

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo final presentado para optar
al grado de Ingeniero Agrónomo



EFICIENCIA AGRONÓMICA DE
***Bradyrhizobium japonicum* EN EL CULTIVO DE SOJA (*Glycine max* (L.)**
***Merrill*) A CAMPO**

Alumna: Carla Bruno

DNI: 27.322.095

Director: Dra. Alicia Thuar

Río Cuarto, Córdoba

Abril 2010

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: EFICIENCIA AGRONÓMICA DE
***Bradyrhizobium japonicum* EN EL CULTIVO DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) A CAMPO**

Autor: Carla Valeria Bruno
DNI: 27.322.095

Director: Dra. María Alicia Thuar

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

(Nombres) **Lenardon, Sergio** _____
 Fernández, Elena _____
 Andrés, Javier _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____.

Secretario Académico

ÍNDICE GENERAL

	Pág.	
I.	INTRODUCCIÓN	1
	A. Origen y difusión en el mundo	1
	B: Etapas del desarrollo	2
	C: Estados vegetativos	3
	D: Estados reproductivos	3
	E: Acumulación y partición de materia seca	4
	F: Acumulación y translocación de nitrógeno	4
	G. Nutrición nitrogenada	4
	H. Inoculación de las leguminosas	10
	I. Características de un buen inoculante	13
	J. Complementarios al inoculante	13
II.	HIPÓTESIS	15
III.	A. OBJETIVO GENERAL	15
	B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
	A. Descripción del área de estudio	16
	B. Evaluaciones	17
	C. Análisis estadísticos	19
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
	A. Clima	20
	B. Resultados del cultivo de soja	23
	B₁ Densidad o stand de plantas	23
	B₂ Número de nódulos totales y discriminados por ubicación sobre raíz principal y laterales	24
	B₃ Peso de nódulos totales	26
	B₄ Peso seco de la parte aérea y de la raíz	27
	B₅ Componentes del rendimiento	28
VI.	CONCLUSIÓN	30
VII.	BIBLIOGRAFÍA	31
VIII.	ANEXO	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°1	Características físico-químicas del suelo	Pág. 20
Cuadro N°2	Valores de densidad	24
Cuadro N°3	Valores de números de nódulos de raíz principal	25
Cuadro N°4	Valores de los nódulos de raíces laterales	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Ubicación geográfica	Pág. 16
Figura N° 2	Curva de cronología anual desde 1939-2004 y la medida histórica (mm)	21
Figura N° 3	Datos de precipitaciones del promedio histórico (mm) y del año de estudio	22
Figura N° 4	Diferencia de precipitaciones entre la media histórica (mm) y las precipitaciones durante el ensayo	22
Figura N° 5	Número de nódulos totales según tratamientos	25
Figura N° 6	Peso seco de nódulos totales	26
Figura N° 7	Peso seco de parte aérea	27
Figura N° 8	Peso seco de parte radicular	28
Figura N° 9	Rendimiento	28
Figura N° 10	Peso de 1000 semillas	29

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Cuadro N°1 Valores de nódulos totales	36
Cuadro N°2 Valores de peso seco de nódulos totales	36
Cuadro N°3 Valores de peso seco de parte aérea.	36
Cuadro N°4 Valores de peso seco de parte radicular	37
Cuadro N°5 Valores de rendimiento	37
Cuadro N°6 Valores de peso de 1000 granos	37

RESUMEN

El nitrógeno es el principal nutriente limitante para la producción de soja y a pesar de ser un elemento abundante en la atmósfera, no siempre está disponible para las plantas. Las simbiosis entre leguminosa y bacterias del género *Rhizobium*, cubre parte de las necesidades nitrogenadas a partir de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN). El objetivo de este trabajo fue establecer los efectos del tratamiento de semillas inoculadas a los 0, 7 y 15 días previos a la siembra, sobre la nodulación y producción de soja. El ensayo se realizó durante el ciclo 2004 en la localidad de Bengolea, Córdoba. El diseño experimental fue en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones y el estadístico utilizado fue el programa Infostat. Los tratamientos fueron: T1 testigo (semilla sin inocular); T2; T3 y T4 semillas inoculadas a los 0, 7 y 15 días antes de la siembra; T5, T6 y T7 semillas inoculadas + fungicida + protector a los 0, 7 y 15 días antes de la siembra. Se determinó peso seco aéreo y de la raíz, número de nódulos de raíz principal y de raíces laterales; peso de nódulos totales, densidad y rendimiento. Los tratamientos cuya formulación sólo incluía al inoculante mostraron mejores resultados que los tratamientos en que, tanto protector como fungicida participaron de la formulación. El tratamiento con semillas inoculadas al momento de la siembra fue el que presentó los valores más altos en el número de nódulos totales, en el número de nódulos en la raíz principal, en los gramos de nódulos totales y consecuentemente en el rendimiento. El tratamiento que secundó estos resultados fue el de semillas inoculadas 7 días antes de la siembra. El mayor establecimiento de plantas se logró en los tratamientos en donde la formulación incluía fungicidas.

Palabras claves: Nitrógeno- Fijación Biológica. Inoculación- Nodulación

SUMMARY

Nitrogen is the main limiting nutrient for soybean production, but in spite of being an abundant element in the atmosphere, it is not always available for plants. Symbiosis between legumes and nitrogen-fixing bacteria (*Rhizobium*) cover part of the nitrogen needs from biological fixation of atmospheric nitrogen. The aim of this study was to determine the effects of treatment of soybean seeds inoculated at 0, 7 and 15 days prior to planting on nodulation and production. The test was carried out in 2004 in Bengolea, Cordoba. The experimental design was in randomized complete blocks with three repetitions and the data were analysed with the program Infostat. The treatments groups were: T1 witness (non inoculated seeds); T2, T3 and T4: seeds inoculated at 0, 7 and 15 days prior to planting; T5, T6 and T7: inoculated seeds + fungicide + protector at 0, 7 and 15 days prior to planting. Air dry air weight, root weight, number of nodules in the main root and lateral roots; weight of total nodules, density and yield potential were determined. Results show that the treatments which included only inoculants in their formulation showed better results than those which included protector and fungicide. The treatment with seeds inoculated at the time of planting presented the highest values in the number of total nodules, in the number of nodules in the main root, in the weight of total nodules and consequently in yield. The treatment which was second in values was the one with seeds inoculated 7 days prior to planting. The biggest number of plants was achieved in treatments where the formulation included fungicides.

Key words: Nitrogen- Biological fixation. Inoculation- Nodulation

I. INTRODUCCIÓN

Origen y difusión en el mundo:

La soja (*Glycine max (L.) Merrill*) surge aproximadamente en el siglo XI a.C. y es nativa del norte y centro de China (Fehr y Caviness, 1977). En América fue introducida por Estados Unidos en 1765.

En la Argentina, las primeras plantaciones se hicieron en 1862. En 1909 se comenzó a ensayar en distintas Escuelas Agrícolas Argentinas, pero recién para 1965 se intensificó la investigación sobre el tema. A pesar de los buenos resultados, el cultivo no logró obtener difusión entre los productores (Pascale, 1989).

A partir de la década del `70, la producción de soja ha venido creciendo constantemente en nuestro país debido a incrementos tanto en la superficie sembrada como en los rendimientos unitarios. Esta producción agrícola impulsó el desarrollo de industrias para elaboración de aceites con importante participación en el mercado internacional, localizadas en las áreas de producción y equipadas con las modernas tecnologías a nivel mundial.

La soja, es actualmente la oleaginosa más difundida del país, ocupa el primer lugar en el mundo como exportadora de aceite de soja y lidera junto a Brasil la exportación de harina de soja. La producción nacional de soja 2007/08, coloca a la Argentina en el cuarto lugar en el mundo (SAGPyA, 2009).

La principal razón del incremento en la producción, a partir de la década del 90', fue la adopción de semilla genéticamente modificada cuya resistencia al herbicida glifosato permite su utilización durante todo el ciclo del cultivo. Así, la variedad transgénica tolera las aplicaciones de glifosato (Franco, 2004).

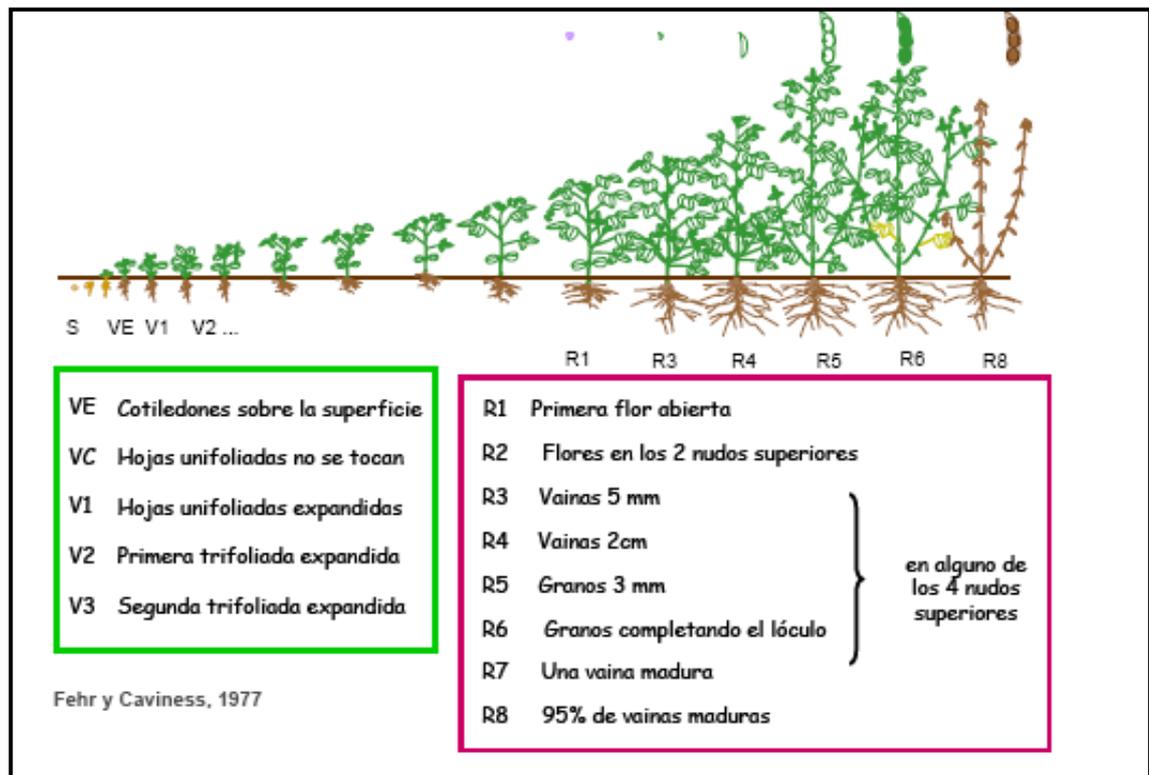
Casi la totalidad de la superficie sembrada corresponde a soja genéticamente modificada expandiéndose así el cultivo hacia otras regiones donde antes no se producía. El empleo de esta semilla, permite reducir el número de agroquímicos además de facilitar la siembra directa y disminuir costos de producción. La soja ha modificado la estructura de la producción agropecuaria y agroindustrial de nuestro país desplazando a otros cultivos tradicionales como girasol, maíz o sorgo, e incluso numerosos productores ganaderos o lecheros abandonaron su actividad para dedicarse al cultivo de la soja, alentados por lo menores costos de producción y mayores márgenes de ganancia (Franco, 2004).

La planta de soja es una dicotiledónea anual primavero-estival. La parte aérea de la planta consta del tallo principal, ramas, hojas y pecíolos. El tallo principal, de altura variable, presenta un número de nudos que oscilan entre 14 y 20, dependiendo de la latitud, época y densidad de siembra, longitud del ciclo y hábito de crecimiento del cultivar. La soja presenta yemas en las axilas de los cotiledones y de las hojas unifoliadas o trifoliadas.

Dichas yemas pueden producir una rama o ramillete floral de color púrpura o blanco, o permanecer latentes (Ritchie *et al.*, 1985). El fruto es una vaina que se forma desde la flor en la etapa reproductiva. De cada 100 flores se desarrollan entre 20 y 50 vainas. Cada vaina madura contiene entre dos y cuatro granos. En los nudos de las hojas trifoliadas se encuentran tres yemas, una central y dos axiales. La cantidad y ubicación de los puntos de crecimiento de la soja le otorgan una importante capacidad para recuperarse de diferentes daños. El sistema radical cuenta con una raíz principal, pivotante, un gran número de raíces secundarias que se ramifican profundamente y raíces adventicias muy ramificadas que salen de la base del hipocótilo (Ritchie *et al.*, 1985). Sus principales características son: importante respuesta fotoperiódica, alta plasticidad reproductiva y producción de semillas con elevados contenidos de proteínas y aceite (Duncan, 1985).

Etapas del desarrollo:

El desarrollo comprende los cambios cualitativos que ocurren en una planta a lo largo de su ciclo biológico. La clasificación propuesta por (Fehr y Caviness, 1977), emplea dos escalas: una para los estados vegetativos y otro para los reproductivos.



Estados vegetativos:

- **Siembra**: La **germinación** comienza con la imbibición de la semilla, ésta absorbe agua por 50% del equivalente de su peso total.
- **VE: Emergencia**. Los cotiledones emergen sobre el suelo. Primero emerge el hipocótilo en forma de arco, luego arrastra los cotiledones y el epicótilo hacia fuera.
- **VC: Cotiledonar**. Los cotiledones se despliegan quedando horizontales a ambos lados del eje principal. Se expanden las dos primeras hojas, que son unifoliadas.
- **V2: Dos nudos**. Las plantas tienen entre 15 y 20 cm. de altura y tres nudos con hojas con folíolos desplegados (el nudo unifoliado y los dos primeros nudos con hojas trifoliadas).
- **V5/R1: Cinco nudos**. Las yemas axilares del tallo comienzan a desarrollar ramificaciones y flores. Estas yemas le otorgan capacidad de recuperarse ante el ataque de plagas o granizo.

Estados reproductivos:

- **R2: Plena floración**. Una flor abierta en uno de los dos nudos superiores del tallo principal con una hoja completamente desplegada. Marca el período de máxima acumulación de materia seca y nutriente hasta R6.
- **R3/R4: Formación de vainas**. Las vainas crecen rápida y constantemente alcanzando el largo y el ancho máximo antes que crezcan las semillas.
- **R5: Llenado de granos**. Este período está caracterizado por el rápido crecimiento de las semillas o llenado de granos. La ocurrencia de estrés afecta negativamente el rendimiento (su capacidad de recuperación es baja).
- **R7: Inicio de madurez**. La madurez fisiológica de una semilla ocurre cuando la acumulación de peso seco (llenado) se detiene. Esto ocurre cuando la semilla y la vaina se tornan de un color amarillento.
- **R8: Plenitud de madurez**. Cuando una planta de soja se encuentra en este período, puede probarse su madurez sacudiéndola y logrando un efecto sonajero proveniente de los granos sueltos dentro de las vainas.

Acumulación y partición de materia seca:

La acumulación de materia seca en el cultivo tiene distribución en forma sigmoide. Al principio del ciclo es lenta y se hace máxima generalmente a partir del comienzo de la floración, durante el establecimiento de los frutos y la primera parte de llenado de los granos. Este período de máxima tasa de crecimiento decrece durante la etapa final del llenado de los granos (Ritchie *et al.*, 1985).

La etapa de acumulación de materia seca máxima y constante se produce inicialmente sobre las estructuras vegetativas (hojas, tallos, pecíolos y raíces) y luego gradualmente cambia hacia las vainas y semillas. Poco después de R5 se alcanzan los valores máximos de materia seca vegetativa (Shibles y Weber, 1965).

Acumulación y translocación de nitrógeno:

La acumulación de N sigue una función muy similar a la acumulación de materia seca, es decir que, al principio del ciclo del cultivo la tasa de asimilación es baja y luego va incrementándose hasta llegar a un máximo durante el período de floración y establecimiento de los frutos (Hume *et al.*, 1989). Durante el período de llenado de las semillas la demanda de N es muy alta y una importante proporción del N foliar es removilizado hacia las mismas. Una reducida tasa asimilatoria de N, ya sea durante el período vegetativo o durante el llenado de los granos, así como una redistribución incompleta del mismo, determinan pérdidas en el potencial de rendimiento de la soja. Hanway y Weber (1971) informaron que las semillas son el principal destino de acumulación de nitrógeno proveniente de la removilización de otras partes vegetativas.

El rendimiento de soja se relaciona de manera positiva con la absorción de N por la planta. Esto fue confirmado por Salvagiotti y Miralles (2008), quienes sobre la base de 637 ensayos realizados principalmente en EEUU entre los años 1966 y 2006, observaron un incremento en los rendimientos de 13 kg. grano por kg. N acumulado en biomasa aérea.

Nutrición nitrogenada:

La soja es una especie oleaginosa que presenta una alta acumulación de proteínas en las semillas, lo cual la convierte en el cultivo con la mayor demanda de N y la menor producción de biomasa de semilla por unidad de fotoasimilado producido (Sinclair y De Wit, 1975).

Por eso, el N es el nutriente más crítico. Si no existen limitantes mayores, el rendimiento de la soja es función directa de la capacidad de acumular N que exhiba el cultivo (González *et al.*, 1997).

El contenido de N en las semillas dependerá de la tasa de acumulación de N en la planta durante el desarrollo de las semillas, la tasa de acumulación de N en semillas, la longitud del período de llenado y la cantidad de N acumulado previamente en los órganos vegetativos, susceptibles de ser translocado a las semillas (Quijano *et al.*, 1995).

En su carácter de leguminosa, la soja puede cubrir sus requerimientos de N a partir del aporte del suelo, por la mineralización de N orgánico; el aire, por medio de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la fertilización (Buttery *et al.*, 1991). Cuando inicia el llenado de granos, la tasa de asimilación de N comienza a declinar. Por ello, la acumulación de N en las semillas es función de la acumulación de N en los tejidos vegetativos (Hume *et al.*, 1989).

El nitrógeno es, después del agua, el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Por esta razón, en el periodo entre 1950 y 1990, se incrementó 10 veces en España el uso de fertilizantes nitrogenados, lo que, a su vez, originó un aumento sin precedentes de la productividad en los cereales. Sin embargo, la aplicación de estos fertilizantes, y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del N y han contribuido a la contaminación de los ecosistemas terrestre y acuáticos con graves riesgos para la salud humana (de Felipe, 2006).

A pesar de la gran cantidad de N en forma libre en la atmósfera (N₂), su disponibilidad para las plantas es limitada ya que no es fácilmente asimilable por los organismos. Por eso, la agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos para mantener altas producciones agrícolas.

La FBN es llevada adelante por algunos microorganismos procariotas (bacterias y cianobacterias) que tienen la capacidad de atrapar y aprovechar el nitrógeno de la atmósfera, a través de una reacción química donde se rompen los enlaces entre los átomos de nitrógeno (a temperatura ambiente y presión parcial de 0.78 atm.) y se incorporan átomos de hidrógeno para fabricar amoníaco (NH₄⁺), un compuesto que los organismos sí son capaces de procesar metabólicamente. Las bacterias fijadoras de nitrógeno poseen una enzima llamada “nitrogenasa”, que es la encargada de la ruptura del triple enlace del nitrógeno molecular y de la formación del amoníaco (Porquebiotecnología, 2007).

Estas bacterias presentan una amplia diversidad taxonómica, con diferentes asociaciones con los vegetales. Sin embargo, sólo una pequeña proporción son capaces de llevar a cabo el proceso de fijación.

Las más eficientes son aquellas que se asocian con las plantas a través de estructuras diferenciadas llamadas “nódulos”, localizados en la raíz de las leguminosas o de las plantas actinorrizas. En el interior de estas estructuras se localizan los microorganismos, desarrollando una verdadera simbiosis con la planta (Baca *et al.*, 2000).

Aunque hay diversas asociaciones que contribuyen a la FBN, en la mayoría de los agroecosistemas el 80% del nitrógeno fijado biológicamente ocurre mediante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. Esta asociación se produce a través de un proceso de reconocimiento específico entre la bacteria y la raíz de la planta (Porquebiotecnología, 2007).

La simbiosis es la convivencia de dos organismos no semejantes en una relación de beneficio mutuo generándose una interdependencia fisiológica.

En el caso de la simbiosis leguminosa-rizobio, el microsimbionte, la bacteria, utiliza el carbono y la energía fotosintética del macrosimbionte (la planta) y le entrega amoníaco, producto de la fijación de N_2 atmosférico. Este proceso se lleva a cabo en los nódulos. La morfología de los nódulos varía según las leguminosas. En general las más tropicales, (como la soja), tienen nódulos redondos de crecimiento determinado. En éstas, el tejido de crecimiento se ubica en forma radial y una vez alcanzado su máximo desarrollo, dejan de crecer (Nitragin, 2007).

En suelos ricos en N, las leguminosas prefieren utilizar la forma inorgánica del suelo, independientemente de la presencia de las bacterias. Por el contrario, si la misma está presente y los niveles de N del suelo son bajos, la planta estimula el ingreso de los rizobios a la raíz, que fijarán N_2 atmosférico.

Aunque la FBN alcanzaría a cubrir un 50 a 60 % de la demanda total (Salvagiotti y Miralles, 2008), resulta todavía insuficiente para cubrir la extracción de N a través de los granos cosechados.

Como la planta debe producir los compuestos carbonados, existe una relación directa entre fotosíntesis y FBN; por lo tanto, ésta se relaciona estrechamente a la producción de biomasa aérea y rendimiento: cuanto mayor sea la biomasa aérea, mayor será la fotosíntesis, y habrá mayor fijación (Nitragin, 2007).

Las leguminosas, en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, cubren parte de sus necesidades nitrogenadas a partir de la FBN. Este proceso resulta crítico para la producción con altos rendimientos en cultivos de soja, arveja, alfalfa y maní. Las bacterias del género *Rhizobium* forman parte de los microorganismos PGPR (plant growth promoting rizobacteria) de la rizosfera, los cuales, tienen la capacidad de promover el crecimiento de los cultivos.

Entre los mecanismos de promoción se encuentra la conversión del nitrógeno atmosférico en amonio (fijación biológica del nitrógeno) una forma químicamente aprovechable por las plantas (Okon y Labandera Gonzáles, 1994).

Los rizobios son bacilos Gram negativos de vida libre, móviles, incapaces de formar esporas y son mesófilos. Se alimentan de la descomposición de organismos muertos, materia orgánica o compuestos químicos secretados por las raíces de las plantas. El pH óptimo para el desarrollo se sitúa entre 6,8 y 7,2 y su tiempo de duplicación varía entre dos y cuatro horas para los llamados “fastgrowers” (crecimiento rápido), que generalmente, forman colonias relativamente grandes (2 a 4 mm. de diámetro) en tres a cinco días y un tiempo de multiplicación de seis a ocho horas para los llamados “slow growers” (crecimiento lento) (bradyrizobios) que producen colonias de 1 mm de diámetro en siete a diez días (Nitrasoil, 2007). Dentro de los nódulos radicales; donde pasan a llamarse bacteroides; se tornan pleomórficas, aumentan su tamaño, se alimentan de formas carbonadas sintetizadas por la planta huésped (leguminosas), requieren bajo nivel de oxígeno, y fijan nitrógeno atmosférico que le entregan a la planta (Nitragin, 2007).

Cualquier leguminosa no puede ser nodulada por cualquier rizobio, debe haber una especificidad rizobio-planta huésped. Existen grupos de especies de leguminosas que pueden ser efectivamente noduladas por la misma especie de rizobio, denominados grupos de inoculación cruzada. Esta especificidad fue usada originalmente para clasificar a los rizobios (Nitragin, 2007).

Una vez germinada la semilla, la rizósfera presenta condiciones favorables para la multiplicación de los rizobios y para que se inicie el proceso de nodulación.

Para el establecimiento de nódulos funcionales ocurren varias etapas (Nitragin, 2007).

1. Reconocimiento mutuo planta-rizobio específico mediante señales bioquímicas
2. Adherencia de los rizobios a los pelos absorbentes
3. Enroscamiento de los pelos absorbentes
4. Invasión del pelo radical y formación de un cordón infeccioso
5. Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección
6. Ingreso de las bacterias a las células de la raíz y diferenciación de los bacteroides
7. Establecimiento del nódulo funcional maduro

Tanto la efectividad como la infectividad están reguladas genéticamente, pero también están vinculadas con los factores ambientales que afectan a la planta (Nitragin, 2007).

La FBN de N₂ tiene un alto costo energético para la planta. Para generar esa energía, debe consumir más compuestos carbonados.

Por lo tanto, y si bien ambos simbioses (planta y bacteria) intervienen en la formación de nódulos, en presencia de rizobios específicos e infectivos, es la leguminosa quién regula la nodulación al definir la provisión de energía. En condiciones óptimas de crecimiento (temperatura, humedad, etc.), es la leguminosa la que manda la primer señal a la bacteria y continúa colaborando en la formación del nódulo. Sin embargo, los factores ambientales, como el exceso de nitrógeno, o algún tipo de estrés condicionarán directamente este proceso. La regulación se produce por la alteración de mecanismos fisiológicos (como puede ser limitando la secreción de moléculas receptoras de rizobio, disminuyendo el número de pelos absorbentes), que impiden la nodulación, o eliminan los nódulos ya establecidos (Nitragin, 2007).

En la nodulación, tanto la asociación rizobio-leguminosa como su funcionalidad, son afectadas positiva o negativamente por las condiciones ambientales durante su ciclo de vida. La ocurrencia de factores ambientales adversos (estrés por temperatura, humedad, acidez, etc.) afecta la supervivencia de los rizobios, disminuyendo el número de la población naturalizada o introducida con el inoculante.

- **Temperatura**

- ✓ La temperatura afecta la persistencia de los rizobios en inoculantes y puede influir sobre su supervivencia en el suelo. Además, puede limitar tanto la nodulación como la fijación de nitrógeno. En general, las temperaturas del suelo superiores a 40 °C limitan la nodulación; mientras que las bajas, retardan el desarrollo de la planta, la formación de nódulos y consecuentemente, disminuyen las tasas de fijación de N₂ (Roughlet, 1970; Zaharan y Sprent, 1986).

- **Humedad**

- ✓ El número de rizobios del suelo se reduce a medida que el suelo se seca; la resistencia de los rizobios a la sequía, aún dentro de una especie, es muy variable. La FBN es un proceso muy lábil al déficit hídrico, en este caso, la planta, como primera medida, inactiva la nitrogenasa, y por lo tanto la fijación de N₂.
- ✓ El anegamiento también afecta a los miembros de esta simbiosis, rizobio y leguminosa, al generar anaerobiosis en el suelo. En soja, las condiciones de anoxia completa, detienen enteramente el crecimiento radical en 2 a 3 minutos. Cuando el estrés no se prolonga más de 30 minutos la tasa de crecimiento retorna a la normalidad. Pero si dura más de 5 horas causa la muerte de las raíces (Weisz *et al.*, 1985).

- **Salinidad**

- ✓ Las leguminosas y el proceso de iniciación nodular son altamente sensibles al estrés salino, probablemente por la inhibición en el desarrollo de los pelos absorbentes.
- ✓ En soja se observó que una vez formados los nódulos, la fijación biológica de N₂ se lleva a cabo, pero puede ser afectada indirectamente al reducirse la tasa de crecimiento del cultivo (Zaharan, 1991; Georgiev y Atkins, 1993).

- **Acidez**

- ✓ La acidez del suelo afecta a todos los aspectos de la simbiosis, desde la supervivencia y multiplicación de los rizobios en el suelo, la infección y nodulación hasta la fijación de N₂ (Howieson *et al.*, 1992).
- ✓ Es de importancia el efecto del pH sobre los nutrientes del suelo. El pH bajo, generará por ejemplo, deficiencias de fósforo disponible, nutriente importante para la fijación de N₂ (Coventry y Evans, 1989).

- **Estrés biológico**

- ✓ La supervivencia de los rizobios en vida libre, como la de cualquier bacteria, está condicionada a la competencia con otros microorganismos, a los efectos antibióticos (Ej.: hongos) y a la predación por otros organismos (Ej.: protozoos) (Ramírez y Alexander, 1980; Whight *et al.*, 1993).

- **Nutrición mineral**

- **Nitrógeno:**

- ✓ El exceso de nitrógeno en el suelo especialmente en forma de nitratos, tiene un efecto inhibitorio sobre la simbiosis en todos los pasos, desde la infección, formación del nódulo y la fijación de N₂.
- ✓ Los niveles bajos de nitrógeno en los primeros estadios vegetativos en los que todavía los nódulos no son funcionales pueden ser beneficiosos.

- **Fósforo:**

- ✓ La simbiosis rizobio-leguminosa es altamente sensible a la carencia de fósforo. Para que sea posible la nodulación y fijación de N₂, es necesario un aporte adecuado de fósforo. Cuando la concentración de P en la planta es inferior al 0.2% la nodulación y la fijación de N₂ son casi despreciables.

- **Azufre:**

- ✓ El azufre cumple una función en el metabolismo de los nódulos y forma parte de ciertas proteínas que intervienen en la reducción del N₂. No se ha descrito el efecto directo de este elemento sobre la nodulación.

- **Micronutrientes**

- ✓ En el proceso de fijación biológica intervienen sustancias químicas (enzimas, proteínas y otros compuestos) que tienen en su constitución micronutrientes. Sus carencias generan por lo tanto fallas en el proceso de fijación (www.nitragin.com.ar; 2007).
- ✓ Las condiciones de estrés (sequía a la siembra, retardo en la emergencia de la radícula, etc.) afectan a las cepas introducidas, ya que éstas no están adaptadas a sobrevivir ante factores adversos. Si las condiciones ambientales en el momento de la inoculación y de manejo del inoculante son adversas (Ej.: falta de humedad a la siembra, etc.) generarán la muerte de cepas introducidas con el inoculante disminuyendo su número y predominarán las cepas naturalizadas, prevaleciendo los nódulos en raíces laterales.
- ✓ La siembra directa, al mantener más humedad en el suelo que las labranzas con remoción, provee mejores condiciones de sobrevivencia para las bacterias del inoculante y una mejor nodulación sobre la raíz principal.
- ✓ En el campo, la observación del cultivo (color de la parte aérea, presencia, tamaño, ubicación y color del interior de los nódulos) permite diagnosticar el éxito de la nodulación y de la efectividad de esos nódulos.
- ✓ Según la ubicación de los nódulos en la raíz, se puede estimar el éxito de la práctica de inoculación (Fernández Canigia, 2003).
- ✓ La nodulación en la corona de la raíz (sobre un cilindro imaginario de 2 cm. alrededor de la raíz principal) sugiere que los nódulos provienen mayormente del inoculante (inoculación exitosa).
- ✓ La ausencia de nódulos en la corona y presencia de los mismos en los extremos de las raíces laterales, sugiere que la nodulación proviene fundamentalmente de las cepas naturalizadas (fallas en la inoculación).

Inoculación de las leguminosas

La inoculación de las semillas se define como la práctica de incorporar los rizobios específicos del inoculante a las semillas, antes de sembrar. De esta manera, la rizósfera tendrá la cantidad de rizobios específicos requeridos para infectar la raicilla naciente y competir favorablemente frente a los otros microorganismos que existen en el suelo (Nitrasoil, 2007).

Un inoculante es un cultivo puro de una determinada cepa de rizobios (en ciertos casos particulares, como en soja, pueden ser más de una cepa) en altísima concentración, en un soporte que permita su aplicación sobre la semilla de la correspondiente leguminosa, antes de la siembra.

La inoculación es una práctica razonable de adoptar, con la finalidad de proveer al cultivo aportes de la FBN y otros estimuladores biológicos del crecimiento (Iglesias *et al.*, 2000).

En nuestros suelos hay baja cantidad de rizobios nativos capaces de nodular soja y además, normalmente, se siembra la semilla “curada” con fungicidas. Ambos aspectos son muy importantes al considerar en la inoculación (Labandera, 2007).

Los fungicidas constituyen el medio más efectivo para el control de enfermedades pero su uso ha demostrado traer importantes y adversas consecuencias ecológicas para la salud humana y para el equilibrio natural de la micro biota del suelo (Andrés *et al.*, 1999).

El uso de inoculantes para la provisión de bacterias fijadoras de nitrógeno resulta más conveniente y económico que la fertilización química, evitando además la contaminación ambiental. Es entonces importante, entender cómo y porqué ocurre este proceso de fijación biológica del nitrógeno, de modo de poder tomar las decisiones correctas para obtener de la inoculación, el máximo beneficio.

El uso de inoculantes para los cultivos de leguminosas continúa creciendo en EEUU, Canadá, Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay. Esto se debe en parte a la aparición de nuevas formulaciones y a la aplicación de nuevas técnicas que hacen de la inoculación una práctica más beneficiosa (Nitragin, 2007).

La alta demanda de nitrógeno de la soja, estimada en unos 80 kg. tn⁻¹ de grano producida, es mayoritariamente cubierta a partir del proceso de fijación biológica de N atmosférico en la simbiosis entre leguminosa y los rizobios. El cultivo obtiene entre el 30 y el 94 % de sus requerimientos de N a partir de esta simbiosis (Hungria y Campo, 2004; Peticari, 2005; Collino *et al.*, 2007).

La inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* permite, en promedio, aumentos de rendimientos de entre 200 y 900 kg. ha⁻¹ en cultivos desarrollados en lotes con y sin historia sojera, respectivamente (Martinez Lalis, 2000; Hungria *et al.*, 2006; Ferraris y Couretot, 2006). Si bien la mayoría de los suelos cultivados con soja presentan poblaciones naturalizadas de rizobios, abundan los estudios que muestran aumentos de aproximadamente el 8 % en los rendimientos al inocular anualmente el cultivo (Hungria *et al.*, 2006; Peticari, 2005).

En la bibliografía se plantea que la nodulación en la raíz principal (RP) es una característica cualitativa que suele ser de utilidad para determinar la calidad de la nodulación y que los nódulos presentes en RP han sido formados por las cepas introducidas con el inoculante en las primeras etapas del cultivo, mientras que los de raíces secundarias (RS) son colonizados por cepas naturalizadas y son mas numerosos, de menor tamaño y con menor actividad fijadora (Papakosta, 1992; Díaz Zorita y Fernández Canigia, 1999; Fernández Canigia, 2003). Los patrones de nodulación respondieron a los de un suelo con buena dotación de población naturalizada y son coincidentes con lo informado por otros autores para la región sojera núcleo (Toresani *et al.*, 2006; Ventimiglia *et al.*, 2003).

La adopción de la técnica de inoculación como estrategia de manejo resulta de significativa importancia debido a la gran cantidad de hectáreas sembradas con esta leguminosa. Según estimaciones en la campaña 2008-2009 en Argentina se sembraron 16.500.000 hectáreas de soja (SAGPyA, 2009).

La inoculación se puede considerar alta en nuestro país. Una encuesta realizada por una empresa productora de inoculantes en 2003, indica que el 79 % de los productores inocula siempre sus cultivos de soja y el 93 % de los técnicos asesores recomienda esa práctica. La encuesta revela también, que el 90 % de la superficie sembrada se inocula. En 2004, una segunda encuesta establece que el 87 % de la soja se inocula, tanto sea de primera como de segunda y que el 94 % de los productores conoce cuáles son los beneficios de la inoculación; asimismo, pone de manifiesto que el 78 % de los productores elige los inoculantes líquidos.

Un protector bacteriano de aplicación conjunta con el inoculante es un agente de protección del microsimbionte ante condiciones adversas tales como la desecación celular (Curley *et al.*, 1975) y resguardante del efecto tóxico de productos químicos que están presentes sobre la semilla y que interactúan con el inoculante (Thompson, 1960).

En áreas sojeras nuevas que no poseen rizobios naturalizados, es indispensable la inoculación con cepas altamente eficientes, dado que, en caso contrario, la producción se ve disminuida significativamente. En suelos previamente cultivados con soja, los rizobios incorporados al suelo por las inoculaciones de años anteriores se naturalizan y compiten por la formación de nódulos con las cepas de las siguientes inoculaciones y permanecen en el suelo en concentraciones del orden de 10^1 o 10^2 bacterias por gramo de suelo (Herridge *et al.*, 1984).

Solamente entre el 10 y el 20% de los nódulos formados proceden de las cepas inoculadas y el impacto de la inoculación se reduce a incrementos del orden de los 10% en el rendimiento, con frecuencia no significativos y con aumentos variables en la proporción de

proteína de los granos. Sin embargo, esto no implica que el proceso de FBN no esté funcional; simplemente lo está en base al predominio de las cepas presentes en el suelo (González, 2003).

Como ya se manifestó, en nuestro país la producción de soja depende de los aportes de N disponibles en el suelo y de la FBN originada en la simbiosis, ya que es muy bajo el consumo de fertilizantes químicos nitrogenados. En los últimos años, a través de numerosos ensayos experimentales empleando productos inoculantes de excelente calidad, se determinó que al utilizar cepas con máximo potencial fijador se pueden incrementar significativamente los rendimientos incluso en ambientes con cultivos sucesivos de soja (Perticari *et al.*, 2006).

Características de un buen inoculante:

Especificidad: La inoculación de una leguminosa debe realizarse únicamente con la especie específica para esa leguminosa (por ej.: *Sinorhizobium meliloti* para alfalfa y *Bradyrhizobium japonicum* para soja). No habrá nodulación si no utiliza el inoculante correcto.

Número: En nuestro país la legislación indica que un inoculante debe tener al menos 1×10^9 ufc/ml a la elaboración, no menos de 1×10^8 ufc/ml al vencimiento del inoculante y no menos de 80.000 bacterias por semilla. Debe ser mantenido en lugar fresco y oscuro.

Esterilidad: cuando nos referimos a esterilidad en un inoculante, se habla de la esterilidad del soporte sobre el cual se mezcla el rizobio específico. En la actualidad gran parte de los inoculantes en base turba y todos los inoculantes acuosos son estériles, lo que elimina la competencia microbiana (Nitragin, 2007).

Complementarios al inoculante:

Lo más común es también aplicar curasemillas que se utilizan para proteger las semillas y plántulas de patógenos. Son productos químicos compuestos por principios activos y otras sustancias químicas acompañantes (“excipientes”). Por aplicarse sobre la semilla, estarán en contacto con los rizobios específicos incorporados en el momento de la inoculación. Por lo tanto, los formulados, principios activos y excipientes, deben ser inocuos para las bacterias, de lo contrario se afectará el número de rizobios por semilla y consecuentemente, la nodulación.

El protector utilizado permite en una sola operación la preinoculación y el tratamiento con fungicidas hasta 20 días antes de la siembra.

En general, los fungicidas (letales únicamente para hongos) actúan de un modo diferente a los bactericidas (letales para bacterias).

Sin embargo, la formulación química en algunos funguicidas puede afectar a las bacterias por su acción biocida directa o como la haría el contacto directo con cualquier producto químico. Este concepto es extensivo a los insecticidas, nematicidas y herbicidas (Nitragin, 2007).

Entre los productos activos de funguicidas compatibles con la supervivencia del rizobio se destacan el thiram y el carbendazim (Nitragin, 2007).

II. HIPÓTESIS

- El momento de inoculación incide sobre la fijación biológica del nitrógeno y productividad de soja.

III. A) OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los efectos del tratamiento de semillas inoculadas al momento de la siembra y a los 7 y 15 días previos a la misma, sobre la nodulación y producción de soja.

III. B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar el efecto de la inoculación en tiempo 0, 7, 15 días sobre la densidad de plantas.
- Evaluar la nodulación: número y biomasa nodular a los 45 días desde la siembra discriminando por ubicación sobre raíz principal y laterales.
- Realizar mediciones de materia seca de la parte aérea y de raíces, en gramos, por separado.
- Determinar peso seco aéreo y radical.
- Analizar del rendimiento y comportamiento del mismo en madurez fisiológica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio:

El ensayo experimental se realizó en el sur de la Provincia de Córdoba, próxima a la localidad de Bengolea (9 km al norte), ruta provincial N° 11, km 49, ubicada dentro del departamento Juárez Celman., comprendida geográficamente en los 32° 57' 0014'' de latitud sur y 63° 38' 0549'' de longitud oeste y a 225 m.s.n.m (Figura 1). El periodo de análisis estuvo comprendido entre enero y junio de 2004. El cultivo antecesor en el lote utilizado fue soja. El suelo es un Hapludol Típico.

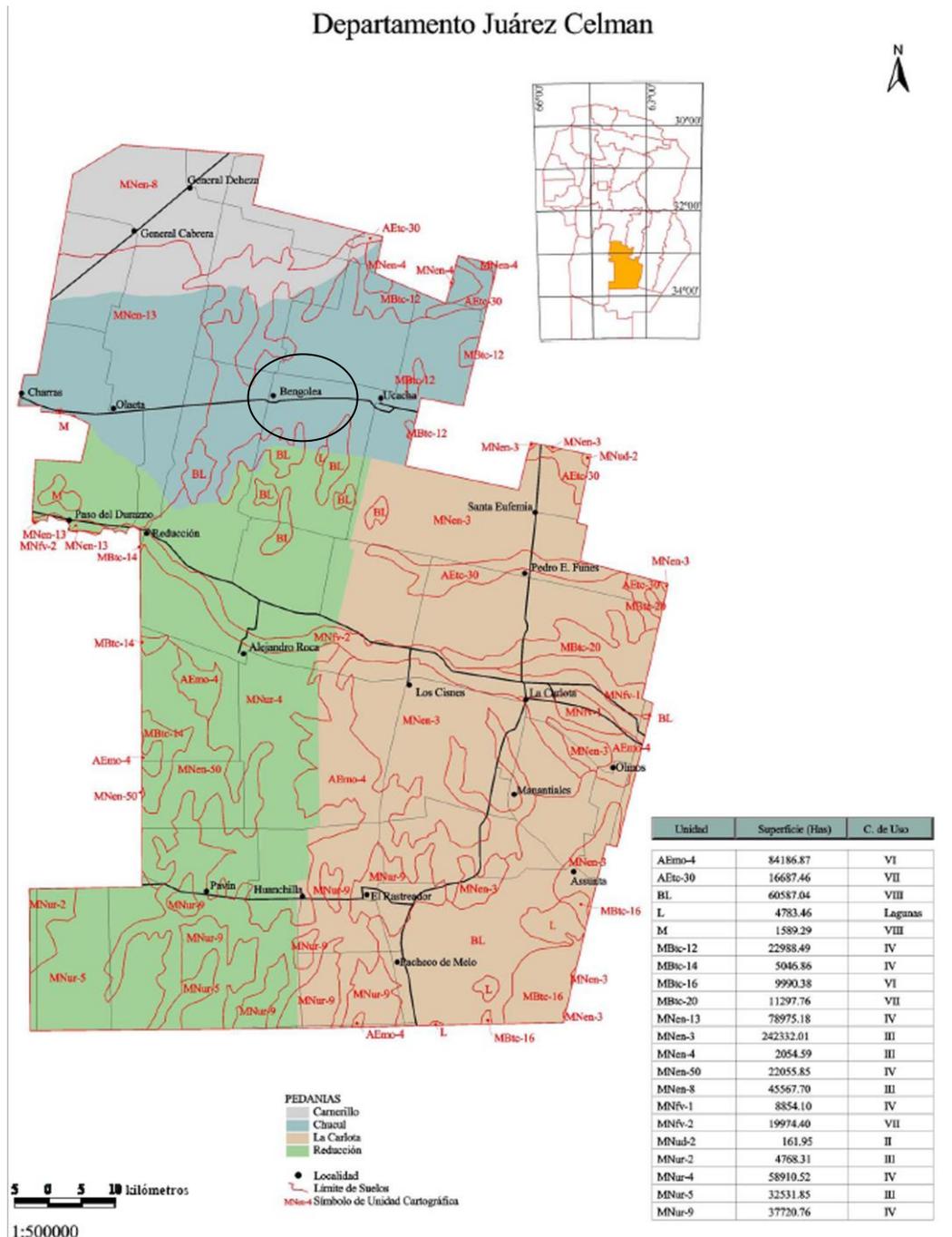


Figura 1. Ubicación geográfica.

La variedad de **semilla** de soja empleada fue A 4303 RG del semillero Nidera cuyas características son: alto potencial, recomendada para sistema de alta productividad, canopeo balanceado, múltiple resistencia a razas de *Phytophthora*. El hábito de crecimiento es indeterminado, 40 días a floración, 133 días a maduración, color pubescencia castaña, color de flor púrpura, planta compacta y muy ramificada con una altura media de 78 cm.

Se utilizó un **inoculante** líquido de base acuosa, el cual incluye un protector bacteriano que permite la preinoculación de las semillas con una anticipación a la siembra de hasta 20 días (según datos del fabricante). Esta formulación mantendría la supervivencia de un alto número de células bacterianas sobre la semilla por periodos prolongados, produciendo una alta nodulación post emergencia de las plántulas.

El terapico para semilla o **fungicida** que se utilizó, fue una mezcla de 15% carbendazin + 35% thiram, teniendo estos activos acción sistemática y de contacto, respectivamente.

Los tratamientos fueron los siguientes:

T1	Testigo: semillas sin inocular
T2	Semillas inoculadas al momento de la siembra (0 días)
T3	Semillas inoculadas 7 días antes de la siembra
T4	Semillas inoculadas 15 días antes de la siembra
T5	Semillas inoculadas + fungicida + protector al momento de la siembra (0 días)
T6	Semillas inoculadas + fungicida + protector 7 días antes de la siembra
T7	Semillas inoculadas + fungicida + protector 15 días antes de la siembra

La metodología empleada consistió en colocar en un recipiente un volumen de 3 ml.kg⁻¹ semilla de inoculante para los tratamientos T2, T3, y T4, y el agregado del fungicida cuyo volumen utilizado fue de 2 ml.kg⁻¹ semilla y 1,6 ml.kg⁻¹ semilla del protector para los tratamientos T5, T6 y T7.

La siembra se realizó en enero del 2004 con sembradora de siembra directa a 70 cm. de distancia entre surcos. La densidad de siembra se calculó en 28 semillas por metro cuadrado.

Evaluaciones:

Densidad de plantas promedio por metro:

Se arrojó un aro regulado en ¼ metro cuadrado (de 56 cm. de diámetro), y se contaron las plantas que se encontraban comprendidas dentro del aro y se procedió a

realizar el siguiente cálculo: $(X1 + X2 + X3 / 3) .4$

X1= N° de plantas contadas en la primera muestra.

X2= N° de plantas contadas en la segunda muestra.

X3= N° de plantas contadas en la tercera muestra

Materia seca:

En estado fenológico V5, se evaluó el peso seco de biomasa aérea y de raíces: para determinar peso seco de parte aérea, se cortó la base de los tallos de cada planta; se colocó en una bolsa de papel y se los llevó a estufa a 65 °C por 48 hs hasta obtener peso constante expresados los valores en gramos; con la parte de la raíz se realizó el mismo procedimiento.

La materia seca se evalúa en V5 debido a que en ese estadio se produce la máxima tasa de crecimiento del cultivo

Nodulación:

En R5, diferenciando su ubicación, raíz principal y raíz lateral, se evaluó el número y peso seco de los nódulos (gramos). Para esta determinación se colocaron los mismos en placa de Petri, la cual se llevó a estufa a 65 °C por 48 hs hasta obtener peso constante. Luego se los peso en balanza de precisión.

La nodulación se determina en el estadio fenológico R5, ya que se produce la mayor expresión de producción de nódulos. En los estadios subsiguientes, se da lugar a la abscisión de los mismos por cambios en la relación fuente destino

Componentes del rendimiento:

Se evaluó el peso de los 1000 granos y evaluación del rendimiento en kg/ha.

Para obtener el rendimiento se desgranaron las plantas de un metro cuadrado, luego se pesan las semillas obtenidas y se realizó el siguiente cálculo:

Peso de semillas desgranadas (gr.) _____	1 m ²
X (gr.) _____	10.000 m ²

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos aleatorizados con 3 repeticiones en cada tratamiento, y parcelas de 7 surcos con distancia entre los mismos de 0.70 m. de ancho y 50 m de largo.

Para cada una de las variables en estudio se realizó un ANOVA sobre un diseño completamente al azar. En caso de detectar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($p < 0.05$), las mismas se compararon mediante el test a posteriori de Tuckey.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características físico-químicas del suelo donde se implantó el ensayo se observan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1: Características físico-químicas del suelo.

Horizonte (cm.)	<i>A (0-27 cm.)</i>	<i>(+de 27 cm.)</i>
Textura	Arenosa franca	Arenosa franca
Materia orgánica.	1,37	0,51
C.E* (mS/cm)	0,72	2,5
RAS*	3,82	14,85
P.S.I.*	4,19	17,11
CIC*(cmol/Kg)	8,69	
Nitrógeno de nitratos (ppm)	4.30	
Nitratos (ppm)	20.5	
Nitrógeno total (%)	0.13	0.08
Fósforo (ppm)	18.0	
pH	6	7.1
Equivalente de humedad (%)	15.1	12.5
Carbono (%)	0.8	0.3

*C.E: Conductividad Eléctrica; *RSA: Relación de Absorción de Sodio *PSI: Porcentaje de Sodio Intercambiable y *CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico.

En ambientes de este tipo los suelos que se desarrollan presentan un patrón de distribución sumamente heterogéneo, con características cuali y cuantitativas que varían en cortas distancias, por esta razón, la Unidad Cartográfica (HIGM 3363-20, Ucacha) recibe el nombre de “Complejo” y las características taxonómicas del mismo responden al Orden Molisol (INTA, 2003).

Clima

En la región predominan las condiciones moderadas y benignas de temperatura y humedad con una estación de crecimiento prolongada, apta para especies estivales e invernales (Pascale y Damario, 1988). No obstante estas condiciones medias, la región está expuesta a la incertidumbre producida por la variabilidad anual en la ocurrencia de heladas y por la presencia de sequías de diferente frecuencia y severidad.

El clima es templado - subhúmedo con un régimen de distribución de precipitaciones de tipo monzónico, es decir, con las lluvias concentradas en un 50% en los meses de verano, el 30 % en el otoño, el 16 % en la primavera y el resto durante el invierno, determinando una estación invernal seca siendo el intervalo de tiempo entre noviembre y marzo la época de mayores lluvias, mientras que desde abril a septiembre se producen los menores registros.

Para el análisis de las precipitaciones se construyeron las curvas de cronología anual (1939-2004). Se observa que posee un promedio anual de 824,5 mm (Figura 1), en 1991 fue el período de mayor valor de precipitación con 1409 mm.

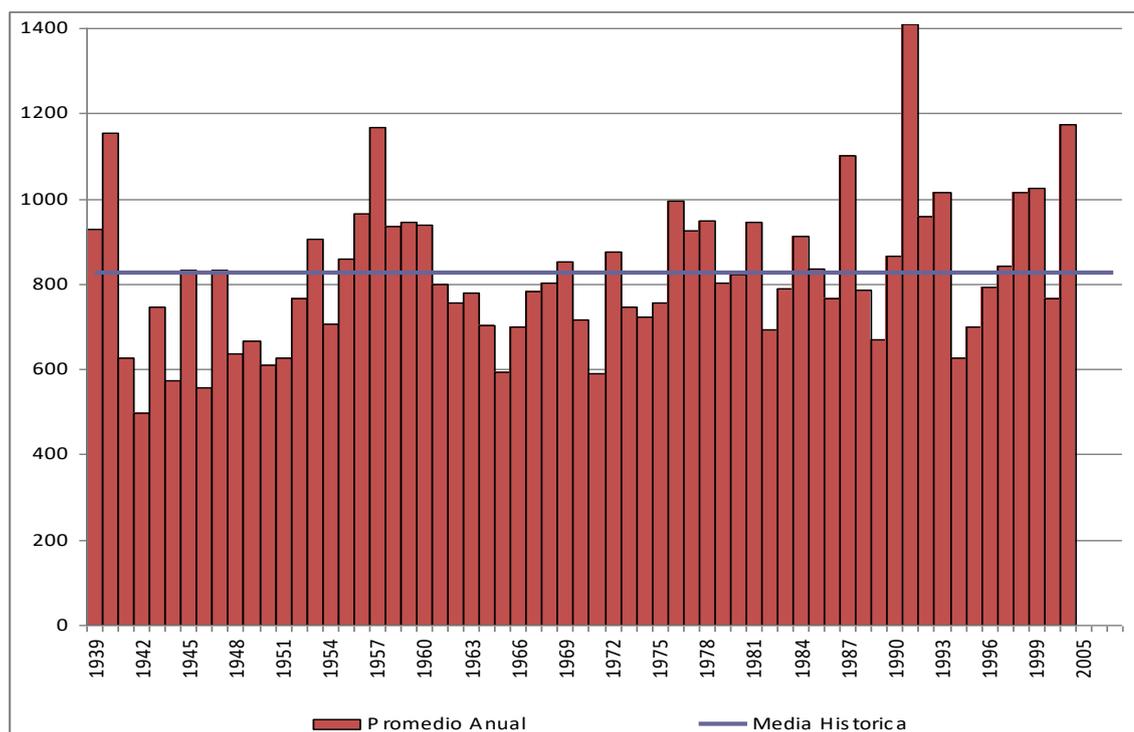


Figura 2: Curva de cronología anual desde 1939-2004 y la media histórica (mm).

En el figura 2 podemos observar las precipitaciones históricas del lugar y las precipitaciones del año de estudio. Con un promedio histórico de 824 milímetros. Datos anuales proporcionados por INTA Ucacha.

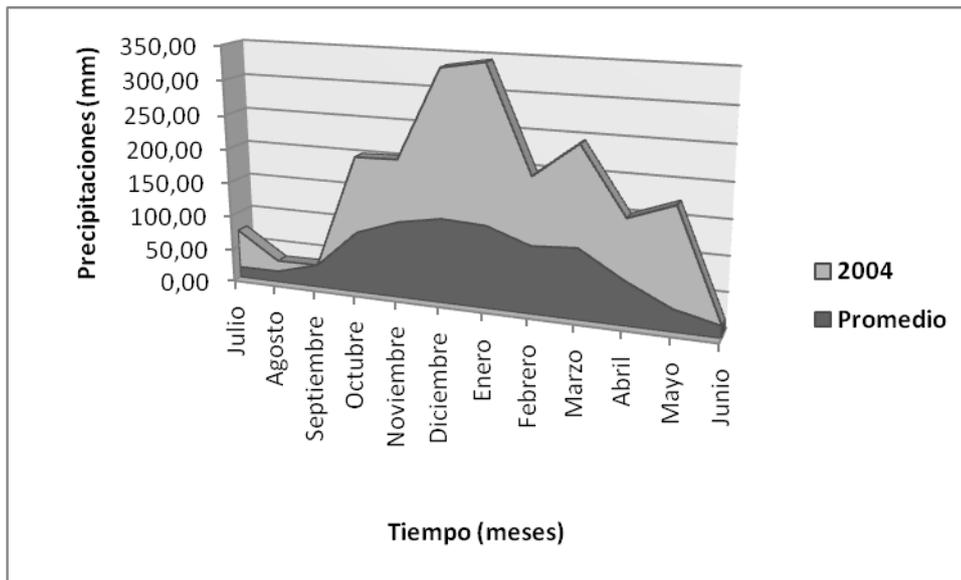


Figura 3: Datos de precipitaciones del promedio histórico (mm) y del año de estudio.

En ésta figura se observa que la distribución de precipitaciones a lo largo del año responde claramente a un régimen Monzónico. Además, se puede visualizar que los valores precipitados durante el periodo de análisis, estuvieron por encima de la media histórica (Figura 3).

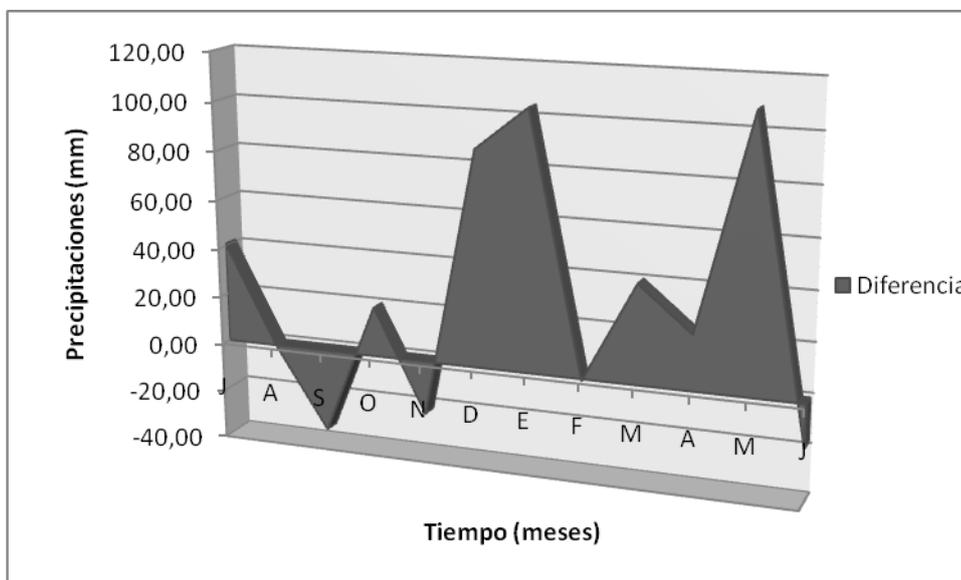


Figura 4: Diferencia de precipitaciones entre la media histórica (mm) y las precipitadas durante el ensayo.

Se observan las diferencias de precipitaciones con respecto a la media histórica y la precipitada durante el ensayo.

Se aprecia que en todos los meses del ensayo las precipitaciones fueron mayores a la media, exceptuando el mes de junio.

Y durante los meses de septiembre y noviembre las precipitaciones estuvieron por debajo de la media histórica.

Régimen térmico:

Es templado - mesotermal, con valores medios anuales de 16 C°, registrándose una clara estacionalidad, siendo enero el mes más caluroso con una media mensual de 22,8 C° y junio el mes más frío con una temperatura media de 9,5 C°. Desde fines de septiembre a mediados de abril se mantienen las temperaturas del aire superiores a 15°C, que se corresponden con iguales niveles en el suelo a 10 cm. de profundidad, de modo que ese período resulta apto para la germinación y desarrollo de la vegetación (Mengui *et al.*, 1998).

Con los valores medios mensuales, el recurso térmico es poco limitativo para el crecimiento vegetal, aunque puede mostrar limitaciones por las heladas. Para la zona de estudio el período libre de heladas es, en promedio de 240 días (desde el 12 de setiembre hasta el 25 de mayo) con un período libre de heladas extremas de 167 días (29 de octubre al 16 de abril) (Rodríguez, 1997). Las principales adversidades climáticas son sequías, heladas extemporáneas, pedreas y la intensidad de las precipitaciones.

Se puede decir que, desde el punto de vista térmico y pluviométrico, es un área apta para el desarrollo de la vegetación de ambientes templados y subtropicales, no presentando limitaciones al crecimiento vegetal. No obstante, las precipitaciones y la descarga de flujos superficiales y subterráneos en interacción con el relieve ocasionan inundaciones, principalmente durante el verano y otoño, con variaciones espaciales e interanuales en la fecha de inicio, en la profundidad y en la duración. La inundación es gradual y no tiene, en general, efectos mecánicos sobre la vegetación (Menghi *et al.*, 2000).

RESULTADOS DEL CULTIVO DE SOJA

Densidad o Stand de plantas (V1)

El **cuadro 2** muestra valores de densidad que corresponden al promedio de 3 repeticiones de los diferentes tratamientos.

Cuadro 2: Valores de densidad.

TRATAMIENTO	DENSIDAD (pl*ha ⁻¹)
1	319 ab
2	300 a
3	300 a
4	410 b
5	391 ab
6	305 a
7	376 ab

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

Se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado 15 días antes de la siembra (T4) con los tratamientos inoculado a los 0 días antes de la siembra (T2); tratamiento inoculado 7 días antes de la siembra (T3) y tratamiento inoculado + fungicida + protector 7 días antes de la siembra (T6).

La mayor densidad o establecimiento de plántulas en los tratamientos en donde la formulación incluía fungicidas, demuestra que éste podría haber influido positivamente en la protección al ataque de patógenos a las semillas y plántulas, con una mejor emergencia y negativamente en cuanto al menor rendimiento para estos tratamiento, ya que estos productos podrían disminuir el número de microorganismos encargado de la fijación biológica del nitrógeno o afectar los procesos de reconocimiento planta-bacteria.

Número de nódulos totales y discriminados por ubicación sobre raíz principal y laterales

La **figura 5** muestra los valores de nódulos totales, correspondientes al promedio de las tres repeticiones de cada tratamiento.

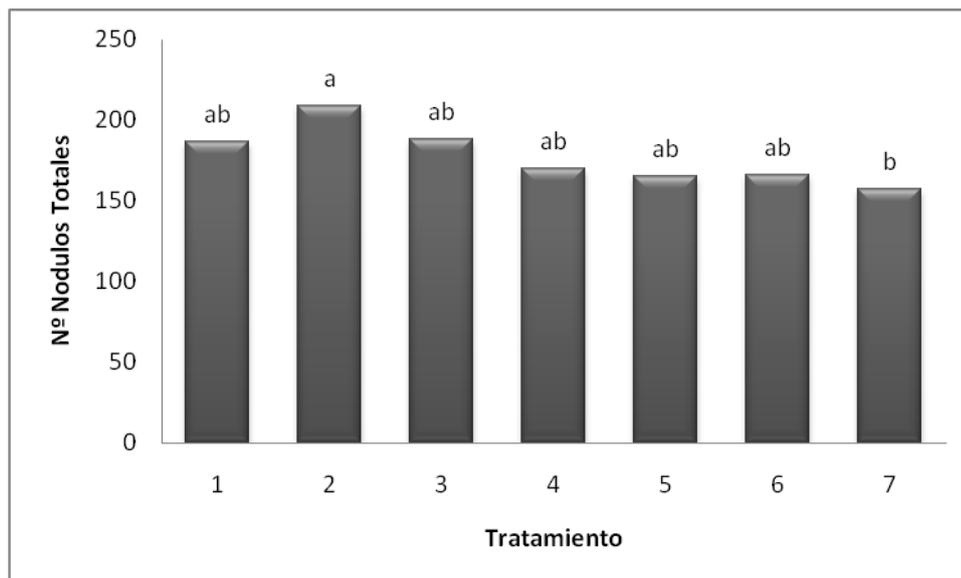


Figura 5: Números de nódulos totales según tratamientos.

Se observan diferencias significativas a favor del tratamiento inoculado a la siembra (T2) comparativamente con el tratamiento inoculado + fungicida + protector 15 días antes de la siembra (T7); (Figura 5). Se observan nódulos en el tratamiento testigo confirmando la existencia de rizobios naturalizados en el lote sembrado.

El **cuadro 3** muestra los valores de números de nódulos de raíz principal obtenidos a partir del promedio de las tres repeticiones en los siete tratamientos.

Cuadro 3: Valores de números de nódulos de raíz principal.

TRATAMIENTO	Nº NODULOS en RP
1	88,00 a
2	75,00 ab
3	55,67 ab
4	42,33 b
5	52,67 ab
6	48,67 ab
7	48,33 b

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos testigo sin inocular (T1) con el tratamiento inoculado 15 días antes de la siembra (T4) y el inoculado + fungicida + protector 15 días antes de la siembra (T7).

El **cuadro 4** muestra los valores de los nódulos de las raíces laterales que corresponden a los promedios de las tres repeticiones de los tratamientos.

Cuadro 4: Valores de los nódulos de raíces laterales.

TRATAMIENTO	Nº NODULOS en RL
1	99,00 a
2	133,67 a
3	132,67 a
4	127,67 a
5	112,67 a
6	117,67 a
7	109,00 a

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

En este parámetro, no se encontraron diferencias significativas entre los siete tratamientos realizados. Por contingencias climáticas y edafológicas la cepa del inoculante no formó nódulos en la raíz principal pero luego sí en raíces laterales más que el testigo en todos los tratamientos.

Peso de nódulos totales

La **figura 6** muestra los valores del peso seco de nódulos totales que corresponden a los promedios de las tres repeticiones de los siete tratamientos realizados.

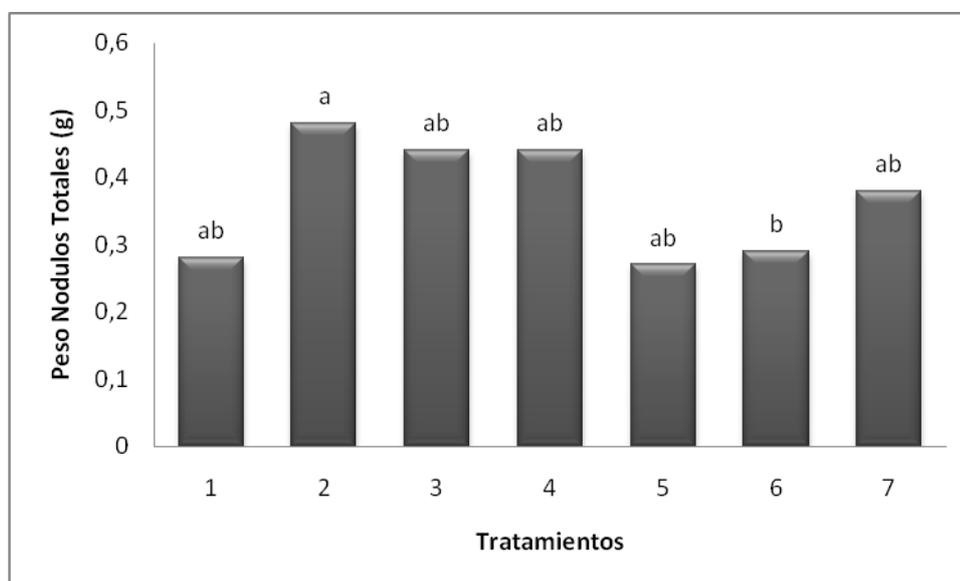


Figura 6: Peso seco de nódulos totales.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos inoculado a los 0 días antes de la siembra (T2) con el tratamiento inoculado + fungicida + protector 7 días antes de la siembra (T6).

El peso seco de nódulos totales, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, pero podemos observar en el tratamiento 2 su valor es mayor al resto de los tratamientos incluido el testigo.

Peso seco de la parte aérea y de la raíz

El **figura 7** muestra los valores correspondientes al peso seco de la parte aérea, en el estado fenológico V5.

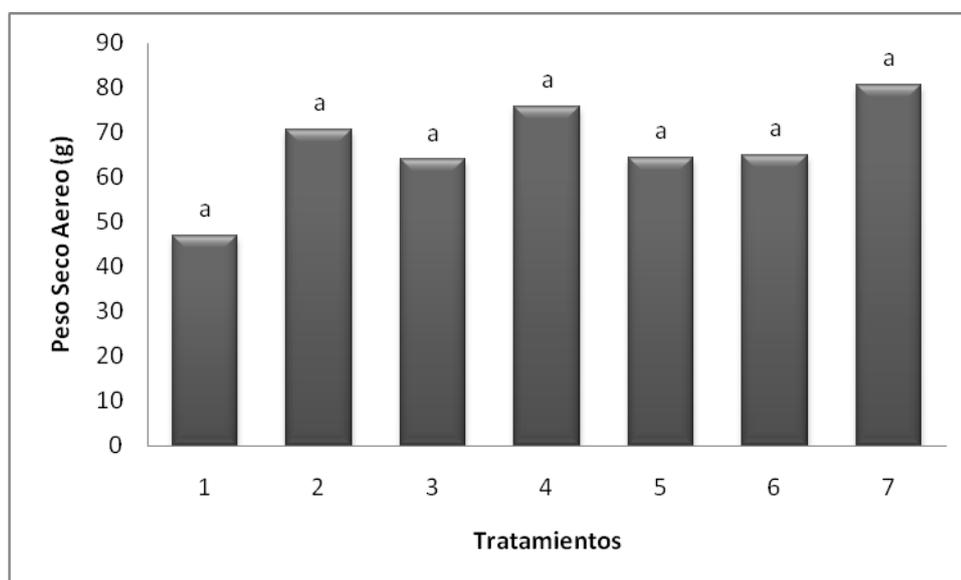


Figura 7: Peso seco de parte aérea.

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque todos presentaron mayor peso seco de la parte aérea en relación al testigo.

La **figura 8** muestra los valores correspondientes al peso seco de la parte radicular en V5.

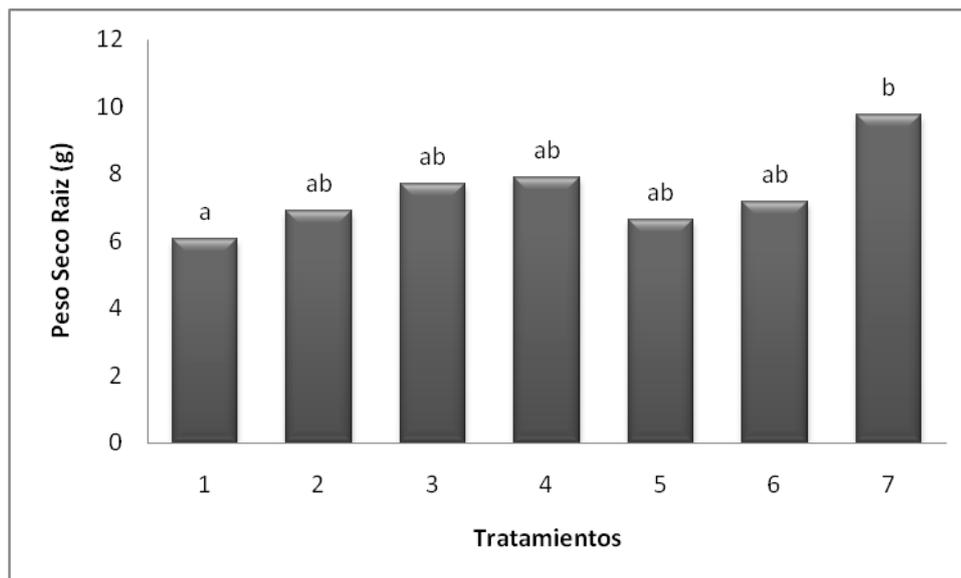


Figura 8: Peso seco de parte radicular.

Hay diferencias significativas en el peso seco de la raíz entre los tratamientos T1 (testigo) con el T7 (semillas inoculadas + fungicida + protector 15 días antes de la siembra). Presentando todos los tratamientos mayor peso seco de la parte radicular en relación al testigo.

Componentes del rendimiento

La **figura 9** muestra valores del rendimiento según tratamiento.

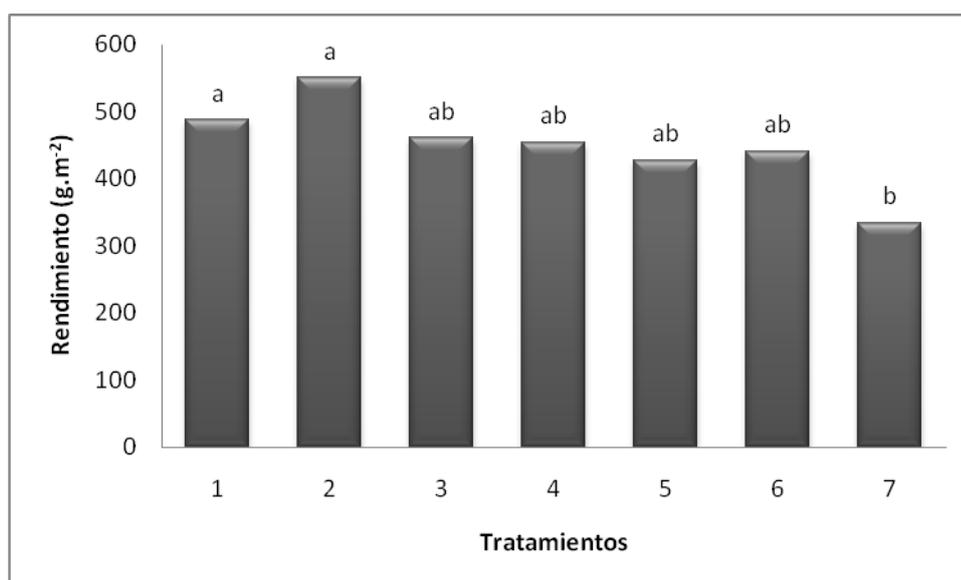


Figura 9: Rendimiento.

Se observaron diferencias significativas en el tratamiento inoculado + fungicida + protector 15 días antes de la siembra (T7) con respecto al testigo y al T2 (tratamiento inoculado a los 0 días antes de la siembra). Dentro de las diferencia de rendimiento observadas, el T7 mostró un 31,5% menos de rendimiento que el testigo. El tratamiento inoculado a los 0 días antes de la siembra (T2) fue el que presentó un mayor rendimiento, con un 12,9% más que el testigo.

La **figura 10** muestra valores del peso de 1000 granos de las tres repeticiones de los siete tratamientos.

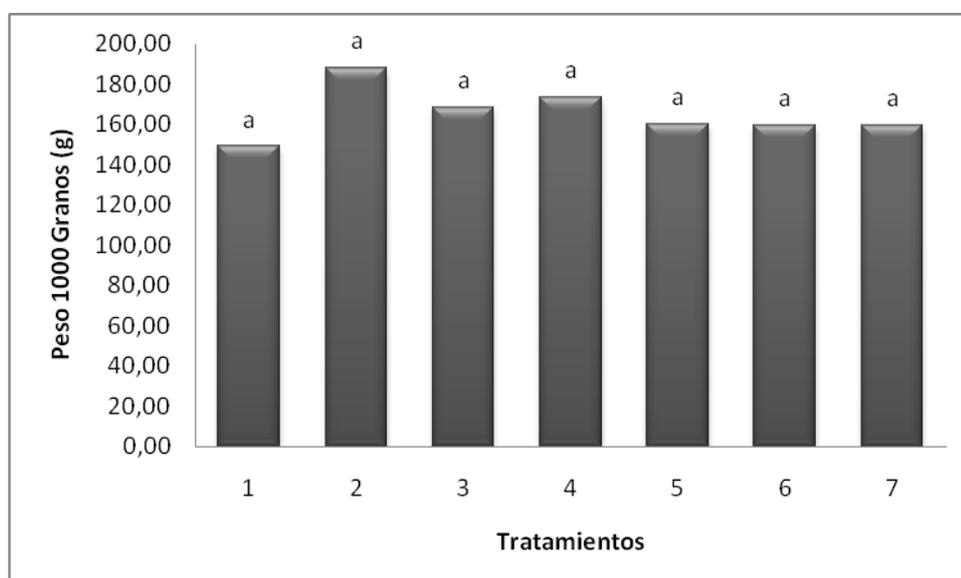


Figura 10: Peso de 1000 semillas

No se encontraron diferencias significativas, sin embargo en el tratamiento inoculado a los 0 días antes de la siembra (T2) (figura 10) se observa el mayor peso de 1000 granos.

VI. CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo determinan que los parámetros evaluados son variables dependientes del momento de aplicación, de la técnica y de la formulación del inoculante empleado conjuntamente con las condiciones climáticas.

En el análisis de este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos analizados en el número de nódulos en las raíces laterales, peso seco de parte aérea y en peso de 1000 granos.

En cuanto a densidad, número de nódulos totales, número de nódulos en raíz principal, peso de nódulos totales, peso seco de la raíz y rendimientos, mostraron diferencias significativas.

El tratamiento con semillas inoculadas al momento de la siembra fue el que más se destacó presentando los valores más altos en el número de nódulos totales, en los peso de nódulos totales y consecuentemente en el rendimiento.

Estos resultados se pueden explicar a través de la decisión del momento de aplicación de la técnica de inoculación, ya que la inoculación al momento de la siembra es el tratamiento que mejores resultados manifestó.

En función al análisis de los resultados de este trabajo y teniendo en cuenta el comportamiento de los diferentes tratamientos es que se puede confirmar la hipótesis planteada en este trabajo: “El momento de inoculación incide sobre la Fijación Biológica del Nitrógeno y productividad de soja”.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ANDRÉS, J.; N. CORREA y S. ROSAS 1999 El potencial mutágeno del fungicida thiram. **Rev. Arg. Microbiol.** 31:82-86.
- BACA, B. E.; SOTO URZUA, L.; y P. PARDO RUIZ 2000 Fijación biológica de nitrógeno. **Revista Elementos** N° 38, Vol 7, Julio-Agosto. p: 43.
- BUTTERY, B. R.; PARK, S. J.; and HUME, D. J. 1991. Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes. **Canadian Journal of Plant Science** 72: 323-349.
- CÁMARA ARGENTINO CHINA-BOLETÍN 2005. En: www.argenchina.org/boletines/boletin2005_02.asp. Consultado: 18-04-2010.
- COLLINO, D., DE LUCA, M., PERTICARI, A., URQUIAGA, S., y R. RACCA 2007 Aporte de la FBN a la nutrición de la soja y factores que la limitan en diferentes regiones del país. **Actas XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología**. Los Cocos, Córdoba. Argentina.
- COVENTRY, D.R. and EVANS, J. 1989 Symbiotic nitrogen fixation and soil acidity. En: Robson AD. (Ed). **soil acidity and plant growth**. Academic Press, Sidney. p: 193-107.
- CURLEY, R. y J. BURTON 1975 Uso de protector Bacteriano sobre la nodulación de plantas de soja. En: www.rizobacter.com.ar. Consultado: 16/05/2006.
- De FELIPE, M. 2006 **Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones**. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada.
- DÍAZ ZORITA, M. y M. FERNÁNDEZ CANIGIA 1999 Patrones de nodulación de soja en relación con propiedades de suelo bajo tres sistemas de labranza. **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata 104 (1) p: 53-60.
- DUNCAN, W. G. 1985 Plant patterns and yield in relation to growth characteristics of two soybean varieties. **Agron. J.** 66: 620-623.
- FEHR, W. R. and C. CAVINESS 1977 Stages of soybean development. Iowa St. Univ. **Special Report** 80.11.pp.
- FERNÁNDEZ CANIGIA, M. V. 2003 **Factores determinantes de la nodulación**. 1° Ed. Buenos Aires. Nitragin Argentina.
- FERRARIS, G. y L. COURETOT 2006 Evaluación de nuevos desarrollos en inoculación en soja. Campaña 205/06. p: 75-79. En: **Experiencias en Soja 2006**. Proyecto Regional Agrícola. Área de Desarrollo Rural EEA Pergamino y General Villegas. 301 p.

- FRANCO, D. 2004 Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. En: www.alimentosargentinos.gov.ar/03/olea/Aceite_soja19/A_soja.htm. Consultado: 30-11-2006.
- GEORGIEV, G. and ATKINS, C.A. 1993 Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolisms and export and diffusive conductance of cowpea nodules. **Symbiosis** 15:239-255.
- GÓMEZ, M. 1996 Estudios de inoculantes para soja en la Argentina. **Actas Seminario Microorganismos Útiles para la Agricultura y la Forestación**. INTA-INRA. La Pampa. 20 a 22 de Mayo 1996 pp: 130-136.
- GONZÁLEZ, N. 2003 Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) en Soja. Cómo elegir el mejor inoculante comercial. INTA Balcarce. En: www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/.../3.htm. Consultado: 21-04-2004.
- GONZÁLEZ, N.; PERTICARI, A.; STEGMAN de GURFINKEL, B y RODRÍGUEZ CACERES, E. 1997. Nutrición nitrogenada. En: Giorda y Baigorri (eds). **El Cultivo de Soja en la Argentina**. Agro 4 de Córdoba. Editar, San Juan, Argentina. Pp.187-198.
- HANWAY, J.J. and C. WEBER 1971 **N, P and K percentages in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plant parts**. 63: 286-290.
- HERRIDGE, D. F.; ROUGHLEY, R. J. and J. BROCKWELL 1984 Effect of rhizobia and soil nitrate on the establishment and functioning of the soybean symbiosis in the field. **Aust. J. Agric. Res.** 35: 149-161.
- HOWIESON, J.G, ROBSON, A.D. and ABBOTT, L.K. 1992 Acrol-tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH wich induce the expression of nodulation gena in *Rhizobium meliloti*. **Australian Journal of Plant Physiology**. 19:287-296.
- HUME, D.J.; FEINDEL, D. E.; WINTER, J. P.; BLAIR, D. and S. PARARAJASINGHAM 1989 Assimilate partitioning in soybean. World Soybean Research Conference IV. Orientación Gráfica Editora S.R.L. Buenos Aires. Argentina. 20 a 22 de Septiembre 1992 Proceedings pp: 177-182
- HUNGRIA, M. y R. CAMPO 2004 Economical and environmental benefits of inoculation and biological nitrogen fixation with the soybean: situation in South America. VII World Soybean Resarch Conference, Foz do Iguazú (PR; Brazil), 2 a 5 de Marzo 2007 Proceedings pp: 488-498.

- HUNGRIA, M., CAMPO R.J., MENDES I.C., y P. GRAHAM 2006 Contribution of biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr) in South America. En: Singh, R.P., N. Shankar y P. K. Jaiwal (eds), **Nitrogen nutrition in plant productivity**. Studium Press, LLC, Houston (TX; USA), pp: 43-93.
- IGLESIAS, María C., M. FOGAR y M. CRACOGNA 2000 UNNE. Inoculación con *Azospirillum* sp en cultivos comerciales. Girasol en la loma. En: www1.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-076.pdf. Consultado: 24-04-2004.
- INTA, E.E.A. Manfredi y Agencia Córdoba Ambiente. 2003. Atlas de Suelos de la Provincia de Córdoba. Capítulo 3: Los Suelos. Taxonomía de Recursos.
- KANTOLIC, A. G. 2003 El Libro de la Soja SEMA CREA. AAPRESID, Buenos Aires, Argentina, p: 29-38. 8.
- LABANDERA, C.; M. L. IZAGUIRRE-MAYORAL y J. SANJUÁN, 2007 Biofertilización en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial. En: www.biofag.org.ar/actividades/.../Libro-Biofag2007.pdf Consultado: 02-02-2007.
- MARTÍNEZ LALIS, R. 2000 Nitrógeno, inoculación y fijación biológica. **Fertilizar** 17: 17-19.
- MENGHI, M.; N. MONTANI, N. MÓNACO; M. J. ROSA y M. HERRERA 1998 Diversidad y producción primaria en un pastizal inundable no pastoreado en la estepa pampeana (Argentina central). **Pastos**, 28(1), 51-67.
- MENGHI, M.; R. SEILER, N. MONTANI; N. MONACO y M.J. ROSA 2000 Variación anual e interanual de la producción de un pastizal inundable en la estepa pampeana (Argentina central). Relación con la precipitación y temperatura. **Pastos**, XXX (1), p: 227-240.
- NITRASOIL 2007 Qué es la fijación biológica del nitrógeno. En: www.nitrasoil.com.ar Consultado: 20-05-2008.
- NITRAGIN 2007 El Manual de Nodulación. En: www.nitragin.com.ar Consultado: 23-05-2008.
- OKON Y. y C.A. LABANDERA-GONZÁLES 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil. Biol. Biochem.** 26:1591-1601.
- PAPAKOSTA, D. K. 1992 Effect of inoculant rate on nodulation and various agronomic traits of soybean. **Journal Agronomy & Crop Science**, 168:238-242.

- PASCALE, A. J. 1989 Evaluación del cultivo de la soja en Argentina. **Revista de la Asociación Argentina de la Soja**. Vol IX (1-2):9-17.
- PASCALE A. J. y E. A. DAMARIO 1988 Características agroclimáticas de la región pampeana. **Revista Facultad de Agronomía**. 9 (12). 41-64.
- PERTICARI, A. 2005 Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. **Actas Congreso Mundo Soja**, Bs. As. 2005 (Argentina),p: 121-126.
- PERTICARI, A. y C. PICCINETTI 2006 La inoculación siempre vale la pena. Sección campo. **Diario La Nación**. Bs. As. Argentina.
- PORQUE BIOTECNOLOGÍA 2007 El cuaderno de porque biotecnología n° 24. En: www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno_24.asp?cuaderno=24
Consultado: 24-09-2009.
- QUIJANO, A.; MORANDO, E. N.; MARTIGNONE, R. A. y M. BORRERO 1995 Efecto de la época de siembra y de la disponibilidad hídrica sobre la acumulación y partición de nitrógeno en soja. En: Primer Congreso Nacional de Soja y Segunda Reunión Nacional de Oleaginosos. AIANBA, ed. Pergamino. Bs. As.1996. Argentina. Cap II. p.: 249-253
- RAMIREZ, C. and ALEXANDER, M. 1980 Evidence suggesting protozoon predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of bean. **Applied and environmental Microbiology**, 40:429-499.
- RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. and G. BENSON 1985 How a soybean plant develops. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service. Ames. Iowa. Special Report p: 53.
- RODRIGUEZ, R. 1997 Estudio hidrogeoquímico como base para la planificación de uso de los recursos hídricos de la cuenca alta del arroyo Chucul, departamento Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Geología. UNRC.
- ROUGHLEY, R.J.1970 The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodule of *Trifolium subterraneum*. **Annual of Botany**, 34: 631-646.
- SAGPyA 2009 Estimaciones agrícolas de la secretaría de Agricultura de la Nación En: www.sagpya.mecon.gov.ar/.../estimaciones/base.php. Consultado: 19-04-2010.
- SALVAGIOTTI, F. and D. J. MIRALLES. 2008. Radiation interception, biomass production and grain yield are affected by the interaction of nitrogen and sulfur fertilization in wheat. **Europ. J. Agronomy** 28: 282-290.

- SHIBLES, R. M. AND WEBER, C. R. 1965. Leaf area solar radiation interception and dry matter production by soybeans. **Crop Sci.** 5: 575-578
- SINCLAIR, T. R AND DE WIT, C. T. 1975. Comparative analysis of photosynthate and N requirements in the production of seeds by various crops. **Science** 189: 565-567
- THOMPSON J. A, 1960. Uso de protector Bacteriano sobre la nodulación de plantas de soja. Publicado 16/05/2006. Rizobacter Argentina S.A.
- TORESANI, S.; PERTICARI, A.; SANCHEZ, M.E. Y GIUBILEO, G. 2006. Evaluación de cepas de rizobios para inocular soja en Zavalla, Santa Fe. 3° Congreso de Soja del Mercosur, Rosario.2006. p:626-628.
- VENTIMIGLIA, L.; CARTA, H.; RILLO, S. Y RICHMOND, P. 2003. Sistema de inoculación en soja. En: Experimentación en campos de productores. Resultados campaña 2002/2003. Unidad de Extensión y Experimentación Adaptativa 9 de julio. p 131-135.
- WEISZ, P.R, DENISON, R.F and SINCLAIR, T.R. 1985 Response to drought stress of nitrogen fixation (acetylene reduction) rater by field grown soybean. **Plant Physiology**, 78: 525-530.
- WHIGHT, D.A; KILLHAM, K.; GLOVER, L.A and PROSSER, J.I.1993 The effect of location in soil and protozoal grazing of a genetically modified bacterial inoculums. **Geoderma**, 56:633-640.
- ZAHARAN, H.H. 1991 Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. **Biology and fertility of soils**, 12:73-80.
- ZAHARAN, H.H and SPRENT, J.I. 1986 Impact of low root temperatures in soybean (*Glycine max.* L. Merr) on nodulation and nitrogen fixation. **Environmental Experimental Botany**, 35: 279-285.

VIII. ANEXO

Cuadro 1: Valores de nódulos totales.

TRATAMIENTO	Nº NODULOS TOTALES
1	187,00 ab
2	208,67 a
3	188,34 ab
4	170,00 ab
5	165,34 ab
6	166,34 ab
7	157,33 b

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

Cuadro 2: Valores de peso seco de nódulos totales.

TRATAMIENTO	NODULOS TOTALES (gr.)
1	0,70 ab
2	0,95 a
3	0,69 ab
4	0,6 ab
5	0,54 ab
6	0,46 b
7	0,58 ab

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey

Cuadro 3: Valores de peso seco de parte aérea.

TRATAMIENTO	PESO SECO AÉREO (gr.)
1	47,00 a
2	70,60 a
3	63,93 a
4	75,80 a
5	64,27 a
6	64,97 a
7	80,67 a

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

Cuadro 4: Valores de peso seco de parte radicular.

TRATAMIENTO	PESO SECO RAIZ (gr.)
1	6,07 a
2	6,90 ab
3	7,70 ab
4	7,90 ab
5	6,63 ab
6	7,17ab
7	9,77 b

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

Cuadro 5: Valores de rendimiento.

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (gr. m ²)
1	486,97 a
2	549,83 a
3	460,63 ab
4	454,07 ab
5	427,20 ab
6	439,97 ab
7	333,57 b

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

Cuadro 5: Valores de peso de 1000 granos.

TRATAMIENTO	PESO 1000 GRANOS (gr.)
1	149,07 a
2	188,00 a
3	168,53 a
4	173,33 a
5	160,00 a
6	159,60 a
7	159,60 a

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas al 5 % con el Test de Tuckey.

-

