

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar
al Grado de Ingeniero Agrónomo

Modalidad: Proyecto



**EVALUACIÓN A CAMPO DE UN INOCULANTE PARA
SOJA ELABORADO CON CEPAS RIZOBIANAS
DESNITRIFICANTES**

Nombre del Alumno: Nelson Jesús Mantegazza

DNI: 33.594.520

Director: Dra. Carla Bruno

Co-Director: Dra. Alicia Thuar

Río Cuarto – Córdoba

Junio 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Evaluación a campo de un
inoculante para soja elaborado con cepas rizobianas
desnitrificantes

Autor: Nelson Jesús Mantegazza

DNI: 33594520

Director: Dra. Carla Bruno

Co-Director: Dra. Alicia Thuar

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

Dra. Autran, Valeria _____

Msc. Grassi, Ezequiel _____

Dra. Bruno, Carla _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

DEDICATORIA

**A mis padres, Estela y Carlos, quienes me dieron la vida, y el apoyo incondicional para seguir siempre adelante y nunca bajar los brazos. Por su presencia y confianza constante que me permitió estudiar y ser quien soy. A mi hermana por darme fuerza y el empuje anímico siempre, para seguir luchando y así cumplir el sueño de convertirme en Ingeniero Agrónomo. A mis amigos de siempre que a la distancia me apoyaron y a cada uno de mis amigos y compañeros de la facultad que supieron acompañarme en este hermoso camino. A todos
Muchas gracias...**

AGRADECIMIENTO

No puedo dejar de agradecer a esta casa que es la Universidad Nacional De Río Cuarto, de la que tanto me llevo, donde aprendí no solo conocimiento teórico sino también muchos aprendizajes valiosos para la vida. Este es el lugar donde todos deberían poder llegar. Ser egresado de la universidad pública me hace sentir un tremendo orgullo y ojala lo pueda transmitir a las siguientes generaciones durante mi vida.

Infinitas gracias UNRC.

INDICE GENERAL	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
A - Características generales del cultivo de soja	3
B - Etapas del desarrollo	3
C - El cultivo de soja en Argentina	5
D - Acumulación y translocación de nitrógeno	6
E - Nutrición nitrogenada	6
F - Inoculación	7
G - Rizobios	8
II. HIPÓTESIS	10
III. A) OBJETIVO GENERAL	10
III. B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	11
A - Cepas bacterianas	11
B - Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de las cepas bacterianas	11
C - Composición del Medio YEM	11
D - Conservación de la cepa bacteriana	12
E - Cultivar de soja	12
F - Ensayo a campo: interacción <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja	13
F - 1 - Fecha de siembra:	13
F - 2 - Toma de muestras	14
F - 3 - Riego	14
F - 4 - Fecha de cosecha	14
F - 5 - Análisis de suelo	14
F - 6 - Balance de nitrógeno	15
F - 7 - Estimación de rendimiento	16
G - Análisis estadísticos	16
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
A - Interacción <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja	17
A - 1 - Condiciones edáficas y climáticas para el desarrollo del cultivo de soja	17
A - 2 - Balance relativo y variación de nitrógeno en el cultivo de soja	20
B - Rendimiento del cultivo de soja	23
VI. CONCLUSIÓN	25
VII. BIBLIOGRAFÍA	26

ÍNDICE DE CUADROS	Pág.
Tabla 1. Descripción de los estadios fenológicos del cultivo de soja según escala de Fehr y Caviness (1977).	4
Tabla 2. Referencia de las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> utilizadas en el ensayo de soja a campo. Río Cuarto, 2014-2015.	11
Tabla 3. Características del cultivar de soja DM 4210 RR Grupo IV C utilizado en el ensayo. Río Cuarto 2014-2015.	12
Tabla 4. Resultado de los parámetros físico-químicos del suelo en el que se desarrolló el ensayo. Río Cuarto, 2014-2015.	17
Tabla 5. Variables de la capacidad de nodulación en la interacción <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja evaluadas en el estadio fenológico R2 y R6, en Río Cuarto en la campaña 2014-2015.	22
Tabla 6. Balance relativo de nitrógeno en cultivo de soja con distintos tratamientos. Río Cuarto, 2014-2015.	23
Tabla 7. Estimación del rendimiento del cultivo de soja en distintos tratamientos. Río Cuarto, 2014-2015.	24

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Esquema del ciclo ontogénico de soja. Cambios morfológicos, estado de los órganos reproductivos más avanzados de los nudos superiores del tallo principal y los periodos aproximados de diferenciación y aparición de órganos.	4
Figura 2. Esquema de los componentes del rendimiento del cultivo de soja. Fuente: Kantolic <i>et al.</i> , 2003.	16
Figura 3. Precipitaciones y temperatura medias diarias registradas en Río Cuarto en la campaña 2014-2015. Fuente: Servicios Agrometeorológicos, UNRC.	19
Figura 4. Evolución del agua en el suelo del cultivo de soja en Río Cuarto en la campaña 2014-2015. Fuente: Servicios Hidrología Agrícola, UNRC.	20
Figura 5. Variación del contenido de Nitrógeno acumulado en la parte aérea de la planta durante las etapas fenológicas R2 (65dds), R6 (120dds) y R8 (135dds) del cultivo de soja. Los datos representan la media \pm E.S. Ref: dds: días después de la siembra.	21

RESUMEN

El nitrógeno es el principal nutriente limitante para la producción de soja y pese a ser un elemento abundante en la atmósfera, no siempre está disponible para las plantas. La simbiosis entre leguminosa y bacterias del género *Rhizobium*, cubre parte de las necesidades nitrogenadas a partir de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN). El objetivo de este trabajo fue contribuir al conocimiento del impacto de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, las cuales fueron seleccionadas por su actividad nitrato reductasa, sobre el comportamiento del cultivo de soja en un ensayo a campo. El mismo se realizó durante la campaña 2014-2015 en la localidad de Río Cuarto, en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto. El diseño experimental fue en bloques al azar con tres repeticiones y el análisis estadístico utilizado fue el ANOVA. Los tratamientos fueron: T1: Control (semillas sin inocular ni fertilizar), T2: Fertilizado (semillas sin inocular y con la adición de 180 kg ha⁻¹ de urea a la siembra), T3: Inoculado con cepa USDA 110 y T4: Inoculado con cepa Per 3.61. Se determinó peso seco aéreo y número de nódulos de la raíz principal y de raíces laterales, peso de nódulos totales y rendimiento. En el sistema experimental, los resultados de rendimiento de soja mostraron que hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos inoculados con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y fertilizado en relación con el control. El tratamiento que presentó los valores más altos de rendimiento fue el de semillas inoculadas con Per 3.61, observándose un aporte promisorio para su uso como inoculante para soja, mejorando la FBN y el rendimiento del cultivo en suelos con alto contenido de nitrato.

Palabras claves: Nitrógeno - Fijación biológica - Inoculado - Nodulación - Rendimiento

SUMMARY

Nitrogen is the main limiting nutrient for soybean production. Despite being an abundant element in the atmosphere, it is not always available for plants. The symbiosis between legume and bacteria of the genus *Rhizobium* covers part of the nitrogen needs from the biological fixation of atmospheric nitrogen (BNF). The objective of this work was to contribute to the knowledge on the impact of the *Bradyrhizobium japonicum's* strains; which were selected for their activity nitrate reductase on the behavior of the soybean crop in field trials. The same was carried out during the 2014-2015 campaign in the town of Río Cuarto, in the Experimental Field of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine of the National University of Río Cuarto. The experimental plot was in random blocks with three repetitions, and the statistical analysis used was ANOVA. The treatments were: T1: Control (seeds without inoculating or fertilizing), T2: Fertilized (seeds without inoculation and with the addition of 180 kg ha⁻¹ of urea at planting), T3: Inoculated with strain USDA 110 and T4: Inoculated with strain Per 3.61. Aerial dry weight, the number of main and lateral roots' nodules, the weight of total nodules and the yield were also determined. Regarding the control, this experimental system showed significant statistical differences between the treatments inoculated with the different *Bradyrhizobium japonicum's* strains and fertilized. Seeds inoculated with Per 3.61 reflected the highest performance, observing a promising contribution for its use as an inoculant for soybean, improving the BNF and the yield of the crop in soils with high nitrate content.

Keywords: Nitrogen - Biological fixation - Inoculation - Nodulation - Yield

I. INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max* L. Merrill) es el cultivo oleaginoso de mayor importancia mundial de origen subtropical, procedente de Oriente, del sureste del continente asiático. Actualmente la producción mundial de soja ocupa el octavo lugar luego del trigo, maíz, arroz, papa, cebada, batata y mandioca (Asociación de la Cadena de la Soja Argentina, 2016). El centro de domesticación es controversial, puede haber ocurrido en China o de forma independiente en varias regiones del este de Asia (Hymowitz, 1970, Xu *et al.*, 2002). Al final de la década de 1940 y en los comienzos de los años 50, Estados Unidos de América expandió el cultivo de la soja, transformándose en el principal productor mundial. En el año 1968 se producían en el mundo aproximadamente unos 28 millones de hectáreas de soja en cerca de 25 países (Hymowitz, 1970). A partir de su sitio de origen, el cultivo de soja se dispersó por diversos puntos del planeta, cultivándose en todos los continentes. En la actualidad, el área sembrada y producción en Argentina y Brasil se han convertido en el polo de producción de soja más importante a nivel mundial.

Originalmente el cultivo de soja se introdujo a mediados de los años sesenta como una opción productiva proveedora de proteínas para la alimentación animal a instancias del programa de desarrollo de oleaginosas promovido por el estado nacional (INTA, 2009). Ese rol experimental ha quedado en el tiempo y en la actualidad el cultivo de soja es el más relevante de toda la producción agropecuaria nacional. Desde mediados de la década de los 90 se produjo en el sector agropecuario una revolución tecnológica liderada por el cultivo de soja y sustentada sobre la siembra directa y las semillas genéticamente modificadas, desplazando a los cultivos tradicionales; a partir de entonces se mantuvo en aumento.

Los rendimientos son generalmente limitados por la oferta de agua y la disponibilidad de nitrógeno (N) y fósforo (P). En relación con el N, es el nutriente más importante para el desarrollo de las plantas, ya que lo utilizan para formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares necesarios para su desarrollo. El crecimiento de la planta y el nivel de rendimiento son a menudo dependientes del aporte de dicho nutriente, lo cual indica una estrecha relación entre el rendimiento y el metabolismo del nitrógeno (Mattson *et al.*, 1991). A pesar de la abundancia de N en la atmósfera (más del 79% de la composición de la misma), solo el 2% está presente en el suelo, el cual, se encuentra en forma mineral siendo asimilable por la planta en cantidad insuficiente para soportar cultivos intensivos (Mareque, 2011). Los balances de nitrógeno en los cultivos de soja han sido caracterizados como negativos considerando que el cultivo destina a grano aproximadamente un 75-80% del N total absorbido. Los aportes de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) están entre 50 y 80% de los requerimientos de N del cultivo de soja, según

el sistema de producción y sin que haya limitantes ambientales para su desarrollo (González, 2006; Salvagiotti *et al.*, 2008). Dicha leguminosa, presenta una alta acumulación de proteínas, lo cual la convierte en el cultivo con mayor demanda de N y la menor producción de biomasa de semilla por fotoasimilado producido. Al ser la soja una leguminosa, puede cubrir sus requerimientos de N a partir del aporte de N de suelo como nitrato y en menor medida como amonio y a través de la FBN.

En el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, el proceso de la FBN, es llevado a cabo por microorganismos (bacterias) que se asocian en forma simbiótica o no a la planta y son capaces de reducir el N₂ atmosférico en amonio favoreciendo así el aporte de nitrógeno a las plantas. Otro proceso es la desnitrificación, mecanismo en el cual los microorganismos son capaces de devolver a la atmósfera el nitrógeno fijado.

El proceso de desnitrificación colabora con la eliminación de nitratos que, como consecuencia del exceso en la utilización de fertilizantes nitrogenados en la práctica agrícola, contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos. Los productos del proceso de desnitrificación tienen además un enorme impacto sobre el medio ambiente ya que liberan gases a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera y en la destrucción de la capa de ozono de la misma. El óxido nítrico (NO, producto intermediario del proceso de desnitrificación) es también una importante molécula señal que participa en mecanismo de defensa frente a patógenos en eucariotas. Por ello, la desnitrificación tiene un gran impacto en la agricultura, medioambiente y salud humana (Delgado y Bedmar, 2006).

Solo *Bradyrhizobium japonicum* y *Azorhizobium caulinodans* son los únicos capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno con nitrato como aceptor final de electrones para la producción de ATP. Ha sido informado que la capacidad de desnitrificar pudiera constituir una ventaja competitiva para la permanencia y distribución en el suelo y para la capacidad de colonización de aquellas bacterias que la posean (Delgado y Bedmar, 2006).

La inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* permite aumentos de rendimientos entre 200 y 900 kilogramos por hectárea en lotes con y sin historia sojera, respectivamente (Martínez Lalis, 2000; Hungría *et al.*, 2006; Ferraris *et al.*, 2006). Si bien la mayoría de los suelos cultivados con soja presentan poblaciones naturalizadas de rizobios, son muchos los estudios que muestran aumentos de aproximadamente el 8% en el rendimiento al inocular anualmente el cultivo (Peticari, 2005).

A - Características generales del cultivo de soja

Taxonómicamente se la clasifica en el orden Fabales, familia Fabaceas, sub-familia Papilonoideas, género *Glycine*. Es una hierba anual, estival, erecta, de hasta 1,5 m de altura. Desde el punto de vista estructural, sus hojas son trifoliadas; folíolos oval-lanceolados, el terminal más grande. Posee flores de color blanco o violáceo, reunidas en racimos axilares. Su fruto es una legumbre, péndula, pluriseminada, hirsuta, solitaria o agrupadas. La plántula tiene germinación epigea, las dos primeras hojas (eófilos) son simples y las posteriores trifolioladas (Bianco *et al.*, 2007). El primer signo externo de la germinación es la emergencia de la radícula (raíz primaria) que crece hacia abajo y ancla la planta al suelo. Luego, comienza el crecimiento del hipocótilo hacia arriba empujando los cotiledones (Melgar *et al.*, 2011). Las semillas esféricas a ligeramente ovaladas, se desarrollan en vainas de 4 a 6 cm de longitud y cada vaina contiene entre 2 y 4 semillas en su interior, y pueden ser de diferentes colores según la variedad.

B - Etapas del desarrollo

El ciclo del cultivo posee dos estados de desarrollo: vegetativo y reproductivo, Fehr y Caviness (1977) desarrollaron una escala fenológica con etapas de generación de estructuras vegetativas y reproductivas (Figura 1 y Tabla 1).

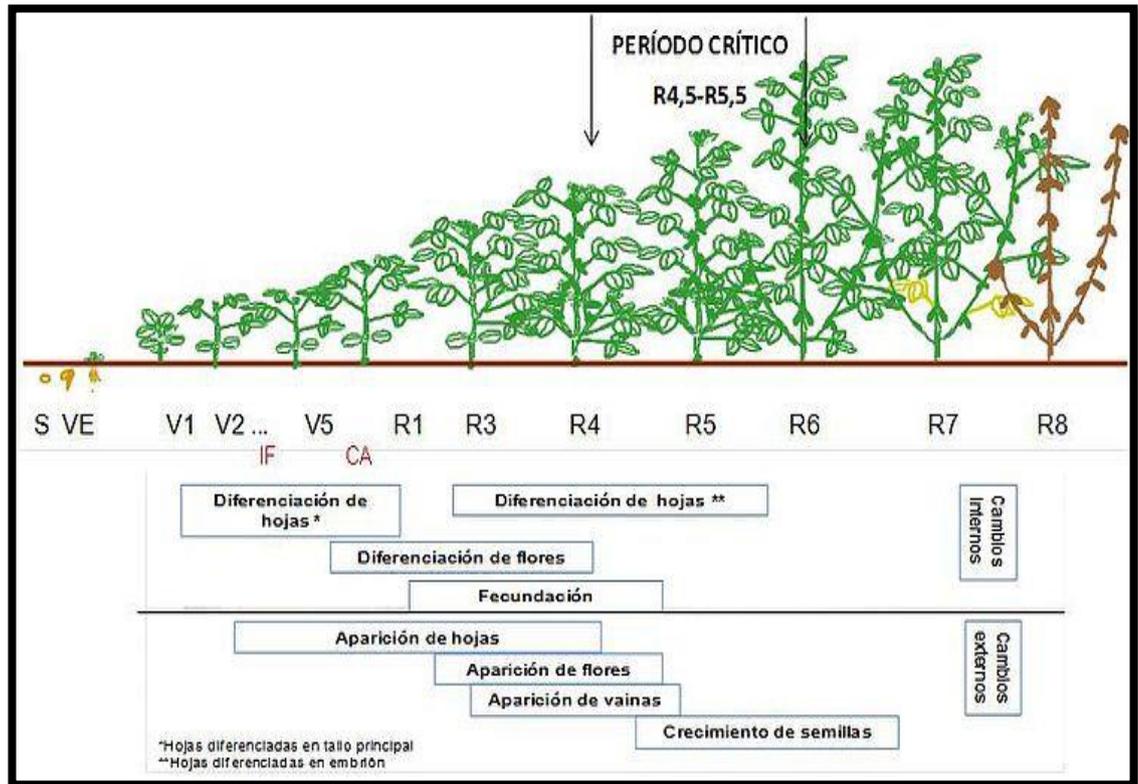


Figura 1. Esquema del ciclo ontogénico de soja. Cambios morfológicos, estado de los órganos reproductivos más avanzados de los nudos superiores del tallo principal y los periodos aproximados de diferenciación y aparición de órganos. Siembra (S), emergencia (VE), comienzo estadio vegetativo (V1), iniciación floral (IF), cambio de ápice (CA), comienzo estadio reproductivo (R1). Fuente: Fehr y Caviness (1977), tomado de: Kantolic, *et al.*, 2004.

Tabla 1. Descripción de los estadios fenológicos del cultivo de soja según escala de Fehr y Caviness (1977).

Estados vegetativos	Estados reproductivos
VE Emergencia	R1 Comienzo de floración
VC Cotiledonar	R2 Plena floración
V1 Un nudo	R3 Comienzo de fructificación
V2 Dos nudos	R4 Plena fructificación
V3 Tres nudos	R5 Comienzo de llenado de granos
	R6 Máximo llenado de granos
	R7 Comienzo de madurez
Vn n nudos	R8 Plena madurez

Dos de los factores ambientales que regulan la dinámica del desarrollo y crecimiento del cultivo de soja son la temperatura y el fotoperiodo. Ambos factores actúan simultáneamente en las plantas que crecen en el campo y hay algunas evidencias de que existen interacciones entre ellos, los efectos de la temperatura varían según el fotoperiodo al que estén expuestas las plantas o viceversa (Sinclair *et al.*, 1991).

La temperatura regula el desarrollo a lo largo de todo el ciclo, pero los requerimientos térmicos y las temperaturas cardinales que regulan la tasa de desarrollo difieren a lo largo de las fases, presentando una menor sensibilidad en estadios de crecimiento y desarrollo más avanzados. Para que se cumpla la fase germinación-emergencia se han calculado temperaturas bases (T_b) entre 6-9 °C, temperaturas óptimas entre 25-30 °C y una máxima de 40 °C. El tiempo térmico requerido para que se cumpla dicha fase se ha estimado entre 120-200 °C día ($T_b=6$ °C), con condiciones de buena-regular provisión hídrica.

La soja es una especie con respuesta fotoperiódica cuantitativa, de días cortos. Presenta una corta fase juvenil, que dura en promedio 8 días desde emergencia (temperatura óptima), durante el cual el cultivo es insensible al fotoperiodo. A partir de V1, el fotoperiodo afecta todas las etapas del desarrollo del cultivo. Tanto el valor de fotoperiodo umbral como la sensibilidad fotoperiódica presentan una considerable variabilidad genotípica.

C - El cultivo de soja en Argentina

La soja se encuentra entre los cultivos agrícolas más importantes del mundo. Se están realizando investigaciones para encontrar detalles relacionados con la producción de soja en diferentes condiciones, incluyendo el estrés. Actualmente es un cultivo de gran importancia por su alto contenido proteico y subproductos industriales y es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo. Los países de mayor producción son Estados Unidos, Brasil, Argentina y China, siendo este último el principal consumidor a nivel mundial (Pagano y Miransari, 2016).

Los primeros registros de siembra de soja en nuestro país datan de 1962, pero fue en los años '70 cuando la producción nacional aumentó notoriamente, superando los 2 millones de hectáreas (ha) sembradas a finales de la década, con una producción de 3,5 millones de toneladas (Tn). A principios del año 2000, la siembra alcanzaba los 9 millones de ha, con una producción de 20,2 millones de Tn. Finalmente, en las últimas campañas de la primera década del siglo actual, la superficie sembrada de dicho cultivo era de 18,3 millones de ha, con producción de 52,6 millones de Tn (Domingo-Yagües *et al.*, 2012).

En nuestro país, la soja ocupa la mayor superficie cultivada (20,2 millones de hectáreas) siendo una de las principales fuentes de ingreso de dinero en los últimos años,

produjo 56,9 millones de Tn de grano en la campaña 2014-2015 (Bolsa de Cereales de Rosario, 2015).

D - Acumulación y translocación de nitrógeno

La acumulación de N sigue una función muy similar a la acumulación de materia seca, es decir que al principio del ciclo del cultivo la tasa de asimilación es baja y luego va incrementándose hasta llegar a un máximo durante el período de floración y establecimiento de los frutos. Cuando comienza el llenado de los granos, la tasa de asimilación de N comienza a declinar. Dicho proceso en las semillas es función de la acumulación de N en los tejidos vegetativos. El porcentaje de N acumulado en las semillas respecto del N en el resto de la planta a la cosecha es de alrededor del 90%, mientras que la partición de materia seca oscila entre el 47-56%. Durante el período de llenado de las semillas la demanda de N es muy alta y una importante proporción del N foliar es removilizado hacia las mismas. Una reducida tasa de asimilación de N, durante el periodo vegetativo o el llenado de grano, así como una redistribución incompleta del mismo, determinan pérdidas en el potencial de rendimiento de la soja. Las semillas son el principal destino de acumulación de nitrógeno proveniente de la removilización de otras partes vegetativas (Paredes, 2013).

E - Nutrición nitrogenada

La asociación mutualista entre la planta y bacterias del género *Bradyrhizobium* forman nódulos a nivel de las raíces. Las bacterias son capaces de transformar el N_2 de la atmósfera en NH_4^+ asimilable por las plantas. El aporte de la FBN representa un ahorro del N del suelo.

Los requerimientos de la planta de soja desde la germinación hasta la floración (R1) son bajos. En ésta etapa la acumulación de N está definida por la tasa de crecimiento del cultivo y es independiente de la oferta de dicho nutriente. En la etapa de fructificación (R3) a plenitud del llenado de grano (R6), son altos. Hasta el comienzo de los estadios reproductivos el suelo puede satisfacer dichas demandas de nitrógeno del cultivo. En las etapas de R3 a R6 es necesaria la participación de la FBN para suplir los requerimientos de N. La FBN comienza unos 30 días después de la emergencia y aumenta notablemente durante el llenado de granos, aumentando el rendimiento en grano (Kantolic *et al.*, 2003).

El aporte de N por fertilizante reduce el aporte de N por fijación biológica. Por éste motivo, sólo se aconseja la fertilización nitrogenada en casos en los que el cultivo de soja no se inocule con rizobios o cuando se evidencia déficit de N por falta de

nodulación. Se estima que el agregado de hasta 18 kg N ha⁻¹ no afecta la nodulación ni la FBN (Paredes, 2013).

En la mayoría de los agroecosistemas el 80% del nitrógeno fijado biológicamente ocurre mediante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. El micro simbionte (la bacteria), utiliza el carbono y la energía fotosintética del macro simbionte (la planta) y le entrega amonio, producto de la fijación de N₂ atmosférico. Este proceso se lleva a cabo en los nódulos. La morfología de los nódulos varía según las leguminosas. En general las tropicales, (como la soja), tienen nódulos redondos de crecimiento determinado. En estas, el tejido de crecimiento se ubica de forma radial y una vez alcanzado su máximo desarrollo, dejan de crecer.

En suelos con altas cantidades de N, las leguminosas prefieren utilizar la forma inorgánica del suelo, independientemente de la presencia de las bacterias. Por el contrario, si la misma está presente y los niveles de N del suelo son bajos, la planta estimula el ingreso de los rizobios a la raíz, que fijaran N₂.

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

F – Inoculación

Dado que la soja tiene una gran demanda de N y casi su totalidad se exporta, si la fijación de N₂ no es eficiente, junto con ese grano estaremos exportando una parte importante de la fertilidad nitrogenada de nuestros suelos (Racca y Collino, 2005; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011). Por ejemplo, con un rendimiento de 2500 kg ha⁻¹, se estarían extrayendo del suelo entre 54 y 61 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Lodeiro, 2015). Desde su inicio el cultivo de soja se ha inoculado debido a la inexistencia o escasa presencia de rizobios específicos en los suelos (Piccinetti *et al.*, 2013). Esto sucede en todas las zonas donde se produce soja en el país, independientemente de las características edafoclimáticas, del manejo y de la conservación del suelo, lo cual se convierte en un problema de la competencia para la nodulación.

En ensayos experimentales utilizando inoculantes de excelente calidad mostraron que el uso de cepas rizobianas potencia el incremento de los rendimientos, incluso aún en ambientes con monocultivos de soja (Peticari *et al.*, 2003; Covelli, 2013). De 41 ensayos realizados durante tres años, hubo una respuesta media de 265 kg ha⁻¹ en campos con historia de soja previa, es decir, con poblaciones de rizobios naturalizadas. Estos resultados son coincidentes con la información recolectada entre los años 1990-2005, los cuales incluyen

193 ensayos realizados con cepas rizobianas eficientes y métodos de inoculación apropiados. En los mismos se observó respuesta positiva en un 84% de los casos, con un promedio de aproximadamente 300 kg ha⁻¹, equivalentes al 11% del rendimiento de los cultivos, siendo las más altas en el norte y las más bajas en el núcleo de la región pampeana (Peticari, 2004).

Las cepas naturalizadas son más competitivas y menos efectivas que las cepas introducidas. Por ello, se recomienda inocular los cultivos sembrados en lotes con historia sojera, aunque ya tienen alto número de rizobios naturalizados (Mumns, 1987). Sin embargo, no se puede generalizar el concepto de que todas las cepas naturalizadas en el suelo son ineficientes o han perdido atributos asociados a la fijación de nitrógeno (González, 2002). Collino *et al.*, (2007) informaron que el N aportado a través de la FBN tiene valores entre 26-71%, dicha variación está determinada por el contenido de N mineral y las condiciones hídricas. En nuestro país la soja se cultiva en secano, lo cual afecta al proceso de FBN que es altamente sensible a la disminución de la condición hídrica del cultivo (Serraj *et al.*, 1999).

Existen evidencias objetivas de respuestas al agregado de N, aunque es difícil aceptar la práctica como tal (Melgar, 2009). Además, no necesariamente el balance de N en el suelo es positivo, es más, en general es negativo a nulo (Gutiérrez-Boem y Salvagiotti, 2014). La planta utiliza nitrógeno del suelo mientras se genera el sistema nodular, si hay mucho nitrógeno en el ambiente de la raíz, el número de nódulos formados será menor (Miransari, 2016). Pero, a medida que el nitrógeno proveniente del suelo o del fertilizante aumenta, el nitrógeno derivado de la fijación biológica y la nodulación disminuyen. Así, el aporte global por FBN para la soja es menor en suelos bien provistos de N que en aquellos en que el nutriente es deficitario (Pietrarelli *et al.*, 2008). Se ha encontrado una disminución del peso de los nódulos por planta de aproximadamente 90 mg de materia seca (MS) por cada ppm de N-NO³⁻ del suelo (Cicore *et al.*, 2004). La base fundamental del manejo del N en el cultivo de soja es la optimización del proceso de fijación biológica.

El manejo del cultivo debe estar dirigido a mejorar el aporte de esta fuente de N, principalmente a través de la inoculación con cepas de alta efectividad y utilizando productos que tengan calidad en cuanto al número de bacterias y las condiciones de conservación (Salvagiotti *et al.*, 2009).

G - Rizobios

Los rizobios son bacilos Gram negativos de vida libre, móviles, incapaces de formar esporas y son mesófilos (temperatura óptima de crecimiento de entre 15-35 °C). Se alimentan de la descomposición de organismos muertos, materia orgánica o compuestos químicos secretados por las raíces de las plantas. El pH óptimo para el desarrollo se sitúa entre 6,8 y 7,2 y su tiempo de duplicación varía entre dos y cuatro horas para los llamados

“fastgrowers” (crecimiento rápido), que generalmente, forman colonias relativamente grandes (2 a 4 mm de diámetro) en tres a cinco días y un tiempo de multiplicación de seis a ocho horas para los llamados “slowgrowers” (crecimiento lento) (Bradirizobios) que producen colonias de 1 mm de diámetro en siete a diez días (Nitrasoil, 2007). Dentro de los nódulos radicales, donde pasan a llamarse bacteroides, se tornan pleomórficas, aumentan su tamaño se alimentan de formas carbonadas sintetizadas por la planta huésped (leguminosas), requieren bajo nivel de oxígeno y fijan nitrógeno atmosférico que le entregan a la planta (Nitragin, 2007).

En la nodulación, tanto la asociación rizobio-leguminosa como su funcionalidad, son afectadas positiva o negativamente por las condiciones ambientales durante su ciclo de vida. La ocurrencia de factores ambientales adversos (estrés por temperatura, humedad, acidez, etc.) afecta la supervivencia de los rizobios, disminuyendo el número de la población naturalizada o introducida con el inoculante (Nitragin, 2007).

En el presente trabajo científico se pretende cuantificar la respuesta productiva de la inoculación de soja con bacterias fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes, con el fin de evaluar el potencial de la inoculación como estrategia productiva y brindar herramientas, que además de aumentar la productividad aporten a la conservación del ambiente.

II. HIPÓTESIS

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, caracterizadas por su actividad desnitrificante, presentan diferente comportamiento fisiológico y simbiótico en su interacción con la planta de soja en presencia de nitratos.

III. A) OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento del impacto de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, seleccionadas por su actividad nitrato reductasa, sobre el comportamiento del cultivo de soja en ensayo a campo.

III. B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la producción de biomasa aérea y variación de nitrógeno en las etapas fenológicas R2, R6 y R8.
- Determinar número y peso de nódulos por planta en las etapas fenológicas R2 y R6.
- Analizar el balance relativo de nitrógeno.
- Evaluar el rendimiento de grano por hectárea (R8).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A - Cepas bacterianas

En la Tabla 2 se muestran las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* que se usaron en este ensayo.

Tabla 2. Referencia de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas en el ensayo de soja a campo. Río Cuarto, 2014-2015.

<i>Bradyrhizobium Japonicum</i>	Descripción	Referencia
USDA 110	Cepa de referencia	Belstville, USDA, Estados Unidos
PER 3.61	Aislamientos nativos de suelos de pergamino	Cedida por la Dra. Leticia Fernández, UNS-Bahía Blanca

B - Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de las cepas bacterianas

Para la formulación del inoculante en el ensayo a campo, se usaron los cultivos bacterianos en medio YEM (Vincent, 1970) con un recuento igual o superior a 1×10^9 UFC ml^{-1} . Los mismos se trasvasaron a una vejiga estéril de 250 ml adicionando goma arábica (0,6 g en 100 ml de agua estéril) y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

C - Composición del Medio YEM

K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
NaCl	0,1 g/l
Manitol	10 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
pH	6,8 – 7,0

Para el mantenimiento de la cepa se utilizó el medio YEMA con el agregado de:

Agar	15 g/l
Rojo Congo	4 ml/l

El medio se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ de atmósfera por 20 min.

D - Conservación de la cepa bacteriana

Las cepas se mantuvieron a 4 °C en placas de medio YEMA. Para el mantenimiento de las cepas a largo plazo, se tomaron alícuotas de cultivos en fase exponencial y se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo glicerol estéril a una concentración final 40 % (v/v). Las suspensiones bacterianas se conservaron a -20 °C.

E - Cultivar de soja

Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max* L. Merrill) variedad Don Mario 4210 RR (Grupo IV C) cuyas características principales se detallan en la Tabla 3:

Tabla 3. Características del cultivar de soja DM 4210 RR Grupo IV C utilizado en el ensayo. Río Cuarto 2014-2015.

Posicionamiento	Zona núcleo sojera y ambientes de alta productividad del Centro de Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. Muy buen comportamiento en siembras de 2°.
Ciclo/Hábito de crecimiento	IV corto / Indeterminado
Días desde emergencia a R8	135
Altura de la planta para su ciclo (cm)	Alta (100)
Potencial de ramificación	Medio
Tipo de ramificación	Abierta
Susceptibilidad al vuelco (1 a 10)	3
Distancia entre surcos recomendada	Reducida (igual o menor a 35 cm)
Peso promedio de 1000 semillas (g)	172
Color de pubescencia / Color de flor	Castaña clara / Violeta
Comportamiento frente al cancro del tallo	Resistente
Comportamiento frente a Phytophthora	Resistente (Rps 1K)

Fuente: Catálogo Don Mario Semillas, 2010.

F - Ensayo a campo: interacción *Bradyrhizobium japonicum*-soja

El estudio se realizó en el campo experimental (CAMDOCEX) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria ubicado en la Universidad Nacional de Río Cuarto (33° 06' 23.46" de latitud sur y 64° 17' 54" de longitud oeste). El suelo es clasificado como Hapludol típico (materia orgánica 2,3%; pH 6,8; arcilla 14,17%; limo 41,97% y arena 43,9%) (INTA, 2006), presenta relieve normal, es profundo, bien drenado, desarrollado a partir de material loésico de textura franca arenosa muy fina, con baja diferenciación horizontal y características de buen suelo agrícola (Uberto, 2008).

El clima de la región de Río Cuarto es templado subhúmedo, con un régimen de precipitaciones de tipo monzónico (80% de las lluvias se concentran en el semestre más cálido, octubre a marzo) con una precipitación media anual de 801 mm. Las fechas medias de primera y última heladas meteorológicas (temperaturas iguales o menores a 0 °C registradas en la casilla meteorológica a 1,5 m de altura) para el periodo 1974-1993 corresponden al 25 de mayo ($\pm 14,3$ días) y 12 de septiembre ($\pm 20,3$ días), respectivamente.

Para ese mismo período, las fechas extremas de primera y última helada fueron el 29 de abril y el 4 de noviembre, respectivamente. El periodo medio libre de heladas meteorológicas resultante es de 255 días. Durante ese lapso de tiempo las temperaturas máximas variaron de 22,1 a 29,1 °C (media= 26,7 °C) y las mínimas de 9,5 a 17,1 °C (media= 14,5 °C), con una temperatura media anual de 16,4 °C (Seiler *et al.*, 1995). Al inicio del ensayo se aplicó glifosato en una formulación estándar líquida soluble de la sal isopropilamina a una concentración del 48% (1200 g i.a. ha⁻¹) en el área experimental como un barbecho químico para el control de malezas.

El diseño experimental que se utilizó fue de bloques al azar con tres repeticiones, con los siguientes tratamientos:

1-Control: sin inocular y fertilizar

2-Fertilizado: sin inocular y con la adición de 180 kg ha⁻¹ de urea a la siembra

3-Inoculado con cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

4-Inoculado con cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61.

El tamaño de las parcelas fue de 15 m de largo y 9 surcos de ancho distanciados a 0,35 m, con una densidad de siembra de 15 semillas por metro lineal de surco. El sistema de labranza utilizado fue siembra directa.

F - 1 - Fecha de siembra: la siembra se realizó el 13 de Noviembre de 2014. La inoculación de las semillas de soja fue al momento de la siembra, aplicando la suspensión de las

diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* para alcanzar una densidad estimada de 10^5 células por semilla.

F - 2 - Toma de muestras: los muestreos se realizaron en las etapas fenológicas R2, R6 y R8. En las etapas fenológicas R2 y R6 se tomaron muestras de los tres bloques, en los cuales en cada uno de los mismos se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento para determinar: peso seco de parte aérea, contenido de N de la parte aérea por el método de Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973), actividad simbiótica a través del número y peso seco de nódulos y modelo de distribución espacial de los nódulos. En R8 se analizó el balance relativo del nitrógeno y el rendimiento.

F - 3 - Riego: el desarrollo del cultivo se realizó bajo condiciones de riego, el cual se realizó a través de un equipo de avance lateral 87,6 m de longitud de trabajo, la distribución del agua es por medio de tuberías de bajada y emisión mediante difusores con reguladores de presión. El método de balance hídrico utilizado fue el Balance Hídrico de Cultivos Extensivos (BAHICU) versión 1.01 (Andriani, 2012); considerando valores diarios de Evapotranspiración de referencia (ET_o) (calculado a través de la Ecuación de Penman-Monteith (Allen *et al.*, 1998), contenido de humedad al momento de siembra, valores de constantes hídricas de capacidad de campo (CC), punto de marchitez permanente (PMP) y agua útil para el suelo donde se desarrolló el ensayo. También para este balance se utilizaron datos de precipitación efectiva que se estimaron por el método de “Bureau of Reclamations” de los EE.UU (Doorenbos y Pruitt, 1977), factores cualitativos como la intensidad de lluvias y estado de humedad del suelo previo a la precipitación. Se consideró como umbral de riego, cuando el agua realmente disponible era del 50%. Para determinar el momento de riego, se tuvo en cuenta el pronóstico del tiempo con 72 hs de antelación.

F - 4 - Fecha de cosecha: se realizó manualmente el día 13 de abril de 2015.

F - 5 - Análisis de suelo: previo a la siembra se tomaron submuestras de suelo de los primeros 20 cm de profundidad utilizando transectas para analizar las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo midiendo los siguientes parámetros: pH (1:2,5 suelo/agua) (Mc Lean, 1982), Materia orgánica (Bremner y Mulvaney, 1982), Calcio intercambiable (Jackson, 1964), Fósforo (Bray y Kurtz, 1945); N-NO₃⁻ por el método de la reducción de Cadmio (Lambert y Dubois, 1971) y Bases-CIC (acetato de amonio) (Thomas, 1982).

Después de la cosecha del cultivo se tomaron submuestras del suelo en dos estratos superiores del perfil del suelo (0-20 y 20-40 cm) para determinar contenido de N-NO₃⁻. La metodología utilizada para determinar la densidad aparente (D_{ap}), dato necesario para expresar los resultados en kg ha⁻¹, fue la del método del cilindro (Blake y Hartge, 1986).

El número de rizobios por gramo de suelo fue determinado mediante la técnica del Número Más Probable (Somasegaran y Hoben, 1994). Para el recuento de rizobios en plantas estériles por el método del número más probable (NMP), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{m \times d}{v \times n}$$

Dónde:

m= número más probable (por ml) en la primera dilución considerada.

d= dilución de la primera dilución considerada.

v = volumen inoculado (2 ml).

n = peso del suelo (10 g).

F - 6 - Balace de nitrógeno: se tomaron muestras de cada tratamiento y repetición y se cosecharon todas las plantas presentes en una superficie de 1 m² para determinar: peso seco de parte aérea y contenido de N de parte aérea por el método de Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973).

Con los datos de contenido de N en suelo y cultivo se calculó el Balance Relativo de N (Cholaky *et al.*, 1986), para estimar las variaciones de su contenido en el sistema suelo-planta resultante de los cambios en las entradas y salidas del sistema y de las transformaciones internas durante el ciclo del cultivo. El objetivo principal fue estimar el aporte por FBN mediante la siguiente ecuación:

$$\text{FBN} = \text{Npc} - [(\text{Nss} + \text{Nm} + \text{Nll}) - \text{Nsc}]$$

Dónde:

FBN: fijación biológica del nitrógeno.

Npc: contenido total de N en la planta a la cosecha (R8).

Nss: contenido de N-NO₃⁻ en el suelo a la siembra.

Nm: N derivado de la mineralización de la materia orgánica del suelo. Este valor es de 3 % para los 6 meses de duración del ciclo del cultivo (Álvarez y Steinbach, 2006).

Nll: N aportado por las lluvias registradas durante el ciclo, estimando en 2,5 ppm de N por cada mm (Harpaz, 1975).

Nsc: contenido de N-NO₃⁻ en el suelo a la cosecha.

También se calculó la variación del N en el suelo según:

$$\text{VNS} = (\text{Nss} + \text{Nm}) - (\text{Nsc} + \text{Nrastrojo})$$

Dónde:

VNS: variación del N en el suelo.

N rastrojo: contenido de N del rastrojo.

F - 7 - Estimación de rendimiento: en la etapa fenológica R8 (plena madurez) se tomaron muestras presentes en 1 m² por tratamiento y repetición y se determinó el rendimiento del cultivo expresado en (kg ha⁻¹).

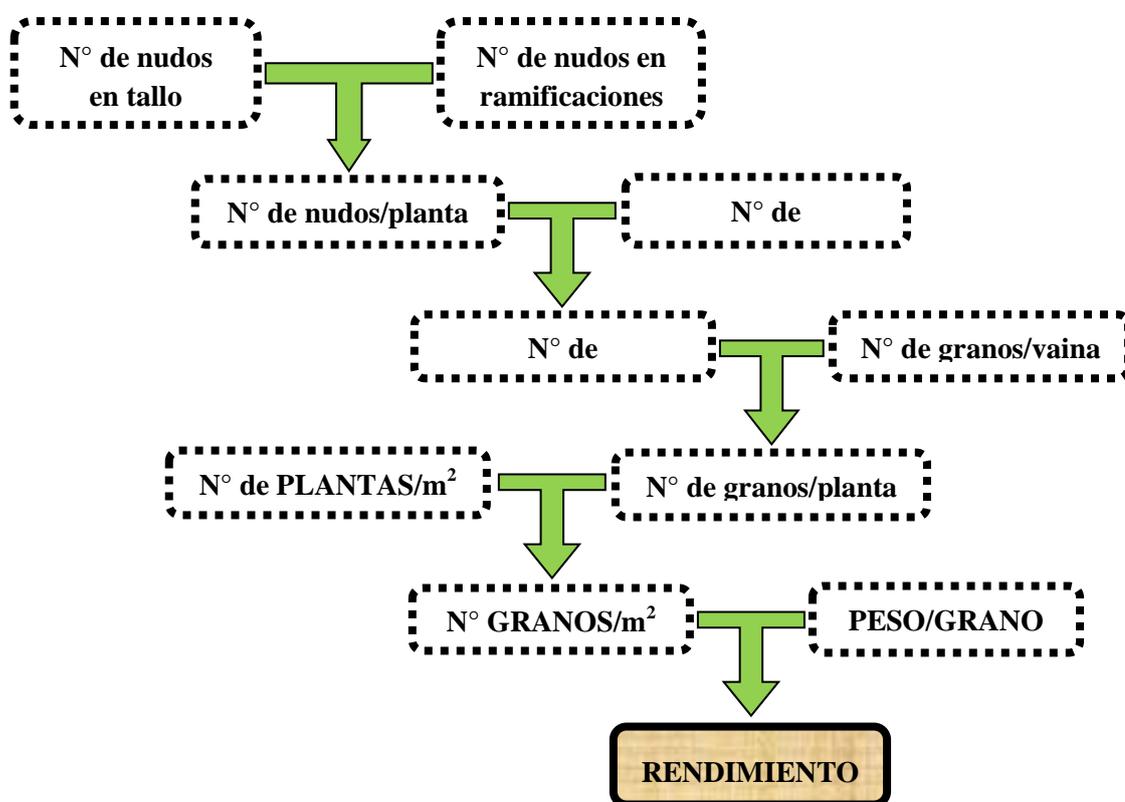


Figura 2. Esquema de los componentes del rendimiento del cultivo de soja. Fuente: Kantolic *et al.*, 2003.

G - Análisis estadísticos

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan para las comparaciones múltiples de las medias con un nivel de significancia de 5 %. El análisis de los datos corresponde a bloques al azar con tres repeticiones para cada tratamiento. El programa estadístico utilizado fue Infostat Versión 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A - Interacción *Bradyrhizobium japonicum*-soja

A - 1 - Condiciones edáficas y climáticas para el desarrollo del cultivo de soja

El ensayo se realizó en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto en un sitio proveniente de rotaciones continuas de cultivos. Al inicio del mismo, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas del suelo mostrando una alta condición de fertilidad por el elevado contenido de nitrógeno disponible para el cultivo ($107,90 \text{ kg ha}^{-1}$), el aporte de la mineralización y la disponibilidad del nutriente para las plantas favorecida por las buenas condiciones hidrológicas del ciclo. Los análisis del suelo, realizados antes de la siembra, se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Resultado de los parámetros físico-químicos del suelo en el que se desarrolló el ensayo. Río Cuarto, 2014-2015.

	0-20 cm	20-40 cm
Materia orgánica (%)	2.51	
Nitratos (ppm)	96.60	84.20
Fosforo (ppm)	22.90	
Humedad (%)	22	18.92
PH (1:2.5 suelo/agua)	6.80	
Calcio (cmol/kg)	9	
CIC (cmol/kg)	20.50	

Los análisis del suelo, mostraron un buen aporte de la mineralización derivado de la materia orgánica y la disponibilidad de fósforo $60,46 \text{ kg ha}^{-1}$ para el cultivo de soja, siendo su requerimiento de 7 kg P Tn^{-1} de grano (García y Correndo, 2012). Siendo el fósforo uno de los 17 nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, junto al nitrógeno y al potasio conforman el grupo de macronutrientes principales, tanto por las cantidades requeridas como por la frecuencia de su deficiencia en los cultivos (García *et al.*, 2014), se considera que la disponibilidad de P es óptima a pH 6-7. El pH óptimo del suelo para la mayoría de los cultivos es el que se encuentra entre 5,5 y 8,3 (Picone, 2014). Cabe destacar que el valor hallado en el ensayo se encuentra dentro del rango establecido. Además, los altos porcentajes de saturación con Ca^{2+} asociados a un pH óptimo son propicios para el crecimiento de las plantas y microorganismos (Vázquez y Pagani, 2014).

Por otra parte, se estimó la población de rizobios naturalizados nodulantes de soja presente en el suelo cuyo valor fue de $1,55 \times 10^3$ rizobios g^{-1} de suelo. En suelos de nuestro país, los valores de los rizobios naturalizados fluctúan entre 10^2 a 10^5 rizobios g^{-1} de suelo (González *et al.*, 1997). La presencia de rizobios naturalizados en el suelo es considerada una barrera para el éxito de la inoculación, estos microorganismos están bien adaptados en condiciones del suelo, sin embargo, con una tasa baja de fijación (Miransari, 2014). Estudios realizados por IMYZA-INTA (Castelar) donde evaluaron 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 . Los valores de población naturalizada superiores al orden de 10^3 provocan el fenómeno de competencia por la ocupación de los nódulos y menores beneficios en la inoculación con las cepas introducidas (Toresani *et al.*, 2007). En el ensayo los valores detectados de la población naturalizada de rizobios en el suelo fueron bajos (del orden de 10^3) resultando favorable para la práctica de inoculación con las cepas eficientes de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 y Per 3.61.

En la Figura 3 se muestran los registros climáticos, precipitaciones y temperaturas medias diarias registradas para el ciclo del cultivo de soja (2014-2015) en el campo experimental de UNRC. Estos datos indican que ha sido una campaña favorable para desarrollo de los diferentes estadios fenológicos del cultivo.

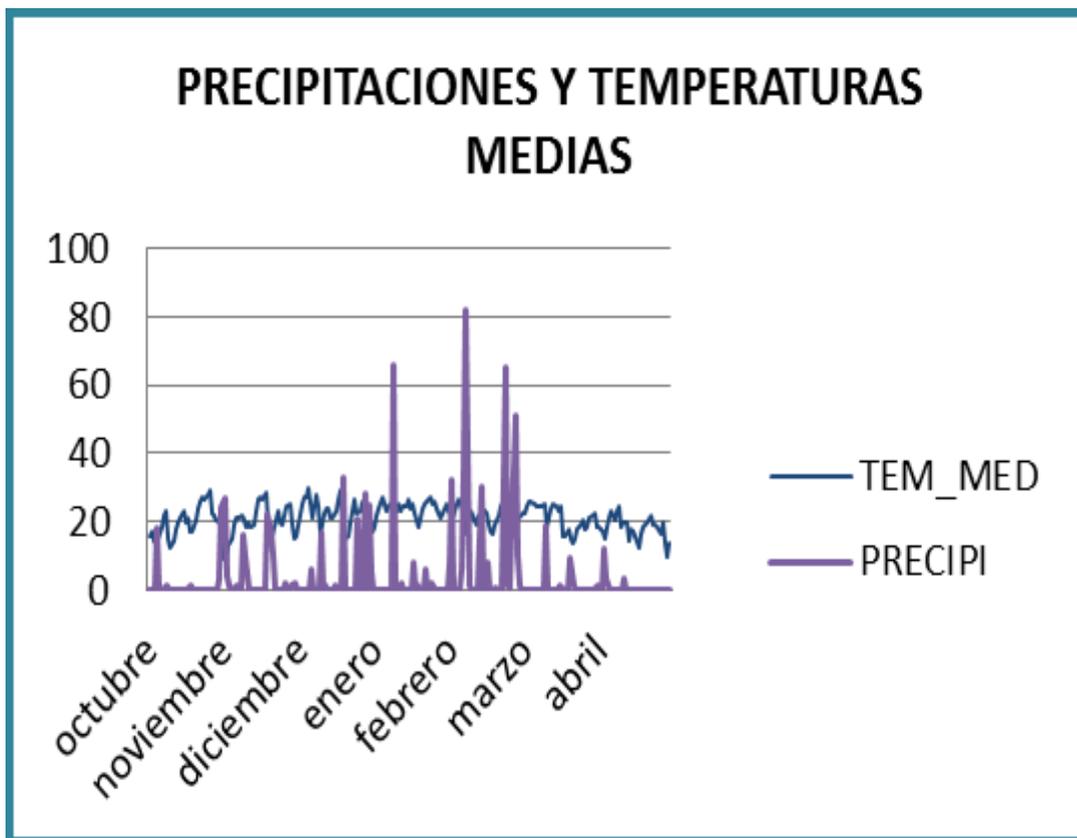


Figura 3. Precipitaciones y temperatura medias diarias registradas en Río Cuarto en la campaña 2014-2015. Fuente: Servicios Agrometeorológicos, UNRC.

El estado de la evolución del agua en el suelo en el ciclo del cultivo de soja fue favorable, ya que las precipitaciones (782 mm) sumado al riego, hicieron que los aportes de agua disponible para el cultivo nunca estuvieron, por largo período, por debajo del límite de estrés establecido (Figura 4).

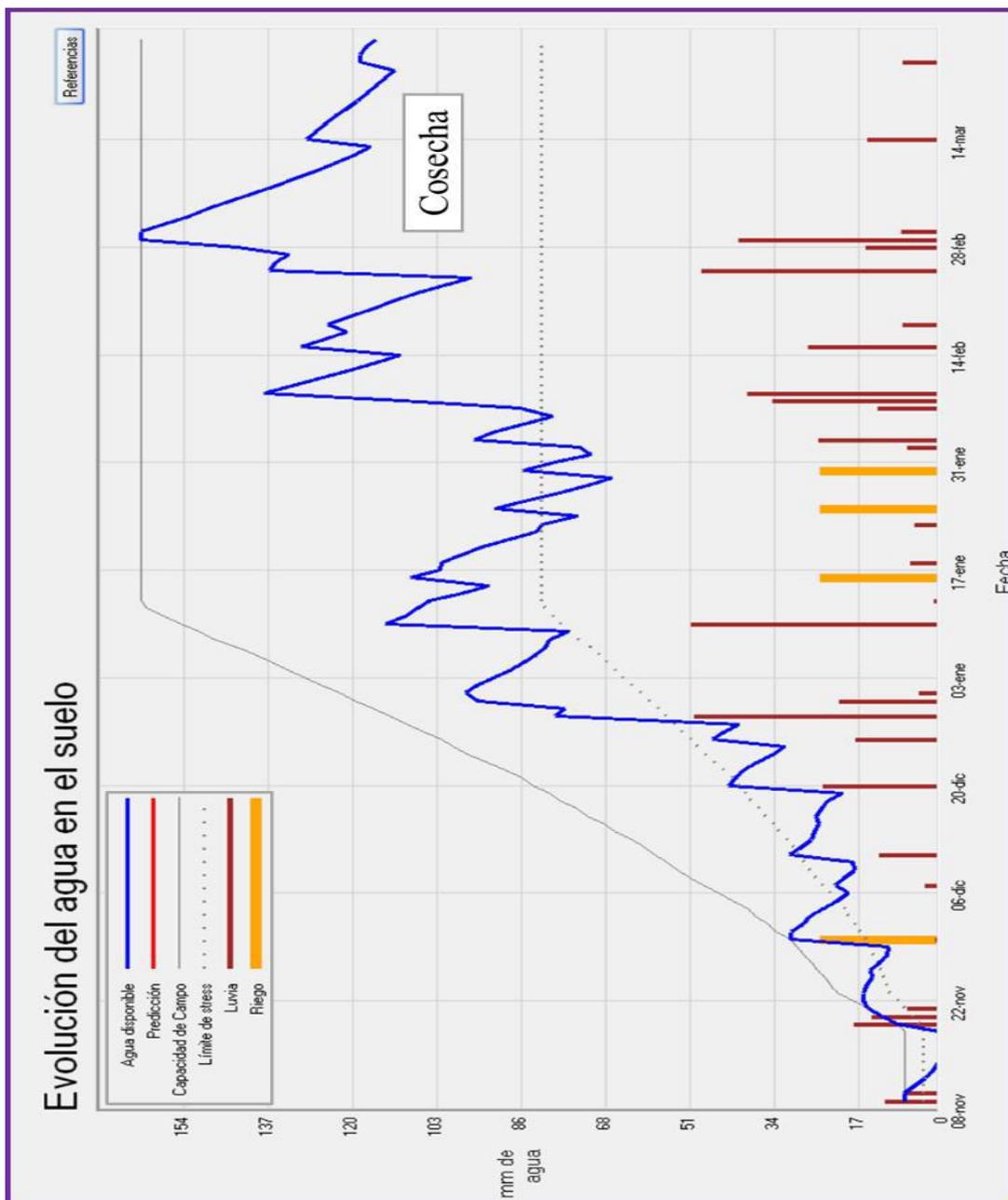


Figura 4. Evolución del agua en el suelo del cultivo de soja en Río Cuarto en la campaña 2014-2015. Fuente: Servicios Hidrología Agrícola, UNRC.

A - 2 - Balance relativo y variación de nitrógeno en el cultivo de soja

Existen diferentes métodos para estimar el balance relativo de nitrógeno en condiciones controladas (por ejemplo, dilución del isótopo ^{15}N , uso de variedades no nodulantes). Sin embargo, para experimentos llevado a cabo en condiciones de campo, como los implementados en este trabajo, el método del balance de nitrógeno usado, es una alternativa válida para fines comparativos ya que tiene en cuenta las condiciones edáficas y de manejo del cultivo (Cholaky *et al.*, 1986). Estudiar el aporte relativo de la FBN asociada a

la fertilidad del suelo, es una consideración importante a tener en cuenta en el manejo del cultivo de leguminosas.

En las etapas fenológicas R2, R6 y R8 se analizó el contenido de nitrógeno de la parte aérea, los resultados obtenidos mostraron un incremento del contenido de N acorde al crecimiento de las plantas de soja para todos los tratamientos. Sin embargo, se observó que las plantas de soja inoculadas con la cepa de *B. japonicum* Per 3.61 presentaron el mayor contenido de nitrógeno en la etapa de madurez (R8). Estos datos concuerdan con Salvagiotti *et al.* (2009) quienes reportaron que utilizando cepas de alta efectividad se mejora el aporte del contenido de nitrógeno a través de la FBN. (Figura 5).

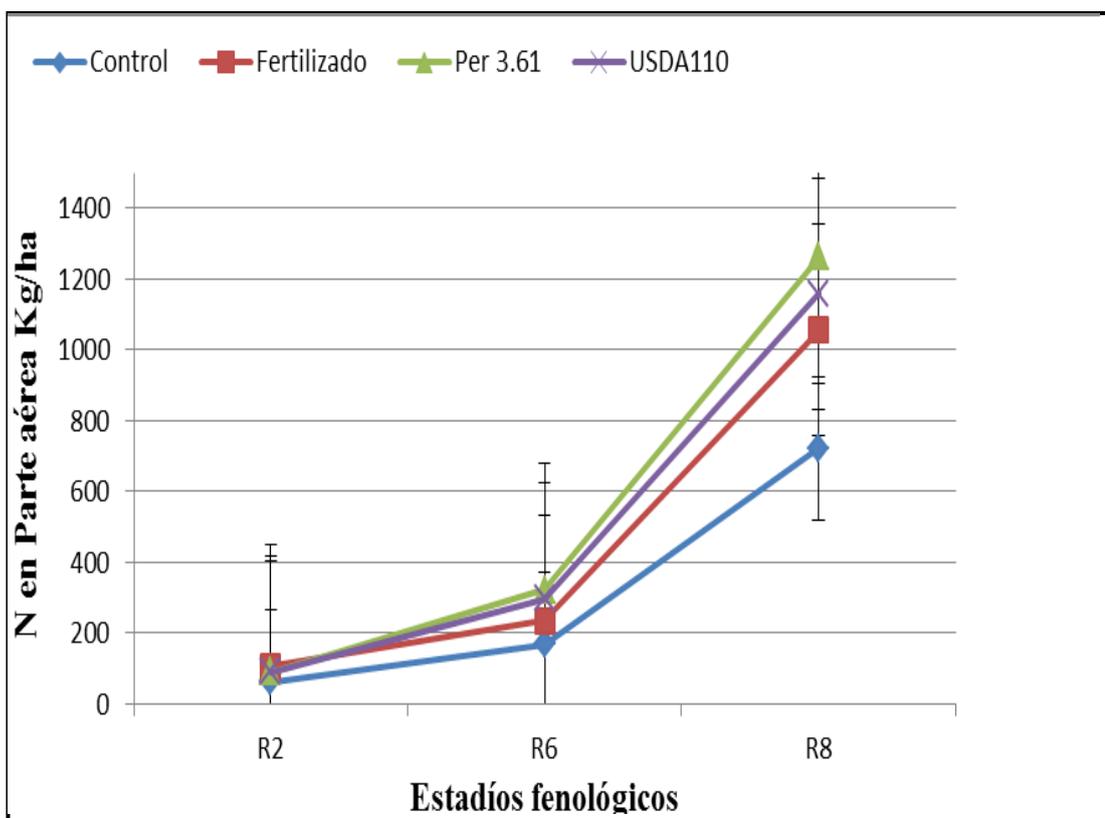


Figura 5. Variación del contenido de Nitrógeno acumulado en la parte aérea de la planta durante las etapas fenológicas R2 (65dds), R6 (120dds) y R8 (135dds) del cultivo de soja. Los datos representan la media \pm E.S. Ref: dds: días después de la siembra.

Para obtener una óptima nodulación y fijación de nitrógeno, las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo son importantes sumado al método apropiado de cultivo (fertilización, fecha de siembra, densidad de siembra, malezas y plagas). Además, resulta esencial el empleo de inoculantes basado en cepas de *Bradyrhizobium japonicum* eficientes para mejorar el rendimiento de la soja (Okyama *et al.*, 2012). En este trabajo de tesis, el porcentaje de nodulación de las plantas de soja inoculadas con las cepas introducidas de *B.*

japonicum (USDA 110 y Per 3.61) fue del 100% y no presentaron cambios en el peso seco, número de nódulos y su distribución en raíz principal y lateral para ambas cepas (Tabla 5).

Tabla 5. Variables de la capacidad de nodulación en la interacción *Bradyrhizobium japonicum*-soja evaluadas en el estadio fenológico R2 y R6, en Río Cuarto en la campaña 2014-2015.

Cepas de <i>B. japonicum</i>	Estado Fenológico	Raíz Principal		Raíces laterales	
		Nº nódulos/planta	Peso seco (mg/planta)	Nº nódulos/planta	Peso seco (mg/planta)
USDA 110	R2	6.38	10.01	21.11	20.12
	R6	15.07	120.01	45.07	260.03
Per 3.61	R2	8.32	10.04	17.12	20.02
	R6	13.57	110.12	52.36	280.01

Los datos representan el promedio de tres repeticiones por tratamiento.

Es de destacar que el desarrollo de nódulos en la raíz principal, es una característica cualitativa útil como un índice del nivel de eficiencia y de la actividad bacteriana en la interacción planta-rizobio en el momento de la siembra. Otro aspecto importante a tener en cuenta ha sido la baja respuesta de la nodulación de las plantas de soja en los tratamientos control y fertilizado del orden del 20%, teniendo en cuenta que la población nativa de rizobios encontrada en el suelo fue del orden del 10^3 .

El balance de nitrógeno es de utilidad para inferir a largo plazo cómo evolucionará el nivel de este nutriente en el suelo. Si bien es fácil estimar la extracción de nitrógeno por cosecha de los granos, no es posible establecer balances confiables pues se carece de estimaciones a campo del ingreso de nitrógeno al sistema suelo-planta por fijación biológica (Di Ciocco, 2004).

En este trabajo, los resultados demostraron que el balance de nitrógeno fue positivo en todos los tratamientos. Estos valores no concuerdan con los estudios realizados por Gutiérrez-Boem y Salvagiotti (2014) donde argumentan que los balances relativos de nitrógeno en general son negativos. La FBN aportó en la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 56% y en la cepa *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 64% de N acumulado por el cultivo, representando un aumento del 20% y 39% respectivamente, con respecto al tratamiento control (46%). Cabe destacar, que en el tratamiento fertilizado la FBN se vio disminuida (32%) siendo esto concordante con lo expresado por Pietrarelli *et al.* (2008) y por Miransari (2016) (Tabla 6).

Tabla 6. Balance relativo de nitrógeno en cultivo de soja con distintos tratamientos. Río Cuarto, 2014-2015.

Tratamientos	FBN (kg ha ⁻¹)	VNS (kg ha ⁻¹)
Control	111,79	85,04
Fertilizado	114,19	76,46
<i>B. japonicum</i> USDA 110	215,71	115,61
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	269,14	97,64

*FBN: fijación biológica del nitrógeno.

*VNS: variación del contenido de nitrógeno del suelo.

Los resultados coincidieron con lo informado por Cicore *et al.* (2004) quienes demostraron que, si el nitrógeno proveniente del suelo o del fertilizante aumenta, el nitrógeno derivado de la fijación biológica y la nodulación disminuye. Además, es importante considerar que la productividad de la soja está condicionada por la acumulación de N proveniente del suelo, del N atmosférico y de las condiciones edafoclimáticas. Conocer y manejar estas interacciones probablemente llevará a la obtención de cultivos más rentables y con una mejor sustentabilidad ambiental. Así, para una producción sostenible, las grandes cantidades de nitrógeno exportadas del campo en las semillas cosechadas deben ser restituidas.

B - Rendimiento del cultivo de soja

Los resultados del rendimiento del cultivo de soja mostraron que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y fertilizado en relación con el control. Covelli (2013) mostró que el uso de cepas rizobianas potencia el incremento de los rendimientos. El mayor rendimiento del cultivo correspondió al tratamiento de soja inoculada con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 (Tabla 7).

Tabla 7. Estimación del rendimiento del cultivo de soja en distintos tratamientos. Río Cuarto, 2014-2015.

Tratamientos	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
Control	4524,27 ± 415,96 a
Fertilizado	6167,55 ± 382,85 b
<i>B. japonicum</i> USDA 110	6624,87 ± 455,82 b
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	7667,37 ± 524,66 c

Los datos representan el promedio de tres repeticiones por tratamiento. Letras diferentes por columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

El rendimiento del cultivo de soja inoculado con la cepa desnitrificante *B. japonicum* Per 3.61 fue 69 % mayor que el control (sin inocular y fertilizar), un 24 % respecto al fertilizado (con urea) y de un 15% cuando la soja fue inoculada con la cepa de referencia USDA 110. En el tratamiento control, el buen rendimiento del cultivo estaría dado por las condiciones edáficas y climáticas tales como el aporte de nitrógeno a la siembra (N-NO₃⁻), materia orgánica, fósforo y humedad del suelo, al coeficiente de mineralización, sumados a las elevadas precipitaciones registradas en el ciclo del cultivo. Sin embargo, no se observó diferencias significativas entre el rendimiento del tratamiento fertilizado, en el cual al momento de la siembra se le agregó 180 kg ha⁻¹ de urea en relación a lo obtenido con la inoculación del cultivo con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Es de destacar que la FBN tiene un importante impacto sobre la agricultura sustentable, el medioambiente y la salud pública.

VI. CONCLUSIÓN

- ✓ El rendimiento del cultivo de soja inoculado con la cepa Per 3.61 fue superior a todos los tratamientos ensayados a campo con elevada concentración de nitrato en el suelo, observándose un aporte significativo de la FBN en el balance relativo de nitrógeno. Estos datos demostraron que la cepa desnitrificante *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61, caracterizada por poseer actividad nitrato reductasa, representa un aporte promisorio para su uso como inoculante para soja, mejorando la FBN y el rendimiento del cultivo en suelos con alto contenido de nitrato.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, R., L. PEREIRA, D. RAES y M. SMITH. 1998. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO. **Irrigation and drainage** 56:300.
- ÁLVAREZ, R. y H. STEINBACH. 2006. Balance de carbono en suelos cultivados. Materia Orgánica. Valor Agronómico y Dinámica en Suelos Pampeanos. pp. 55-78.
- ANDRIANI, J. 2012. Desarrollo y validación del software de balance hídrico de cultivos extensivos “BAHICU”. XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Actas del Congreso, Mar del Plata. Argentina. pp. 1-10.
- ASOCIACIÓN DE LA CADENA DE LA SOJA ARGENTINA. 2016. Soja. En: <http://www.acsoja.org.ar/soja/>. Consultado: 16-04-2018.
- BIANCO, C.A., T.A. KRAUS y C.O. NUÑEZ. 2007. Botánica Agrícola. Segunda Edición. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina. 498p.
- BLAKE, G. Y K. HARTGE. 1986. Bulck Density, en Methods of soil analysis. Part 1. Segunda edición, ASA.SSSA. Physical and Mineralogical Methods 9:363-375.
- BOLSA DE CEREALES ROSARIO. 2015. Guía estratégica para el agro. Estimaciones de producción. En: <http://www.bcr.com.ar/default.asp>. Consultado: 15-06-2015.
- BRAY, R. y L. KURTZ. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. Soil Science 59:9-45.
- BREMNER, J. y C. MULVANEY. 1982. Regular Kjeldahl Method. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. En: Page AL Ed. American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of América, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA. pp. 595-622.
- CHOLAKY, S., A. CANTERO-GUTIÉRREZ, O. GIAYETTO, E. BONADEO y E. NEUMAN. 1986. Fertilización nitrogenada y modelos de siembra en soja de hábito determinado. Rev. UNRC 6(2):133-166.
- CICORE, P., H. SAINZ-ROZAS, H. ECHEVERRÍA y P. BARBIERI. 2004. Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en un cultivo de soja bajo diferentes condiciones de manejo. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo - II Simposio Nacional sobre Suelos Vertisólicos. En: Quintero, C.E., Boschetti N.G. y E.L. Díaz (Ed.), Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo. Argentina. pp. 23(2):205-210.

- COLLINO, D., M. DE LUCA, A. PERTICARI, S. URQUIAGA y R. RACCA. 2007. Aporte de la FBN a la nutrición de la soja y factores que la limitan en diferentes regiones del país. Actas XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Los Cocos, Córdoba, Argentina.
- COVELLI, J. 2013. Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: Aspectos ecofisiológicos del problema de la competencia para la nodulación. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. IBBM-CONICET. 9-24p.
- DELGADO, M.J. y E. BEDMAR. 2006. Metabolismo anaerobio del nitrato en bacterias simbióticas: respiración y desnitrificación. En: Bedmar, E., González, J., Lluch, C., Rodelas, B. (eds). Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. SEFIN, Granada-España. pp. 92-101.
- DI CIOCCO, C., R. ÁLVAREZ, Y. ANDRADA y F. MOMO. 2004. Balance de nitrógeno en un cultivo de soja de segunda en la pampa ondulada. Ciencia del Suelo 22(1):48-51.
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALSARINI, L. GONZALEZ, M. TABLADA y C. W. ROBLEDO. 2014. Grupo InfoStat versión 2014, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DOMINGO-YAGÜES, J., R. FERREYRA, R. LANGHI, G. PAUSICH, A. PEZZOLA y C. COMA. 2012. Campaña Sojera 2010-2011. INTA, Red de Información Agropecuaria Nacional (RIAN). En: <http://inta.gob.ar/documentos/campana-sojera-2010-2011-republica-argentina>. Consultado: 14-12-2016.
- DOORENBOS, J. y W. PRUITT. 1997. Las necesidades de agua de los cultivos. Serie, Riego y Drenaje. Estudio FAO. Roma. Irrigation and drainage 56:194.
- FEHR, W.R. y C.E. CAVINESS. 1977. Stages of soybean development, Ames, IA. Iowa StateUniversity. SpecialReport 80. 11p.
- FERRARIS, G., G. GONZÁLEZ ANTA y M. DÍAZ-ZORITA. 2006. Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. Mercosoja 2006 – 3° Congreso de Soja del MERCOSUR. Rosario, Santa Fe. pp. 85-88.
- GARCÍA, F. y A. CORRENDO. 2012. Cálculo de requerimientos nutricionales. IPNI. Programa Latinoamérica. Cono Sur. En: <http://lacs.ipni.net/article/LACS-2014>. Consultado: 20-04-2017

- GARCÍA, F., L. PICONE y I. CIAMPITTI. 2014. *Fósforo*. Capítulo 8. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. En: Echeverría, H., y García, F. eds. INTA. Buenos Aires, Argentina. pp. 229-264.
- GONZÁLEZ, N., A. PERTICARI, B. STEGMAN y E. RODRIGUEZ-CÁCERES. 1997. Nutrición nitrogenada. En: Giorda, L.M. y Baigorri, H.E.J. Eds. El cultivo de la soja en Argentina. INTA. Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez EE Manfredi. Coordinación Subprograma Soja. pp. 187-198.
- GONZÁLEZ, N. 2002. Algunos elementos de juicio para interpretar el fenómeno de la nodulación en soja. Publicación de las Jornadas de Cosecha Gruesa. INTA CIAM, Mar del Plata. 4p.
- GONZÁLEZ, N. 2006. Fijación del nitrógeno en soja: situación actual en la Argentina. Mercosoja 2006. Tercer Congreso de Soja del MERCOSUR. Rosario, Santa Fe. pp. 10-13.
- GUTIÉRREZ-BOEM, F. y F. SALVAGIOTTI. 2014. Soja. Capítulo 16: Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. En: Echeverría, H., y García, F. eds. INTA. Buenos Aires, Argentina. pp. 479-508.
- HARPAZ, Y. 1975. Simulation of the nitrogen balance in semi-arid regions. Thesis for the Degree Doctor of Philosophy, Hebrew University, Jerusalem, Israel. pp. 159-169.
- HUNGRIA, M., R.J. CAMPO, I.C. MENDES y P.H. GRAHAM. 2006. Contribution of biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr) in South America. En: Singh, R.P., N. Shankar y P.K. Jaiwal (eds), Nitrogen nutrition in plant productivity. StadiumPress, LLCC, Houston (TX, USA). pp. 43-93.
- HYMOWITZ, T. 1970. On the domestication of the soybean. *Economic Botany* 24: 408-421.
- INTA. 2006. Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba. Los Suelos. Agencia Córdoba Ambiente. Área Subordinación Suelo. EEA Manfredi. Córdoba. Argentina. pp. 14-53.
- INTA. 2009. Problemas actuales de malezas que pueden afectar al cultivo de soja. Protección vegetal INTA EEA Oliveros. En: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-problemas_actuales_de_malezas.pdf. Consultado: 16-08-2016.
- JACKSON, M. 1964. Método: Extracción de los cationes canjeables del suelo mediante acetato de amonio a pH 7. *Análisis Químico de Suelos*. Omega. Barcelona. pp. 468.

- KANTOLIC, A., P. GIMÉNEZ y E. DE LA FUENTE. 2003. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en soja. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. 166-201.
- 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: Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo. 2da edición. Ed: A. Pascale, Buenos Aires. pp. 167-195.
- LAMBERT, R. y R. DUBOIS. 1971. Spectrophotometric determination of nitrate in the presence of chloride. International Journal of Analytical Chemistry 43:955-957.
- LODEIRO, A. 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. Revista Argentina de Microbiología 47(3):261-273.
- MAREQUE, C. 2011. Estudio de la nodulación en una colección de simbioses de Parapiptadenia rígida (angico). Facultad de Ciencias, Licenciatura en Ciencias Biológicas. Orientación Microbiología, Universidad de la República (Uruguay). En: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/123456789/1318>. Consultado: 28-08-2017.
- MARTÍNEZ LALIS, R. 2000. Nitrógeno, inoculación y fijación biológica. Fertilizar 17: 17-19.
- MATTSON, M., T. LUNDBORG y C. LARSON. 1991. Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. I. Growth and nitrate uptake kinetics in vegetative cultures grown at different relative addition rates of nitrate-N. J. Exp. Bot. 43:15-23.
- MC LEAN, E. 1982. Soil pH and lime requirement. In Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. En: Page AL (ed) American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA. pp. 199-223.
- MELGAR, R. 2009. How much more can South America farmers pay for fertilizers. Fertilizantes Latinoamérica: 18-20. Panama City, Panama.
- MELGAR, R., G. VITTI y V.M. BENITES. 2011. Fertilizando para altos rendimientos. Soja en Latinoamérica. Boletín 20: 6-21. INTA EEA Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- MIRANSARI, M. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria. Journal Plant Nutrition 37:2227-2235.
- MIRANSARI, M. 2016. Soybean N fixation and production of soybean inocula. Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production. Soybean Production: 107-129.

- MUMNS, D. 1987. Nitrogen fixation potential of bean (*P. vulgaris*) compared with other grains legumes under controlled conditions. *Plant and Soil* 98(2):169-182.
- NELSON, D. y L. SOMMERS. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112.
- NITRAGIN, 2007. El Manual de Nodulación. En: www.nitragin.com.ar. Consultado: 14-12-2017.
- NITRASOIL, 2007. Qué es la fijación biológica del nitrógeno. En: www.nitrasoil.com.ar. Consultado: 14-12-2017.
- OKYAMA, T., R. MINAGAWA, S. ISHIKAWA, M. YAMAMOTO, N. VAN PHI HUNG, N. OHTAKE, K. SUEYOSHI, T. SATO, Y. NAGUMO y Y. TAKAHASHI. 2012. Soybean Seed Production and Nitrogen Nutrition. En: <http://dx.doi.org/10.5772/45867>. Consultado: 18-10-2016.
- PAGANO, M. y M. MIRANSARI. 2016. The importance of soybean production worldwide. *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production. Soybean Production*: 1-26.
- PAREDES, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. En: bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf; 35-36p. Consultado: 13-12-2017.
- PERTICARI, A., N. ARIAS, H. BAIGORRI, J. DE BATTISTA, M. MONTECCHIA, J. PACHECO-BASRCO, A. SIMONELLA, S. TORESANI, L. VENTIMIGLIA y R. VICENTE. 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. (Satorre, E., ed). *El libro de la soja*. Buenos Aires. Servicios y Marketing Agropecuario. 69-76p.
- PERTICARI, A. 2004. Impacto de la fijación biológica de nitrógeno en la producción de soja. *Fertilizar* 34: 22-27.
- PERTICARI, A. 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. *Actas del Congreso Mundo Soja*: 111-120. Buenos Aires. Argentina.
- PICCINETTI, C., N. ARIAS, L. VENTIMIGLIA, M. DÍAZ-ZORITA, L. MURUA, H. SÁNCHEZ, G. FERRARIS, F. MOUSEGNE, H. FONTANETTO, E. SÁPEREIRA, J. CAPURRO, J. ENRICO, C. LÓPEZ, A. CARRIZO, F. SALVAGGIOTTI, D. COLLINO y A. PERTICARI. 2013. Efectos positivos de la inoculación de soja sobre la nodulación, FBN y en los parámetros de producción del cultivo. *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación en Argentina. (Segunda Edición)*. pp. 283-297.

- PICONE, L. 2014. El ambiente físico-químico del suelo relacionado con la fertilidad. Capítulo 1. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. En: Echeverría, H., y García, F. eds. INTA ediciones. Buenos Aires, Argentina. pp. 31-51.
- PIETRARELLI, L., J. ZAMAR, H. LEGUÍA, E. ALESSANDRIA, J. SÁNCHEZ, M. ARBORNO y S. LUQUE. 2008. Efectos de diferentes prácticas de manejo en la nodulación y en el rendimiento del cultivo de soja. *Agriscientia* 25(2):81-87.
- RACCA, R. y D. COLLINO. 2005. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. *Actas del Congreso Mundo Soja*. 111-120. Buenos Aires, Argentina.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, D., I. MARGARET-OLIVER, M. ALBAREDA-CONTRERAS y J. RUIZ-SAINZ. 2011. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development* 31:173-190.
- SALVAGIOTTI, F., K. CASSMAN, J. SPECHT, D. WALTERS, A. WEISS y A. DOBERMANN. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. *Field Crops Research* 108:1-13.
- SALVAGIOTTI, F., J. SPECHT, K. CASSMAN, D. WALTERS, A. WEISS y A. DOBERMANN. 2009. Growth and nitrogen fixation in high yielding soybean: impact of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* 101:958-970.
- SEILER, R., R. FABRICIUS, V. ROTONDO, M. VINOCUR y B. BONACCI. 1995. *Agroclimatología de Río Cuarto 1974/1993*. Volume: 1. Cátedra de Agrometeorología-Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.
- SERRAJ, R., T. SINCLAIR y L. ALLEN. 1999. Soybean nodulation and N₂ fixation response to drought under carbon dioxide enrichment. *Plant Cell and Environment* 21:491-500.
- SINCLAIR, T.R., S. KITANI, K. HINSON, J. BRUNIARD y T. HORIE. 1991. Soybean flowering date: linear and logistic models based on temperature and photoperiod. *Crop Sci.* 31:786-790.
- SOMASEGARAN, P. y H. HOBEN. 1994. *Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer-Verlag. New York. Inc. Sección III. 382p.
- THOMAS, 1982; PAGE, 1982, RHOADES, 1982. SAMLA SAGPyA. 2004. Sistema de Apoyo Metodológico a los Laboratorios de Análisis de Suelos, Agua, Vegetales y Enmiendas Orgánicas. Primera edición, SAGPyA, Dirección de Agricultura. En: <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/samla/index.php>. Consultado: 26-11-2016.

- TORESANI, S., M. BODRERO y J. ENRICO. 2007. Comportamiento de inoculantes para soja en la zona sur de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR* 11: 35-40.
- UBERTO, M. 2008. Adaptación de un modelo de simulación para el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) en las condiciones edafoclimáticas de Río Cuarto. Tesis MSc. Ingeniero Agrónomo. FAV-UNRC. Río Cuarto. Córdoba, Argentina. 123p.
- VÁZQUEZ, M. y A. PAGANI. 2014. Calcio y magnesio. Manejo de fertilización y enmiendas. Capítulo 11. *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos*. En: Echeverría, H., y García, F. eds. INTA ediciones. Buenos Aires, Argentina. pp. 317-350.
- VINCENT, J. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. En: IBP Handbook N° 15, Blackwell Scientific Publication, Oxford. Editor: W. Schwartz. pp 164.
- XU, D.H., J. ABE, J.Y. GAI y Y. SHIMAMOTO. 2002. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 645–653.

