

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo

TÍTULO:

Respuesta de la inoculación y coinoculación en el cultivo de soja (*Glycine max*
L. Merr) sobre los componentes del rendimiento

Alumna: Sofía Mariel Guareschi

D.N.I.: 33.278.099

Directora: Alicia Thuar

Río Cuarto, Córdoba

Octubre, 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Respuesta de la inoculación y coinoculación en el cultivo de soja (*Glycine max* L. Merr) sobre los componentes del rendimiento

Autor: Sofía Mariel Guareschi

Director: Dra. Alicia Thuar

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

Ing. Agr. Carla Bruno

Dra. Rosana Malpassi

Dra. Alicia Thuar

Fecha de Presentación: ____/____/____

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____

Secretario Académico

DEDICATORIA

Dedicado a mi papá Carlos, esa estrellita que Dios me puso en el cielo y que brilla fuerte para seguir marcándome el camino. A vos papá por transmitirme ese amor por el campo y esas ganas de luchar sin bajar los brazos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por ser ese pilar que siempre estuvo para mí y me acompañó durante todos los momentos, buenos o malos. Por darme la oportunidad de tener una buena educación y darme la libertad de elegir la profesión que me hace feliz. Por hacer tantos sacrificios, pero principalmente por nunca dejar de confiar en mí.

A Juan, mi otra mitad. Me diste la posibilidad de compartir con vos más de la mitad de la carrera. Fuiste el que vivió en carne propia junto conmigo los logros, fracasos, broncas, miedos e incertidumbres, pero jamás perdiste la confianza en mí y nunca permitiste que dudara de mi misma. Sos mi fortaleza y mi luz.

A mis amigos, a los que se unieron a mitad de trayecto y nunca más se separaron, a los que se fueron buscando otros sueños, pero permaneciendo siempre cerca, y a aquellos que estuvieron de punta a punta. Fueron la mejor parte de la universidad, e hicieron que cada anécdota fuera única e inolvidable.

A Alicia, por el espacio y tiempo brindado para poder realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por darnos la posibilidad a los estudiantes de acceder a un título de manera libre y gratuita. Por permitirnos tener una herramienta tan valiosa como lo es la educación.

ÍNDICE DE TEXTOS

RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
INTRODUCCIÓN	
Antecedentes	1
Hipótesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
MATERIALES Y MÉTODOS	
Sitio de estudio	11
Tratamientos	12
Especie y cultivar empleado	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Determinaciones en V5:	
Peso seco de biomasa vegetal aérea	15
Peso seco de biomasa vegetal radical	15
Determinaciones en R5:	
Número de nódulos en raíz principal	16
Número de nódulos en raíces secundarias	17
Peso de nódulos en raíz principal	17
Peso de nódulos en raíces secundarias	18
Determinaciones en R8:	
Rendimiento	19
Peso de mil semillas	19
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Peso seco de biomasa vegetal aérea	15
Figura 2: Peso seco de biomasa vegetal radical	16
Figura 3: Número de nódulos en raíz principal	16
Figura 4: Número de nódulos en raíces secundarias	17
Figura 5: Peso seco de nódulos en raíz principal	18
Figura 6: Peso seco de nódulos en raíces secundarias	18
Figura 7: Rendimiento	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Precipitaciones durante el ciclo del cultivo	11
Tabla 2: Análisis físico-químico del suelo	12
Tabla 3: Peso de mil semillas.	20

ANEXO

Anexo 1: Peso seco de biomasa vegetal aérea	27
Anexo 2: Peso seco de biomasa vegetal radical	27
Anexo 3: Número de nódulos en raíz principal	28
Anexo 4: Número de nódulos en raíces secundarias	28
Anexo 5: Peso seco de nódulos en raíz principal	29
Anexo 6: Peso seco de nódulos en raíces secundarias	29
Anexo 7: Rendimiento	30

RESUMEN

La soja se ha constituido en uno de los productos agrícolas de mayor importancia a nivel mundial. La producción en nuestro país se ha ido incrementando constantemente debido a la mejora en los precios, la expansión de la frontera agrícola, el paso de la ganadería a la agricultura y los avances tecnológicos. El cultivo tiene altos requerimientos de nitrógeno cubiertos tanto desde la solución del suelo, como por la Fijación Biológica del Nitrógeno atmosférico en simbiosis con *Bradyrhizobium japonicum*. En general, nuestros suelos carecen de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y por ello fue necesaria la incorporación de estas bacterias mediante la inoculación. La inoculación mixta de leguminosas con bacterias representa la utilización de combinaciones de diferentes microorganismos, los cuales producen un efecto sinérgico, en el cual se superan los resultados productivos obtenidos con los mismos en forma independiente, este procedimiento es conocido como coinoculación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de biomasa, nodulación y rendimiento en un cultivo de soja en relación a la inoculación y coinoculación. Se emplearon los siguientes tratamientos: Tratamiento A: Inoculante Signum; Tratamiento B: Inoculante Signum + Bacteria Gram negativa; Tratamiento C: Inoculante Signum + Rizoderma; Tratamiento D: Inoculante Signum + Inoculante Risoja; Tratamiento E: Inoculante Risoja + Protector Experimental y Tratamiento F: Testigo. Se determinó peso seco de biomasa aérea y radical durante V5, número y peso seco de nódulos en raíces primarias y laterales durante R5 y rendimiento en R8; a partir de dichas determinaciones, se demostró que la inoculación y coinoculación si bien generaron una menor nodulación y producción de biomasa que el resto de los tratamientos, esto no influyó en el rendimiento, ya que aquellos tratamientos inoculados y coinoculados fueron los responsables de los mayores rendimientos obtenidos.

SUMMARY

Soybean has become one of the most important agricultural products worldwide. In our country, the production of soybean has continually been increasing because of the improvement in prices, the expansion of the agricultural frontier, the transition from livestock to farming and the technological advances. This crop has high nitrogen requirements from soil solution as well as from the biological fixation of the atmospheric nitrogen in symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum*. In general, our soils lack *Bradyrhizobium japonicum* strains; therefore, the incorporation of bacteria by inoculation was required. The mixed inoculation of legume with bacteria; that is, the use of combined microorganisms produces a synergistic effect. This process is known as co-inoculation. The purpose of this study was to evaluate biomass production, nodulation and yield in a soybean crop in relation to inoculation and co-inoculation. The following treatment were used: Treatment A: Signum Inoculant; Treatment B: Signum Inoculant +Gran negative bacteria; Treatment C: Signum + Inoculant Rizoderma; Treatment D: Signum + Risoja Inoculant; Treatment E: Risoja Inoculant + Experimental Protector and Treatment F: Control. Particularly, it has been analyzed dry weight of aerial and radical biomass during V5, number and dry weight of nodules in main and lateral roots during R5 and yield R8. From these measurements, it has been shown that inoculation and co-inoculation generated less nodulation and biomass production in a soybean crop than the other treatments. However, these inoculated and co-inoculated treatments have been responsible for greatest yield levels in the soybean crop.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] en Argentina se ha consolidado como una de las actividades agrícolas de mayor importancia para el país extendiéndose en variados ambientes y condiciones de producción, hecho que nos demanda una permanente generación de tecnología para su manejo. Argentina mantiene un liderazgo en lo que se refiere a productividad a pesar del constante incremento de área de producción alcanzado en los últimos años y esto se explica en gran medida por la celeridad en incorporar desarrollos experimentales en los sistemas de producción (Díaz Zorita y Duarte, 2004).

A partir de los años '70, la soja revolucionó la cadena agroalimentaria global al transformarse en la principal fuente de proteína vegetal para la alimentación en los sistemas intensivos de producción animal, así como proveedora de aceites para consumo humano. En estos últimos años es también uno de los cultivos claves para la obtención de biocombustibles (Domingo Yagües *et al.*, 2012).

Los primeros registros de siembra de soja en nuestro país datan de 1962, sin instalarse como actividad productiva. Fue durante los '70 cuando la producción nacional se incrementó notoriamente, superando al final de esa década dos millones de hectáreas sembradas y una producción de 3,5 millones de toneladas. Al comienzo del año 2000, la siembra ya casi alcanzaba los nueve millones de hectáreas, con una producción de 20,2 millones de toneladas. Finalmente, durante las últimas campañas de la primera década del siglo actual, la siembra nacional de soja mostraba una ocupación de 18,3 millones de hectáreas con una producción de 52,6 millones de toneladas (Domingo Yagües *et al.*, 2012).

El crecimiento de la soja y sus derivados en Argentina en los últimos 30 años se ha constituido en un fenómeno trascendente y fundamental para el país, tanto desde el punto de vista económico como social. El sector agropecuario, especialmente en la pampa húmeda, ha orientado hacia un modelo de "especialización sojera", que se expande rápidamente hacia regiones extra pampeanas, al que muchos definen como el proceso de "sojización", y el nuevo paradigma de la agricultura argentina basado en nuevos materiales y siembra directa (www.agrositio.com).

La soja en su ambiente natural, Sudeste Asiático, evolucionó estableciendo relaciones simbióticas con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno (N_2), denominadas en forma genérica rizobios. Como fruto de esta asociación se forman nuevas estructuras en las raíces, los nódulos donde se realiza el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). En nuestro país desde sus comienzos el cultivo fue acompañado por la inoculación dado la inexistencia o escasa presencia en nuestros suelos de rizobios específicos perteneciente a la especie *Bradyrhizobium japonicum*. Los efectos de esta tecnología sobre el cultivo son altamente significativos, avalando su uso por los productores agropecuarios (Piccinetti *et al.*, 2013).

Si hacemos una breve historia de la inoculación en Argentina nos remontamos al año 1939 cuando el ex Instituto Experimental de Investigación y Fomento Agrícola-Ganadero de la provincia de Santa Fe, comenzó a difundir cultivos bacterianos seleccionados. En años posteriores, siguió el ejemplo el Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires y posteriormente la ex Dirección General de Investigaciones Agrícolas. En 1958 esta función pasa al INTA. En la década del 70, la mayor parte de los inoculantes eran importados junto con la semilla de soja desde los EEUU y a partir de 1980 el IMYZA-INTA Castelar lleva adelante el programa nacional de selección y evaluación de cepas de rizobios. A principio de los '90 se introducen los inoculantes con soporte líquido, como oleosos no estériles que incluyen fungicida y los acuosos estériles, alcanzando actualmente estos últimos el 90% de los productos presentes en el mercado. Con respecto a la calidad, entre 1983 y 1998, el 80% de los inoculantes que se evaluaban, no alcanzaban al vencimiento el número de bacterias indicado en la descripción del producto. En la actualidad, la calidad de los productos se encuentra dentro de rangos internacionales, con alto número de rizobios viables por unidad de producto y con buena supervivencia en el tiempo (Toresani *et al.*, 2012).

La incorporación de los sistemas de siembra directa a dicho cultivo acompañado de nuevos cultivares con mayor capacidad productiva, junto a precios y costos favorables permitieron la fuerte expansión del cultivo a nuevas áreas. En concomitancia, se aumentaron las necesidades de inoculación para las nuevas áreas y los requerimientos de nitrógeno de la soja para alcanzar los rindes esperados con los nuevos cultivares. Esto representó una oportunidad para que la inoculación o el aporte biológico de nitrógeno sea incorporada definitivamente en los sistemas productivos (Piccinetti *et al.*, 2013).

La soja presenta una alta acumulación de proteínas en sus semillas, lo cual la convierte en el cultivo con la mayor demanda de nitrógeno y la menor producción de biomasa de semilla por fotoasimilado producido. Por eso, el nitrógeno es el nutriente más crítico para el cultivo. Si no existen limitantes mayores, el rendimiento de soja es función directa de la capacidad de acumular nitrógeno que exhibe el cultivo (Peticari, 2006).

La alta demanda de nitrógeno (80 kg tn⁻¹ de grano) lo constituye en el elemento que en mayor medida, luego de la disponibilidad hídrica, limita el logro del cultivo de soja de alta producción. Las especies leguminosas como es el caso de la soja, logran proveerse del N por dos mecanismos, por un lado a través de la absorción desde el suelo por flujo masal y por el otro a través de la FBN (Diaz Zorita y Duarte, 2004).

Las bacterias fijadoras de N₂ convierten este nutriente en amonio mediante la acción de la enzima nitrogenasa. La soja fija el nitrógeno en simbiosis con *Bradyrhizobium japonicum*, y como resultado dentro de los nódulos se lleva a cabo la reducción del N₂. La combinación de factores tales como: las características del huésped, temperatura y humedad ambiental, las propiedades físico-

químicas del suelo y la naturaleza de la población rizobiana naturalizada determinan la adecuada formación de nódulos, la eficiencia en la fijación del nitrógeno y la productividad del cultivo (González *et al.*, 1997).

La FBN puede aportar del 25 al 90% del nitrógeno necesario para el desarrollo del cultivo, pero esto sólo puede concretarse cuando los factores ambientales no actúan como limitantes (González *et al.*, 1997; Peticari *et al.*, 2003; Peticari, 2005). El uso de especies capaces de nodular vigorosamente y de fijar el nitrógeno eficientemente, combinado con estrategias agronómicas simples, permitirán obtener altos rendimientos y contribuir a las reservas nitrogenadas del suelo (Brockwell *et al.*, 1995; Peticari *et al.*, 2003).

En condiciones ideales de expresión de la simbiosis, la nodulación comienza a visualizarse a los 3-5 días y la actividad de fijación desde los 10-15 días de emergencia. Los valores de N fijado son bajos de los estados vegetativos hasta comienzos de floración, con registros promedio 0,5-1kg de N₂ fijado/ha/día. De ahí en adelante se registra la mayor actividad. Las tasas máximas de fijación se sitúan entre los estados reproductivos R5-R6 con valores promedio de 3 y máximos de 5 kg de N₂ fijado/ha/día. Luego de esta etapa el proceso cae en forma abrupta. Imsande (1998) trabajando con distintas fuentes de nitrógeno (nitratos, urea y nitrógeno de FBN) registró aportes de 600 mg de N/planta por la fijación durante el período de llenado de granos. Concluye que en presencia de niveles no inhibitorios de N inorgánico y la rápida fijación de N₂ durante el llenado de granos mejora la eficiencia de la fotosíntesis de la soja y por este motivo se espera mayor acumulación de materia seca con esta fuente de N (Peticari, 2006).

Para la planta la FBN es un proceso de elevado costo energético, siendo de 16 a 18 moles de ATP por molécula de N reducida (Racca y Collino, 2005). Como la asimilación es energéticamente más cara que la absorción de nitrógeno del suelo, las leguminosas desarrollan mecanismos fisiológicos que permiten disminuir o anular la FBN ante suficiente nitrógeno mineral en el suelo. Debido a estos mecanismos, cuando hay suficiente N disponible en el suelo, la FBN tiende a cero. En ausencia de nitrógeno se produce el desbloqueo de estos mecanismos y se restablece la FBN. En síntesis, mientras el sistema de cultivo es pobre en nitrógeno, las leguminosas lo aportan al sistema; por el contrario, en sistemas ricos en nitrógeno, las leguminosas lo extraen del suelo (Racca, 2002).

Si no hay limitaciones ambientales, en numerosas experiencias observamos que estados vegetativos V4-V5 las plantas cuentan con 10-12 nódulos/planta, ubicados mayormente en la parte superior de la raíz primaria, con un peso por planta superior a 80 mg y un peso individual de nódulo de 7 a 8 mg. En estado reproductivo R5-R6 la adecuada nodulación presenta 40-50 nódulos por planta, de los cuáles por lo menos 12 se encuentran en parte superior de la raíz primaria, de tamaño mediano a grande, 4-6 mm de diámetro. El peso seco de nódulos por planta ideal ronda los 800 mg y el peso individual de nódulo de 7 a 9 mg (Peticari, 2006).

Durante el proceso de simbiosis las leguminosas secretan compuestos específicos (flavonoides, entre otros) que atraen a los rizobios, y en respuesta a ellos los rizobios activan una serie de genes implicados en la nodulación. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta los nutrientes hacia y desde él. La planta también expresa proteínas específicas del nódulo a las que llama nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina, tiene la función de aportar O₂ a los bacteroides y de controlar sus niveles (González *et al.*, 1997).

La leghemoglobina es la responsable de conferir el típico color rojo o rosado de los nódulos funcionales. Los nódulos no fijadores generalmente son blancos en su interior. Cuando el nódulo se deteriora por senescencia natural ó motivada por algún estrés y se finaliza la FBN, cambia de coloración interna y toma coloración verde por la presencia de legcoleglobina y en el estado final previo a la degradación es amarronado por la presencia de legmethemoglina. El primer producto estable que se obtiene de la fijación de N₂ es el amonio. En el caso de la soja, dicho amonio es asimilado en forma de glutamina y luego exportado vía xilema hacia las hojas como ureidos. Los nódulos se nutren de fotoasimilados en retorno vía floema (Fernandez Canigia, 2003).

La eficiencia del proceso de FBN atmosférico depende de diversos factores que condicionan la adecuada formación de nódulos con las cepas seleccionadas provistas de inoculantes. La temperatura y la humedad son importantes ya que afectan el crecimiento del rizobio, su supervivencia en el suelo y la simbiosis. Por lo tanto, se supone que las condiciones edáficas presentes en la siembra directa (mayor humedad, menor nivel de nitratos, mayor porcentaje de fuentes carbonadas, etc) interactuarían favorablemente sobre la nodulación inicial del cultivo de soja (Graham, 1992).

A modo de ejemplo, Unkovich y Pate (2000) observaron aportes de nitrógeno por FBN de 175 kg N ha⁻¹ para cultivos bajo riego y de 100 kg N ha⁻¹ en seco, lo que representa el 50% del N asimilado por la soja. En la región pampeana, González (1996) determinó aportes de N por FBN del orden del 30-70% de las necesidades totales de nitrógeno del cultivo, el cual va a depender de la disponibilidad de nitrógeno del suelo y de las características climáticas de la estación de crecimiento (Unkovich y Pate, 2000; González, 1996).

La práctica más recomendable para lograr que la FBN sea una fuente importante de N₂ para el cultivo, es la inoculación de la semilla con cepas de rizobios incorporados por medio de inoculantes de alta calidad, entendiendo a los inoculantes como productos formulados con microorganismos viables, benéficos, seleccionados para favorecer la nutrición y/o promover el desarrollo de las plantas. La respuesta a la inoculación es mayor cuando los lotes no cuentan con antecedentes de soja. En áreas con varias secuencias del cultivo, la repetida inoculación anual ha permitido que los rizobios introducidos capaces de nodular, se hayan establecido y naturalizado. Por esta razón, es posible observar la presencia de nódulos en las raíces de soja no inoculada en suelos con historia sojera previa (Amigo *et al.*, 2003, Diaz Zorita *et al.*, 2005). En trabajos de investigación se han demostrado que los rizobios

que se han naturalizado en el suelo van perdiendo eficacia en la fijación de N_2 , pero mantienen una alta capacidad para formar nódulos (Peticari, 2005). Según Brockwell *et al.* (1995), en suelos con niveles medios de rizobios naturalizados, a 10^3 rizobios g^{-1} de suelo, la competencia entre los rizobios introducidos con el inoculante y los presentes naturalmente en el suelo, puede resultar de interés, especialmente si la población naturalizada es pobremente efectiva en la fijación del N_2 . Con valores mayores de población naturalizada, el fenómeno de competencia por la ocupación de los nódulos es muy grande, lo que trae como consecuencia menores beneficios con la inoculación.

En nuestro país, los rizobios naturalizados, constituyen una población variable según la zona, que fluctúa entre 10^2 a 10^5 rizobios g suelo $^{-1}$. Estudios realizados por IMYZA -INTA Castelar donde se evaluó la capacidad simbiótica de cepas aisladas de diferentes suelos, determinaron que la gran mayoría presenta buena capacidad de nodulación, pero mediana capacidad para la fijación del N_2 (González *et al.*, 1997). Una estrategia para disminuir el número de nódulos con bacterias naturalizadas e incrementar los nódulos con las introducidas, es realizar una correcta inoculación y siembra de soja, utilizando productos de conocida eficiencia y alta carga bacteriana (Albanesi, 2006).

La inoculación es la práctica agronómica que incorpora artificialmente a la semilla los microorganismos seleccionados que cumplen una función benéfica sobre el crecimiento y/o desarrollo del cultivo. Es la única práctica agrícola difundida que se dispone en la actualidad que nos proporciona mayor certidumbre de poder generar simbiosis temprana en el cultivo, esto permite disponer lo antes posible del N atmosférico. En el procedimiento de inoculación se debe lograr que cada semilla contenga una carga de rizobios óptima para una adecuada nodulación. Como se mencionó anteriormente, en suelos con historia sojera se establecen poblaciones de rizobios introducidos por la repetida inoculación, sin embargo, el rizobio es poco móvil en el suelo siendo su distribución no homogénea y no toda la semilla estará en contacto con poblaciones de rizobios presentes en el suelo. En cambio, con la inoculación aseguramos que cada semilla cuente con el número de rizobios necesarios para una rápida y adecuada nodulación. Además, al disponer el inoculante de las cepas seleccionadas por su alta capacidad de fijar N_2 se crean las mejores condiciones para una mayor expresión del proceso de FBN desde las etapas tempranas del cultivo de soja manteniendo el mayor tiempo posible los aportes desde esta vía (Piccinetti *et al.*, 2013).

En el proceso de selección de cepas, los criterios básicos a considerar son la capacidad para formar nódulos (infectividad), para fijar N_2 (efectividad), la sobrevivencia en las semillas, la adaptación o tolerancia a situaciones de estrés, la estabilidad genética, como así también es fundamental la capacidad de crecimiento en las condiciones de producción de los inoculantes (Peticari, 2006).

Los estudios comienzan en laboratorio donde se evalúa la infectividad. Con las cepas preseleccionadas se inician estudios de invernáculo a fin determinar la efectividad de las mismas.

Finalmente se realizan ensayos en condiciones de campo en diferentes áreas cultivadas con soja (Peticari, 2006). Las cepas más eficientes son aquellas que tienen mayor cantidad de nódulos medianos y grandes, siendo rojos en su interior, ubicados en raíz primaria con una rápida y prolongada fijación (desde estado V2-V3 hasta R6). En cambio las rizobios menos eficientes tienen nódulos más pequeños, ubicados en raíces secundarias y tienden a paralizar la FBN en etapas más tempranas (anteriores a floración) presentando en esos casos nódulos de coloración verde. Los biotipos ineficientes tienen nódulos pequeños, no tienen presencia visible de leghemoglobina y son en su interior blancos desde etapas muy tempranas. Estos no realizan la FBN y son consideradas cepas parásitas (Thuar *et al.*, 2007). En IMYZA-INTA luego de un programa de selección iniciado en 1980, con numerosos ensayos en diferentes áreas productivas, se determinó que la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum* es una de las cepa recomendables para la inoculación de soja (Peticari *et al.*, 1994).

En los últimos Registros del SENASA, se verifica que existen en el país más de 50 marcas comerciales de inoculantes para soja, registradas por 26 empresas productoras. Las condiciones de almacenamiento y transporte requeridas por cada producto deben ser respetadas. Para la mayoría de las situaciones es indispensable no exponer los productos al sol, ni a temperaturas superiores a 25 °C. Es sumamente riesgoso almacenarlo en contacto con productos químicos que puedan dañarlo (Peticari, 2006).

La producción biotecnológica de inoculantes ha experimentado en los últimos 15 años una evolución positiva, ya que se pasó de inoculantes fabricados con soportes en base turba no estériles, a los actuales inoculantes formulados en base líquida estéril. Sin embargo, la evolución del concepto biotecnológico de inoculante no se detuvo en el solo cambio del soporte empleado para su fabricación, sino que experimentó una mejora continua en la calidad de los productos finales que se emplean a nivel de lote de producción (González Anta, 2011).

No obstante, existe una alta mortandad bacteriana en el inoculante luego de su aplicación sobre la semilla. La principal causa de ello es la desecación celular que comienza rápidamente. Ante tal situación, es posible reducir significativamente la tasa de mortandad bacteriana sobre la semilla aplicando tecnologías de protección celular que resultan en un inoculante especialmente formulado. El desarrollo de un inoculante bajo tecnologías de protección bacteriana tiene como objetivo mejorar el estado fisiológico de las bacterias que van a estar sometidas a estrés por desecación una vez que se encuentren sobre la semilla inoculada (González Anta, 2011).

Analizando la calidad de los inoculantes, según la Resolución N° 310/1994 del SENASA los inoculantes deben contener no menos de 1000 millones (10^9) de rizobios por gr o ml de producto a la fecha de elaboración y no menos de 100 millones (10^8) por gr o ml a la fecha de vencimiento. Por la inoculación se deben incorporar 80 mil rizobios por semilla de soja. Un inoculante apto debe permitir

que más del 80% de las plántulas de soja, colocadas en vermiculita, tengan 3 o más nódulos en la parte superior de las raíces luego de 14 días de emergidas. En el envase debe constar obligatoriamente la fecha de vencimiento y el número de lote. Esta marca debe ser realizada de manera tal que no permita su adulteración (Peticari, 2006).

En lo que respecta al proceso mismo de inoculación, la elección del método de inoculación apropiado, ya sea con soporte pulverulento o líquido, es básico para incorporar el número adecuado de bacterias por simiente y para disminuir la mortandad de las mismas. Es fundamental leer y respetar las condiciones de uso descritas en el producto inoculante adquirido. Se debe lograr que todas las semillas queden cubiertas con el inoculante, a fin de que cada una de ellas disponga del número de rizobios adecuado. Debe controlarse la fecha de vencimiento, la inscripción en SENASA y el número de lote (Peticari, 2006).

La inoculación puede realizarse empleando máquinas inoculadoras desarrolladas para hacer el proceso, o en su defecto mediante implementos adaptados que realicen el procedimiento permitiendo un correcto mezclado sin provocar daño mecánico a las semillas. Es imprescindible ajustar el proceso de manera tal que todas las semillas reciban la misma cantidad de inoculante. El proceso de inoculación preferiblemente debe realizarse a la sombra y a temperaturas moderadas, en lo posible inferiores a 25 °C. Como una importante cantidad de bacterias muere al momento de inoculación es conveniente efectuar la siembra lo más rápido posible, en lo posible antes de las 12 h de aplicado el producto. Si el proceso incluye el curado con fungicidas o insecticidas los tiempos se acortan y se recomienda no superar las 4 h. La inoculación en la sembradora no es aconsejable bajo ningún concepto, ya que nunca se logra una distribución apropiada del inoculante quedando muchas semillas sin inocular (Peticari *et al.*, 1994).

La inoculación mixta de leguminosas con bacterias simbióticas y asimbióticas representa la utilización de combinaciones de diferentes microorganismos, los cuales producen un efecto sinérgico, en el cual se superan los resultados productivos obtenidos con los mismos en forma independiente (Ferlini, 2006).

La inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno (*Bradyrhizobium japonicum*) es una práctica habitual en el cultivo de soja y permite fijar nitrógeno atmosférico, posibilitando que la planta lo utilice. La aplicación al cultivo, en forma conjunta -coinoculación- de bacterias PGPR con bacterias fijadoras de nitrógeno, produce efectos benéficos que incluyen mejoras en el establecimiento del sistema nodular, promoción del cultivo y aumento de rendimiento (Gholami *et al.*, 2009).

Las bacterias conocidas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) son capaces de colonizar activamente las raíces, provocando aumento del crecimiento vegetal y del rendimiento. Los mecanismos de los PGPR son: fijación biológica del nitrógeno, producción de fithormonas,

solubilización de fosfatos, actividad antagónica de rizobios contra microorganismos fitopatógenos y producción de sideróforos (Gholami *et al.*, 2009). Dado que es deseable favorecer el establecimiento de bacterias PGPR en las rizosferas de las plantas cultivadas, resulta importante comprender como dichas bacterias se distribuyen en los ambientes y qué papel juega en ello la movilidad bacteriana. Este último aspecto es la clave para garantizar una buena respuesta a la inoculación de este tipo de bacterias en semillas (Thuar *et al.*, 2007).

La coinoculación se define como la inoculación combinada de diferentes géneros o especies de bacterias seleccionadas que interactúan de manera sinérgica sobre la planta. Los efectos beneficiosos de la co-inoculación PGPR-rizobio son dependientes de la cepa PGPR utilizada. Ciertas cepas de PGPR mejoran la nodulación en leguminosas por afectar el intercambio de señales entre las plantas y los rizobios. Estas cepas producen análogos de moléculas señal y/o estimulan a la planta para producir más moléculas (Parmar y Dadarwal, 1999). Otro modo de acción posible es mediante la alteración del metabolito secundario y/o la generación de antibiosis en la rizósfera. De esta manera se elimina la competencia de los rizobios con los microorganismos perjudiciales (van Loon y Bakker, 2003).

Las interacciones biológicas de *Bradyrhizobium japonicum* con otras bacterias del suelo han sido objeto de interés, dada su evidente repercusión económica. Esto es consecuencia de la potenciación de la nodulación y del mayor crecimiento que experimentan las leguminosas de grano, en respuesta a la interacción positiva entre las bacterias simbióticas y las bacterias diazótrofes del suelo y la rizósfera, en especial las pertenecientes al género *Azospirillum*. Estas combinaciones de bacterias aplicadas a las semillas de los cultivos han redundado en mayor producción vegetal, lo cual se asociaba en forma directa a la mayor fijación de N₂ que estos microorganismos producen (Ferlini, 2006).

El género *Azospirillum* está incluido dentro del grupo de bacterias PGPR, bacterias promotoras del desarrollo vegetal. Burdmann *et al.* (2000) manifiesta que la estimulación de la nodulación posterior a la inoculación de leguminosas con *Azospirillum brasilense* puede estar dada por el incremento en la inducción de la producción de genes Nod, de raíces laterales, de la densidad de los pelos radicales y las ramificaciones de dicho pelos. De este modo, la inoculación combinada de *Bradyrhizobium japonicum* con otras bacterias incrementa los rendimientos de las leguminosas, también bajo condiciones limitadas de agua y de nitrógeno (Ferlini, 2006).

Algunos ensayos realizados demostraron que la coinoculación produjo aumentos en la fijación del nitrógeno, en el número de nódulos y en el rendimiento (Iruthayathas *et al.*, 1983; Rai, 1983; Sarig *et al.*, 1986). En otros ensayos se ha observado que la inoculación produjo una aparición de nódulos más temprana y un comienzo más temprano de la actividad de fijación de nitrógeno (González y Llunch, 1992; Burdmann *et al.*, 1997; Okon y Vanderleyden, 1997; Groppa *et al.*, 1998).

Galal (1997) demostró que la coinoculación en semillas de soja con *Azospirillum* sp. y *Bradyrhizobium japonicum* presento mejoras en la materia seca en plantas de 60 días, en el porcentaje de nitrógeno y en el nitrógeno asimilado comparando con la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* solamente, atribuyendo esto a las sustancias del tipo fitohormonas liberadas por *Azospirillum*.

Se observó en otro ensayo que la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* Az39 modificó la capacidad de la semilla de soja para germinar, el crecimiento aéreo y radical comparado con el control sin inocular (Cassán *et al.*, 2009).

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con que se formulan los inoculantes para soja son objeto de estudio permanente y, bajo convenios de investigación específicos, se están seleccionando nuevas cepas procurando una alta competitividad y eficiencia en FBN para mejorar la performance actual de inoculantes comerciales. Hasta el momento es poca la información a nivel nacional que permita estimar el impacto en el rendimiento del cultivo de soja a nivel de producción cuando se realizan las prácticas de inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* junto a otras bacterias del suelo. Por esta razón existe la necesidad de definir en forma precisa su efecto en la producción (Ferraris *et al.*, 2006).

HIPÓTESIS

La inoculación y coinoculación del cultivo de soja permite un mayor rendimiento.

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar a campo la respuesta de diferentes inoculantes en el cultivo de soja.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la respuesta del cultivo de soja a la aplicación de diferentes inoculantes sobre la producción de biomasa aérea y radical durante el estadio V5.

Evaluar la respuesta del cultivo de soja a la aplicación de diferentes inoculantes sobre la nodulación en raíces primarias y secundarias durante el estadio R5.

Determinar la respuesta del cultivo de soja a la aplicación de diferentes inoculantes sobre el rendimiento en el estadio R8.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio:

El ensayo se realizó en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto (CAMDOCEX) Ruta Nacional 36 – km 601, a los 33° 07' S y 64° 14' O, Río Cuarto, Córdoba – Argentina, durante la campaña 2012/13.

La región de Río Cuarto presenta un clima templado sub húmedo, con precipitaciones que suelen exceder la evapotranspiración en los meses de primavera y otoño y con déficits puntuales en verano e invierno, es decir se caracteriza por tener un régimen 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 (Cátedra de Agrometeorología y Climatología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina 2012).

El régimen térmico es Mesotermal. La temperatura media del mes más cálido (enero) es de 22.4 °C con una máxima absoluta de 41.6 °C. La temperatura media del mes más frío (julio) es de 9.9 °C con una mínima absoluta de -11.6 °C. La amplitud térmica media anual es de 12.5 °C. La fecha media de la primera helada es el 25 de mayo y de la última helada es el 12 de septiembre, siendo el período libre de heladas promedio de 255 días (Seiler *et al.*, 1995).

La Tabla 1 muestra las precipitaciones ocurridas en el período desde la primera década de diciembre 2012 hasta la segunda década de abril 2013 (Cátedra de Agrometeorología y Climatología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina 2015)

Precipitaciones durante el ciclo del cultivo:

Tabla 1: Precipitaciones decádicas (mm) durante el ciclo del cultivo (2012/13).

1° Década	diciembre	2012	18 mm
2° Década	diciembre	2012	86 mm
3° Década	diciembre	2012	106 mm
1° Década	enero	2013	33 mm
2° Década	enero	2013	19 mm
3° Década	enero	2013	24 mm
1° Década	febrero	2013	5 mm
2° Década	febrero	2013	59 mm
3° Década	febrero	2013	0 mm
1° Década	marzo	2013	25 mm
2° Década	marzo	2013	54 mm
3° Década	marzo	2013	22 mm
1° Década	abril	2013	23 mm
2° Década	abril	2013	3 mm

El suelo sobre el cual se realizó el ensayo está clasificado como Hapludol típico, franco arenoso muy fino (Cantero *et al.*, 1986). Previo a la siembra se realizó una caracterización del mismo a través de un análisis físico - químico. Para ello se tomó una muestra compuesta por 20 sub muestras de los primeros 20 cm del suelo. El muestreo sistemático se realizó atravesando las parcelas en forma diagonal tratando de obtener una muestra homogénea. Se determinó materia orgánica (Método Walkley – Black, 1934); nitrógeno de nitratos por el método de la reducción de cadmio (Lambert y Dubois, 1971); fósforo (Bray y Kurtz, 1945); pH (1:2,5 suelo/agua) (Mc Lean, 1982) (Tabla 2). El análisis puede ser un elemento imprescindible y altamente confiable en el diagnóstico de las deficiencias de ciertos elementos poco móviles en el suelo como el fósforo.

Análisis físico-químico del suelo:

Tabla 2: Análisis físico-químico del suelo.

Materia Orgánica	%	1,70
Nitrógeno de Nitratos	Ppm	22,60
Nitratos	Ppm	100,1
Fósforo	Ppm	16,60
Humedad	%	20,50
pH		7,14

Se utilizó el modelo en bloques completos al azar con 6 tratamientos. El tamaño de cada parcela fue de 4 surcos separados a 0.52 m de distancia, con un largo de 10 m realizándose 4 repeticiones por cada tratamiento.

Tratamientos:

- ✓ **Tratamiento A:** Inoculante Signum® (Signum 150 ml + protector Premax 50 ml/ cada 50 kg de semilla)
- ✓ **Tratamiento B:** Inoculante Signum® (Signum 150 ml + protector Premax 50 ml/ cada 50 kg de semilla) + Bacteria Gram negativa (a razón de 340 ml cada 50 kg de semillas).
- ✓ **Tratamiento C:** Inoculante Signum® (Signum 150 ml + protector Premax 50 ml/ cada 50 kg de semilla) + Rizoderma® (a razón de 250 ml cada 50 kg de semilla).
- ✓ **Tratamiento D:** Inoculante Signum® (Signum 150 ml + protector Premax 50 ml/ cada 50 kg de semilla) + inoculante Risoja® (a razón de 300 ml cada 50 kg de semillas).
- ✓ **Tratamiento E:** Inoculante Risoja® (300 ml cada 100 kg) + protector Experimental 1 (140 ml cada 100 kg de semilla).
- ✓ **Tratamiento F:** Testigo absoluto.

Los productos evaluados son marcas comerciales o precomerciales de Rizobacter Argentina S.A. Se utilizó la cepa *Bradyrhizobium spp.*

El cultivo se implantó en siembra directa, sobre un rastrojo de maíz, en condiciones de secano.

Especie y cultivar empleado:

La variedad de soja utilizada fue la NS 4009, la cual es una variedad indeterminada, con un excelente potencial de rendimiento y especialmente adaptada para manejo de alta tecnología. Se comporta muy bien en toda la región pampeana Central y Sur. Se caracteriza también por tener una rápida cobertura inicial y ser tolerante al estrés hídrico.

Ciclo días a floración	39
Ciclo días a maduración	131
Color pubescencia	Castaño claro
Color flor	Púrpura
Potencial de rendimiento	Alto
Plantas m ⁻¹ a cosecha (siembra 1 a 52 cm)	34
Altura de planta (cm)	88
Tipo de planta	Ramificada
Peso por mil (g) (1)	183

(1) Valor de referencia, el peso por mil puede variar en función de las condiciones durante el llenado de granos.

Fuente: Nidera Semillas.

Determinaciones a realizar:

Los muestreos del cultivo implantado se realizaron en la etapa vegetativa V5 y las reproductivas R5 y R8.

En la etapa vegetativa V5 se midió:

- ✓ Peso seco de biomasa vegetal aérea en g planta⁻¹.
- ✓ Peso seco de biomasa vegetal radical en g planta⁻¹.

En la etapa reproductiva R5 se midió:

- ✓ Número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias.
- ✓ Peso seco de cada muestra en g m⁻².

En la etapa reproductiva R8 se midió:

- ✓ Peso de los 1000 granos en g.
- ✓ Rendimiento por tratamiento en kg ha⁻¹.

Análisis de resultados:

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza con una $p = 0.05$ y se compararon los promedios con el Test de Tuckey empleando el Software InfoStat/E (Di Rienzo *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinaciones en V5:

Peso seco de Biomasa Vegetal Aérea: el peso aéreo de la biomasa no mostró diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos. Hubo diferencias entre los tratamiento E y F con $4.80 \text{ g planta}^{-1}$ siendo los de mayor valor, con los tratamientos A, B y C cuyo valor fue de $4.30 \text{ g planta}^{-1}$ ubicándose en una posición intermedia, y el tratamiento D que fue el menor con $3.30 \text{ g planta}^{-1}$ (Figura 1) (Anexo 1). Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos del ensayo realizado durante la campaña 2010/11 por González Fiqueni *et al.* (2011) en Buenos Aires, quienes no lograron detectar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos de inoculación y co inoculación. Es interesante destacar el buen comportamiento de la variedad utilizada en cuanto al carácter evaluado.

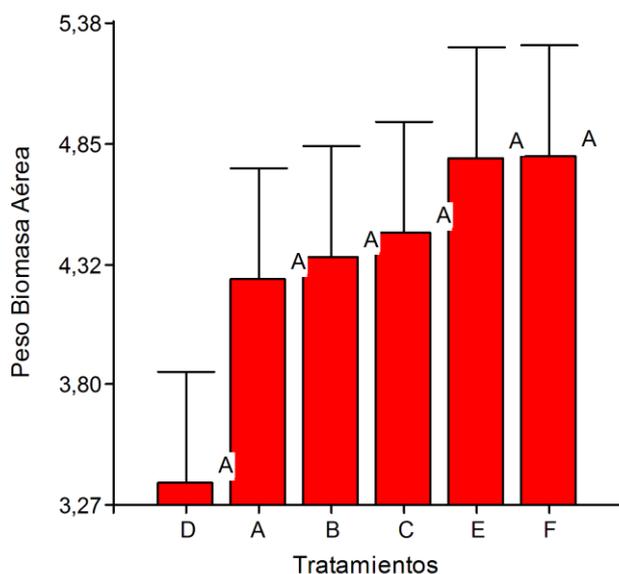


Figura 1: Peso seco de biomasa vegetal aérea (g) en V5. Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Peso seco de Biomasa Vegetal Radical: en el análisis de dicha variable se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento F (Testigo) con el tratamiento B (Figura 2) (Anexo 2). El resto de los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

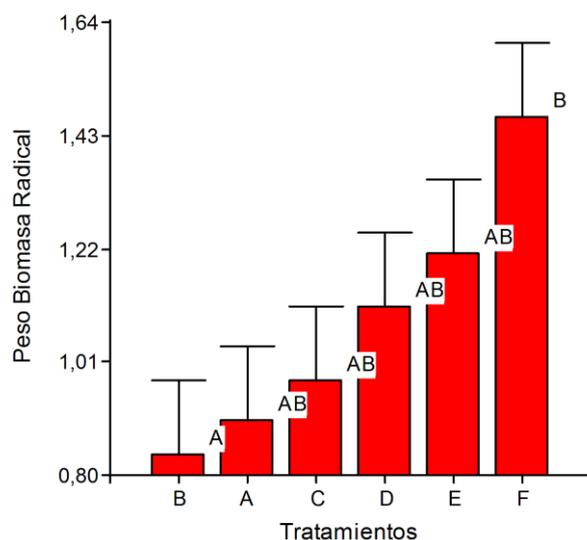


Figura 2: Peso seco de biomasa vegetal radical (g) en V5. Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Determinaciones en R5:

Número de Nódulos en Raíz Principal: observando el número de nódulos en la raíz principal (Figura 3) no se detectan diferencias estadísticamente significativas (Anexo 3). Sin embargo, se destaca el tratamiento C alcanzando 19 nódulos. Resultados semejantes fueron observados por González Fiqueni *et al.* (2011) durante la campaña 2010/11. Brockwell *et al.* (1995) afirman que si la población naturalizada de rizobios es grande habrá mayor competencia por la ocupación de los nódulos, impidiendo la máxima expresión de la inoculación, trayendo consecuencias negativas si la población naturalizada es pobremente efectiva en la fijación del N_2 .

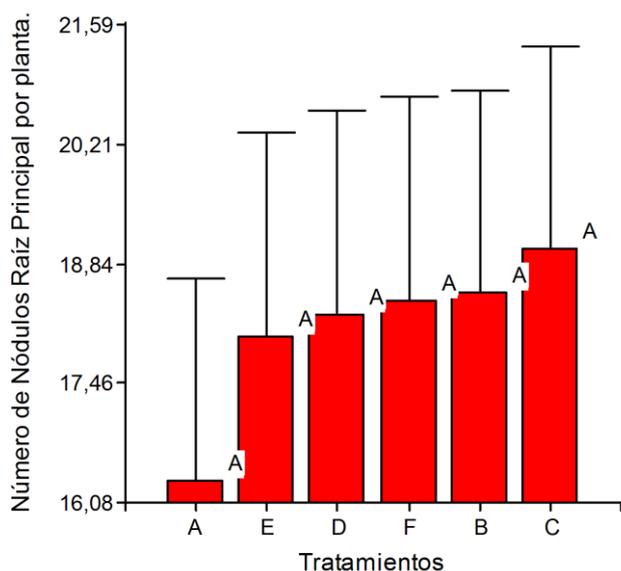


Figura 3: Número de nódulos en raíz principal en R5. Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Número de Nódulos en Raíces Secundarias: en relación al número de nódulos en las raíces secundarias (Figura 4), se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 4) entre los tratamientos. Hay diferencia entre los tratamientos F y A con 74 – 76 nódulos respectivamente, del resto de los tratamientos.

El estrés hídrico tiene efecto directo sobre la nodulación y la FBN: Las siembras en condiciones secas provocan la mortandad de bacterias y disminuyen la posibilidad de lograr una nodulación apropiada; la falta de agua en etapas tempranas retrasa la aparición de los nódulos y en etapas reproductivas limita la FBN. Los resultados obtenidos para la variable número de nódulos en raíces principales y laterales puede atribuirse a un estrés hídrico que sufrió el cultivo durante el ciclo, provocando un mayor número de nódulos en raíces laterales (Figura 4), cuando en realidad lo normal es que el mayor número de nódulo se encuentre en la raíz principal. Los resultados obtenidos son similares a los que encontraron Peticari *et al.* (2003) y Racca (2002), en experiencias donde evaluaron el efecto del estrés hídrico sobre nodulación y FBN.

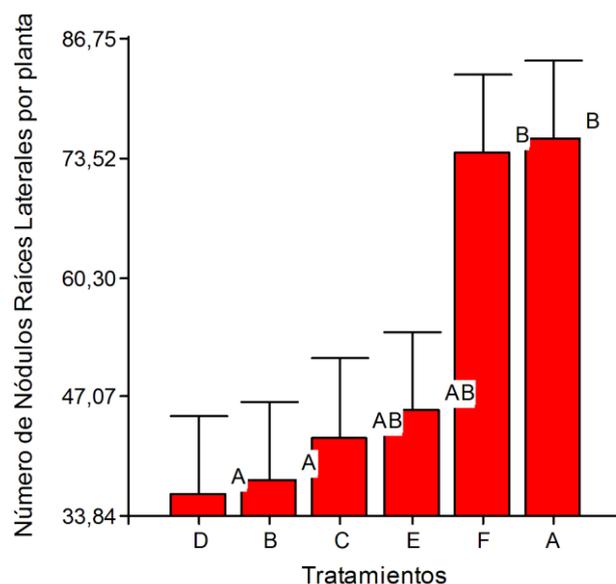


Figura 4: Número de nódulos en raíces secundarias en R5. Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Peso seco de Nódulos en Raíz Principal: el peso de los nódulos (g) en la raíz principal no presenta diferencias estadísticamente significativas (Figura 5) (Anexo 5). Sin embargo, se destacan los tratamientos C, F y E con valores mayores al resto de los tratamientos.

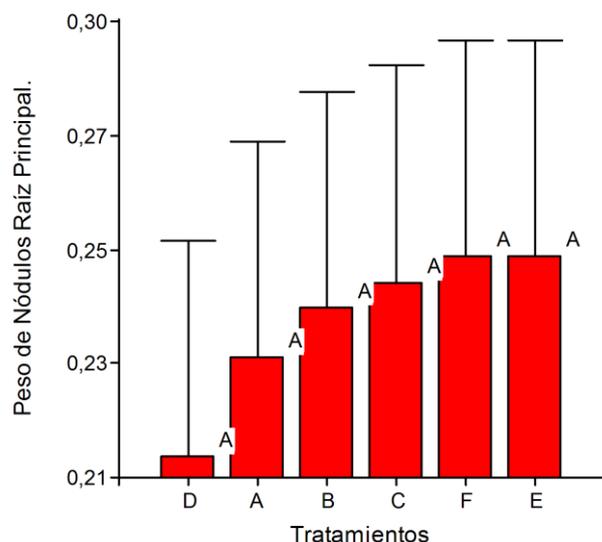


Figura 5: Peso seco de nódulos (g) en raíz principal en R5. Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Peso seco de Nódulos en Raíces Secundarias: en cuanto al peso seco de nódulos en las raíces laterales (Figura 6) los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Anexo 6). En este caso se destaca el efecto del inoculante Signum correspondiente al tratamiento A. El tratamiento F correspondiente al testigo se encuentra en un valor cercano al tratamiento A pero sin diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, ambos superan los valores de los tratamientos restantes. Estos resultados son similares a los encontrados por Chebotar *et al.* (2001) y Gonzalez Fiqueni *et al.* (2011), quienes observaron que la práctica de inoculación aumentó la biomasa nodular.

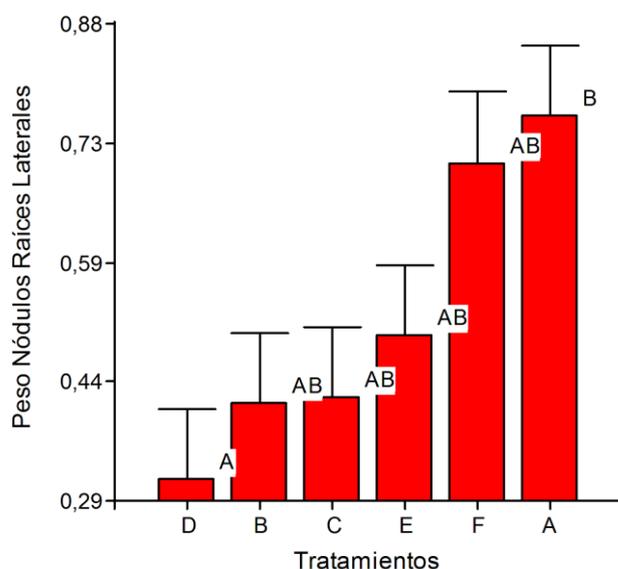


Figura 6: Peso seco de nódulos (g) en raíces laterales en R5. Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Determinaciones en R8:

Rendimiento: entre los factores principales que determinan el rendimiento de soja se encuentran las condiciones edafoclimáticas (temperatura, radiación, precipitaciones disponibilidad de nutrientes, condiciones de la cama de siembra, etc.), las características propias del cultivar (genotipo) y las prácticas de manejo (densidad y fecha de siembra, manejo del agua). Dentro de estas últimas está incluida la práctica de inoculación y co inoculación (Arias, 2010). Analizando el rendimiento (Figura 7) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Anexo 7). Se puede decir que el tratamiento B supera al resto llegando a los 3295 kg ha⁻¹, los tratamientos A, E y D obtuvieron valores intermedios, y los tratamientos C y F obtuvieron los rendimientos con menor valor. Lo mismo fue observado por González Fiqueni *et al.* (2011) el cual no encontró diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y coinoculados. Sin embargo, Ventimiglia y Torrens Baudrix (2013) observaron aumentos significativos de 11,5 % al coinocular, en comparación con un tratamiento de inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* únicamente, aumentando el rendimiento unos 452 kg ha⁻¹, pasando de 3940 kg ha⁻¹ a 4392 kg ha⁻¹, respectivamente (Ventimiglia y Torrens Baudrix, 2013).

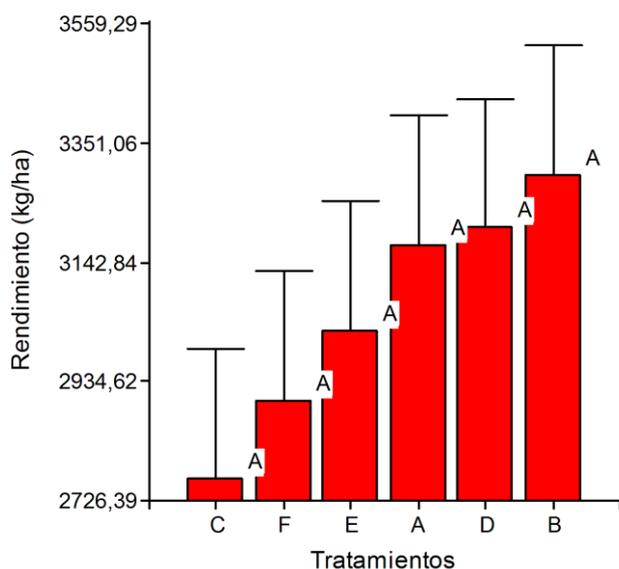


Figura 7: Rendimiento de Soja (kg ha⁻¹). Campaña 2012/13. Río Cuarto, Córdoba.

Peso de mil semillas: la medición del peso de las 1000 semillas (Tabla 3) muestra valores que van desde los 156,7 g hasta los 179 g, con un promedio de 165 g. Este valor depende de la variedad utilizada pero principalmente de las condiciones de crecimiento durante del llenado de granos. A partir del peso de mil semillas se pueden calcular las densidades de siembra en kg ha⁻¹ (www.niderasemillas.com.ar).

Tabla 3: Peso de Mil Semillas.

Tratamientos	Peso de 1000 semillas (g)
A	160,7
B	160,9
C	156,7
D	179,0
E	161,6
F	171,3

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir:

- ✓ La aplicación del inoculante Signum combinado con Rizoderma provocó la presencia de un mayor número de nódulos en las raíces principales, pero los mismos presentaron un menor peso comparado con el testigo.
- ✓ La implementación del inoculante Signum generó un mayor número y peso seco de nódulos en las raíces laterales.
- ✓ La biomasa aérea y radical en el tratamiento testigo obtuvo el mayor valor, pero es necesario señalar que esto no se traduce en un mayor rendimiento, ya que el testigo obtuvo el segundo lugar en orden creciente de resultados de dicha variable.
- ✓ Los tratamientos inoculados y coinoculados con bacterias lograron los mayores rendimientos en relación al tratamiento testigo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBANESI, A. 2006. El nitrógeno y la necesidad de la inoculación en soja. *Todo soja 2006*. S. M. de Tucumán. pp. 23-25.
- AMIGO, J.; A. STEGMAYER.; J. CAJAL.; J. LENIS.; F. LEDESMA.; M. DEVANI. 2003. Comportamiento comparativo de cepas comerciales y naturalizadas de rizobios en la Provincia de Tucumán. **IV Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos y IV Encuentro de Fijación Biológica del Nitrógeno**. Tucumán 10-12 Abril, Argentina.
- ARIAS, N. 2010. Comportamiento de cultivares de soja en Gualeguaychú. Campaña 2009/10. Uruguay. INTA. pp. 15.
- BRAY, R. H. y L. T. KURTZ. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- BROCKWELL, J.; P. BOTTOMLEY.; J. E. THIES. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility. *Plant and Soil.* 174: 143-180.
- BURDMANN, S.; J. HIGEL.; Y. OKON. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean. *Soil Biology and Biochemistry.* 29: 923-929.
- BURDMANN, S.; B. HAMAOUY.; Y. OKON. 2000. Improvement of legume crop yields by co-inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. The Hebrew University of Jerusalem, Israel. pp. 92-100.
- CANTERO G. A.; E. M. BRICCHI.; V. H. BECERRA.; J. M. CISNEROS.; H. A. GIL. 1986. Zonificación y descripción de las tierras del Departamento Río Cuarto. UNRC-FAV. pp. 80.
- CASSÁN, F.; D. PERRIG.; V. SGROY.; O. MASCIARELLI.; C. PENNA.; V. LUNA. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*). *Eur. J. of Soil Biol.* 45: 28-35.
- CHEBOTAR, V. K.; C. A. ASIS.; S. AKAO. 2001. Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biol. Fert. Soils.* 34: 427-432.
- DIAZ ZORITA, M.; R. BALIÑA.; M. FERNANDEZ CANIGIA. 2005. Inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en cultivos de soja. Campaña 2003-2004. Resumen de resultados de investigación y desarrollo aplicado. Nitragin Argentina S.A. pp. 7-12.

- DIAZ ZORITA, M. y G. DUARTE. 2004. Manual Práctico para la Producción de Soja. pp. 19-92.
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES., M. G. BALZARINI., L. GONZALEZ, M. TABLADA y C. W ROBLEDO. 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DOMINGO YAGÜES, J.; A. FERREYRA.; R. LANGHI.; G. PAUSICH.; A. PEZZOLA.; C. COMA. 2012. Campaña Sojera 2010-11. INTA, Red de Información Agropecuaria Nacional (RIAN). Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/campana-sojera-2010-2011-republica-argentina>. Consultado: Enero 2013
- FERLINI, H.A. 2006. Coinoculación en soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. En: www.engormix.com. Consultado: Febrero 2013.
- FERNÁNDEZ CANIGIA, M.V. 2003. Manual de nodulación. Departamento de Investigación y Desarrollo. Nitragin Argentina. S.A. pp. 46
- FERRARIS, G.; G. GONZÁLEZ ANTA.; M. DÍAZ ZORITA. 2006. Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. En: Mercosoja 2003. **3° Congreso de Soja del MERCOSUR. Soja Sudamericana Liberando el Porvenir**. Rosario, Santa Fe, 27-30 Junio, 2006. Argentina. Conferencias Planetarias-Foros-Workshops. pp. 85-88.
- GALAL, Y. M. G. 1997. Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean (*Glycine max*). Biol Fertil Soils. 24: 317-322.
- GHOLAMI, A.; S. SHAHSAVANI.; S. NEZARAT. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination seedling growth and yield of maize. World Academy of science, Engineering and Technology 49. pp. 19-24.
- GONZÁLEZ ANTA, G. 2011. Los últimos avances sobre Biotecnología aplicada a la nutrición de los cultivos. En: www.on24.com.ar. Consultado: Febrero 2013.
- GONZÁLEZ FIQUENI, M. F.; S. DURMAN.; E. MORETTI.; I. PUEYO.; M. VACCA.; T. Bosco. 2011. Coinoculación en soja: efectos sobre nodulación, crecimiento y rendimiento. En: Mercosoja 2011. **5° Congreso de la Soja del MERCOSUR**. Rosario, Santa Fe, 14-16 Septiembre, 2011. Argentina. pp. 2.
- GONZÁLEZ, J. y C. LLUCH. 1992. Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo. Rueda (ed.) Madrid. España, pp. 141-161.

- GONZÁLEZ, N. 1996. Fijación de nitrógeno. En: Curso de Actualización “Dinámica de nutrientes en suelos agrícolas”. EEA INTA Balcarce. pp. 56-65.
- GONZÁLEZ, N.; A. PERTICARI.; B. STEGMAN.; E. RODRÍGUEZ CÁCERES. 1997. Nutrición nitrogenada. En: Giorda L. M. y H. E. J. Baigorri, (Eds.). El cultivo de la soja en Argentina. INTA, Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez- EEA. pp. 188- 198.
- GRAHAM, P.H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Can. J. Microbiol. 38: 475-484.
- GROPPA, M. D.; M.S. ZAWOZNIK.; M. L. TOMARO. 1998. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. Eur. J. Soil Biol. 34(2):75-80.
- IMSANDE, J. 1998. Nitrogen déficit during soybean pod fill and increased plant biomass by vigorous N₂ fixation. European Journal of Agronomy. 8: 1-11.
- IRUTHAYATHAS, E. E.; S. GUNASEKARAN.; K. VLASSAK. 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂- fixation of winged bean and soybean. Scientia Horticulturae. 20: 83-90.
- LAMBERT, R. J. y R. J. DUBOIS, 1971. Spectrophotometric determination of nitrate in the presence of chloride. Analytical Chemistry. 43: 955-957.
- MC LEAN, E. O. 1982. Soil pH and lime requirement. In Page, A. L., R. H. Miller and D. R. Keeney (eds). Methods of soil analysis. Part 2 - Chemical and microbiological properties. (2nd Ed.). Agronomy. 9: 199-223.
- OKON, Y. y J. VANDERLEYDEN. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News. 63: 366-370.
- PARMAR, N. y K. R. DADARWAL. 1999. Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. Journal of Applied Microbiology. 2: 36-44.
- PERTICARI, A.; J. C. PACHECO BARSUCO.; G. BENINTENDE. 1994. Interacción entre diferentes inoculantes y temperaturas de almacenamiento sobre semilla pre-inoculada de soja. **XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología**. La Habana, Cuba. pp. 50-70.
- PERTICARI, A.; N. ARIAS.; H. BAIGORRI.; J. J. DE BATTISTA.; M. MONTECCHIA.; J. C. PACHECO BASURCO.; A. SIMONELLA.; S. TORESANI.; L. VENTIMIGLIA.; R. VICENTE. 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. El libro de la soja. Buenos Aires. Servicios y Marketing Agropecuario. pp. 69-76.

PERTICARI, A. 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Actas del Congreso Mundo Soja. Buenos Aires, Argentina. pp. 111-120.

PERTICARI, A. 2006. Especial inoculación. En: www.lanacion.com.ar. Consultado: Mayo 2015.

PICCINETTI, C.; N. ARIAS.; L. VENTIMIGLIA.; M. DÍAZ ZORITA.; L. MURUA.; H. SANCHEZ.; G. FERRARIS.; F. MOUSEGNE.; H. FONTANETTO.; E. SÁ PEREIRA.; J. CAPURRO.; J. M. ENRICO.; C. LOPEZ.; A. CARRIZO.; F. SALVAGIOTTI.; D. COLLINO.; A. PERTICARI. 2013. Efectos positivos de la inoculación de soja sobre la nodulación, la FBN y en los parámetros de producción del cultivo. Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación en Argentina. Segunda edición. pp. 283-297.

RACCA, R. 2002. Inoculación en soja: Una herramienta fundamental para maximizar la productividad. INTA – IFIVE. En: www.fertilizar.org.ar. Consultado: Agosto 2013.

RACCA, R.; D. J. COLLINO. 2005. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. Congreso Mundo Soja. Buenos Aires. pp. 111-120

RAI, R. 1983. Efficacy of associative N₂-fixation by streptomycin-resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes of chick pea *Rhizobium* strains. J. Agric. Sci. Camb. 100:75-80.

SARIG, S.; Y. KAPULNIK.; Y. OKON. 1986. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several Winter legumes. Plant and Soil. 90: 335-342.

SEILER, R.; R. FABRICIUS.; V. ROTONDO.; M. VINOCUR. 1995. Agroclimatología de Río Cuarto – 1974 / 1993. UNRC. I. pp. 41.

TORESANI, S.; V. ROMAGNOLI.; B. CANAVE. 2012. Inoculación en soja: Calidad de Inoculantes y experiencias a campo en el sur de Santa Fe. Revista Agromensajes de la Facultad UNR.

THUAR, A., F. CASSÁN y C. OLMEDO. 2007. En: De la biología del suelo a la agricultura. 1^o Edición. pp. 1-291.

UNKOVICH, M. J. y J. S. PATE. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. Field Crops Res. 65: 211–228.

Van LOON, L. C. y P. A. H. M. BAKKER. 2003. Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In: De Kroon, H. and E. J. W. Visser (eds.), Root ecology, (Ecological studies). 168: 297-330.

VENTIMIGLIA, L. y L. TORRENS BAUDRIX. 2013. Dosis de inoculante y complementación de *Bradyrhizobium* con BPCV en soja. Agromercado. 177: 14-17.

WALKLEY, A y I. BLACK. 1934. An examination of the Degtjareff method and a proposed modification of the chromic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 34: 29-38.

WWW.AGROSITIO.COM/VERTEXT.PHP?ID=105902&AREA_ID=2. Consultado: Junio 2015.

WWW.NIDERASEMILLAS.COM.AR/NIDERASEMILLAS/SOJA_DETALLE.ASPX?ID=44.

Consultado: Mayo 2015.

ANEXO

Anexo 1: Peso seco de Biomasa Vegetal Aérea.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso Biomasa Aérea	72	0,15	0,04	38,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,50	8	3,94	1,40	0,2154
Tratamientos	16,60	5	3,32	1,18	0,3301
Repeticiones	14,90	3	4,97	1,76	0,1635
Error	177,59	63	2,82		
Total	209,09	71			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,01462

Error: 2,8188 gl: 63

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
D	3,37	12	0,48	A
A	4,26	12	0,48	A
B	4,36	12	0,48	A
C	4,46	12	0,48	A
E	4,79	12	0,48	A
F	4,80	12	0,48	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 2: Peso seco de Biomasa Vegetal Radical.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso Biomasa Radical	72	0,22	0,12	43,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,94	8	0,49	2,24	0,0357
Tratamientos	3,15	5	0,63	2,86	0,0217
Repeticiones	0,80	3	0,27	1,21	0,3144
Error	13,86	63	0,22		
Total	17,81	71			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,56287

Error: 0,2200 gl: 63

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
B	0,84	12	0,14	A
A	0,91	12	0,14	A B
C	0,98	12	0,14	A B
D	1,11	12	0,14	A B
E	1,21	12	0,14	A B
F	1,46	12	0,14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 3: Número de Nódulos en Raíz Principal.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de Nódulos Raíz Pri..	72	0,06	0,00	44,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	270,94	8	33,87	0,52	0,8400
Tratamientos	50,67	5	10,13	0,15	0,9780
Repeticiones	220,28	3	73,43	1,12	0,3482
Error	4134,56	63	65,63		
Total	4405,50	71			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,72082

Error: 65,6279 gl: 63

Tratamientos	Medias	n	E.E.
A	16,33	12	2,34 A
E	18,00	12	2,34 A
D	18,25	12	2,34 A
F	18,42	12	2,34 A
B	18,50	12	2,34 A
C	19,00	12	2,34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 4: Número de Nódulos en Raíces Secundarias.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de Nódulos Raíces L..	72	0,30	0,21	57,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	23900,28	8	2987,53	3,31	0,0032
Tratamientos	19573,83	5	3914,77	4,33	0,0019
Repeticiones	4326,44	3	1442,15	1,60	0,1991
Error	56907,72	63	903,30		
Total	80808,00	71			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=36,06402

Error: 903,2972 gl: 63

Tratamientos	Medias	n	E.E.
D	36,25	12	8,68 A
B	37,83	12	8,68 A
C	42,58	12	8,68 A B
E	45,50	12	8,68 A B
F	74,17	12	8,68 B
A	75,67	12	8,68 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5: Peso seco de Nódulos en Raíz Principal.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso de Nódulos Raíz Princ..	24	0,25	0,00	36,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	8	4,7E-03	0,64	0,7369
Tratamientos	4,8E-03	5	9,5E-04	0,13	0,9837
Repeticiones	0,03	3	0,01	1,48	0,2597
Error	0,11	15	0,01		
Total	0,15	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19791

Error: 0,0074 gl: 15

Tratamientos	Medias	n	E.E.
D	0,21	4	0,04 A
A	0,23	4	0,04 A
B	0,24	4	0,04 A
C	0,25	4	0,04 A
F	0,25	4	0,04 A
E	0,25	4	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 6: Peso seco de Nódulos en Raíces Secundarias.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso Nódulos Raíces Latera..	24	0,63	0,43	33,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,76	8	0,10	3,17	0,0258
Tratamientos	0,63	5	0,13	4,20	0,0138
Repeticiones	0,13	3	0,04	1,46	0,2658
Error	0,45	15	0,03		
Total	1,21	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,39761

Error: 0,0300 gl: 15

Tratamientos	Medias	n	E.E.
D	0,32	4	0,09 A
B	0,41	4	0,09 A B
C	0,42	4	0,09 A B
E	0,50	4	0,09 A B
F	0,71	4	0,09 A B
A	0,77	4	0,09 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7: Rendimiento.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento (kg/ha)	24	0,25	0,00	14,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1008456,33	8	126057,04	0,62	0,7508
Tratamientos	810244,83	5	162048,97	0,79	0,5707
Repeticiones	198211,50	3	66070,50	0,32	0,8083
Error	3062645,50	15	204176,37		
Total	4071101,83	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1038,08566

Error: 204176,3667 gl: 15

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
C	2764,25	4	225,93	A
F	2901,25	4	225,93	A
E	3023,75	4	225,93	A
A	3173,50	4	225,93	A
D	3202,25	4	225,93	A
B	3295,50	4	225,93	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)