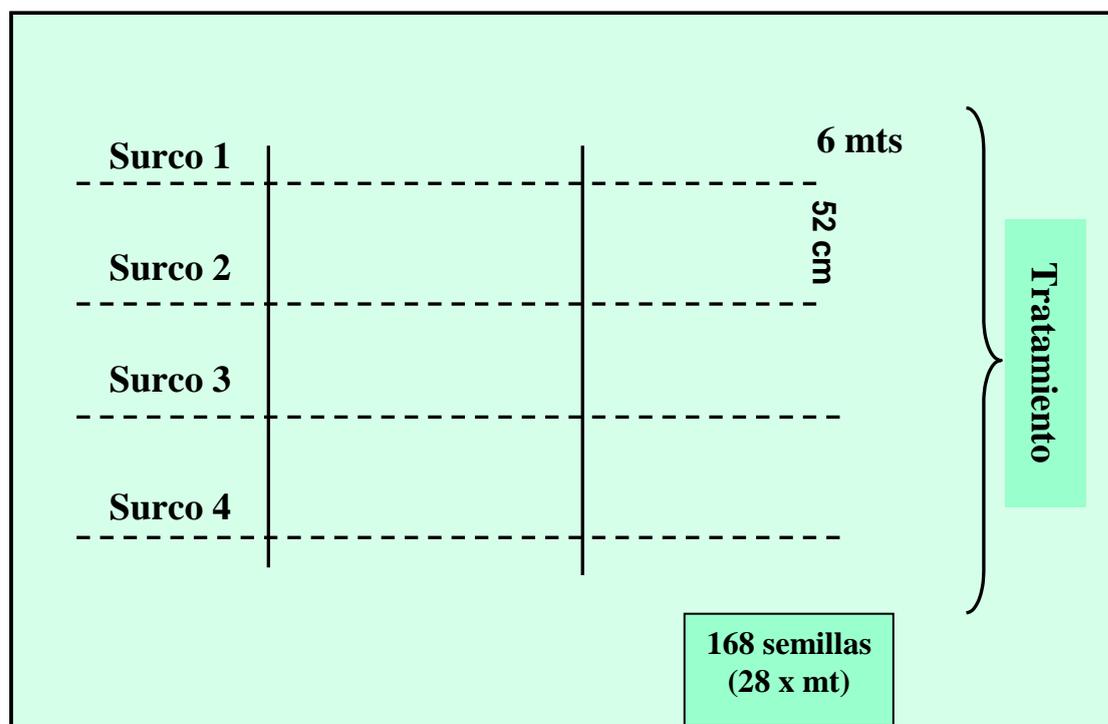
1. Testigo sin inocular
2. Inoculante líquido 1 (Nitrap)
3. Inoculante líquido 2 (Nitrap), dosis simple (100cc cada 50 Kg. de semilla)
4. Inoculante líquido 2, dosis doble (200cc cada 50 kg de semilla)
5. Inoculante líquido 2, dosis simple (100cc cada 50 Kg. de semilla más protector, 100 cc cada 50 kg de semilla)
6. Inoculante líquido 2, dosis doble (200cc cada 50 kg de semilla más protector 100 cc cada 50 kg de semilla)
7. Inoculante líquido 2, dosis simple (100cc cada 50 Kg. de semilla más protector 100 cc cada 50 kg de semilla y curasemilla 100 cc cada 50 Kg de semilla)
8. Inoculante líquido 2, dosis simple (100cc cada 50 kg de semilla preinoculado con protector 200 cc cada 50 kg de semilla)
9. Inoculante sólido, dosis simple (100cc cada 50 Kg de semilla más media dosis de inoculante sólido con soporte de turba, 85 gr cada 50 kg de semilla).

Las semillas de soja fueron sembradas el 17 de Diciembre, mediante siembra directa, siendo el cultivar utilizado el cv 4613 de Nidera.

La siembra se realizó con un cultivar de soja de grupo de madurez IV largo. Este tipo

de granos son los más estables y los que mejor sortean los distintos tipos de estrés, como sequía o granizo (obviamente siempre y cuando los mismos no ocurran en su período crítico).

La unidad experimental consistió en 4 surcos de 6 m de largo y la distancia entre hileras de 52 cm, colocándose 28 semillas por metro lineal en siembra directa (Grafico 1)



**Gráfico 1. Modelo de unidad experimental utilizado.** Este modelo se repitió 9 veces según cada tratamiento hasta obtener un total de 36 surcos.

Al cultivo se le realizó un seguimiento de observación desde su emergencia pasando por sus estados vegetativos y reproductivos. El muestreo fue realizado en R1 extrayendo 5 plantas de cada tratamiento con tres repeticiones de cada uno por lo que en total se obtuvieron 15 plantas de cada tratamiento.

Para la extracción de las plantas se utilizó una pala de punta mediante la cual se extrajo la rizosfera<sup>4</sup> completa sin dañar la raíz y por consiguiente los nódulos presentes en la misma.

<sup>4</sup> La rizosfera es la parte del suelo inmediata a las raíces donde tiene lugar una interacción dinámica con los microorganismos.

Las muestras obtenidas por cada tratamiento fueron trasladadas al laboratorio de microbiología ubicado en la FAV – UNRC, en bolsas de polietileno rotuladas.

El siguiente tratamiento consistió en extraerles la tierra que acompañaba las raíces, y luego cada planta fue lavada de forma individual, con agua corriente, haciendo así visibles los nódulos.

## 1. EVALUACIONES

En la totalidad del muestreo las variables a analizar fueron:

- Cantidad de nódulos: Los nódulos se desprendieron manualmente y con extrema delicadeza para evitar su ruptura. Se contabilizaron de forma separada aquellos presentes en las raíces principales y laterales, obteniendo con estos datos el número de nódulos totales.

- Peso seco de nódulos: Una vez que se obtuvo la cantidad de nódulos de las muestras de cada repetición, se colocaron en una placa de petri de vidrio de 10 cm de diámetro. Cada placa de petri fue colocada en una estufa de secado a 70° C por un período de 48 horas. Las placas fueron retiradas de la estufa y los nódulos fueron pesados en una balanza digital obteniendo así el peso seco del total de los nódulos de cada repetición.

- Peso seco de la planta: Cada planta fue cortada con una tijera a la altura del comienzo de la raíz obteniendo dos sub muestras: una radicular y una aérea. Cada sub muestra se secó de la misma forma que en el caso de los nódulos y posteriormente se pesaron en una balanza digital. De este procesamiento se extrajeron datos de peso seco radicular y peso seco aéreo, rendimiento y componentes del mismo.

Los datos recogidos fueron volcados en planillas (Cuadro 1) para su posterior tabulación y análisis.

Las variables se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA.) por medio del programa estadístico Infostat. Las comparaciones entre medias se hicieron por el Test de Duncan ( $\alpha=0.05$ )

Tratamiento	Nº nódulos raíz principal	Nº nódulos raíz lateral	Nº total nódulos	Peso seco nódulos
Nº 2				
A				
1				
2				
3				
4				
5				
B				
1				
2				
3				
4				
5				
C				
1				
2				
3				
4				
5				

**Cuadro 1. Formato de planillas para la recolección de datos.**

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la bibliografía especializada (Ferlini, 2006), se menciona que durante los primeros estadios de la planta no existen diferencias apreciables, y que estas solo se evidencian en el número de raíces secundarias y de raicillas. Luego de los 50 días, recién se empiezan a diferenciar los distintos tratamientos.

El muestreo realizado para esta investigación fue efectuado durante el estadio R1, es decir en el estadio reproductivo de la planta.

La temperatura media del aire y las precipitaciones registradas durante el período de siembra y recopilación de datos se presentan, en valores decádicos, en el Gráfico 2.

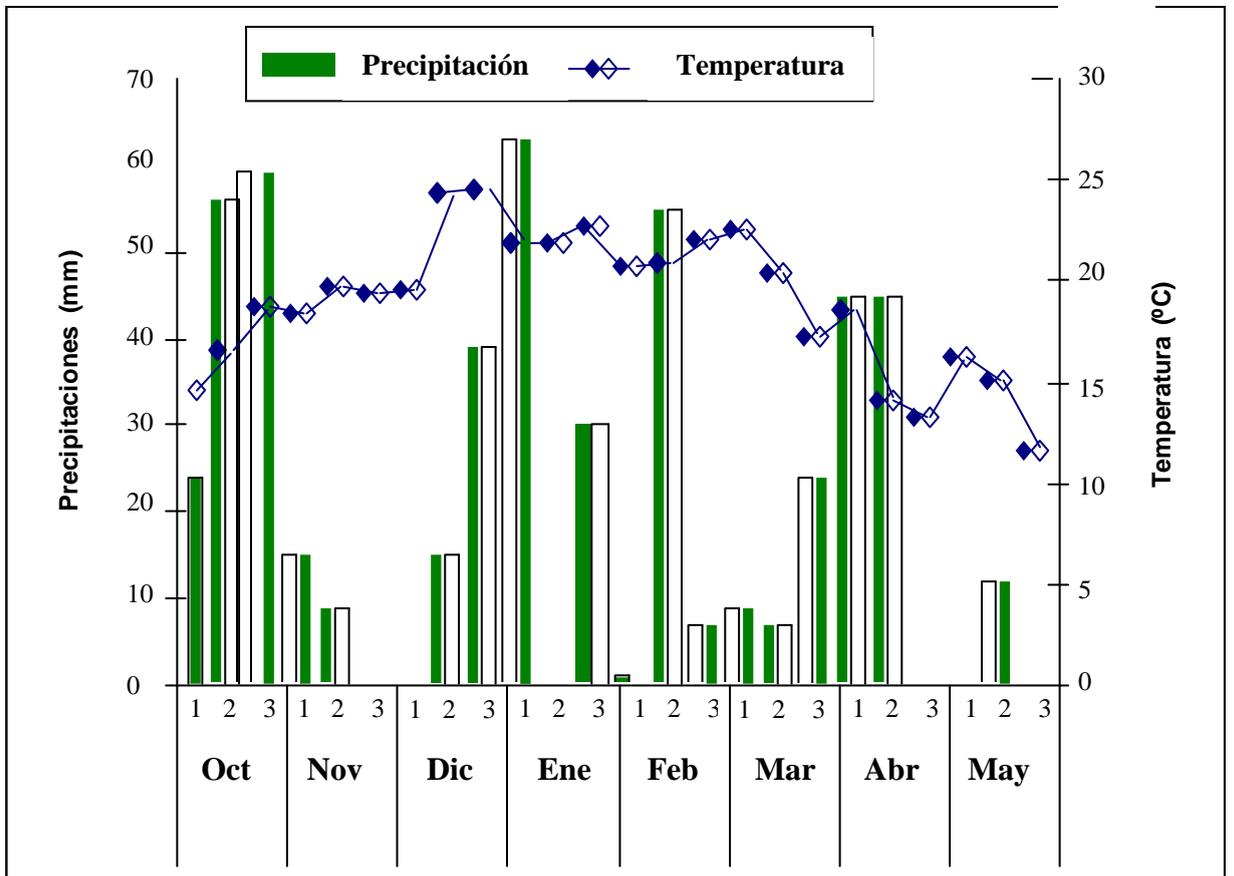
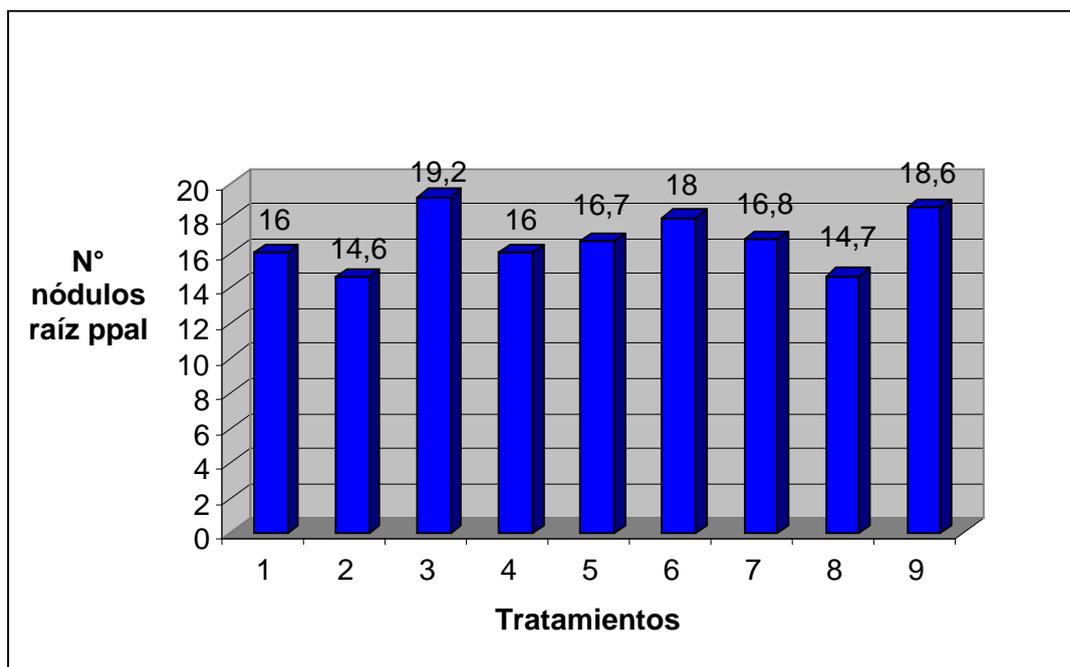


Gráfico 2. Valores decádicos de temperatura media del aire (°C) y precipitaciones (mm) durante el período octubre de 2004 - mayo 2005 en el campo experimental de UNRC.

En el análisis estadístico de los datos, se observó que el tratamiento N° 3 (Inoculante líquido 2, dosis simple) presentó una mayor cantidad de nódulos en raíz principal que los tratamientos restantes. En comparación con el testigo, el tratamiento N° 3 también difirió en la misma variable, en un 16,6%.

Los valores cuantitativos más bajos de nodulación fueron los hallados en el tratamiento N° 2 (Inoculante líquido 1) aún cuando se los comparó con el testigo (Gráfico 3). Los tratamientos N° 3 y 9 cuantitativamente se diferenciaron en un 3,2% pero son los dos que presentaron mas nódulos en raíz principal a pesar que no es el mismo tipo de inoculante ni formulación pero según Balatti 2007 todas las estirpes de *Bradhyrizobium* se diferencian en su capacidad para nodular y fijar N<sub>2</sub>, además están influenciado según (Punos e Iglesias, 2005) por las características del suelo, ambientales y también genéticas.

Sin embargo, en el análisis de varianza y las comparaciones entre medias por Test de Duncan se observó, que en el modelo no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). En el anexo se muestra el test de Duncan para la interacción y las variables estudiadas.



**Gráfico 3. Número de nódulos en raíz principal según cada tratamiento empleado.**

Con respecto al número de nódulos encontrados en la raíz lateral (Gráfico 4), los valores medios más elevados corresponden a los tratamientos N° 5 y 8. Es decir a semillas tratadas con Inoculante líquido 2, dosis doble y con Inoculante líquido 2, dosis simple. En tanto el valor más bajo de nodulación en raíz lateral fue el correspondiente al tratamiento sin inocular.

Los cultivos de leguminosas ocurren exitosamente cuando la mejor combinación leguminosa-rizobios (simbiosis) se produce, pero este proceso puede presentar problemas como la presencia en el suelo de cepas nativas, los nódulos de raíces laterales según (Racca, 2007) son originados por cepas de rizobios nativos o naturalizados.

En el análisis de la varianza se observó que el número de nódulos en raíces laterales fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos N° 1 testigo (c), 8(b) y 9(a). En el anexo se muestra el test de Duncan para la interacción de las variables estudiadas, las letras distintas indican diferencias significativas.

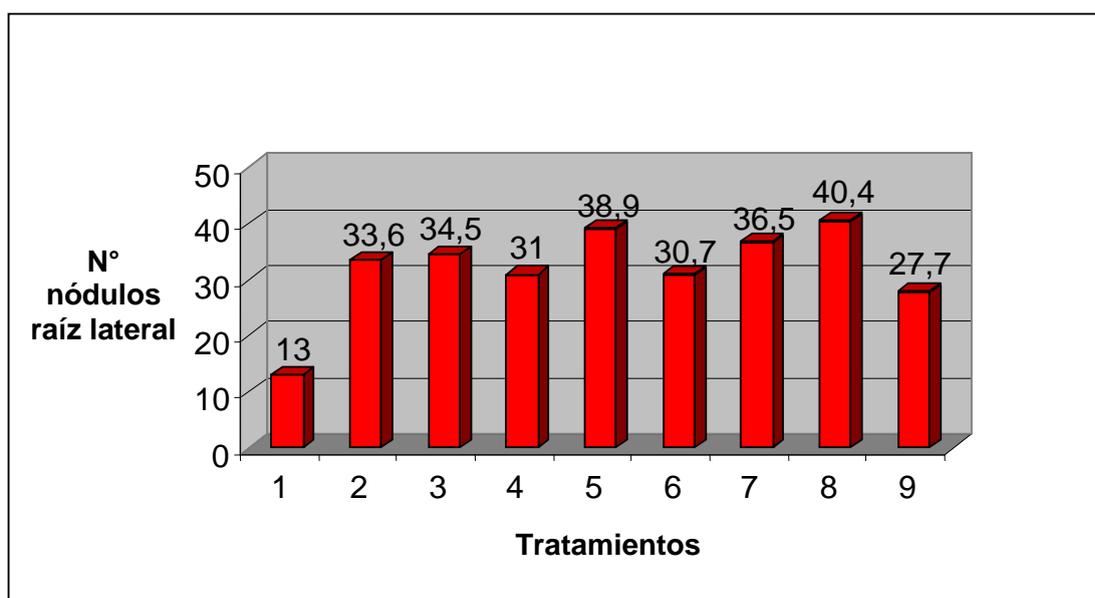


Gráfico 4. Número de nódulos en raíz lateral según cada tratamiento empleado.

La tercera variable analizada fue el número total de nódulos presentes en las plantas según cada uno de los tratamientos aplicados. No existieron diferencias significativas en el análisis de varianza, entre los tratamientos con inoculantes (N° 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9), aunque si existió una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre estos y el tratamiento testigo (N°1). (Gráfico 5 y Anexo)

Esto confirma lo dicho por varios autores (Long, 1989; Denarie y Cullimore, 1993; Van Rhijn y Vanderleyden, 1995) quienes observaron que la inoculación con cepas eficientes y efectivas como las que contienen los inoculantes son competitivas para obtener sitios de formación de nódulos.

Los valores de nodulación más elevados fueron hallados en los tratamientos N° 5 y 8, mientras que el más bajo correspondió al tratamiento sin inocular o testigo.

En el análisis de varianza se observó que el modelo presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre los tratamientos inoculados con diferentes dosis y el tratamiento N° 1 sin inocular, como se puede observar en el Test de Duncan (Anexo).

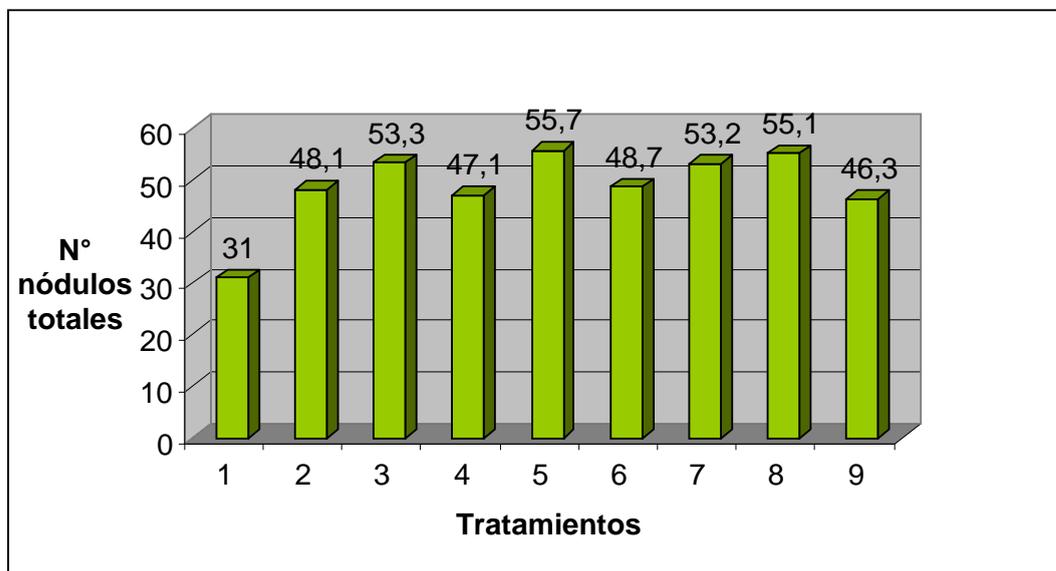


Gráfico 5. Número total de nódulos según cada tratamiento aplicado.

Posteriormente se estableció el peso seco de los nódulos de las muestras de cada repetición. El valor más elevado fue encontrado en el tratamiento N° 5 (Gráfico 6) donde se observó una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos. Una vez más el tratamiento con valores más bajos fue el N° 1 ó tratamiento sin inocular.

Este gráfico N° 6 mantiene una tendencia similar al anterior (Gráfico 5) y se justifica porque el peso aumentó al igual que el número de nódulos, esta característica está relacionada según (Racca 2007) con la capacidad de infección de la cepa del inoculante.

En el análisis de la varianza se observó que en el modelo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En el anexo se muestra el test de Duncan para la interacción y las variables estudiadas, allí se puede ver que, si las letras distintas indican diferencias significativas, las mismas se hallaron entre los tratamientos N° 7 (a) y N° 1 (c).

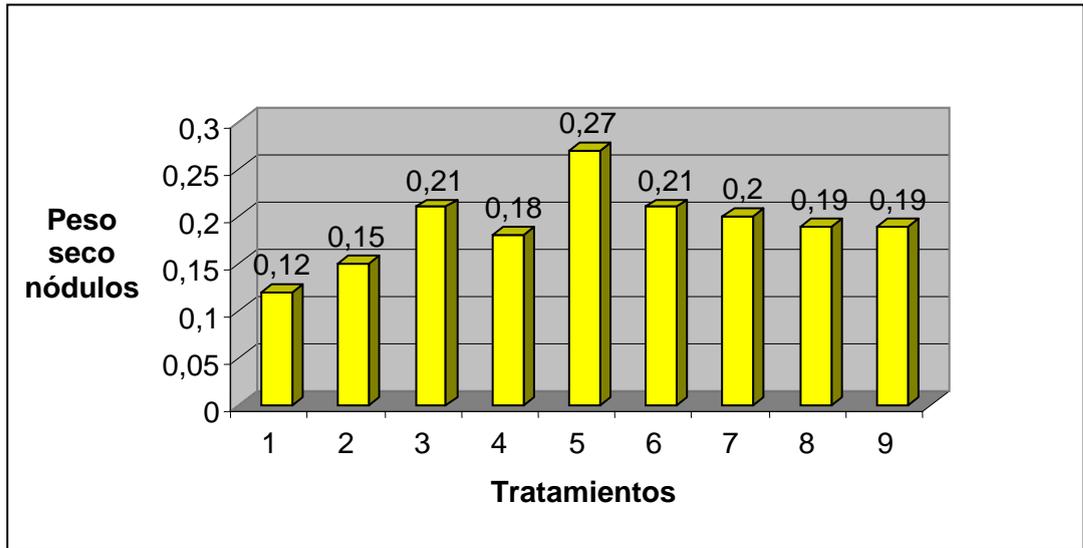


Gráfico 6. Peso seco de nódulos según cada tratamiento aplicado.

En el Gráfico 7 se presentan los valores medios de peso seco de biomasa aérea en gramos, y se observa que los valores más elevados son los hallados en el tratamiento N° 3, mientras que los más bajos fueron encontrados en el tratamiento N° 1.

En el análisis de la varianza (Ver Anexo) se observó que en el modelo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos N° 3 (a) y N° 1 (c).

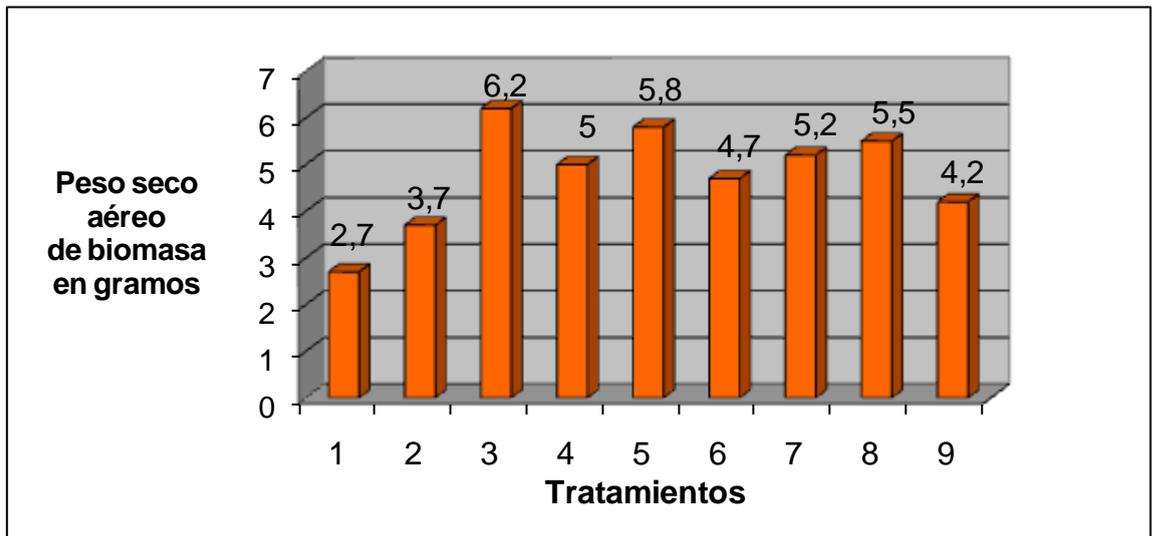


Gráfico 7. Peso seco biomasa aérea en gramos según cada tratamiento aplicado.

Los gráficos N° 7 y 8 (peso seco de biomasa aérea y raíz) están ligados al objetivo de la inoculación, la mejor simbiosis nos permitirá obtener según (González, 2003) plantas verdes con buen desarrollo de su biomasa y raíces por ser la soja cultivo dependiente del nitrógeno.

La variable analizada peso seco de raíz en gramos (Gráfico 8), los valores medios obtenidos presentan entre si, mínimas diferencias entre un tratamiento y los otros, sin embargo se observa que una vez más el tratamientos N° 5 presentó el valor más elevado, mientras que el tratamiento N° 1 fue quién mostró el valor más bajos.

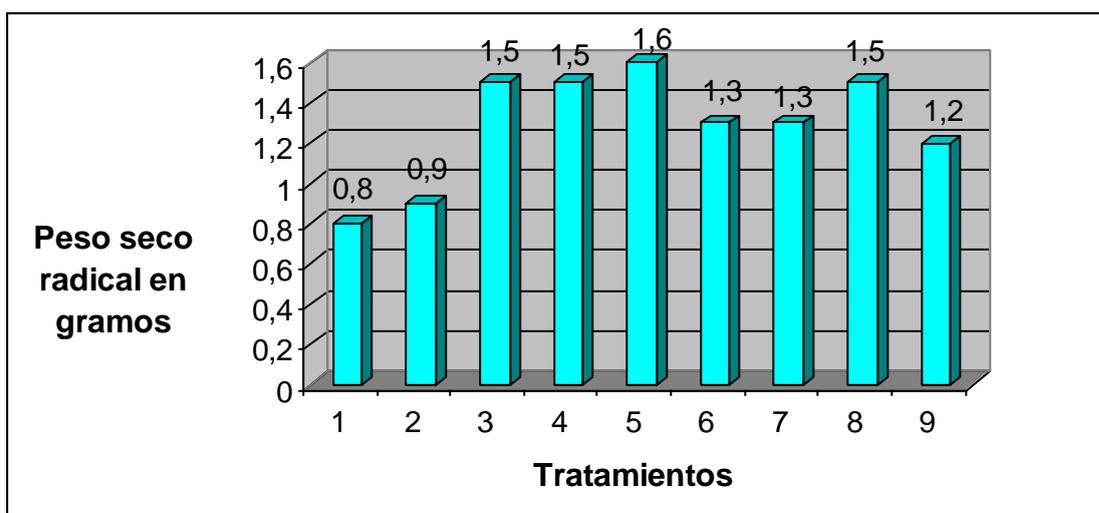


Gráfico 8. Peso seco de raíz en gramos según cada tratamiento aplicado.

Con respecto al rinde presentado por cada uno de los tratamientos, se observó que los valores más elevados fueron los encontrados en los tratamientos N° 5 y 8 (Gráfico 9), mientras que el valor más bajo fue el hallado en el tratamiento sin inocular. La soja es una de las especies que mayores cantidades de Nm necesita acumular durante su ciclo por tratarse según (Ferraris y Couretot, 2007) de un cultivo proteico por excelencia, aquí los tratamientos que mas nitrógeno acumularon durante su ciclo fueron los tratamientos N° 5 y 8 y por ende tuvieron los mayores rendimientos.

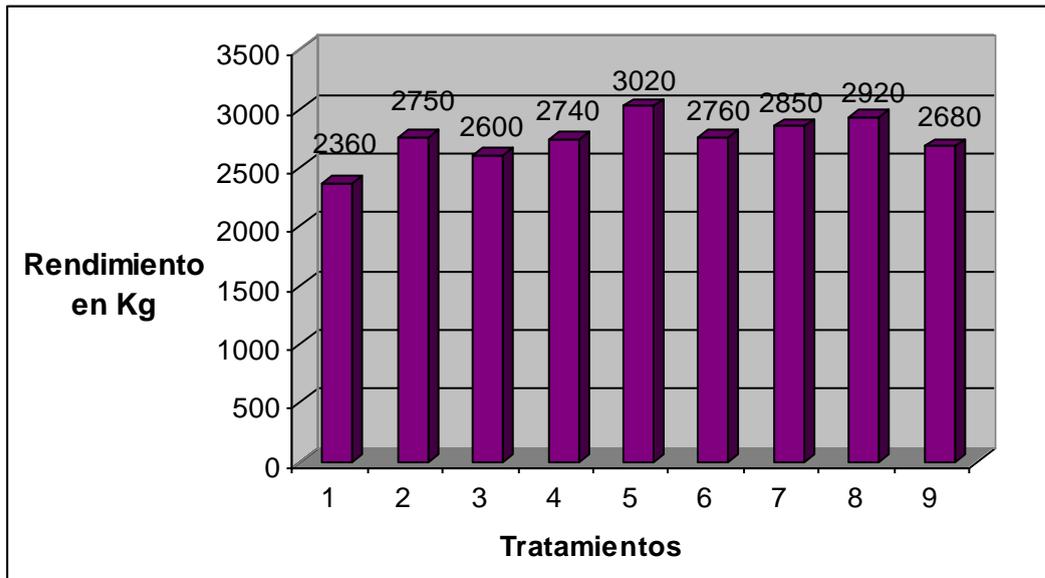


Gráfico 9. Rendimiento de la planta según cada tratamiento aplicado.

## CONCLUSION

Para concluir, se puede afirmar que:

- El empleo de diferentes dosis de inoculante con *Bradyrhizobium japonicum* no aumentó el número de nódulos en raíz principal.
- Las diferentes dosis de inoculante produjeron un aumento significativo con respecto al testigo en la cantidad de nódulos en raíz lateral
- No hubo diferencias significativas en la cantidad de nódulos totales en los tratamientos de inoculación pero si entre ellos y el testigos.
- El peso seco de los nódulos totales fue significativamente diferente en el tratamiento numero 5 con respecto al resto de los tratamientos y al testigo.

De estas conclusiones se desprende que el tratamiento 5 si bien no tuvo un aumento significativo de nódulos en raíz principal, el peso seco de los mismos no solo fue mayor con respecto al testigo si no que también obtuvo diferencias sobresaliendo del resto de los tratamientos testeados.

Los resultados obtenidos validan la hipótesis planteada. El empleo de diferentes formulaciones con dosis de *Bradyrhizobium japonicum* incrementa el número de nódulos en las raíces de las plantas en estado vegetativo, consecuentemente aumenta la biomasa aérea, radicular y sus rendimientos.

## BIBLIOGRAFÍA

**BALLONE, C.** 2000. Proceso de nodulación. Revista Agromercado. supl. 35. Argentina.

**DATE, R.** 1976. Principles of *Rhizobium* strain selection. Ch. 12, p. 137-150. In P.S. Nutman (ed) Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge U Press, Camb., England.

**DENARIE, J. y J. CULLIMORE.** 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell. 74 (6) p. 951– 954.

**DIAZ ZORITA, M y G. DUARTE.** 2004. Manual práctico para la producción de soja. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina.

**DIEZ LÓPEZ, J. A.** 1999. Optimización de la fertilización nitrogenada: procedimientos de análisis de suelo, toma de muestra y elección del tipo de fertilizante. Revista Edafología. Vol. 6. p. 73 – 84. Publicada por la Sociedad Española de la Ciencia del Suelo. España.

**FERLINI, H.** 2006. Co-inoculación en soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. En: <http://www.buscagro.com/biblioteca/FerliniMicheli/CoinoculacionSoja.pdf>

**FERNÁNDEZ CANIGIA, M. V.** 2003. Factores determinantes de la nodulación. 1º Ed. Bs.As. Nitragin Arg. ISBN 987-21058-0-4.

**FERRARIS, G y L. COURETOT.** 2007. Nuevas estrategias de producción para alcanzar los rendimientos potenciales en soja. Proyecto regional Agrícola. Área de Desarrollo Rural INTA EEA Pergamino. Soja Campaña 2006-2007. Argentina.

**FONTANETTO, H y O. KELLER,** 2006. Consideraciones sobre el manejo de la fertilización en la soja. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información técnica cultivos de verano. Campaña 2006. Publicación Miscelánea N° 106.

**GARCIA, F.** 2000. Requerimientos nutricionales de los cultivos. Fertilidad 2000. INPOFOS. p. 40 – 43. Rosario. Argentina.

**GODOY, G.** 2008. Diversidad de bacterias del genero *bradyrhizobium* naturalizadas en los suelos del cinturón sojero argentino. XVII congreso argentino de la ciencia del suelo. Mar del plata. Argentina

**GONZÁLEZ, N.** 2003. Algunos elementos de juicio para interpretar el fenómeno de la nodulación en soja. INTA. Balcarce. En:

<http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=55021&se=12>

**KANTOLIC, A.** 2004. Ecofisiología del Cultivo de Soja: Bases para el Manejo y para el aumento del Rendimiento Potencia. Reproducción. Boletín electrónico de Infotec, Sistema de información Científica de las Américas, IICA. En <http://infoagro.net/infotec>

**LONG, P. E.** 1989. Microbiología Ambiental. Editorial Acribia. p. 222. Argentina.

**PEREIRA GODOY, L.; RIBEIRO VASCONCELOS, A. T.; OLIVEIRA CHUEIRE, L. M.; SOUZA, R. C.; NICOLÁS, M. F.; GOMES BARCELLOS, F y M. HUNGRIA.** 2008. Genomic panorama of Bradyrhizobium japonicum CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. Soil Biology and Biochemistry. Elsevier. Volume 40, Issue 11, N p 2743-2753

**PERTICARI, A.** 2008. Uso de biofertilizantes. Inoculación y fijación biológica del nitrógeno en el cultivo de soja. En: <http://www.inta.gov.ar/imyza/info/doc/inoc/inocular.pdf>

**PETERSON, H. y T. E. LOYNACHAN.** 1981. The significance and application of Rhizobium in agriculture. pp. 311-331. In: The Biology of the Rhizobiaceae. Academic Press, New York.

**PUIGDOMENECH, E. R; MONTERO, M. y P. PIZZI.** 2006. Ciudades intermedias y la problemática de la no gestión. Estudio de caso: la ciudad de Río Cuarto. En: <http://elistas.egrupos.net/lista/encuentrohumboldt/archivo/indice/2001/msg/2065/>

**PUNOS, L e M. C. IGLESIAS.** 2005. Relación Entre el nivel de nodulación y la fertilización nitrogenada en soja. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: A-051. Universidad Nacional del Nordeste.

**RACCA, R.W** 2007. Algunos conceptos sobre la fijación de nitrógeno en los cultivos. IV reunión científico técnica de biología de suelo. Termas de rio hondo. Argentina

**RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. y G. O. BENSON.** 2000. Como se desarrolla una planta de soja. Reporte Especial N° 53. Universidad de Ciencias y Tecnología del estado de Iowa. Servicio Cooperativo de Extensión, Ames, Iowa. Edición en español: INPOFOS Cono sur Potash and Phosphate Institute. Potash and Phosphate Institute of Canadá. En: <http://www.planetasoja.com/trabajos/trabajos800.php?id1=2766&publi=69&idSec=7&id2=2767>

**RUSSEL, F.F.** 1991. The insolation of typhoid bacilli, from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium.

**TOLEDO, R. E.** 2006. Etapas fenológicas del cultivo de soja. En: <http://www.buscagro.com/biblioteca/Toledo/Clave.pdf>

**VAN RHIJN, P. y J. VANDERLEYDEN.** 1995. The Rhizobium – Plant Symbiosis. Microbiological Reviews. p. 124–142 vol. 59, no. 1. 0146. American Society for Microbiology. Heverlee, Belgium.

**VENTIMIGLIA, L. A. y H. G. CARTA.** 2000. Inoculación en soja: un nuevo sistema que permite mejorar la captura de nitrógeno. INTA. En:[http://www.ipni.net/ppiweb/ltams.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/82d620bfc4cdb289032570a4004fcb20/\\$FILE/INOCULACI%C3%93N%20EN%20SOJA%20UN%20NUEVO%20SIS TEMA.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/ltams.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/82d620bfc4cdb289032570a4004fcb20/$FILE/INOCULACI%C3%93N%20EN%20SOJA%20UN%20NUEVO%20SIS%20TEMA.pdf)

**VINCENT, J.M.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook. Vol. 15. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

## ANEXOS

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Rendimiento	135	1,00	1,00	0,00

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4364333,33	10	436433,33	sd	sd
TRATAMIENTO	4364333,33	8	545541,67	sd	sd
REPETICIONES	0,00	2	-2,3E-10	sd	sd
Error	0,00	124	0,00		
Total	4364333,33	134			

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
N° Nod R.Principal	135	0,08	0,01	42,64

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	578,16	10	57,82	1,10	0,3702
TRATAMIENTO	309,88	8	38,74	0,73	0,6609
REPETICIONES	268,28	2	134,14	2,54	0,0827
Error	6539,72	124	52,74		
Total	7117,88	134			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 52,7397 gl: 124

TRATAMIENTO	Medias	n	
3,00	19,27	15	A
9,00	18,60	15	A
1,00	18,07	15	A
6,00	18,00	15	A
7,00	16,87	15	A
5,00	16,80	15	A
4,00	16,07	15	A
8,00	15,13	15	A
2,00	14,47	15	A

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
N° Nod R.Lateral	135	0,23	0,17	48,51

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8956,27	10	895,63	3,76	0,0002
TRATAMIENTO	8112,67	8	1014,08	4,26	0,0002
REPETICIONES	843,60	2	421,80	1,77	0,1742
Error	29505,33	124	237,95		
Total	38461,60	134			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 237,9462 gl: 124

TRATAMIENTO	Medias	n		
8,00	41,13	15	A	
5,00	38,93	15	A	B
7,00	36,53	15	A	B
3,00	33,87	15	A	B
2,00	33,67	15	A	B
4,00	30,93	15	A	B
6,00	30,40	15	A	B
9,00	27,73	15		B
1,00	13,00	15		C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
N° Nod Total	135	0,16	0,10	38,46

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8584,43	10	858,44	2,43	0,0110
TRATAMIENTO	6997,21	8	874,65	2,48	0,0157
REPETICIONES	1587,21	2	793,61	2,25	0,1097
Error	43738,65	124	352,73		
Total	52323,08	134			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 352,7311 gl: 124

TRATAMIENTO	Medias	n		
8,00	56,27	15	A	
5,00	55,73	15	A	
7,00	53,27	15	A	
3,00	53,13	15	A	
6,00	48,40	15	A	
2,00	48,13	15	A	
4,00	47,13	15	A	
9,00	46,33	15	A	
1,00	31,07	15		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso seco de Nod	135	0,18	0,11	44,80

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,21	10	0,02	2,65	0,0058
TRATAMIENTO	0,17	8	0,02	2,65	0,0101
REPETICIONES	0,04	2	0,02	2,63	0,0758
Error	0,98	124	0,01		
Total	1,19	134			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 0,0079 gl: 124

TRATAMIENTO	Medias	n			
7,00	0,26	15	A		
5,00	0,22	15	A	B	
3,00	0,22	15	A	B	
8,00	0,21	15	A	B	
6,00	0,20	15	A	B	
9,00	0,19	15	A	B	C
4,00	0,19	15	A	B	C
2,00	0,16	15		B	C
1,00	0,13	15			C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso seco aereo	135	0,17	0,10	45,54

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	119,20	10	11,92	2,48	0,0097
TRATAMIENTO	95,86	8	11,98	2,49	0,0153
REPETICIONES	23,33	2	11,67	2,43	0,0926
Error	596,29	124	4,81		
Total	715,49	134			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 4,8088 gl: 124

TRATAMIENTO	Medias	n			
3,00	6,11	15	A		
5,00	5,80	15	A		
7,00	5,28	15	A	B	
4,00	5,08	15	A	B	C
8,00	4,87	15	A	B	C
6,00	4,77	15	A	B	C
9,00	4,29	15	A	B	C
2,00	3,70	15		B	C
1,00	3,43	15			C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso seco raíz	135	0,22	0,15	47,48

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13,43	10	1,34	3,45	0,0005
TRATAMIENTO	12,11	8	1,51	3,89	0,0004
REPETICIONES	1,32	2	0,66	1,70	0,1867
Error	48,22	124	0,39		
Total	61,66	134			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 0,3889 gl: 124

TRATAMIENTO	Medias	n			
5,00	1,61	15	A		
8,00	1,58	15	A		
3,00	1,53	15	A		
4,00	1,51	15	A		
7,00	1,39	15	A	B	
6,00	1,34	15	A	B	
9,00	1,24	15	A	B	
2,00	0,99	15		B	C
1,00	0,64	15			C

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 1				
A				
1	15	7	22	0.076
2	12	28	40	0.081
3	25	16	41	0.234
4	13	13	26	0.122
5	12	4	16	0.083
	<b>15.4</b>	<b>13.6</b>	<b>29</b>	<b>0.119</b>
B				
1	25	27	52	0.113
2	8	8	16	0.053
3	18	5	23	0.114
4	40	23	63	0.235
5	22	4	26	0.145
	<b>16.6</b>	<b>13.4</b>	<b>36</b>	<b>0.118</b>
C				
1	25	14	39	0.112
2	11	4	15	0.101
3	21	18	39	0.215
4	12	4	16	0.087
5	12	20	32	0.165
	<b>16.2</b>	<b>12</b>	<b>28.2</b>	<b>0.136</b>

Tratamient	Peso seco aéreo en	Peso seco radical en
Nº 1		
A		
1	1.8	1.2
2	2.2	0.7
3	1488	1.7
4	0.6	0.9
5	2.7	0.6
B		
1	5.1	0.5
2	3	0.9
3	1.8	0.9
4	2.5	0.7
5	4	1.3
C		
1	3.9	0.8
2	6	0.6
3	3.1	1
4	1.4	1
5	2	0.3

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 2				
A				
1	6	50	56	0.230
2	8	49	57	0.180
3	15	47	62	0.210
4	23	20	43	0.150
5	12	36	48	0.110
	<b>12.8</b>	<b>40.4</b>	<b>53.2</b>	<b>0.176</b>
B				
1	24	25	49	0.200
2	8	41	49	0.150
3	11	36	47	0.150
4	15	34	49	0.150
5	41	52	93	0.200
	<b>19.8</b>	<b>37.6</b>	<b>57.4</b>	<b>0.170</b>
C				
1	12	14	26	0.120
2	11	16	27	0.080
3	7	50	57	0.210
4	14	14	28	0.120
5	10	21	31	0.100
	<b>10.8</b>	<b>23</b>	<b>33.8</b>	<b>0.126</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 2		
A		
1	4.9	1.2
2	2.3	0.7
3	7.3	1.7
4	2	0.9
5	1.7	0.6
B		
1	4.4	1.5
2	3.2	0.9
3	3.1	0.9
4	3.4	0.7
5	6	1.3
C		
1	2.6	0.8
2	1.9	0.6
3	7.3	1.8
4	4.1	1
5	1.3	0.3

Tratamie	N° nódulos raíz	N° nódulos raíz	N° total	Peso seco
N° 3				
A				
1	20	6	26	0.090
2	18	22	40	0.170
3	23	26	49	0.180
4	3	18	21	0.090
5	9	14	23	0.130
	<b>14.6</b>	<b>17.2</b>	<b>32.4</b>	<b>0.130</b>
B				
1	21	26	47	0.210
2	14	39	53	0.260
3	23	29	52	0.322
4	19	23	42	0.240
5	20	28	48	0.270
	<b>19.4</b>	<b>31</b>	<b>48.4</b>	<b>0.260</b>
C				
1	8	89	97	0.70
2	30	54	84	0.330
3	30	53	83	0.250
4	18	46	64	0.220
5	33	35	68	0.240
	<b>23.8</b>	<b>55.4</b>	<b>79.2</b>	<b>0.262</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
N° 3		
A		
1	1.9	0.6
2	4.7	1.4
3	4.6	1.6
4	5.7	1.3
5	4.6	1.1
B		
1	9.9	2.6
2	3.4	0.7
3	7.6	1.5
4	8.2	2.8
5	7.5	2.4
C		
1	4.3	1.2
2	10.1	1.6
3	5.4	1.4
4	7.1	1
5	9.1	1.7

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 4				
A				
1	11	12	23	0.161
2	29	58	87	0.354
3	12	33	45	0.195
4	9	16	25	0.116
5	31	33	64	0.240
	<b>18.4</b>	<b>30.4</b>	<b>48.8</b>	<b>0.213</b>
B				
1	20	35	55	0.211
2	12	40	52	0.170
3	14	22	36	0.180
4	23	52	75	0.254
5	19	23	42	0.176
	<b>17.6</b>	<b>34.4</b>	<b>52</b>	<b>0.198</b>
C				
1	2	26	28	0.087
2	17	47	64	0.235
3	14	11	25	0.147
4	16	23	39	0.122
5	12	35	47	0.208
	<b>12.2</b>	<b>28.4</b>	<b>40.6</b>	<b>0.158</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 4		
A		
1	2.8	1
2	6.6	2.2
3	8.9	2.9
4	1.9	0.5
5	4.2	1.3
B		
1	6.5	1.3
2	5.3	1.5
3	6	1.5
4	8.3	1.9
5	3.6	1
C		
1	0.6	1.6
2	9.1	2.1
3	4.5	1.3
4	3.6	1.1
5	4.3	1.3

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 5				
A				
1	16	23	39	0.170
2	20	55	75	0.367
3	13	45	58	0.215
4	23	54	77	0.424
5	10	15	25	0.086
	<b>16.4</b>	<b>38.4</b>	<b>54.8</b>	<b>0.409</b>
B				
1	19	31	50	0.232
2	20	75	95	0.310
3	28	45	73	0.240
4	14	11	25	0.123
5	22	26	48	0.160
	<b>20.4</b>	<b>37.6</b>	<b>58.2</b>	<b>0.213</b>
C				
1	21	38	59	0.227
2	5	22	27	0.128
3	16	56	72	0.215
4	15	40	55	0.208
5	10	48	58	0.254
	<b>13.4</b>	<b>40.8</b>	<b>54.2</b>	<b>0.206</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 5		
A		
1	4.7	1.7
2	9.9	3.2
3	4.2	1.2
4	10.1	2.8
5	5.6	1.4
B		
1	5.7	1.7
2	5.4	1.3
3	3.4	1
4	3.2	0.8
5	2.8	0.8
C		
1	6.9	1.7
2	3.3	1
3	4.4	1.1
4	6.1	1
5	11.3	3.4

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 6				
A				
1	16	16	32	0.175
2	14	49	63	0.244
3	16	30	46	0.150
4	15	29	44	0.197
5	14	15	29	0.150
	<b>15</b>	<b>27.8</b>	<b>42.8</b>	<b>0.183</b>
B				
1	27	20	47	0.210
2	17	54	71	0.283
3	24	41	65	0.219
4	20	25	45	0.217
5	24	42	66	0.336
	<b>22.4</b>	<b>36.4</b>	<b>58.8</b>	<b>0.295</b>
C				
1	22	55	77	0.264
2	10	20	30	0.164
3	9	28	37	0.132
4	11	8	19	0.091
5	31	24	55	0.189
	<b>16.6</b>	<b>28</b>	<b>44.6</b>	<b>0.168</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 6		
A		
1	1.5	0.5
2	3.2	1.3
3	2	0.8
4	5.9	2
5	3.3	1.1
B		
1	5.3	1.2
2	7	1.7
3	5.5	1.3
4	4.7	1.2
5	6.5	2
C		
1	4.9	1.6
2	6.4	1.6
3	6.5	1.9
4	2.7	0.6
5	6.1	1.3

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 7				
A				
1	17	36	53	0.246
2	15	51	66	0.270
3	10	20	30	0.138
4	22	31	51	0.225
5	18	60	78	0.233
	<b>16.4</b>	<b>39.6</b>	<b>55.6</b>	<b>0.222</b>
B				
1	10	20	30	0.090
2	15	20	35	0.151
3	27	80	107	0.364
4	9	30	39	0.159
5	17	46	63	0.226
	<b>15.6</b>	<b>39.2</b>	<b>54.8</b>	<b>0.199</b>
C				
1	26	46	72	0.250
2	17	36	53	0.212
3	11	12	23	0.114
4	19	31	50	0.160
5	20	29	49	0.217
	<b>18.6</b>	<b>30.8</b>	<b>49.4</b>	<b>0.190</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 7		
A		
1	5.1	1.7
2	5	1.7
3	6.5	1.7
4	2.7	0.9
5	4.7	1.6
B		
1	2.3	0.5
2	5.4	1.7
3	8	1.7
4	5.1	1.7
5	9.3	2.3
C		
1	7.6	1.7
2	5	1.1
3	2.1	0.4
4	3.5	0.8
5	6.9	1.3

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 8				
A				
1	18	34	52	0.250
2	11	37	48	0.240
3	6	22	28	0.081
4	12	10	22	0.113
5	19	23	42	0.184
	<b>12</b>	<b>23</b>	<b>35</b>	<b>0.154</b>
B				
1	18	41	59	0.156
2	10	70	80	0.363
3	12	30	42	0.144
4	22	31	53	0.213
5	5	50	55	0.201
	<b>13.4</b>	<b>44.4</b>	<b>57.8</b>	<b>0.184</b>
C				
1	24	49	73	0.234
2	22	70	92	0.262
3	18	38	56	0.235
4	8	54	62	0.243
5	22	58	80	0.282
	<b>18.8</b>	<b>53.8</b>	<b>72.6</b>	<b>0.251</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 8		
A		
1	10.8	3.7
2	3.3	1.2
3	2.8	0.8
4	2	0.4
5	4.3	1.2
B		
1	3.2	1
2	7.9	1.9
3	8.9	2.7
4	5.1	1.2
5	13.3	3.5
C		
1	2.7	0.9
2	3.2	0.9
3	6.7	1.6
4	3.7	1
5	5.2	1.7

Tratamie	Nº nódulos raíz	Nº nódulos raíz	Nº total	Peso seco
Nº 9				
A				
1	14	12	26	0.117
2	29	34	63	0.223
3	12	11	23	0.100
4	21	24	45	0.204
5	32	30	62	0.258
	<b>21.6</b>	<b>22.2</b>	<b>43.8</b>	<b>0.180</b>
B				
1	31	41	72	0.281
2	10	16	26	0.087
3	23	25	48	0.210
4	23	35	58	0.265
5	12	29	41	0.168
	<b>19.8</b>	<b>29.2</b>	<b>49</b>	<b>0.202</b>
C				
1	13	22	35	0.126
2	23	43	66	0.260
3	11	12	23	0.110
4	12	39	51	0.182
5	13	43	56	0.300
	<b>14.4</b>	<b>31.8</b>	<b>46.2</b>	<b>0.195</b>

Tratamie	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Nº 9		
A		
1	5.2	1.4
2	4.8	1.6
3	1.5	0.4
4	5.8	1.6
5	7.8	2
B		
1	6.3	1.9
2	3.3	0.5
3	6.9	2.3
4	4.3	1.5
5	2.1	0.8
C		
1	2.7	0.8
2	3.5	1.1
3	1.9	0.5
4	2.9	0.6
5	5.4	1.6

<b>Tratamient</b>	<b>Nódulos</b>	<b>Raíz</b>	<b>Raíz</b>	<b>Peso</b>	<b>Rind</b>
<b>1</b>	29,00	15,60	13,00	0,1360	2360
<b>2</b>	48,13	14,46	33,66	0,1570	2750
<b>3</b>	42,53	19,26	34,53	0,2170	2600
<b>4</b>	47,13	16,06	31,06	0,1896	2740
<b>5</b>	55,73	16,80	38,93	0,2762	3020
<b>6</b>	48,00	18,00	30,73	0,2150	2760
<b>7</b>	49,40	18,60	36,53	0,1906	2850
<b>8</b>	55,13	15,13	44,46	0,1966	2920
<b>9</b>	46,33	18,60	27,73	0,1928	2680