

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Proyecto de Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero
Agrónomo

Modalidad: Proyecto

Consortios microbianos en el cultivo de soja.

Nombre del Alumno: Blengino Marcos Alberto.

DNI: 34.372.903

Directora: Alicia Thuar.

Río Cuarto – Córdoba

Diciembre 2012

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:

Conorcios microbianos en el cultivo de soja.

Autor: Blengino Marcos Alberto.

DNI: 34.372.903

Director: Thuar, Alicia María

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la
Comisión Evaluadora:

Prof. Teresa Amalia Kraus _____

Prof. Andrea Amuchástegui _____

Prof. Alicia María Thuar _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

II

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi familia por apoyarme siempre durante todo el transcurso de mi carrera, y para mi novia por contenerme en todo momento.

III

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas por todo el apoyo y la contención brindada hacia mí.

A mi novia por haber estado siempre.

A Alicia por haberme brindado su tiempo para realizar este trabajo.

A todos mis amigos, y en especial a Facundo por su cooperación en todo momento.

INDICE DE TEXTO

RESUMEN	X
SUMMARY	XI
INTRODUCCION	
Antecedentes.....	1
Hipótesis.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
MATERIALES Y METODOS	
Caracterización del sitio experimental.....	9
Cepas.....	10
Tratamiento de semillas.....	10
Tratamientos evaluados.....	10
Diseño experimental del ensayo.....	11
Cultivar.....	11
Evaluaciones realizadas.....	11
Fertilizante.....	11
Siembra y fertilización.....	12
Análisis de datos.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Características de la campaña 2011-2012	13
Determinaciones en estadio fenológico R2	
Número de nódulos.....	14
Peso seco de nódulos.....	16
Peso seco aéreo y radical.....	19
Determinaciones en estadio fenológico R6	
Número de nódulos.....	21
Peso seco de nódulos.....	22
Peso seco aéreo y radical.....	24

Comparaciones entre estadio fenológico R2 y R6 para las variables analizadas.....	25
Determinaciones en estadio fenológico R8	
Rendimiento.....	27
Contenido de proteína.....	31
CONCLUSION.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34
ANEXOS.....	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados del análisis de suelo “Estancia El Porvenir”, campaña 2011-2012, Río Cuarto.....	9
Tabla 2: Peso seco de los nódulos de las raíces principales y secundarias m^{-2} expresado como porcentaje sobre el peso seco de los nódulos totales en los estadios fenológicos R2 y R6.....	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Relación entre el N proveniente de la FBN y la disponibilidad inicial de nitratos en suelo.....	2
Figura 2: Temperaturas medias mensuales históricas y temperaturas medias mensuales de la campaña 2011-2012.....	13
Figura 3: Precipitaciones medias mensuales históricas y precipitaciones medias mensuales de la campaña 2011-2012.....	13

DETERMINACIONES EN ESTADIO FENOLOGICO R2

Figura 4: Número de nódulos en las raíces principales m^{-2} en el estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....	15
---	----

Figura 5: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en el estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....16

Figura 6: Peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....17

Figura 7: Peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....17

Figura 8: Peso seco de nódulos totales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....18

Figura 9: Peso seco aéreo (gr) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....19

Figura 10: Peso radical (gr) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto.....19

Figura 11: Peso seco aéreo y radical (gr) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....20

DETERMINACIONES EN ESTADIO FENOLOGICO R6

Figura 12: Número de nódulos de las raíces principales / m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....21

Figura 13: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....22

Figura 14: Peso seco de nódulos de raíces principales / m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....23

Figura 15: Peso seco de nódulos de raíces secundarias / m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....23

Figura 16: Peso seco de nódulos totales / m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....23

VII

Figura 17: Peso seco Aéreo m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....24

Figura 18: Peso seco radical m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....24

Figura 19: Peso seco total m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....25

DETERMINACIONES EN ESTADIO FENOLOGICO R8

Figura N°20: Rendimiento ($Kg\ ha^{-1}$) en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....29

Figura N°21: Número de granos m^{-2} en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....29

Figura 22: Peso de 100 granos en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....30

Figura N°23: Correlación entre el número de granos y rendimiento en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....30

Figura 24: Correlación entre el número de granos y rendimiento en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....30

Figura 25: Contenido de proteína (%) en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012.....31

Figura 26: Contenido de Proteína en granos (%) en relación al rendimiento ($Kg\ ha^{-1}$)...32

INDICE DE ANEXOS

ANEXOS DE LAS TABLAS DE ANOVA REALIZADAS PARA LAS VARIABLES MEDIDAS EN ESTADÍO FENOLÓGICO R2.

Anexo 1: Número de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	40
Anexo 2: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	40
Anexo 3: Peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	41
Anexo 4: Peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	41
Anexo 5: Peso seco de los nódulos totales (Principales + Secundarias) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	42
Anexo 6: Peso seco Aéreo m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	42
Anexo 7: Peso seco Radical m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	43
Anexo 8: Peso seco Total (Aéreo + Radical) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja.....	43

ANEXOS DE LAS TABLAS DE ANOVA REALIZADAS PARA LAS VARIABLES MEDIDAS EN ESTADÍO FENOLÓGICO R6.

Anexo 9: Número de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	44
Anexo 10: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	44
Anexo 11: Peso seco de los nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	45
Anexo 12: Peso seco de los nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	45
Anexo 13: Peso seco de los nódulos Totales (Principales + Secundarias) m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	46
Anexo 14: Peso seco Aéreo m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	46
Anexo 15: Peso seco Radical m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	47
Anexo 16: Peso seco Total (Aéreo + Radical) m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja.....	47

ANEXOS DE LAS TABLAS DE ANOVA REALIZADAS PARA LAS VARIABLES MEDIDAS EN ESTADÍO FENOLÓGICO R8.

Anexo 17: Rendimiento (Kg ha^{-1}) en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja.....48

Anexo 18: Número de granos m^{-2} en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja....48

Anexo 19: Peso de los 100 granos en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja.....49

Anexo 20: Contenido de proteína en grano en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja.....49

RESUMEN

El proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) cubre parcialmente la alta demanda de nitrógeno de la soja estimada en unos 80 kg por tonelada de grano producido. Este proceso sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos seres vivos, todos ellos procariotas. *Bradyrhizobium japonicum* es el simbiote por excelencia de la soja. Además, se puede utilizar la técnica de coinoculación de la bacteria combinada con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), como *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, la cual permite obtener mejores resultados en rendimiento gracias al efecto sinérgico de estas PGPR benéficas. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la fijación biológica del nitrógeno con consorcio de microorganismos en el cultivo de soja para lograr un mayor rendimiento del mismo. Se realizó un ensayo con 4 tratamientos inoculados, un tratamiento con agregado exógeno de fertilizante nitrogenado y un testigo sin inocular ni fertilizar. Los resultados obtenidos muestran que la inoculación aumenta el número de los nódulos de raíces principales y secundarias, y que el agregado externo de nitrógeno, disminuye esa nodulación, a su vez no se observaron aumentos del peso individual de cada nódulo para los diferentes tratamientos. La inoculación con diferentes microorganismos, aumentó el peso seco aéreo y radical del cultivo de soja. El rendimiento en granos fue mayor en los tratamientos con microorganismos en relación al testigo, no observándose diferencia entre los diferentes tratamientos inoculados. Sería de interés seguir investigando sobre este tema en años con diferentes condiciones ambientales, para brindar un mayor conocimiento.

Palabras clave: Soja, Efecto sinérgico, Coinoculación, Nitrógeno, Rendimiento.

SUMMARY

The process of biological fixation of atmospheric nitrogen (FBN) partially covers the high demand for soybean nitrogen estimated at 80 kg per tonne of grain produced. This process can only be performed by a few living beings, all prokaryotes. *Bradyrhizobium japonicum* is the quintessential symbiont of soybeans. Furthermore, the technique can use the bacterium coinoculation combined with plant growth-promoting bacteria (PGPR) as *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*, which enables better results in performance due to the synergistic effect of these beneficial PGPR. The aim of this study was to optimize biological nitrogen fixation with consortium of microorganisms in the soybean crop to achieve higher performance. We conducted a study of 4 inoculated treatments, treatment with exogenous addition of nitrogen fertilizer and uninoculated or fertilize. The results show that inoculation increased the number of nodules of primary and secondary roots, and that the external addition of nitrogen decreases the nodulation turn increases were not observed individual weight of each node for the different treatments. Inoculation with different microorganisms, increased shoot dry weight and root of soybean. The grain yield was higher in treatments than the control organisms are not differences between the different treatments inoculated. It would be interesting to investigate further on this in years with different environmental conditions, to provide a better understanding.

Keywords: Soybean, Synergy, coinoculation, Nitrogen, Yield.

INTRODUCCIÓN

La soja ha significado en el mundo una gran revolución productiva-comercial en la cadena agroalimentaria mundial a partir de los años setenta, por ser a la vez principal fuente de proteína vegetal para la alimentación animal en sistemas de cría intensiva, así como proveedora de aceites para alimentación humana. Adicionalmente, en estos últimos años es también uno de los cultivos claves para la obtención de biocombustibles.

Argentina es el tercer exportador de grano, luego de Estados Unidos y Brasil pero es el primer exportador mundial de productos procesados: Aceites –tanto crudo como envasados - y harinas proteicas en un nivel de oferta muy superior al de Brasil que es el segundo exportador mundial (Sanson *et al.*, 2009).

El cultivo de la soja se introdujo en nuestro país en los años sesenta como una opción productiva proveedora de proteínas para la alimentación animal a instancias de INTA a nivel estatal y del IADO (Instituto Argentino de Desarrollo de Oleaginosas), hoy desaparecido.

Actualmente el país es el primer exportador mundial de aceites y harinas proteicas de soja y es el primer rubro de exportación de la economía argentina con el 25% del valor total exportado por nuestro país (Francomano y Picardi, 2012).

La alta demanda de nitrógeno de la soja (*Glycine max* L. Merr.) estimada en unos 80 kg por tonelada de grano producido, es parcialmente cubierta a partir del proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN).

En la atmósfera terrestre hay una abundante disponibilidad de N, 79% en la forma molecular (N₂). Esta forma de N gaseoso debe ser transformada para ser empleada por la mayoría de los organismos. La soja de la misma manera que la gran mayoría de las leguminosas establece una relación simbiótica con bacterias Gram (-) conocidos como rizobios, cuyo resultado es el desarrollo de nódulos en donde el nitrógeno molecular (N₂) se transforma en compuestos nitrogenados asimilables para la planta, proceso denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) (Vassey, 2003).

Cuando se lleva a cabo la FBN, el N₂ atmosférico se transforma a NH₄⁺ en las células de los nódulos infectadas por bacterias; de allí pasa a células no infectadas donde se transforma principalmente en ureidos, que a su vez son exportados hacia los tejidos vegetales. Ambas fuentes, el suelo y la FBN deben complementarse para determinar mayores rendimientos. Sin embargo, se reconoce que la primera fuente condiciona la magnitud de la expresión de la segunda, a través de la definición del número de nódulos y de la actividad enzimática de los mismos. En consecuencia, el aporte global por FBN para la soja es menor en suelos bien provistos de N que en aquéllos en que el nutriente es deficitario, situación que se relaciona con niveles bajos de materia orgánica, suelos arenosos o suelos sometidos a agricultura continua.

El impacto de la FBN sobre el rendimiento de la soja depende principalmente de la disponibilidad de agua en dos momentos:

- En los primeros quince días después de la siembra, cuando se instala el sistema nodular y
- En el período crítico para la definición de rendimiento, entre los estadios R₄ y R₆, que coincide con el llenado de los granos.

Sin embargo, el proceso de FBN es altamente sensible al estrés hídrico, de tal modo que cada vez que el agua útil de suelo disminuye por debajo de 60%, umbral crítico para soja durante el llenado de granos, se compromete también la fijación de N, que es máxima en esta etapa, disminuyendo el rendimiento potencial a través de la influencia que el suministro de nitrógeno fijado ejerce sobre él. (González, 2002).

La FBN es una adaptación de las plantas a una situación de carencia de N (Racca, 2002).

A causa del elevado costo energético que demanda este proceso, que alcanza de 16 a 18 moles de ATP por molécula de N reducida, la soja prioriza otras fuentes de suministro en caso de tenerlas disponibles. La abundancia de N en el suelo afecta drásticamente la FBN, disminuyéndola o anulándola (Racca y Collino, 2005).

Por este motivo, la disponibilidad inicial de N inorgánico en el suelo y la capacidad para mineralizarlo durante la estación de crecimiento regulan la magnitud de la FBN (Fig. 1)

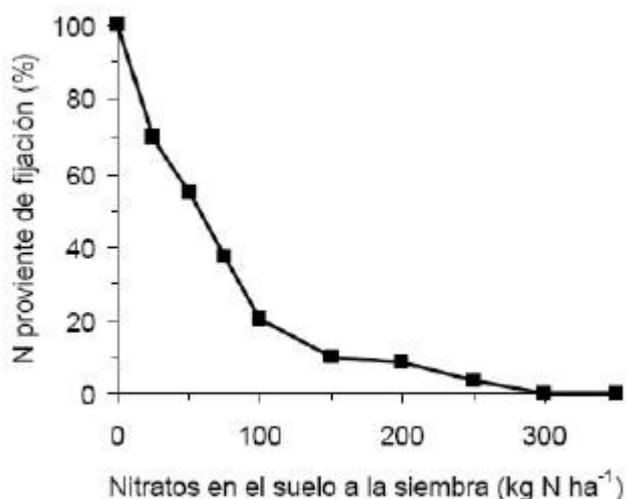


Figura 1: Relación entre el N proveniente de la FBN y la disponibilidad inicial de nitratos en suelo. (Herridge *et al.*, 2001 En: Ferraris y Gonzales, 2007).

De la misma manera, la adición de fertilizantes nitrogenados ha demostrado ser antagónica con la FBN. Diversos ensayos de fertilización nitrogenada muestran una sustitución del N fijado por el aportado por el fertilizante, sin un aumento neto en la asimilación del nutriente (Deibert *et al.*, 1979; Ghelfi *et al.*, 1984).

En general, el interés que posee la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas se basa en la importancia y magnitud del aporte de la fijación biológica de nitrógeno al balance de nitrógeno de la biósfera, particularmente en la fertilización de los cultivos de leguminosas. Los numerosos datos que registra la bibliografía, documentan el efecto positivo de la simbiosis sobre la productividad agrícola, propiedad que se agrega a las ventajas de conservación del medio ambiente (Vassey, 2003).

Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas. *Bradyrhizobium japonicum* ha sido y es el simbiote por excelencia de la soja y la fuente de bacterias para la fabricación de inoculantes comerciales, a pesar de que aproximadamente en 1927 ya se habían descrito dos tipos de organismos que formaban nódulos en la soja, que presentaban morfología similar pero aspectos fisiológicos y serológicos distintos. *Bradyrhizobium japonicum* es el Rizobio más conocido por ser el endosimbionte (organismo simbiótico que se aloja en el interior de su hospedante, en éste caso la planta de soja) que coloniza las raíces de las plantas de soja formando los nódulos donde se realiza la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Al establecerse la relación endosimbiótica entre el huésped (rizobio) y el hospedante (planta leguminosa), el hospedante forma una estructura característica (nódulo) en la que se dan las condiciones apropiadas óptimas para que el rizobio cambie su metabolismo y se transforme en lo que se conoce como bacteroide.

El bacteroide es un rizobio que dedica los recursos energéticos aportados por la planta para producir la Fijación Biológica de Nitrógeno, que es una reacción muy poco frecuente en la naturaleza por la dificultad de transformar este gas tan poco reactivo en una forma disponible para los seres vivos. La planta realiza este esfuerzo ya que a cambio obtiene un recurso (Nitrógeno) que normalmente es insuficiente en el suelo. (Greenquality, 2011) El suelo es el soporte natural en el que proliferan comúnmente un gran número de microorganismos. Se utiliza el término rizósfera para describir la parte del suelo en la que se induce la proliferación de microorganismos por la presencia del sistema radical de las plantas (Garate y Bonilla, 2000).

Entre los microorganismos que colonizan ávidamente la rizosfera, se encuentran los que se conocen colectivamente como promotores del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés) (Kloepper, 1993). Este grupo incluye fijadores de nitrógeno en vida libre o simbiótica, solubilizadores de fósforo, antagonistas de fitopatógenos, microorganismos capaces de sintetizar y liberar reguladores del crecimiento vegetal, etc.

Bajo condiciones de manejo apropiado, estas bacterias aumentan la productividad de los cultivos. A pesar de encontrarse libremente en los suelos, sólo cuando se aplican a las semillas o a las raíces en condiciones óptimas son capaces de producir beneficios agronómicos importantes, incrementando el rendimiento de los cultivos en valores entre 5 a 30% sobre los controles no biofertilizados (Greenquality, 2012 b).

El género *Azospirillum* está conformado por bacterias diazotróficas de vida libre con capacidad de colonizar los tejidos internos y externos de las raíces (Bashan y Levanony, 1990). Este es uno de los géneros más estudiados (Dardanelli *et al.*, 2008).

Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar esta promoción está relacionado con la capacidad de *Azospirillum* de producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas (Okon y Labandera Gonzalez, 1994). Estos compuestos son auxinas, especialmente el ácido indol acético (AIA), giberelinas (GAs), citocininas (CA), etileno (E) (Bottini *et al.*, 1989; Patten y Glick, 1996; Rademacher, 1994; Strzelczyk *et al.*, 1994; Perrig *et al.*, 2007) así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal en las condiciones de estrés abiótico como el ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.* 2007).

Azospirillum brasilense es la PGPR de mayor uso en Agricultura, y por esto, una de las más estudiadas por sus efectos de promoción de crecimiento vegetal. Los resultados obtenidos en todo el mundo la ubicaron entre las bacterias de mayor uso en biofertilizantes comerciales, a partir de 1970 se detectó la capacidad de este microorganismo de estimular el crecimiento de cultivos no leguminosos.

Otra característica muy importante es que esta bacteria puede asociarse a la superficie de las raíces en plantas no leguminosas como cereales y pastos. Sin embargo, su efecto promotor se debe también a otras cualidades de este microorganismo. Una de ellas y la más importante para beneficiar el crecimiento de las plantas es la capacidad de producir fitohormonas. El efecto más notorio de esta capacidad es la estimulación del desarrollo radicular, el cual se traduce en mayor superficie de captación de nutrientes y por lo tanto en una mayor capacidad de crecimiento.

A. brasilense produce las fitohormonas auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico, dependiendo de las condiciones fisiológicas del cultivo bacteriano. Todas estas sustancias actúan como reguladores desencadenando procesos de desarrollo en las plantas y protegiéndolas también frente a condiciones de estrés.

Un cultivo de *A. brasilense* en condiciones fisiológicas adecuadas proveerá a la planta de una adecuada proporción de fitohormonas. Las citoquininas inducen a la división celular favoreciendo entre otros procesos la germinación. Las auxinas aumentan la capacidad de enraizamiento por producir mayor número de raíces laterales y pelos radiculares. Las giberelinas participan en la germinación y alargamiento de tallo. El etileno y el ácido

abscísico son consideradas las hormonas del estrés y protegen a la planta frente a esas condiciones.

Además esta bacteria posee una gran versatilidad metabólica que le permite vivir en un amplio rango de condiciones ambientales. Su metabolismo de C y N es flexible adaptándose a condiciones de estrés y ayuno, utilizando sustancias de reserva que almacenan previamente (polihidroxibutiratos). Por otro lado también produce sideróforos para captar Fe del suelo, aumentando la nutrición de la planta y disminuyendo la población de otros microorganismos patógenos de los alrededores de las raíces por competencia con ellos por este nutriente. (Greenquality, 2012 *a*). El fósforo, después del nitrógeno, es el elemento más requerido por las plantas y microorganismos. Si bien es un constituyente esencial de todos los seres vivos y el nutriente más abundante en la materia orgánica del suelo, generalmente la disponibilidad de fósforo para las plantas y microorganismos se encuentra reducida ya que solo una pequeña fracción es absorbible por las plantas (Cunningham y Munns, 1985). La disponibilidad de este nutriente depende en gran parte de la acción microbiana. La inoculación con cepas solubilizadoras de fósforo en plantas de leguminosas y no-leguminosas ha demostrado tener efectos complementarios a los fertilizantes fosforados (Chabot *et al.*, 1996, Fernandez *et al.*, 2005). Está descrito que los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* son los solubilizadores de fósforo más eficientes (Rodríguez y Fraga, 1999). Existen un importante número de reportes y estudios científicos sobre aislamientos de *Pseudomonas* con diferentes capacidades de mejorar el desarrollo vegetal. La mayoría de estos aislamientos han sido testeados en condiciones controladas de laboratorio o invernadero y, en algunos casos se han observado efectos positivos de la inoculación en condiciones de campo (Valverde y Ferraris, 2009).

Pseudomonas fluorescens pertenece al grupo de las PGPR y las diferentes cepas abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las plantas, pero no establecen una relación simbiótica. En la actualidad, la principal característica promotora de crecimiento las cepas comercializadas de *Pseudomonas fluorescens* es la capacidad de solubilizar fósforo, haciéndolo disponible para la planta. Esta característica es de suma importancia para los suelos que poseen este nutriente en forma mineral ya que si bien el nutriente está presente, la planta no puede incorporarlo. Este microorganismo excreta en el suelo sustancias que hacen soluble el fósforo, permitiendo su biodisponibilidad para la planta.

La alta capacidad de solubilizar el fósforo que posee *Pseudomonas fluorescens*, se debe a dos características:

a) producen y liberan al medio ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucónico) que actúan disminuyendo el pH del suelo favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo.

b) la otra forma es a través de las fosfatasa que posee, que son enzimas hidrolíticas mono y di-esterasas que liberan los grupos fosfatos de la materia orgánica los que pasan a la solución del suelo.

Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato para ser absorbido por las raíces de las plantas. (Greenquality, 2012 c).

Para maximizar el rendimiento en soja, y sin perder la ventaja de la FBN, se pueden utilizar inoculantes, que son productos preparados con microorganismos activos de modo que puedan colonizar eficientemente las raíces al momento de la aplicación. Por esto, el inoculante es el medio en que estas bacterias son transportadas desde la elaboración hasta el momento de aplicación. El inoculante de mayor historia y conocimiento en el mercado es el que incluye al Rizobio *Bradyrhizobium japonicum*, que es el huésped de *Glycine max* (Soja).

La condición fisiológica de las bacterias depende entonces de la formulación de dicho inoculante y del recuento obtenido en la elaboración. Es fundamental que los Rizobios se encuentren en un estado activo para que una vez aplicados sobre la semilla puedan competir por la colonización de las raíces con la flora nativa del suelo y estimular adecuadamente a las plántulas de soja para lograr la formación de nódulos óptima en su cultivo.

Además, se puede utilizar *Bradyrhizobium japonicum* combinada con las bacterias promotoras de crecimiento *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, el cual permite obtener todavía mejores resultados en rendimiento gracias al efecto sinérgico de estas bacterias benéficas específicamente seleccionadas para este cultivo.

Estudios de inoculación en plantas indican que algunas PGPR, que interactúan entre ellas, proveen nutrientes a la planta, remueven productos inhibitorios y se estimulan unas a otras mediante actividades físicas o bioquímicas, que podrían aumentar algunos aspectos benéficos de su fisiología, como por ejemplo la FBN (Bashan, 1998). Algunas PGPR como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Serratia* y *Aeromonas* pueden mejorar la nodulación y la fijación de nitrógeno en plantas leguminosas (Barea *et al.*, 2005).

Estudios de co-inoculación con PGPR de vida libre y *Rizobium* han demostrado incrementos en el peso seco radical y de la parte aérea, el vigor de la planta, la nodulación, y el nitrógeno fijado en varias leguminosas. Una de las co-inoculaciones mas ensayadas es la de *Azospirillum- Rizobium*. Okon, 2007; cita el efecto positivo en leguminosas con respecto a esta co-inoculación y especialmente el número de nódulos, aparición de los nódulos e incremento del crecimiento de la planta.

Los PGPR se encuentran en contacto íntimo con la semilla y la raicilla expuesta ni bien la semilla germina. En este punto comienza a intercambiarse información entre *Bradyrhizobium japonicum* y *Glycine max* del mismo modo que en la Inoculación convencional. La diferencia radica en que también se obtienen sustancias fitoestimulantes de

Pseudomonas fluorescens y *Azospirillum brasilense*. Esta última bacteria tiene un efecto destacado por su reconocida estimulación del desarrollo radicular directamente, gracias a las hormonas que es capaz de generar. Así, el mayor desarrollo radicular logrado aumenta la superficie expuesta al rizobio endosimbótico de este cultivo, lográndose una nodulación más temprana y eficiente, lo que adelanta los beneficios de la Fijación Biológica de Nitrógeno.

El beneficio de este producto tribacterial es todavía mayor, ya que la mayor superficie radicular lograda no solo adelanta y favorece la FBN, sino que también aumenta la superficie radicular y la capacidad de captación de todos los nutrientes que la planta necesita. Por supuesto, la mayor superficie radicular aumenta la capacidad de captación de agua.

Azospirillum brasilense también es capaz de realizar fijación de Nitrógeno gaseoso, aunque en mucho menor medida que *Bradyrhizobium japonicum*, y sin ingresar a la planta ni producir una estructura diferenciada como el nódulo.

El aporte de *Pseudomonas fluorescens* se destaca por la capacidad de esta bacteria de solubilizar fosfatos, los cuales suelen estar poco disponibles en la mayoría de los suelos del país. Esta bacteria aumenta entonces la disponibilidad de este nutriente tan importante para el desarrollo de las plantas. Además aporta sustancias promotoras del crecimiento vegetal y libera sideróforos que impiden el desarrollo de algunos microorganismos patógenos.

Adicionalmente produce sustancias bactericidas y funguicidas que disminuyen la ocurrencia de enfermedades a nivel radicular y mejoran la sanidad del suelo y de su cultivo.

Las ventajas mencionadas son las más importantes y reconocidas, pero existen todavía muchas otras, las cuales actúan sinérgicamente para mejorar la resistencia a condiciones de estrés en el cultivo y finalmente para producir mejoras en el rendimiento. También se obtienen beneficios secundarios menos conocidos y estudiados, como por ejemplo, el aumento de la biomasa producida, lo que implica mayor recirculación de materia orgánica en el suelo, efecto que a largo plazo mejora la retención de agua, disminuye los requerimientos de fertilización química. (Greenquality, 2012d).

En este proyecto se pretende cuantificar la respuesta de la interacción entre bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (consorcio o mezclas) en el cultivo de soja para brindar a la agricultura herramientas que permitan, no solo una mayor productividad, sino también aportar hacia la conservación del medio ambiente.

HIPÓTESIS

Los tratamientos inoculados con mezclas (consorcio) de microorganismos generan aumentos del rendimiento en el cultivo de soja.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la fijación biológica del nitrógeno con consorcio de microorganismos en el cultivo de soja para lograr un mayor rendimiento del mismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el peso seco aéreo y radical por metro cuadrado de superficie en los diferentes tratamientos a los 60 días después de siembra cuando el cultivo se encuentre en plena floración (R2) y a los 90 días después de siembra cuando el cultivo se encuentre en pleno llenado de granos (R5-R6).
- Cuantificar el peso seco m^{-2} y número de nódulos de las raíces principales y secundarias (todos los órdenes de las raíces) m^{-2} en los diferentes tratamientos a los 60 días después de siembra cuando el cultivo se encuentre en plena floración (R2).
- Cuantificar el peso seco de los nódulos y números de los mismos a los 90 días después de siembra en los diferentes tratamientos cuando el cultivo se encuentre en pleno llenado de granos (R5-R6).
- Evaluar el rendimiento en granos y los componentes del mismo (número de granos por superficie y peso de los 100 granos) en estado de madurez fisiológica (R8).
- Determinar el contenido proteico de los granos.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) -Caracterización del sitio experimental

Para cumplir con los objetivos propuestos, el ensayo se estableció en la “Estancia El Porvenir”, ubicada a 15,5 km al Este de la ciudad de Río Cuarto en la provincia de Córdoba (33° 06′ 91″ Latitud Sur; 64° 30′ 97″ Longitud Oeste; 503 mts SNM). La temperatura media del mes más frío (julio) es 9.9 °C, con una mínima absoluta de -11.6 °C, siendo la temperatura media del mes más cálido (enero) de 22,4 °C con una máxima absoluta de 41.6 °C. La amplitud térmica media anual es de 12.5 ° C (Servicio de Agrometeorología, 2012). La fecha media de la primera helada es el 25 de mayo y la fecha media de la última helada es el 12 de septiembre, siendo el período libre de heladas en promedio de 255 días (Seiler *et al.*, 1995). El sitio experimental está caracterizado por un régimen de precipitaciones monzónico, que concentra el 80% de las lluvias en el período de octubre a abril. La precipitación media anual es de 784 mm para la serie 1981-2010 (Servicio de Agrometeorología, 2012).

Los suelos predominantes en este establecimiento según el Atlas de Suelos de la Provincia de Córdoba son clasificados taxonómicamente como **Hapludoles Típicos** de textura franca gruesa, mixta. Esta familia agrupa suelos profundos, bien drenados, desarrollados sobre materiales francos vinculados a sectores deprimidos. (Atlas de Suelos de la Provincia de Córdoba, 2006)

Análisis de suelo: Previo a la siembra se tomaron submuestras de suelo de los primeros 40 cm de profundidad utilizando transectas para analizar las propiedades físico-químicas del suelo midiendo los siguientes parámetros: pH y Conductividad eléctrica (1:2,5 suelo/agua) (Mc Lean, 1982); Materia orgánica (Bremner y Mulvaney, 1982); Fósforo (Bray y Kurtz, 1945); N-NO₃ por el método de reducción de cadmio (Lambert y Dubois, 1971). En la tabla 1 se observan los valores de los parámetros obtenidos mediante análisis de suelo en sus respectivas unidades.

Tabla 1: Resultado de análisis de suelo, campaña 2011-2012, Río Cuarto.

P del suelo (ppm)	13,45
N-N03 (0-20 cm) (ppm)	14,33
N-N03 (20-40 cm) (ppm)	10,65
NO3 (0-20 cm) (ppm)	63,50
NO3 (20-40 cm) (ppm)	47,20
MO (%)	1,89
pH (0-20 cm)	6,1
pH (20-40 cm)	6,85
CE 1:1 (mmho/cm) (0-20 cm)	0,093
CE 1:1 (mmho/cm) (20-40 cm)	0,086

b) -Cepas:

- a. *Bradyrhizobium japonicum* E109 (INTA_IMYZA) como cepa de referencia.
- b. *Pseudomonas* spp. solubilizadora de fósforo.
- c. *Azospirillum brasilense* AZ 39

c) -Tratamiento de las semillas:

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas* spp. y *Azospirillum brasilense* a emplear se formularon como inoculantes líquidos, siguiendo procedimientos estándares del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1988). El número de microorganismos por mililitro de inoculante es del orden de 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) para *Bradyrhizobium japonicum*, de 10^{10} UFC para *Pseudomonas fluorescens* y de 10^9 UFC para *Azospirillum brasilense*. Los inoculantes se aplicaron a la semilla previo a la siembra. En el tratamiento de mezclas de microorganismos se aplicó a las semillas el coinoculante constituido por las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *Peudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense* en las siguientes dosis:

- Tratamiento con *Bradyrhizobium japonicum*: 50 ml. cada 100 kg. de semilla
- Tratamiento con *Pseudomonas fluorescens*: 50 ml. cada 100 kg. de semilla
- Tratamiento con *Azospirillum brasilense*: 20 ml. cada 100 kg. de semilla

En todos los casos se utilizó agua destilada hasta completar 500 ml de caldo cada 100 kg de semilla.

d) -Tratamientos evaluados:

T1- C: Control: sin inocular ni fertilizar.

T2- N: Fertilización nitrogenada: se aplicó UREA como fuente de fertilizante nitrogenado hasta alcanzar una dosis total de 250kg N/ha a la siembra, se cuantificó el N a aportar por medio de análisis de suelo.

T3- I: Inoculado con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* E109.

T4- I+PF: Inoculado con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Pseudomonas* spp.

T5- I+PF+AB: Inoculado con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* E109, *Pseudomonas* spp. y *Azospirillum brasilense* AZ 39.

T6- I+AB: Inoculado con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* AZ 39.

e) -Diseño experimental del ensayo:

Los tratamientos se asignaron en un diseño experimental de bloques completos al azar con 3 repeticiones. El tamaño de las parcelas fue de 15 m de largo y 6 surcos de ancho distanciados a 0,52 metros. El sistema de labranza utilizado fue un sistema en siembra directa en un lote con cultivo antecesor de maíz y el desarrollo del cultivo se realizó bajo condiciones de secano.

f) -Cultivar: Soja variedad Don Mario 4210 (Grupo IV corto).**g) -Evaluaciones realizadas**

En las etapas fenológicas R2 (plena floración) y R6 (máximo tamaño de semillas) se tomaron muestras de plantas de cada tratamiento y repetición para determinar:

- Peso seco de raíz y de parte aérea m^{-2} . Las muestras fueron secadas en estufa a 70 °C hasta peso constante.
- Número y peso seco de nódulos m^{-2} : los nódulos se secaron en estufa a 70 °C hasta peso constante.
- Estimación del rendimiento: En la etapa fenológica R8 (madurez fisiológica) se determinó el rendimiento expresado en kilogramos por hectárea en base a los componentes del mismo es decir número de granos por superficie (influenciado por número de plantas/ m^2 , número de vainas/planta, número de granos/vaina) y peso de los 100 granos.
- Determinación del contenido proteico de los granos expresados en porcentaje a través del método de Kjeldahl modificado para cada tratamiento.

Para realizar los muestreos representativos de cada parcela se descartaron surcos de bordura, y se trabajó sobre surcos centrales. El procedimiento fue extraer las plantas que se encontraban en medio metro cuadrado de superficie (95,23 cm. de surco), realizándose 3 repeticiones por cada parcela.

El análisis de contenido de proteína de los granos se realizó por duplicado sobre muestras formadas por granos de todas las repeticiones de cada tratamiento, por razones de costo económico de cada análisis.

h) -Fertilizante:

El fertilizante utilizado en el ensayo fue UREA granulada (46 % de nitrógeno), aplicada al costado de la línea de siembra.

i) -Siembra y Fertilización:

La siembra fue realizada el día 25 de noviembre de 2011 con una sembradora AGROMETAL de 9 surcos, distanciados a 0,525 mts con sistema dosificador a placas. La cantidad de semilla a utilizar fue de 82 kg/ha (24 semillas por metro lineal, considerando un peso de las 100 semillas de 18 gr). La fertilización con nitrógeno fue realizada solamente en el tratamiento T2 en el cual se aplicó UREA granulada (46% N) como fuente de nitrógeno en una dosis de 180 kg/ ha (suponiendo una eficiencia de utilización del fertilizante en el orden del 70%), aplicada al boleo 6 días posteriores a la siembra. En cuanto a la fertilización fosforada, de acuerdo a los análisis de suelo, no se realizó aplicación alguna de fertilizante ya que el análisis de suelo arrojó buenos valores de fósforo.

J) -Análisis de datos:

Con los datos obtenidos de cada variable a medir y en cada etapa fenológica correspondiente, se realizó el análisis estadístico de ANOVA (análisis de varianza) y las medias comparadas con la prueba de DGC con un nivel de significancia de 5 % ($p=0,05$) (Di Renzo *et al.*, 2012). El análisis estadístico se realizó usando el programa InfoStat (InfoStat, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de la campaña 2011-2012

La campaña en estudio se caracterizó por ser una de las más problemáticas para el normal crecimiento y desarrollo de los cultivos en gran parte del territorio Argentino. Como puede notarse, este efecto también afectó a nuestra zona en donde las temperaturas anuales presentaron valores superiores a los históricos durante toda la etapa de crecimiento del cultivo en estudio (Fig. 2), a su vez, también puede observarse que las precipitaciones si bien fueron levemente superiores a las históricas en el mes de enero y bastante superiores en febrero (fig. 3), no alcanzaron a contrarrestar los problemas causados por las elevadas temperaturas acompañadas de déficits hídricos durante los meses de diciembre, enero y marzo, desencadenando severos problemas para los cultivos estivales de esta campaña.

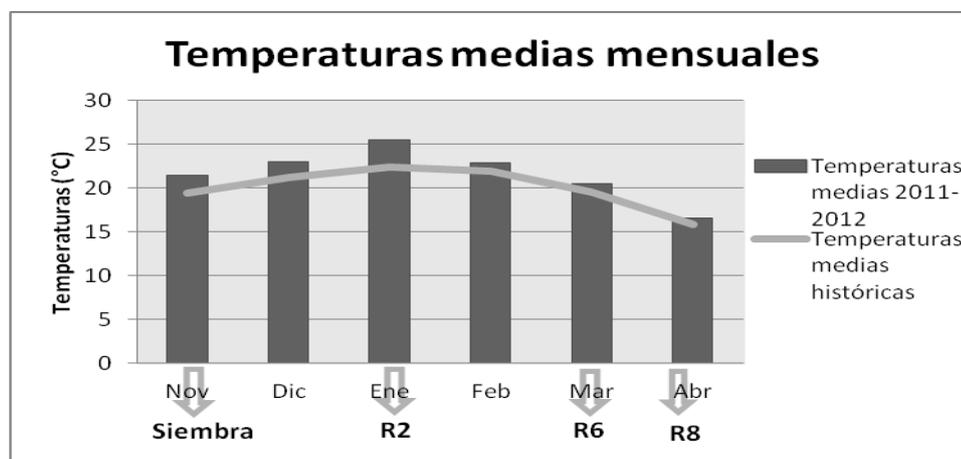


Figura 2: Temperaturas medias mensuales históricas y temperaturas medias mensuales de la campaña 2011-2012, Río Cuarto. Servicio de Agrometeorología, 2012.

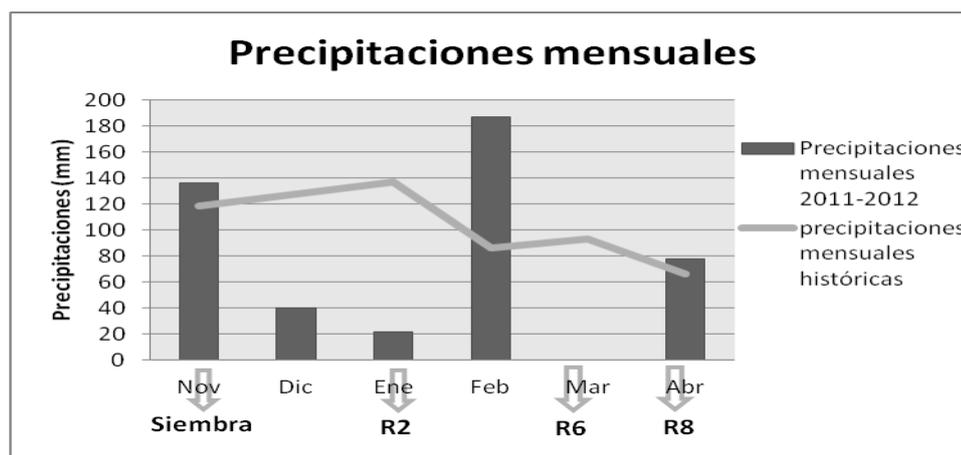


Figura 3: Precipitaciones medias mensuales históricas y precipitaciones medias mensuales de la campaña 2011-2012, Río Cuarto. Servicio de Agrometeorología, 2012.

Determinaciones en el estadio fenológico R2

Los siguientes datos fueron tomados a campo el día 24 de enero del año 2012, cuando el cultivo se encontraba en estadio fenológico R2.

A)-Número de nódulos:

Como puede observarse en la figura 4, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y el número de nódulos en las raíces principales por superficie en relación al testigo, esto puede deberse a que el lugar en donde se realizó el experimento, contaba con varios años de agricultura y ya se había aplicado la práctica de inoculación en varias oportunidades, esto lleva a que en el suelo, se encuentren formas naturalizadas de rizobios los cuales compiten en la capacidad de infectar las raíces de las plantas con las bacterias presentes en el inoculante, no observándose el efecto de dicho tratamiento en el estadio fenológico R2. Se observa, que todos los tratamientos en los que se aplicó alguna técnica de inoculación (T3; T4; T5 y T6), presentaron un mayor número de nódulos que el tratamiento testigo (T1), y el tratamiento que fue fertilizado con UREA (T2), también posee un mayor número de nódulos que el testigo, y similar al tratamiento 3. Peticari (2005) dice que en áreas con varias secuencias del cultivo de soja la repetida inoculación anual ha permitido que los rizobios introducidos capaces de nodular al cultivo de soja se hayan establecido en la mayoría de los suelos sojeros.

Gonzalez (2002), cita que una vez que la población de rizobios se ha naturalizado, comienza a operar el fenómeno de competencia entre las cepas inoculadas y las naturalizadas en el suelo por la formación de nódulos.

Las cepas naturalizadas son más competitivas y más resistentes al stress pero menos eficientes en la FBN que las recientemente introducidas (Racca, 2002).

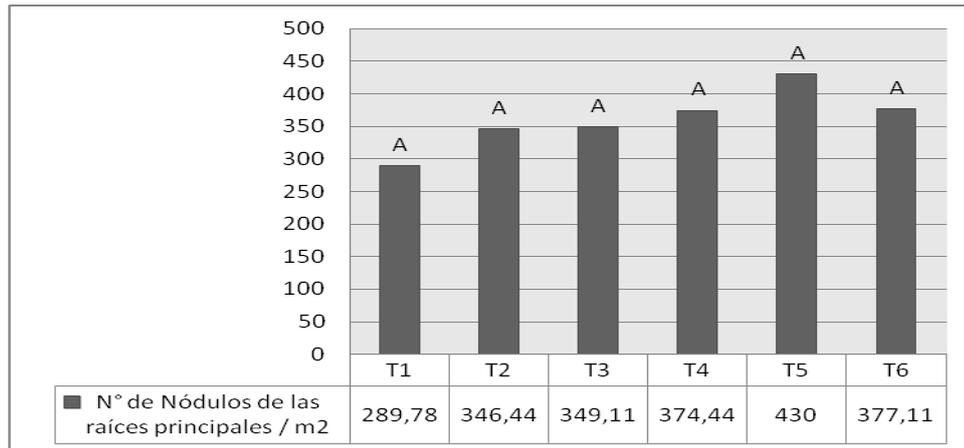


Figura 4: Número de nódulos en las raíces principales m^{-2} en el estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Como puede observarse en la figura 5, no hay diferencias estadísticas entre el número de nódulos de las raíces secundarias por metro cuadrado y los diferentes tratamientos con respecto al tratamiento testigo. Se observa que los valores absolutos de todos los tratamientos estuvieron por encima del tratamiento T2, demostrando que el agregado exógeno de fertilizante nitrogenado, disminuye la nodulación. Respuesta similar a la obtenida en este trabajo fue la de Ferraris y Gonzalez Anta (2007), quienes dicen que fertilizar con nitrógeno el cultivo de soja disminuye considerablemente la nodulación y la contribución de la FBN, sin lograr aumentos significativos de rendimiento. Racca (2002), cita que como la nodulación es energéticamente más cara que la absorción de N del suelo, las leguminosas desarrollaron mecanismos fisiológicos que permiten disminuir o anular la FBN ante suficiente N mineral en el suelo. Debido a estos mecanismos, cuando hay suficiente N disponible en el suelo la FBN tiende a cero.

Además de lo expuesto anteriormente, puede observarse que el tratamiento T6, el cual contiene *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* AZ 39, posee un mayor número de nódulos que el testigo, resultado similar al obtenido por Marko e Iglesias (2003) en el que vieron que la co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum* Az 39 INTA marcaron ventajas favorables para el número de nódulos con relación al testigo sin inocular.

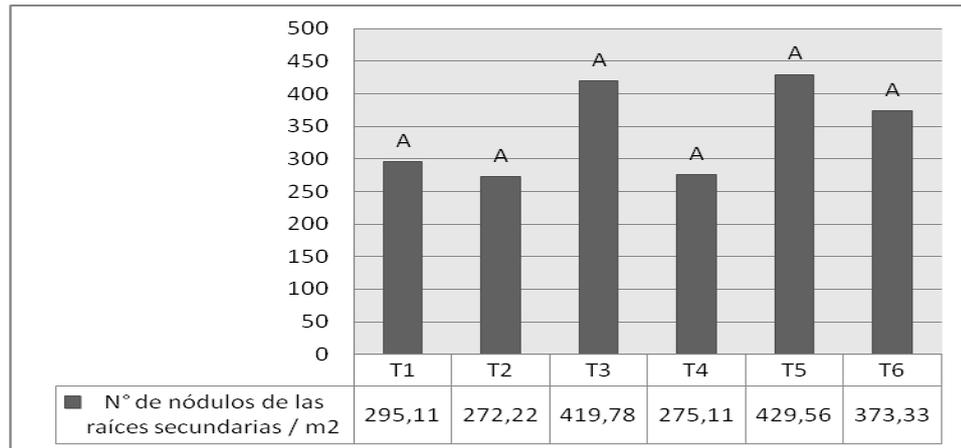


Figura 5: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en el estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

B) - Peso seco de nódulos:

Como puede observarse en la fig. 6 no existen diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los nódulos y los diferentes tratamientos con relación al testigo. Si bien no hay diferencias estadísticas, se puede observar en la figura 6 que el peso seco de los nódulos de los tratamientos T3; T4; T5 y T6, son mayores al peso de los nódulos del tratamiento testigo T1, demostrando que la inoculación genera un mayor peso seco de nódulos. A su vez, también puede observarse que los tratamientos T5 y T6 fueron los que presentaron el mayor peso de nódulos, de manera similar al resultado obtenido por Urich y Benintende (2005), quienes encontraron en la región noreste argentina que la coinoculación de rizobios y azospirilos en un lote en el que se había realizado cultivo de soja con anterioridad, mostró efectos positivos en la variable peso de nódulos.

Con respecto al tratamiento T2, este presenta un mayor peso de nódulos que el testigo, pero eso puede deberse a que como se explicó anteriormente, el cultivo no presentó la cantidad suficiente de nitrógeno en forma temprana, lo que produjo un mayor número de nódulos en las raíces principales m^{-2} y por consiguiente, al haber una mayor cantidad de nódulos de las raíces principales por superficie, se obtiene un mayor peso de los mismos.

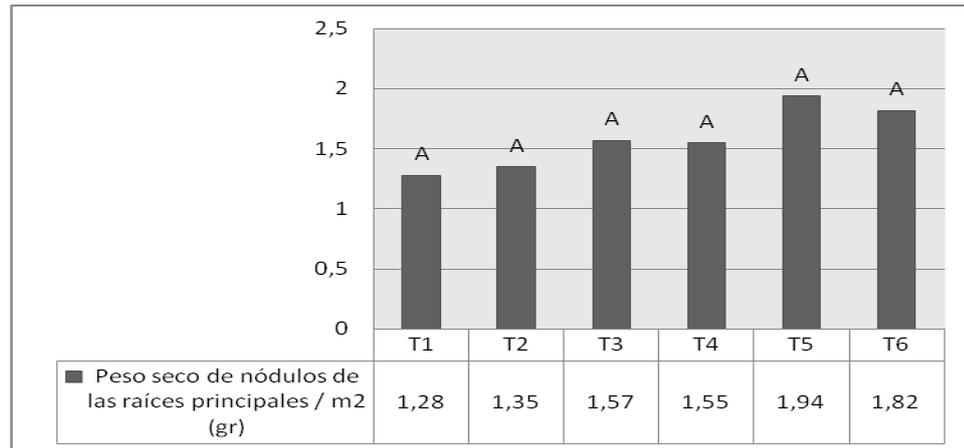


Figura 6: Peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Como se puede observar en la figura 7, el tratamiento T5 difiere estadísticamente de los demás tratamientos en el peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} . Para los demás tratamientos, T3; y T6, no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento testigo T1. La diferencia estadística entre el tratamiento T5 y el tratamiento testigo, deja en evidencia que la co-inoculación de *Bradyrhizobium japonicum* con *Pseudomonas spp* y *Azospirillum brasilense* genera un mayor peso de nódulos en las raíces secundarias m^{-2} . Los tratamientos T2 y T4, mostraron el menor peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} .

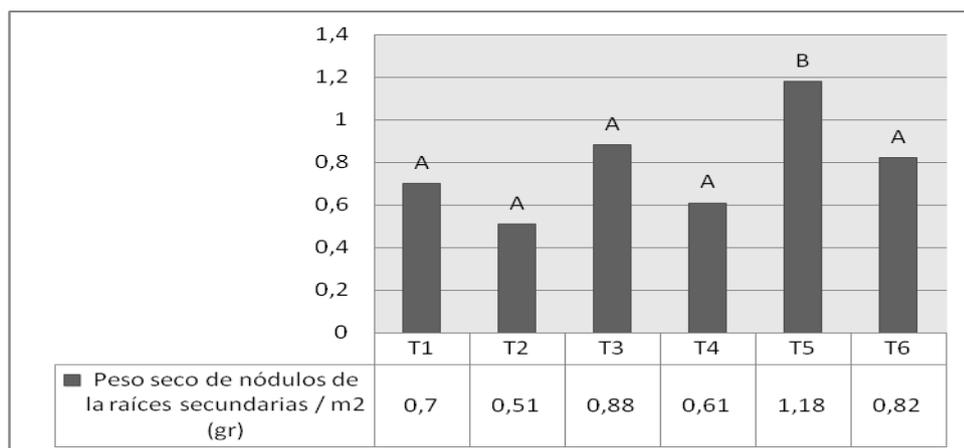


Figura 7: Peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Como puede observarse en la figura 8, no existen diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos y el testigo para la variable peso seco de nódulos totales m^{-2} . Puede notarse que todos los tratamientos en los que se realizó alguna práctica de inoculación (T3; T4; T5 y T6), obtuvieron valores superiores al tratamiento testigo T1, evidenciando que la práctica de inoculación genera un mayor peso seco de nódulos. De manera similar a lo obtenido para el peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} , se puede observar que el tratamiento T6 posee un mayor peso seco de nódulos m^{-2} , coincidiendo este resultado al obtenido por Uhrich y Benintende (2005), quienes en su trabajo si bien no detectaron diferencias significativas entre la aplicación dual y la simple se pudo observar que en promedio la aplicación de los dos microorganismos (*Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*) incrementó un 12 % el peso de nódulos respecto de la aplicación simple de *B. japonicum*.

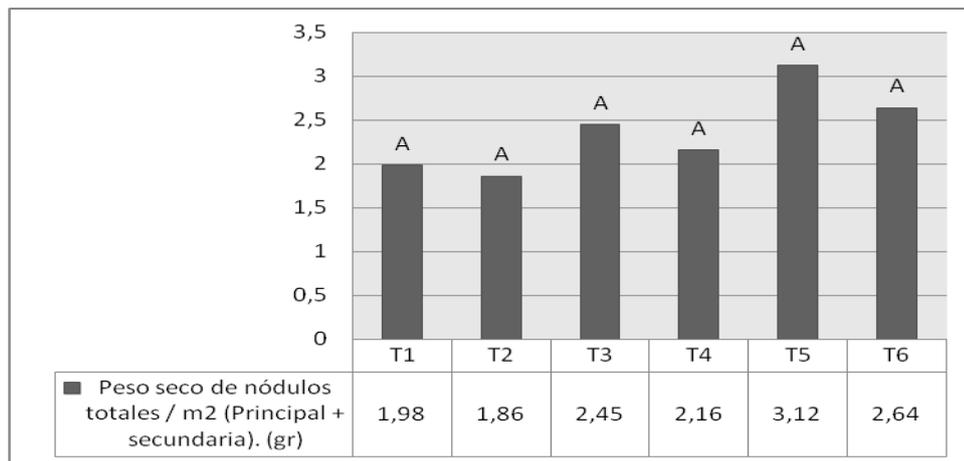


Figura 8: Peso seco de nódulos totales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

C) - Peso seco aéreo y radical.

En las figuras 9, 10 y 11 se pueden observar el peso seco aéreo, radical y total m^{-2} respectivamente de los diferentes tratamientos expresados en gramos (gr).

No existen diferencias estadísticas en cuanto al peso seco aéreo, radical y total de los diferentes tratamientos, con relación al testigo sin inocular. Lo que si puede notarse es que el tratamiento T2 fertilizado con nitrógeno, posee un mayor peso seco en esta primera medición con respecto a los demás tratamientos, esto puede deberse a que como se fertilizó con UREA el suelo dispone de una suficiente cantidad de nitrógeno y permite un mejor crecimiento de la planta.

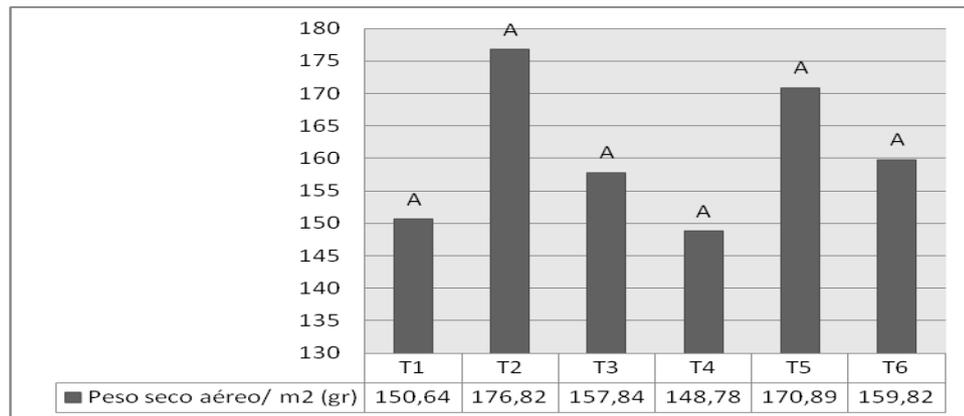


Figura 9: Peso seco aéreo (gr) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

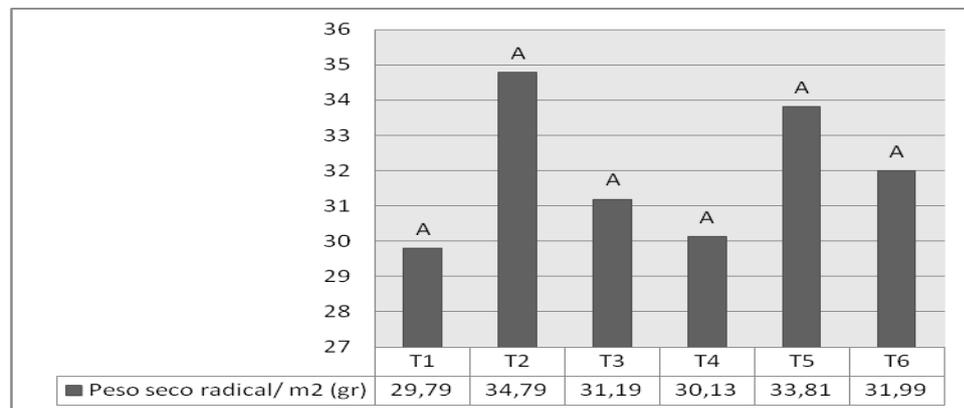


Figura 10: Peso radical (gr) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

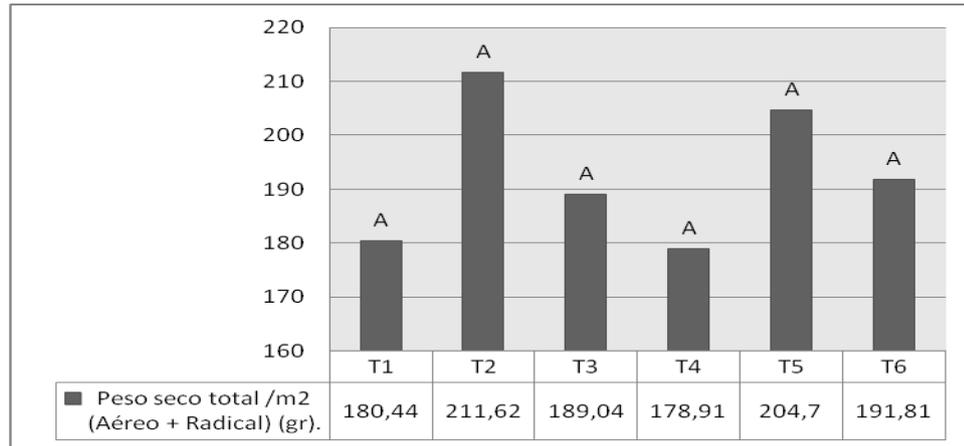


Figura 11: Peso seco aéreo y radical (gr) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Determinaciones en el estadio fenológico R6.

Los siguientes datos fueron tomados a campo el día 13 de Marzo del año 2012, cuando el cultivo se encontraba en estadio fenológico R6.

A) - Número de nódulos:

Como puede observarse en la figura 12, existen diferencias estadísticas en el número de nódulos de las raíces principales m^{-2} de los tratamientos con algún tipo de inoculación (T3 a T6) con respecto al testigo, los cuales en promedio arrojan un valor de 288,8 nódulos m^{-2} , superando en un 68,4 % al tratamiento testigo sin inocular (T1). Dentro de los diferentes tratamientos que recibieron la práctica de inoculación (T3 a T6), no hubo diferencias estadísticas entre ellos. En este estadio fenológico R6, puede notarse que la inoculación fue positiva en relación a T1 y T2.

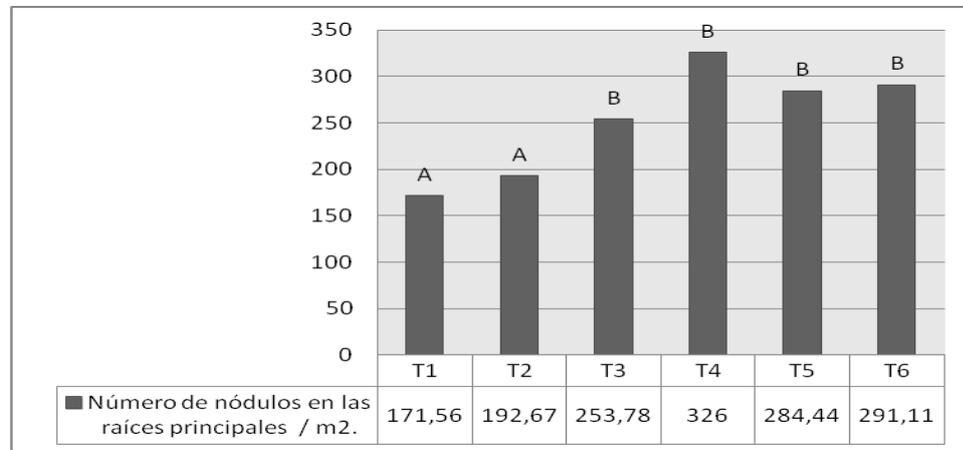


Figura 12: Número de nódulos de las raíces principales / m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

La figura 13 muestra los resultados obtenidos en la medición del número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} de superficie, en donde se puede observar que no existen diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos y el tratamiento testigo. Puede notarse con claridad una mayor cantidad de nódulos en los tratamientos que fueron tratados con inoculantes (T3; T4; T5 y T6) con respecto al tratamiento testigo, cantidad que equivale en promedio a un 36,4% más de nódulos en los tratamientos mencionados con relación al tratamiento testigo.

A su vez puede notarse que el número de nódulos de las raíces principales m^{-2} de los tratamientos inoculados, supera estadísticamente al tratamiento testigo, demostrando el efecto del inoculante utilizado, coincidiendo con Peticari et. al., (2003), quien afirma que las cepas más eficientes son aquellas que tienen mayor cantidad de nódulos medianos y grandes,

ubicados en raíz primaria y tienen rápida y prolongada fijación (Desde estado V2-V3 hasta R6).

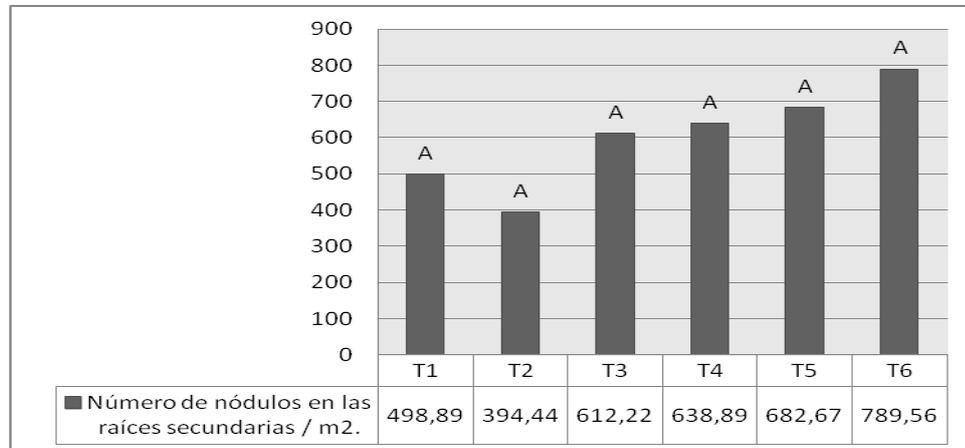


Figura 13: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

B) - Peso seco de Nódulos.

Al observar las figuras 14, 15 y 16 en donde se representan el peso seco de nódulos de las raíces principales, secundarias y totales m^{-2} respectivamente, puede notarse que existen diferencias estadísticamente significativas en 2 de las 3 variables estudiadas, (Peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} , y peso seco de nódulos de las raíces totales m^{-2}), no observándose diferencia estadística en la restante variable analizada (Peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2}) con respecto al tratamiento testigo. Puede observarse que los tratamientos que fueron inoculados (T3 al T6), difieren estadísticamente con respecto al tratamiento testigo sin inocular T1 en el peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} de superficie (Fig. 14) superándolo en promedio en un 99%, obteniéndose el máximo valor para esta variable en el tratamiento T6, el cual superó al tratamiento testigo en un 113% .

Con respecto al peso seco de los nódulos de las raíces secundarias m^{-2} , no se presentó diferencia estadística entre los diferentes tratamientos y el tratamiento testigo. No obstante puede observarse que los tratamientos cuyas semillas fueron tratadas con microorganismos (T3 al T6), superaron en promedio al tratamiento testigo en un 14% (Fig. 15).

Al observarse la figura N° 16 puede notarse que existen diferencias estadísticas para la variable peso seco de nódulos totales m^{-2} de superficie entre los tratamientos que fueron inoculados (T3 al T6) con respecto al tratamiento testigo sin inocular T1.

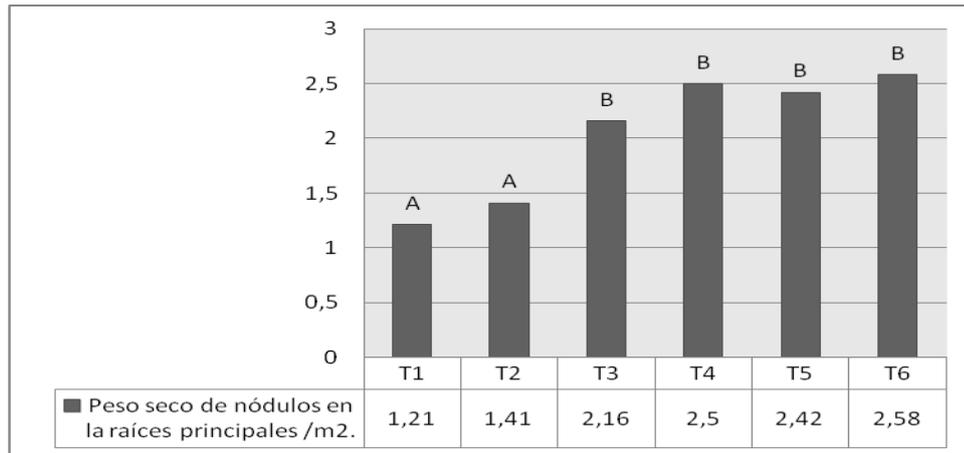


Figura 14: Peso seco de nódulos de raíces principales / m² en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

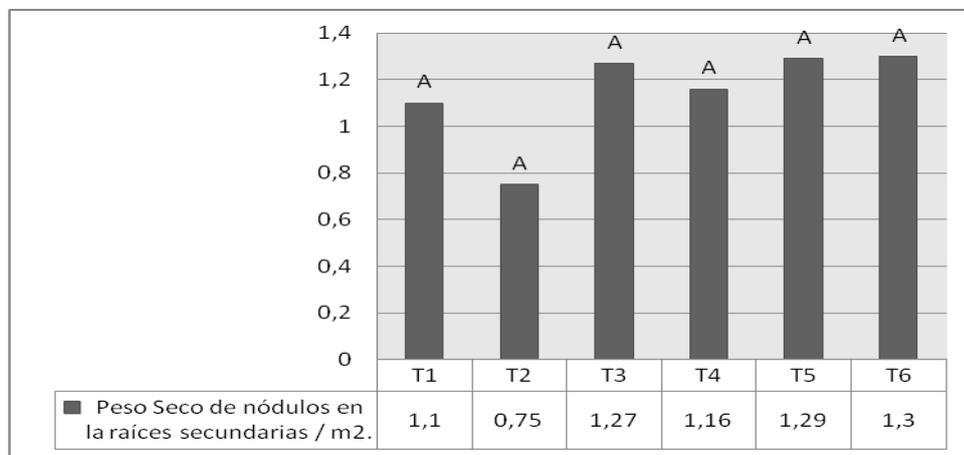


Figura 15: Peso seco de nódulos de raíces secundarias / m² en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

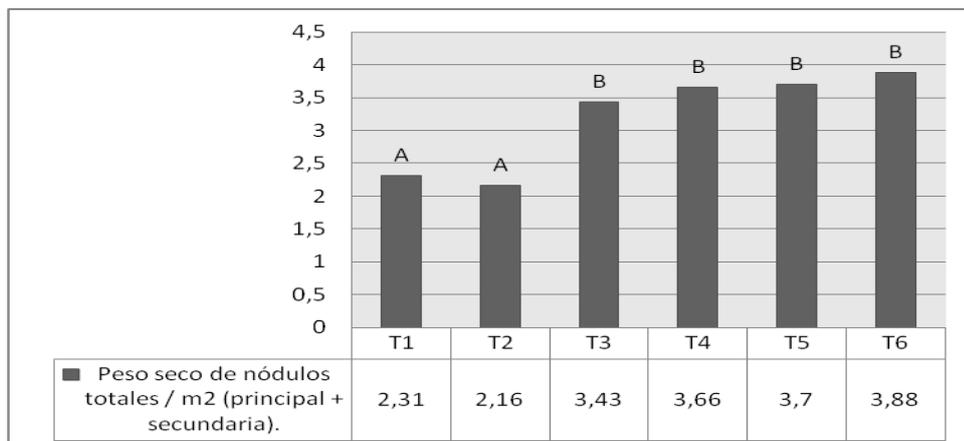


Figura 16: Peso seco de nódulos totales / m² en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

C) - Peso seco Aéreo y Radical.

Como puede verse en las figuras 17, 18 y 19, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y el tratamiento testigo para la variable peso seco aéreo, radical y total (aéreo + radical) respectivamente. Puede notarse que todos los tratamientos que han sido tratados con microorganismos (T3; T4; T5 y T6), superaron al tratamiento testigo T1 en el peso seco, ya sea aéreo (Fig. 17), radical (Fig. 18) y total (Fig. 19).

En lo que respecta al tratamiento T2 (Fertilizado), puede notarse que superó al tratamiento testigo en el peso seco aéreo y total, pero no lo fue así en el peso seco radical.

Esto puede deberse a que en el cultivo en este estadio, el déficit hídrico no fue tan marcado como lo fue en el estadio fenológico R2, por lo que la planta no destinó demasiado fotoasimilados para el crecimiento radical y si lo hizo para lograr un mayor crecimiento aéreo.

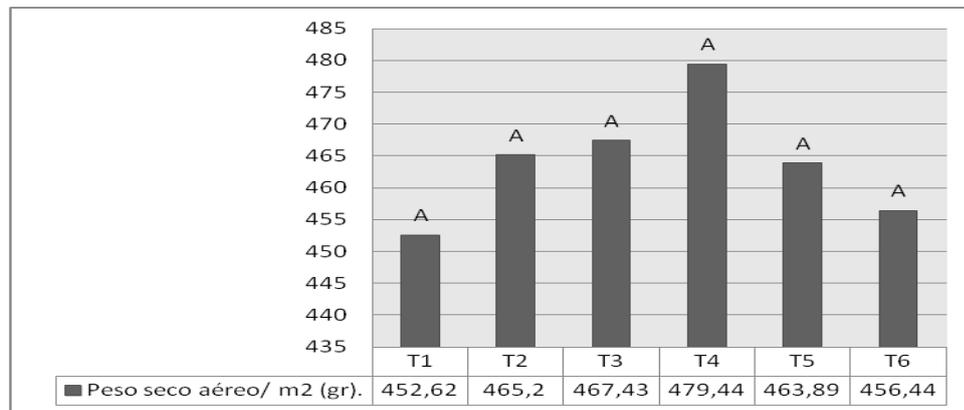


Figura 17: Peso seco Aéreo m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

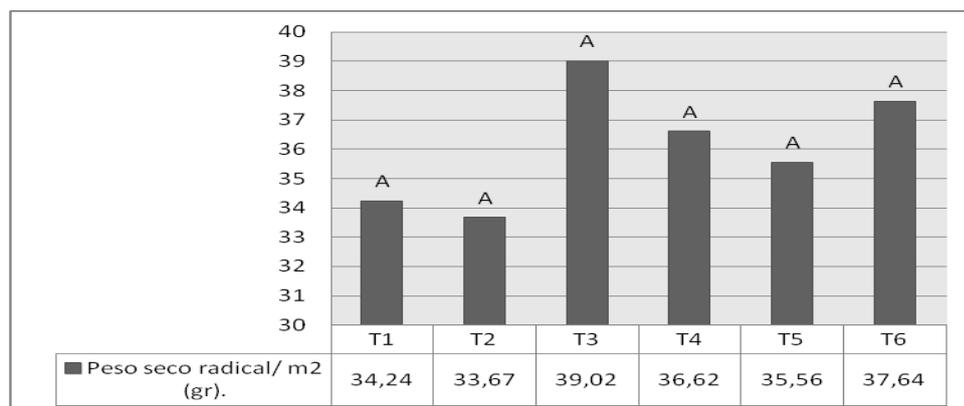


Figura 18: Peso seco radical m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

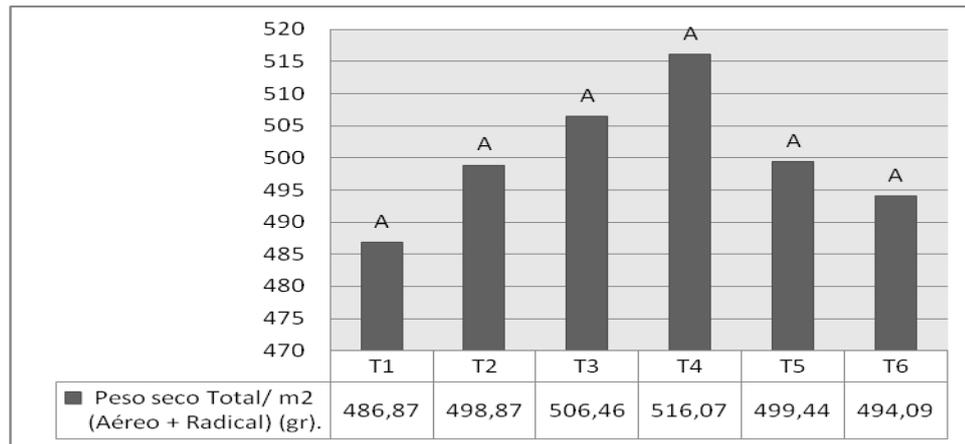


Figura 19: Peso seco total m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Comparaciones entre estadios fenológicos R2 y R6 para las variables analizadas.

En ambos estadios fenológicos el número de nódulos de las raíces principales por metro cuadrado de superficie es mayor en los tratamientos inoculados que en el tratamiento testigo, diferenciándose estadísticamente solamente en el estadio R6. En el estadio fenológico R2, los tratamientos inoculados (T3 al T6) superan en promedio al tratamiento testigo en un 32%, arrojando un valor promedio de 382 nódulos m^{-2} . En el estadio fenológico R6, los tratamientos inoculados superan en promedio al testigo en un 68,4 %, lo que representa un valor de 288 nódulos m^{-2} . Como bien puede observarse el número de nódulos de las raíces principales disminuyó a lo largo de la estación de crecimiento del cultivo, esto podría deberse a las pésimas condiciones hídricas por las que atravesó el cultivo disminuyendo el número de nódulos en las raíces principales a medida que este iba creciendo.

Si bien el número de nódulos de las raíces secundarias por metro cuadrado es mayor en los tratamientos inoculados con respecto al tratamiento testigo en los estadios fenológicos R2 y R6, puede observarse que el número de nódulos en las raíces secundarias se duplicó en R6 con respecto a R2.

Todo lo dicho anteriormente coincide con los resultados obtenidos por Racca, 2002, quien afirma que para la soja en particular, ante condiciones estresantes los nódulos se ubican preferentemente en las raíces secundarias.

En cuanto al peso seco de los nódulos en los estadios fenológicos R2 y R6, puede observarse que en ambos estadios fenológicos, el peso seco de los nódulos de las raíces principales fue el que mayor influenció en el peso seco de los nódulos Totales, sin embargo también puede notarse que esa influencia fue mayor en el estadio R2 que en el estadio R6

(Tabla N° 2). Esto puede deberse a que como se mencionó anteriormente, en el estadio fenológico R6 el número de nódulos en las raíces secundarias en los tratamientos inoculados se duplicó con respecto al obtenido en el estadio R2, y como el peso individual de cada nódulo obtenido mediante la división del peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} y el número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} , fue igual (0,0019 gr.) para los dos estadios fenológicos (R2 y R6), la mayor influencia de los nódulos de las raíces secundarias en el peso seco de nódulos totales en R6 con respecto a R2, se debe a un mayor número de nódulos en las raíces secundarias en R6.

En cuanto al peso seco Aéreo, Radical y Total, todos los tratamientos presentaron valores de estas variables superiores al tratamiento testigo tanto en el estadio R2 como R6. Comparando entre los diferentes estadios, puede notarse que el tratamiento T2 fue el que mayor peso seco presentó en el estadio R2 y que en el estadio R6 el tratamiento T4 fue el que mayor peso seco presentó.

Tabla 2: Peso seco de los nódulos de las raíces principales y secundarias m^{-2} expresado como porcentaje sobre el peso seco de los nódulos totales en los estadios fenológicos R2 y R6.

Tratamientos	R2		R6	
	Principales	Secundarias	Principales	Secundarias
T1	64,6	35,4	52,4	47,6
T2	72,6	27,4	65,3	34,7
T3	64,1	35,9	63,0	37,0
T4	71,8	28,2	68,3	31,7
T5	62,2	37,8	65,4	34,9
T6	68,9	31,1	66,5	33,5

Determinación en estadio fenológico R8.

Los siguientes datos fueron tomados a campo el día 4 de Abril del año 2012, cuando el cultivo se encontraba en estadio fenológico R8.

A) – Rendimiento (Kg ha⁻¹)

El rendimiento medio de los diferentes tratamientos osciló entre los 2989 y los 3629 kg ha⁻¹ observándose diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos y el tratamiento testigo (Fig.20). Como puede notarse, los tratamientos inoculados (T3 al T6) superaron en promedio al tratamiento testigo en un 12, 3% lo que representa unos 382 kg de granos ha⁻¹ con valores que varían entre un 7,6% (T1 vs T5) y un 21,4 % (T1 vs T6), representando 227 y 640 Kg ha⁻¹ respectivamente.

Si se compara el rendimiento del tratamiento inoculado solamente con *Bradyrhizobium japonicum* (T3) y el tratamiento testigo (T1), puede notarse que se obtiene un mayor rendimiento en el primero, el cual es de 3272 Kg ha⁻¹, lo que representa un 9,5 % más de rendimiento que el tratamiento testigo.

Al comparar el tratamiento coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas spp.*(T4) con el tratamiento testigo, puede observarse que el tratamiento T4 mostró un incremento del rendimiento que fue del 12,6%, representando unos 376 kg ha⁻¹ de grano mayor que el testigo. Ahora bien, si se comparan los tratamientos T3, inoculado con *Bradyrhizobium japonicum*, y el tratamiento T4, coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas spp.* se puede observar un leve aumento (2,8%) del rendimiento a favor del tratamiento T4, demostrando que la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas spp.* ejerce un cierto grado de sinergismo logrando rendimiento superiores a los de inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum*.

Cuando se compara el tratamiento T6, coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* con el tratamiento testigo T1, puede notarse un mayor rendimiento del primero alcanzando valores de 3629 Kg ha⁻¹, representando un incremento del 21,4 % con respecto al testigo sin inocular. Si se comparan el tratamiento T3 inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y el tratamiento T6, coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*, se puede determinar que la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* genera un efecto positivo en el rendimiento, (Ver T3 vs T1) y que este es mayor, cuando se coinocula con *Azospirillum brasilense*.

Al comparar el tratamiento T5 coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas sp.* y *Azospirillum brasilense* con el tratamiento testigo T1 sin inocular, se puede observar que la coinoculación presenta un aumento con relación al testigo del 7,6% en el rendimiento, equivalente a unos 228 Kg ha⁻¹, ahora cuando se comparan los

tratamientos T5 y T3, puede notarse que el mayor rendimiento no es el del tratamiento T5 como es de esperarse, esto no permite deducir como se suponía anteriormente que la coinoculación genera mayores rendimientos que la inoculación simple.

Al comparar los tratamientos T2 y T1, tratamiento fertilizado con nitrógeno y tratamiento testigo respectivamente, puede observarse que existe diferencia estadísticamente significativa a favor del tratamiento T2, alcanzando un rendimiento de 3418 Kg ha⁻¹ y representando un aumento del 14,3% con respecto al tratamiento testigo T1.

Analizando los componentes del rendimiento, número de granos m⁻² y peso de los granos (Fig. 21 y 22, respectivamente) puede notarse que el componente que mas varía es el número y no el peso de los granos, esto es así, debido a que la variable peso de los granos está controlada genéticamente, fenómeno contrario al ocurrido con la otra variable (Número de granos) la cuál es controlada por factores ambientales. Esto puede evidenciarse al observar las figuras 23 y 24, en donde se ve la alta correlación (R^2 : 0,93) que existe entre el número de granos y el rendimiento (fig. 23), y la pequeña correlación (R^2 : 0,13) existente entre el peso de los granos y el rendimiento (fig. 24).

Como en todos los cultivos para granos, el rendimiento del cultivo de soja resulta de dos componentes numéricos principales que no son plenamente independientes entre sí: el número de granos que se establecen por unidad de área y el peso unitario que alcanzan. El número de granos puede subdividirse, a su vez, en varios subcomponentes. Estos subcomponentes representan la cantidad de sitios potenciales para el establecimiento de los granos (número de nudos por unidad de área del cultivo), la fertilidad de esos sitios (número de vainas por nudo) y la fertilidad de los frutos (número de granos por vaina). El número de nudos depende del número de plantas emergidas por unidad de área, cuántos nudos aparecen en el tallo principal en cada una de ellas, cuántas ramificaciones poseen y cuantos nudos tienen esas ramificaciones. Dentro de un amplio rango de condiciones y para la mayoría de las situaciones agronómicas, el número de plantas establecidas por unidad de superficie tiene un efecto neutro sobre el número de granos y sobre el rendimiento, ya que una densidad menor de plantas es compensada por un número mayor de nudos en las ramificaciones o por un aumento de la fertilidad de cada nudo.

El número de vainas por nudo depende de cuantas inflorescencias se desarrollan en cada nudo y cuantas vainas se desarrollan en cada inflorescencia. Pueden encontrarse entre 1 y 20 vainas por nudo, existiendo alta variabilidad entre los nudos de la planta, entre genotipos y ante cambios en las condiciones ambientales. El número de granos por vaina, tiene un grado de control genético importante. Una vaina puede contener entre 1 y 4 granos, raramente 5.

La otra variable que determina el rendimiento de la soja es el peso de los granos, la misma puede variar entre 80 y más de 400 mg. Dentro de las variedades de soja que se

cultivan tradicionalmente y para la mayor parte de las condiciones ambientales, el peso individual de los granos suele variar entre 140 y 220 mg.

Las variaciones en el número de granos provocadas por variaciones ambientales en general están estrechamente asociadas con cambios en el rendimiento. Contrariamente, la relación entre el peso de los granos y el rendimiento no es tan robusta (Kantolic *et al.*, 2004).

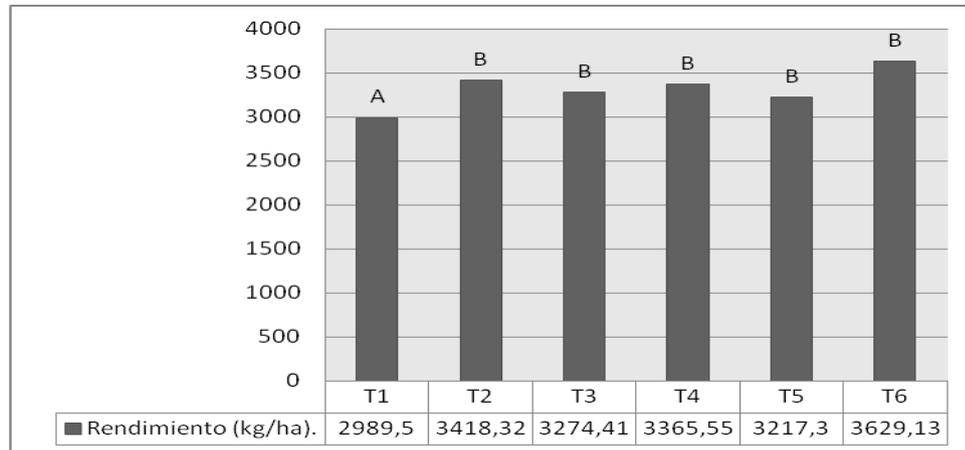


Figura 20: Rendimiento (Kg ha^{-1}) en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

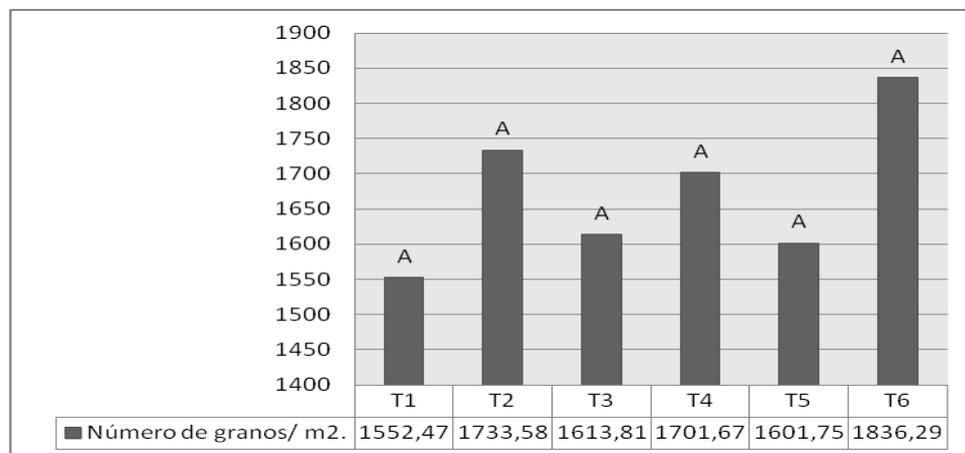


Figura 21: Número de granos m^{-2} en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

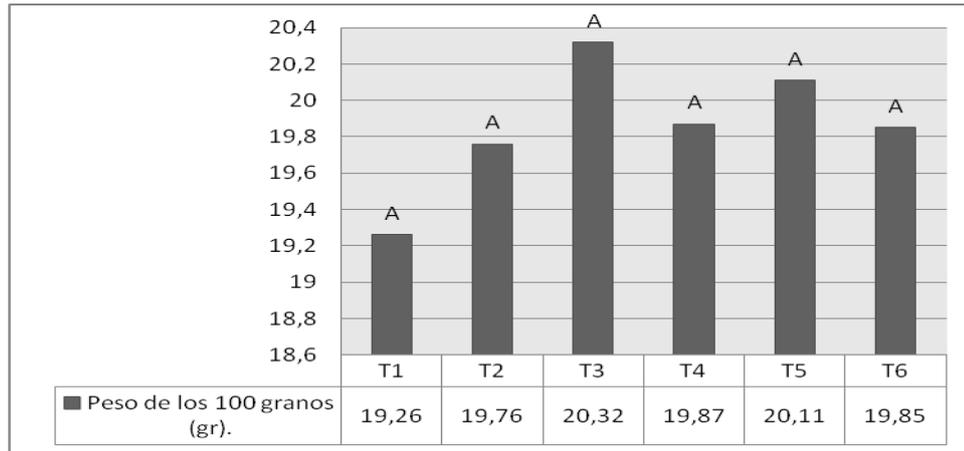


Figura 22: Peso de 100 granos en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

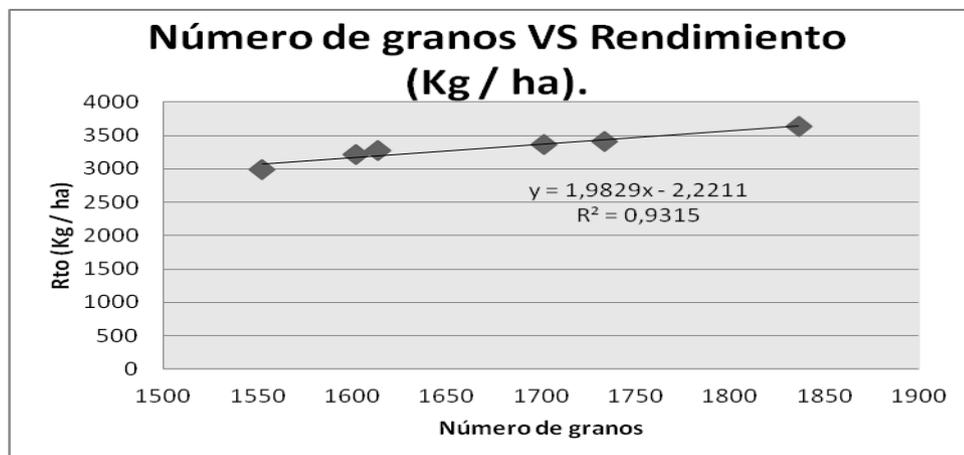


Figura 23: Correlación entre el número de granos y rendimiento en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto.

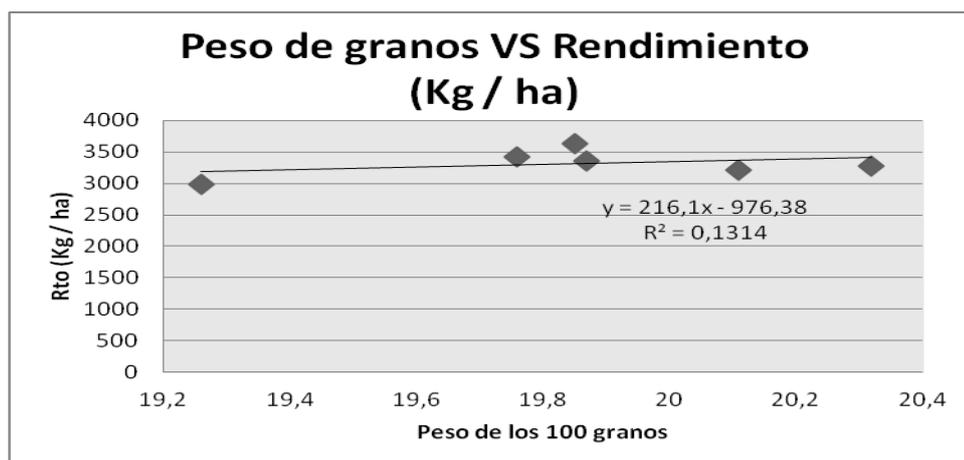


Figura 24: Correlación entre el peso de granos y rendimiento en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto.

B)- Contenido de Proteína (%).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de proteínas de los diferentes tratamientos con respecto al tratamiento testigo (fig. 25). Al observarse la siguiente figura, puede notarse que los tratamientos tratados con microorganismos (T3; T4; T5 y T6), difirieron estadísticamente del tratamiento testigo T1. A su vez puede notarse que el tratamiento T4, coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas spp.* difiere estadísticamente de los demás tratamientos que sufrieron algún tipo de inoculación.

Puede concluirse que la técnica de inoculación en el cultivo de soja, aumenta el contenido de proteína de sus granos, y que esta es mayor, si se coinocula con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas spp.* Esta conclusión se contradice con los resultados obtenidos por Devani *et al.*, (2003), quienes observaron que no se presentaron incrementos en el contenido de N y en el porcentaje de proteínas de las semillas de los distintos tratamientos inoculados con relación al testigo no tratado, sino que por el contrario, se registraron valores levemente inferiores. Esto seguramente estuvo relacionado a los aumentos de rendimiento registrados en los tratamientos con inoculantes.

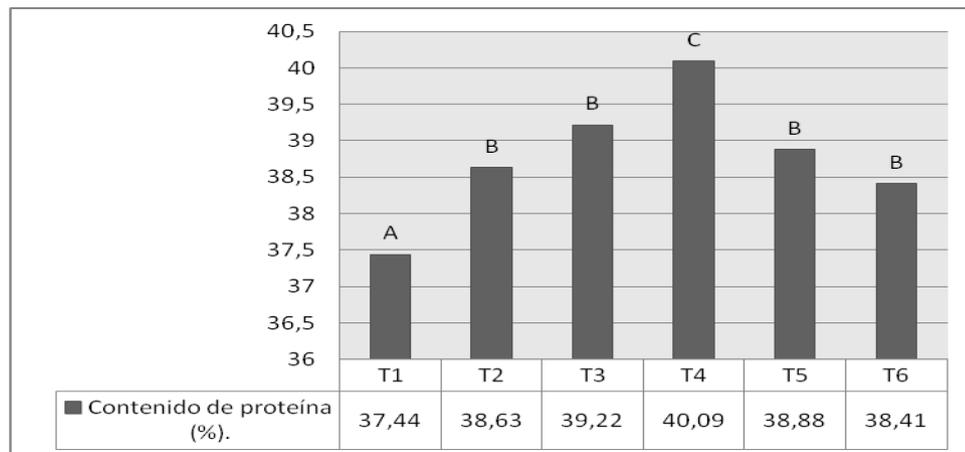


Figura 25: Contenido de proteína (%) en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja, campaña 2011-2012, Río Cuarto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

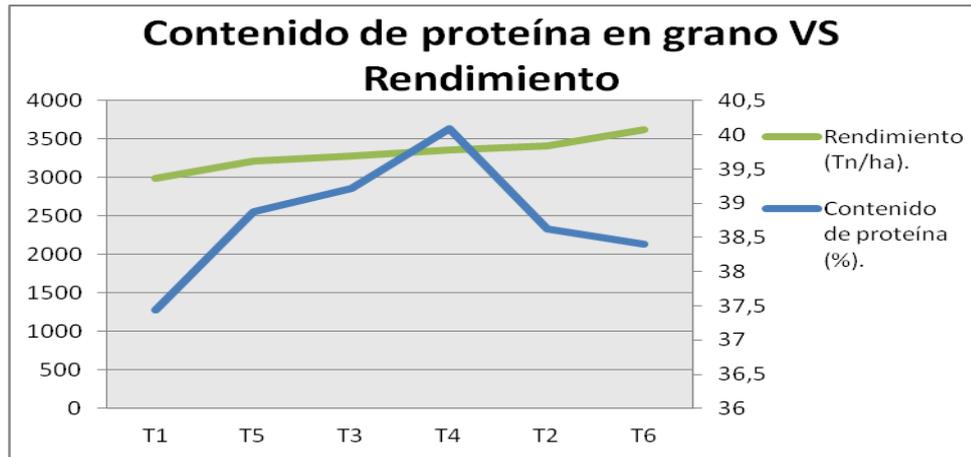


Figura 26: Contenido de Proteína en granos (%) en relación al rendimiento (Kg ha^{-1}).

Si se observa la figura anterior (Fig. 26), puede verse que el contenido de proteína aumenta de manera directamente proporcional a como lo hace el rendimiento, hasta cierto punto (T4), en el que el mayor rendimiento disminuye el contenido de proteína del grano. Sin embargo puede notarse que el tratamiento testigo T1 es el que posee el menor contenido proteico, e incluso diferenciándose estadísticamente con el resto de los tratamientos evaluados. Esto deja en claro que al inocular las semillas de soja, se logran aumentos en el porcentaje de proteína, y que a medida que el rendimiento aumenta, el contenido proteico lo hace de la misma manera, hasta un punto (T4 en este caso), en el que el mayor rendimiento disminuye el contenido proteico debido a un efecto de dilución del nitrógeno en grano.

CONCLUSIONES

- La inoculación genera aumentos en el número de nódulos tanto de las raíces principales como secundarias y este aumento es mayor en las raíces secundarias a medida que pasa el estadio fenológico cuando las condiciones hídricas no son las adecuadas.
- En condiciones estresantes para el cultivo desde el punto de vista hídrico, se favorece la nodulación de las raíces secundarias en detrimento de la nodulación en las raíces primarias.
- La práctica de inoculación no varió el peso seco de cada nódulo tanto en las raíces principales como las secundarias, pero sí varió en peso de los nódulos m^{-2} en los estadios fenológicos R2 y R6, siendo mayor en este último, debido principalmente a un aumento en el número de nódulos m^{-2} .
- La inoculación genera aumentos en el peso seco aéreo, radical y total (Aéreo + Radical) de las plantas de soja.
- Inocular con microorganismos las semillas de soja, aumenta el contenido de proteína de los mismos.
- La práctica de inoculación genera aumentos del rendimiento respecto al tratamiento testigo sin inocular. Cuando se compara a los tratamientos inoculados entre sí, puede verse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Al comparar el tratamiento T3 inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* con los demás tratamientos inoculados (T4; T5 y T6), el tratamiento T4 inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas sp* y el tratamiento T6 con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* presentaron un mayor rendimiento con respecto al tratamiento con inoculación simple. Al comparar el tratamiento T3 y T5, inoculado con *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas sp.* y *Azospirillum brasilense*, se observa que presenta un menor rendimiento que el T3, resultado que no permite confirmar la hipótesis del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA:

-ATLAS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA. 2006. Agencia Córdoba Ambiente. Área Subcoordinación Suelos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Manfredi, Córdoba. 2006

-BAREA, J.M; M.J.POZO; C. AZCÓN-AGUILAR. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56: 1761-1778. En: *Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz. Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA).*

-BASHAN. Y; H. LEVANONY. 1990. Current status of Azospirillum inoculation technology: **Azospirillum as a challenge for agriculture.** *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.

-BASHAN. Y.1998. Inoculation of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Adv.* 16: 729-770. En: *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo del trigo y maíz. Proyecto inocular PGPM (Plant Growth Promoting Microorganism).* Buenos Aires: Ediciones INTA, 2009.

-BOTTINI. R.; M. FULCHIERI; D. PEARCE; R. PHARIS. 1989. **Identification of gibberellins A₁, A₂, and Iso- A₃ in cultures of A. lipoferum.** *Plant Physiol.* 90:45-47.

-BRAY. R y L. KURTZ. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59: 9-45.

-BREMNER. J y C. MULVANEY. 1982. Regular Kjeldahl Method. En: **Methods of Soil Analysis.** Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition..Page AL (ed). American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of América, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA.

-CIAT. 1988. **Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico.** Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) , Cali, Colombia.

-CHABOT. R; H. ANTOUN; M.P. CESCAS,1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar Phaseoli. *Plant Soil*. 184:311-321. En: **De la Biología del suelo a la Agricultura**. Universidad Nacional de Río Cuarto.

-CUNNINGHAM S.D. y D.N. MUNNS. 1985. Effect of Rhizobial extracellular polysaccharidae on solution phosphate levels of acids soils. *Soil. Sci. Am. J. Microbiol.* 49:399-405. En: **De la Biología del suelo a la Agricultura**. Universidad Nacional de Río Cuarto.

-DARDANELLI. M.; F.J. FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA; R. ESPUNY; M.A. RODRIGUEZ CARAVAJAL; M.E. SORIA DÍAZ; A.M. GIL SERRANO; Y. OKON; Y M. MEGÍAS. 2008. **Effect of Azospirillum brasilense coinoculated with Rizobium on Phaseolus vulgaris flavonoids and Nod factor production under salt strees**. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2713-2721.

-DEIBERT. E.J., M. BIJERIEGO, Y R.A. OLSON. 1979. **Utilization of 15N fertilizer by nodulating and non-nodulating soybean isolines**. *Agron. J.* 71: 717-723.

-DEVANI. M; J. AMIGO; D. GANDUR; M. LEDESMA; F. LENIS; J. PLOPER y A. STEGMAYER, 2003. **Inoculación de Soja en la Provincia de Tucumán Resultados de la Campaña 2001/02**. EEA Obispo Colombres (CC 9), Las Talitas, Tucumán - Facultad de Agronomía y Zootecnia (UNT)

-DI RENZO, M. A.; M. A. IBAÑEZ; N. C. BONAMICO. 2012. **Diseño de Experimentos**. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

-FERNÁNDEZ, L.A., P. ZALBA; M. A. GÓMEZ, M. A. SAGARDOY, 2005. Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ci.Suelo* 23: 31-37. En: **De la Biología del suelo a la Agricultura**. Universidad Nacional de Río Cuarto.

-FERRARIS, G.; G. GONZÁLEZ ANTA. 2007. Contribución del nitrógeno inorgánico y de la FBN a la nutrición de soja en la Argentina. En: www.planetasoja.com. Consultado: 10-10-2011.

-FRANCOMANO y PICARDI, 2012. La importancia económica de la soja. En: http://www.francomanopicardi.com.ar/news/004_abril2008/04_21a125/03_agricultura_ACS_OJA_ImportanciaEconomica.htm. Consultado: 29-10-2012.

-GARATE A. y I. BONILLA. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. En: **Fundamentos de fisiología vegetal**. Eds. Azcón-Bieto and Talón E. pp 113-130. McGraw-Hill Internam. Madrid. En: **De la Biología del suelo a la Agricultura**. Universidad Nacional de Río Cuarto.

-GHELFI, R.A.; A. BUJAN; M.C. QUITEGUI, y L.E.P. DE GHELFI. 1984. Determinación de N₂ atmosférico fijado por soja (*Glycine max* L.) mediante utilización de ¹⁵N en condiciones de campo. **Ciencia del Suelo** 2: 45-51.

-GONZÁLEZ, N. 2002. **Fijación biológica del nitrógeno en soja, como elegir el mejor inoculante comercial**, cuadernillo Agromercado (N° 70): 14-16.

-GREENQUALITY, 2011. *Bradyrhizobium japonicum*. En: <http://www.greenquality.com.ar/faq.html>. Consultado: 15-10-2011.

-GREENQUALITY, 2012a. *Azospirillum brasilense*. En: <http://www.greenquality.com.ar/faq.html>. Consultado: 30-10-2012.

-GREENQUALITY, 2012b. Bacterias PGPR. En: <http://www.greenquality.com.ar/faq.html>. Consultado: 15-10-2011.

-GREENQUALITY, 2012c. *Pseudomonas fluorescens*. En: <http://www.greenquality.com.ar/faq.html>. Consultado: 30-10-2012.

-GREENQUALITY, 2012d. Como promueven las PGPR el crecimiento de los cultivos. En: <http://www.greenquality.com.ar/faq.html>. Consultado: 30-10-2012.

-KANTOLIC, A; P. GIMÉNEZ y E. DE LA FUENTE, 2004. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad de soja. En: **Pascale (ed.) Producción de Granos**. Bases funcionales para su manejo. Buenos Aires. pp 181-183.

- KLOEPPER, J. 1993. Plant growth- promoting rhizobacteria as biological control agents. In: **Soil Microbial Ecology** (Ed) F. B. Metting Jr. 254-274. Springer Verlag.

-LAMBERT, R; R.J. DUBOIS. 1971. **Spectrophotometric determination of nitrate in the presence of chloride**. Anal. Chem. 43: 955-957.

-MARKO, C. J. y M. C. IGLESIAS. 2003. Co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum Az 39* INTA en el cultivo de soja (*Glycine max* L.) fertilizado. **Universidad Nacional del Nordeste** Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

-MC LEAN, E.O. 1982. Soil pH and lime requirement. En: **Methods of Soil Analysis**. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. Page AL (ed) American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA.

-OKON Y. y C.A, LAVANDERA GONZÁLEZ. 1994. **Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation**. Soil Biol. Biochem. 26:1591-1601.

-OKON, Y., 2007. “Aspectos fisiológicos y agronómicos en la asociación entre *Azospirillum* y las plantas”. **Primeras jornadas Bonaerenses de “Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable”**. Universidad Nacional de Luján. Departamento de Ciencias Básicas. p.85

-PATTEN, C. y B, GLICK. 1996. **Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid**. Can. J. Microbiol. 42:207-220.

-PERRIG, D.; L. BOIERO; O. MASCIARELLI; C. PENNA; F. CASSÁN Y V. LUNA. 2007. **Plant Growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculants formulation**. Applied Microbiology and Biotechnology. On line: 10.1007/s00253-007-0909-9.

-PERTICARI, A.; N. ARIAS; H. BAIGORRI; J. DE BATTISTA; L. LETT; M. MONTECCHIA; J. PACHECO BASURCO; A. SIMONELLA; S. TORESANI; L. VENTIMIGLIA; R.VICENTINI, 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. Disponible en:

<http://www.planetasoja.com/empresas800/prodinsa/fijacionbilogica.php>. Consultado: 20-11-2012.

-PERTICARI, A. 2005. IMYZA INTA Castelar. Presentado en el Congreso Mundo Soja 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Disponible en: <http://www.ecampo.com/sections/news/display.php/uuid.01CF4233-041A-470CAF1E2B189595B25D/catUuid.91D0DC54-E269-11D3-A5140006292E2740/>
Consultado: 1-11-2012.

-RACCA, R.W. 2002. Inoculación en soja: una herramienta para maximizar la productividad. INTA – IFIVE En: www.fertilizar.org.ar/articulos/articulos.asp. Consultado el día 30-10-2012.

-RACCA, R. W y D.J.COLLINO. 2005. **Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja**. Actas del Congreso Mundo Soja, Buenos Aires (Argentina), 111-120.

-RADEMACHER W. 1994. **Gibberellin formation in microorganisms**. Plant Growth Regul. 15:303-314.

-RODRÍGUEZ, H; R. FRAGA. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv. 17: 319-339. En: **De la Biología del suelo a la Agricultura**. Universidad Nacional de Río Cuarto.

- SANSON, E; P. BRITOS; D. RODRIGUEZ; R. GARCÍA-MARTÍNEZ, 2009. **clasificacion automatica para la prevencion del estrés de los suelos y la fatiga de soja en el noroeste argentino**. Centro de Ingeniería de Software Ingeniería del Conocimiento. Escuela de Postgrado. ITBA, Laboratorio de Sistemas Inteligentes. Facultad de Ingeniería.UBA , Área Ingeniería del Software. Licenciatura Sistemas. UNLa, Área Ingeniería del Software. Unidad Académica Río Gallegos. UNPA

-SEILER, R. A.; V. H. ROTONDO; R. A. FABRICIUS; M. G. VINO CUR; C. BONACCI. 1995. **Agroclimatología de Río Cuarto- 1974/93**. Volumen I. Publicación realizada por el Dpto. de Imprenta y Publicaciones U.N.R.C., Argentina. 66 p.

-SERVICIO DE AGROMETEREOLOGÍA. 2012. **Banco de datos. Serie datos climáticos Río Cuarto: 1974-2010.** Cátedra de Agrometeorología. FAV – UNRC, Río Cuarto, Argentina.

-STRZELCZYK E.; M. KAMPER y C. LI. 1994. **Cytocinin-like-substances and ethylene production by Azospirillum in media with different carbon sources.** Microbiol. Res. 149:55-60.

-UHRICH, W. y S. BENINTENDE. 2005. Aplicación de *Azospirillum brasilense* en cultivo de soja en coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Científica Agropecuaria 9(1): 71-75.**

-VALVERDE, CLAUDIO y G. FERRARIS, 2009. Las pseudomonas: un grupo heterogéneo con diversos mecanismos promotores del desarrollo vegetal. En: **Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo del trigo y maíz.** Proyecto inocular PGPM (Plant Growth Promoting Microorganism). Buenos Aires: Ediciones INTA, 2009.

-VASSEY, J.K. 2003. **Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers.** Plant Soil 255: 571-586.

ANEXOS

**ANEXOS DE LAS TABLAS DE ANOVA REALIZADAS PARA LAS VARIABLES MEDIDAS
EN ESTADÍO FENOLÓGICO R2.**

Anexo 1: Número de nódulos de las raíces principales m⁻² en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

N° de Nódulos de las raíces principales m⁻²		
Tratamiento	Media	
T1	289,78	A
T2	346,44	A
T3	349,11	A
T4	374,44	A
T5	430	A
T6	377,11	A
Valor de p =	0,1165	
CV=	27,82	

Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

Anexo 2: Número de nódulos de las raíces secundarias m⁻² en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

N° de Nódulos de las raíces secundarias m⁻²		
Tratamiento	Media	
T1	295,11	A
T2	272,22	A
T3	419,78	A
T4	275,11	A
T5	429,56	A
T6	373,33	A
Valor de p =	0,2601	
CV=	28,76	

Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

Anexo 3: Peso seco de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco de los Nódulos de las raíces principales m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	1,28	A
T2	1,35	A
T3	1,57	A
T4	1,55	A
T5	1,94	A
T6	1,82	A
Valor de p =	0,2027	
CV=	35,96	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 4: Peso seco de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco de los Nódulos de las raíces secundarias m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	0,7	A
T2	0,51	A
T3	0,88	A
T4	0,61	A
T5	1,18	B
T6	0,82	A
Valor de p =	0,0660	
CV=	35,97	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 5: Peso seco de los nódulos totales (Principales + Secundarias) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco de los Nódulos de las raíces Totales (Principales + Secundarias) m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	1,98	A
T2	1,86	A
T3	2,45	A
T4	2,16	A
T5	3,12	A
T6	2,64	A
Valor de p =	0,1293	
CV=	33,81	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 6: Peso seco Aéreo m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco Aéreo m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	150,64	A
T2	176,82	A
T3	157,84	A
T4	148,78	A
T5	170,89	A
T6	159,82	A
Valor de p =	0,2728	
CV=	16,43	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 7: Peso seco Radical m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco Radical m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	29,79	A
T2	34,79	A
T3	31,19	A
T4	30,13	A
T5	33,81	A
T6	31,99	A
Valor de p =	0,1112	
CV=	12,74	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 8: Peso seco Total (Aéreo + Radical) m^{-2} en estadio fenológico R2 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco Total (Aéreo + Radical) m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	180,44	A
T2	211,62	A
T3	189,04	A
T4	178,91	A
T5	204,7	A
T6	191,81	A
Valor de p =	0,2395	
CV=	15,46	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

ANEXOS DE LAS TABLAS DE ANOVA REALIZADAS PARA LAS VARIABLES MEDIDAS EN ESTADÍO FENOLÓGICO R6.

Anexo 9: Número de nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Número de nódulos de las raíces principales m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	171,56	A
T2	192,67	A
T3	253,78	B
T4	326	B
T5	284,44	B
T6	291,11	B
Valor de p =	0,0118	
CV=	26,19	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 10: Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Número de nódulos de las raíces secundarias m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	498,89	A
T2	394,44	A
T3	612,22	A
T4	638,89	A
T5	682,67	A
T6	789,56	A
Valor de p =	0,3015	
CV=	38,79	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 11: Peso seco de los nódulos de las raíces principales m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco de los nódulos de las raíces principales m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	1,21	A
T2	1,41	A
T3	2,16	B
T4	2,5	B
T5	2,42	B
T6	2,58	B
Valor de p =	0,0039	
CV=	32,77	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 12: Peso seco de los nódulos de las raíces secundarias m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco de los nódulos de las raíces secundarias m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	1,1	A
T2	0,75	A
T3	1,27	A
T4	1,16	A
T5	1,29	A
T6	1,3	A
Valor de p =	0,2733	
CV=	34,53	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 13: Peso seco de los nódulos Totales (Principales + Secundarias) m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco de los nódulos de las raíces Totales (Principales + Secundarias) m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	2,31	A
T2	2,16	A
T3	3,43	B
T4	3,66	B
T5	3,7	B
T6	3,88	B
Valor de p =	0,0119	
CV=	29,24	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 14: Peso seco Aéreo m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco Aéreo m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	452,62	A
T2	465,2	A
T3	467,43	A
T4	479,44	A
T5	463,89	A
T6	456,44	A
Valor de p =	0,9242	
CV=	12,50	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 15: Peso seco Radical m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco Radical m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	34,24	A
T2	33,67	A
T3	39,02	A
T4	36,62	A
T5	35,56	A
T6	37,64	A
Valor de p =	0,3792	
CV=	10,43	

Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

Anexo 16: Peso seco Total (Aéreo + Radical) m^{-2} en estadio fenológico R6 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso seco Total (Aéreo + Radical) m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	486,87	A
T2	498,87	A
T3	506,46	A
T4	516,07	A
T5	499,44	A
T6	494,09	A
Valor de p =	0,9505	
CV=	11,93	

Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

**ANEXOS DE LAS TABLAS DE ANOVA REALIZADAS PARA LAS VARIABLES MEDIDAS
EN ESTADÍO FENOLÓGICO R8.**

Anexo 17: Rendimiento (Kg ha^{-1}) en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Rendimiento (Kg ha^{-1})		
Tratamiento	Media	
T1	2989,5	A
T2	3418,32	B
T3	3274,41	B
T4	3365,55	B
T5	3217,3	B
T6	3629,13	B
Valor de p =	0,0400	
CV=	13,48	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 18: Número de granos m^{-2} en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Número de granos m^{-2}		
Tratamiento	Media	
T1	1552,47	A
T2	1733,58	A
T3	1613,81	A
T4	1701,67	A
T5	1601,75	A
T6	1836,29	A
Valor de p =	0,1893	
CV=	14,52	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P=0,05$) según test de DGC.

Anexo 19: Peso de los 100 granos en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Peso de los 100 granos		
Tratamiento	Media	
T1	19,26	A
T2	19,76	A
T3	20,32	A
T4	19,87	A
T5	20,11	A
T6	19,85	A
Valor de p =	0,2248	
CV=	3,91	

Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.

Anexo 20: Contenido de proteína en grano en estadio fenológico R8 en el cultivo de soja. Campaña 2011-2012. Río Cuarto.

Contenido de proteína en grano		
Tratamiento	Media	
T1	37,44	A
T2	38,63	B
T3	39,22	B
T4	40,09	B
T5	38,88	B
T6	38,41	C
Valor de p =	0,0011	
CV=	0,61	

Letras distintas indican diferencias significativas (P=0,05) según test de DGC.