



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero
Agrónomo

Modalidad: Proyecto

**RESPUESTA A LA INOCULACIÓN Y A LA
FERTILIZACIÓN EN EL CULTIVO DE SOJA (*Glycine
max*) CON CEPAS DE *Bradyrhizobium* spp.**

Alumno: ARNOSIO, Mayco Gustavo

DNI: 38.019.494

Director: Dra. Bruno, Carla Valeria.

Co-Director/a: Dra. Thuar, Alicia María.

Río Cuarto – Córdoba

Julio 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO FACULTAD DE
AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: RESPUESTA A LA INOCULACIÓN Y A LA
FERTILIZACIÓN EN EL CULTIVO DE SOJA (*Glycine max*) CON CEPAS
DE *Bradyrhizobium* spp.

Autor: Arnosio, Mayco Gustavo.

DNI: 38.019.494

Director: Dra. Bruno, Carla Valeria.

Co-Director: Dra. Thuar, Alicia María.

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

Dr. Andrés Javier Alberto _____

Dra. Bianco Luciana _____

Dra. Bruno Carla Valeria _____

Fecha de presentación: ____/____/____.

Secretario Académico _____

DEDICATORIA

A mi familia y amigos por haber contribuido directa o indirectamente con la meta de obtener mi título profesional.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y principalmente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria, que contribuyeron con mi formación profesional y humana.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Bruno Carla Valeria, por la orientación, el seguimiento y la supervisión de la investigación.

A la co-directora de este proyecto, Dra. Thuar Alicia María, por el apoyo y las correcciones brindadas.

Al Dr. Andrés Javier Alberto y a la Dra. Bianco Luciana, por la atenta lectura y corrección de este trabajo.

A la Lic. Basualdo Claudia, por compartir sus conocimientos y disponibilidad para ayudarme.

A los compañeros Palermo Franco y Carranza Nahuel, por la colaboración en el ensayo a campo.

A mi familia por su apoyo incondicional y acompañarme siempre.

A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

El cultivo de *Glycine max* (soja) es uno de los de mayor importancia en Argentina y de la región agrícola de la provincia de Córdoba. Esta leguminosa tiene la propiedad de asociarse con bacterias, las cuales poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, siendo una importante fuente de nutriente. En la asociación simbiótica *Bradyrhizobium-Glycine max*, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) resulta ser una herramienta muy útil para mantener una agricultura sustentable, aunque se encuentra limitada por muchas condiciones ambientales, entre ellas, altas concentraciones de nitrato del suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de la fertilización e inoculación con diferentes cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium* spp. (USDA, Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12) en el rendimiento de *Glycine max*. El ensayo se realizó en la localidad de Río Cuarto, Córdoba, en un diseño completamente al azar con 7 tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que la fertilización nitrogenada no afectó de forma negativa la FBN. El tratamiento inoculado con la cepa Per 1.12, presentó valores superiores en todas las variables analizadas, excepto en el peso seco de biomasa aérea. El rendimiento en grano de *Glycine max* inoculado con esta cepa, presentó un aumento significativo con respecto al resto de los tratamientos. En conclusión, la cepa desnitrificante Per 1.12, representa un aporte promisorio para su uso como inoculante para *Glycine max*, mejorando la FBN y el rendimiento del cultivo en suelos con alto contenido de nitrato.

Palabras claves: *Glycine max*, *Bradyrhizobium* spp., rendimiento.

ABSTRACT

The cultivation of *Glycine max* (soybean) is one of the most important in Argentina and the agricultural region of the province of Córdoba. This legume has the property of associating with bacteria, which possess the ability to fix atmospheric nitrogen, being an important source of nutrient. In the *Bradyrhizobium-Glycine max* symbiotic association, the biological fixation of nitrogen (BNF) turns out to be a very useful tool to maintain a sustainable agriculture, although it is limited by many environmental conditions, among them, high concentrations of nitrate of the soil. The objective of this work was to evaluate the response of fertilitation and inoculation with different denitrifying strains of *Bradyrhizobium* spp. (USDA, Per 3.64, Per 3.61 and Per 1.12) in the performance of *Glycine max*. The trial was carried out in the town of Río Cuarto, Córdoba, in a completely randomized design with 7 treatments. The results obtained show that nitrogen fertilization did not negatively affect the BNF. The treatment inoculated with the strain Per 1.12, showed higher values in all the variables analyzed, except in the dry weight of aerial biomass. The grain yield of *Glycine max* inoculated with this strain, showed a significant increase regarding the rest of the treatments. In conclusion, the denitrifying strain Per 1.12, represents a promising contribution for its use as an inoculant for *Glycine max*, improving the BNF and the yield of the crop in soils with a high nitrate content.

Keywords: *Glycine max*, *Bradyrhizobium* spp., performance.

ÍNDICE GENERAL

Certificado de aprobación.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Índice general	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.1. Características generales de los rizobios.....	3
I.2. Características de las cepas desnitrificantes.....	4
I.3. Rizobios naturalizados.....	4
I.4. Competencia entre rizobios naturalizados e inoculados.....	5
I.5. Efecto del nitrato sobre la fijación biológica del nitrógeno.....	5
I.6. Hipótesis y objetivos.....	8
I.6.a. Hipótesis.....	8
I.6.b. Objetivos generales.....	8
I.6.c. Objetivos específicos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
II.1. Caracterización del sitio experimental.....	9
II.2. Establecimiento de las condiciones edáficas y climáticas para el desarrollo del cultivo de <i>Glycine max</i>	10
II.3. Diseño experimental y tratamientos.....	12
II.4. Cultivar.....	13
II.5. Determinaciones realizadas.....	14
II.6. Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
III.1. Número de plántulas emergidas.....	17
III.2. Número de nódulos en raíz principal	17
III.3. Número de nódulos en raíces secundarias	18
III.4. Peso seco de nódulos	18
III.5. Peso seco de biomasa aérea.....	19
III.6. Número de vainas por planta	20
III.7. Número de granos por planta	21
III.8. Peso de 1000 granos.....	21

III.9. Rendimiento en grano	21
III.10. Análisis multivariado entre las variables estadísticamente significativas.....	22
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25
Anexos.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estados fenológicos del cultivo de <i>Glycine max</i>	2
Tabla 2. Características generales del sitio experimental (2017-2018)	10
Tabla 3. Características de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp.	12
Tabla 4. Características del cultivar de <i>Glycine max</i>	13
Tabla 5. Perfil sanitario del cultivar de <i>Glycine max</i>	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Precipitaciones y temperaturas registradas durante el ciclo del cultivo de <i>Glycine max</i>	11
Figura 2. Comparación de medias del número de nódulos en raíz principal.....	17
Figura 3. Comparación de medias del número de nódulos en raíces secundarias.....	18
Figura 4. Comparación de medias del peso seco de nódulos.....	19
Figura 5. Comparación de medias de la biomasa aérea.....	20
Figura 6. Comparación de medias del número de vainas por planta.....	20
Figura 7. Comparación de medias del rendimiento en granos.....	22
Figura 8. Análisis multivariado entre las variables estadísticamente significativas.....	23

INTRODUCCIÓN

Glycine max (soja) es un cultivo de alto valor proteico, utilizado para la alimentación humana y animal, como también para la producción de aceites (SAGPyA, 2009), por lo que su principal destino es la industrialización. El grano contiene entre 37 a 43% de proteína y 18% de materia grasa. Si bien los granos tienen una composición balanceada de aminoácidos, requieren un tratamiento industrial para inactivar inhibidores perjudiciales (Mulin y Álvarez, 2004). Esta oleaginosa es una de las más importantes en los sistemas agrícolas de Argentina (SAGPyA, 2009).

En Argentina, el cultivo de *Glycine max* comenzó a expandirse a principios de los '70, ocupando 79.800 has para la campaña 1971/72. Para la campaña 1981/82, ocupó una superficie de 2.040.000 has, y ya era considerado uno de los principales cultivos. Para la campaña 1986/87 el área sembrada superó a la del *Zea mays*, y en la campaña 1991/92 la del *Triticum aestivum*, convirtiéndose en el cultivo más importante del país (Cadenazzi, 2009).

Para la campaña 2013/14 el área sembrada con *Glycine max* superó los 18 millones de hectáreas con una producción cercana a 50 millones de toneladas, ocupando el 50% de la superficie cultivada del país y constituyéndose en el único cultivo en muchas provincias gracias a la aplicación de tecnología y a su gran adaptabilidad a diferentes suelos y climas (Gutiérrez-Boem y Salvagiotti, 2014).

En la campaña 2016/2017, Estados Unidos fue el principal productor de poroto de *Glycine max* con 117 millones de toneladas. Le siguió Brasil con 114 millones de toneladas y, en tercer lugar, Argentina, con 57,8 millones de toneladas según estimaciones del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) (Bolsa de Cereales de Rosario, 2017).

Botánicamente, *Glycine max* es una especie que pertenece a la familia de las leguminosas (*Fabaceae*), es una hierba anual, estival y erecta, que alcanza una altura de 150 cm. Las hojas son compuestas (trifolioladas imparipinnadas), los folíolos son de forma oval-lanceolada. La flor presenta la corola blanca o violácea, y están reunidas en racimos axilares. El fruto es una legumbre, en su interior posee semillas exendospermadas con un alto contenido de proteína (Bianco *et al.*, 2007).

En la tabla 1 se observan los estados fenológicos del cultivo de *Glycine max* de acuerdo a la escala de Fehr y Caviness (1977).

Tabla 1. Estados fenológicos del cultivo de *Glycine max*.

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 Semilla completamente desarrollada
	R7 Comienzo de madurez
Vn n nudos	R8 Plena madurez

La temperatura, el fotoperiodo y la variabilidad entre genotipos regulan la duración de las fases de desarrollo del cultivo. Estos factores actúan simultáneamente en el crecimiento de *Glycine max* y hay algunas evidencias de que existen interacciones entre ellas (Satorre *et al.*, 2010). Existe variabilidad entre genotipos en cuanto a su respuesta térmica y fotoperiódica. En general, las variaciones entre genotipos se suelen interpretar en el contexto de los grupos de madurez, aunque también existen diferencias dentro de cada grupo (Satorre *et al.*, 2010).

Las temperaturas cardinales que regulan las fases de desarrollo de *Glycine max* varían a lo largo del ciclo del cultivo. El rango de temperaturas óptimas para su desarrollo es entre 25-30°C, y una máxima de 40°C. *Glycine max* es una especie que también responde al fotoperiodo, acelerando su desarrollo en días cortos (respuesta cuantitativa), regulando principalmente la etapa reproductiva (Satorre *et al.*, 2010). En cuanto a sus requerimientos hídricos, dependen del momento de siembra, para temprana entre 500-600 mm y para tardía 350-550 mm. El déficit hídrico es el principal responsable de pérdidas de rendimientos en cultivos en secano (Satorre *et al.*, 2010).

Si bien *Glycine max* es ocasionalmente productiva en suelos pobres, es exigente en fertilidad para alcanzar altos rendimientos (Ohlrogge y Kamprath, 1968). Los nutrientes presentan cambios temporales al interactuar con factores bióticos y abióticos del sistema suelo planta.

El nitrógeno (N) es el más importante entre los nutrientes esenciales de los cultivos, por su rol en los sistemas biológicos, la complejidad de su ciclo y su participación en la producción (Satorre *et al.*, 2010). Los requerimientos del cultivo de *Glycine max* son entre 60-80 kg por cada tonelada de grano producido. La provisión de N puede ser a través de compuestos nitrogenados presentes en la solución del suelo y de la mineralización de la materia orgánica, o a través de la FBN, mediante la asociación con bacterias, la cual da lugar a la formación de nódulos radicales fijadores de N. En el caso del cultivo de *Glycine max*, la

simbiosis se produce principalmente con *Bradyrhizobium japonicum*. Este es un proceso altamente sensible al estrés hídrico (Satorre *et al.*, 2010).

La respuesta a la inoculación es mayor cuando los lotes no cuentan con antecedentes de *Glycine max*. No obstante, también se ha observado respuesta a la re-inoculación en estos lotes (Díaz Zorita *et al.*, 2004). En los últimos años, esto se ha visto favorecido por la incorporación al mercado de productos de alta calidad, que incluyen en su formulación protectores de las bacterias y micronutrientes esenciales para el proceso de FBN, como Cobalto (Co) y Molibdeno (Mo) (Masgrau, 2006).

El cultivo de leguminosas, en asociación con bacterias fijadoras, regula la fertilidad del suelo, lo que le confiere una gran eficacia a la hora de la fitorecuperación de suelos forestales y revegetación, además de preparar los suelos agrícolas para ser utilizados con otros cultivos, por medio de la rotación de los mismos (Carpena *et al.*, 2006).

En la asociación simbiótica *Bradyrhizobium-Glycine max*, la FBN resulta ser una herramienta muy útil para mantener una agricultura sustentable, aunque se encuentra limitada por diferentes condiciones ambientales, entre ellas, altas concentraciones de nitratos del suelo (Bruno, 2017). También la carencia de Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Azufre (S) y micronutrientes disminuyen la formación de nódulos, y, por consiguiente, la FBN (Baigorri *et al.*, 2003).

En condiciones ideales de expresión de la simbiosis, la nodulación comienza a visualizarse a los 3-5 días de emergencia y la actividad de fijación desde los 10-15 días (Muñoz, 2011). La tasa máxima de fijación ocurre entre los estados reproductivos R5-R6. Luego de esta etapa, el proceso cae en forma significativa (Baigorri *et al.*, 2003; Muñoz, 2011).

La ubicación, número y características morfológicas de los nódulos a lo largo de las raíces está ligada principalmente al género, especie de la planta y a la presencia de rizobios en el suelo. El bajo número de nódulos por planta se compensa parcialmente con un aumento en el tamaño de estos. En *Glycine max*, la mayor nodulación se produce en la raíz primaria, teniendo una capacidad de fijación muy superior a los ubicados en raíces secundarias (Toniutti *et al.*, 2004; Muñoz, 2011).

Características generales de los Rizobios

Los rizobios son bacterias Gram (-) móviles que habitan el suelo y tienen forma de bacilo. Este término incluye un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común la capacidad de sintetizar la enzima nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico (N₂) y lo convierte en amonio (Graham, 2008).

Los rizobios que nodulan a *Glycine max* pertenecen a varias especies diferentes de *Bradyrhizobium* (*B. canariense*, *B. daqingense*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. yuanningense*, *B. diazoefficiens*) (Delamuta *et al.*, 2013).

El género *Bradyrhizobium* está constituido por bacilos Gram (-), de un tamaño entre 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm , no forman esporas y son móviles por poseer un flagelo polar o subpolar. Por lo general, contienen gránulos de poli-hidroxibutirato. Se desarrolla en forma adecuada con temperaturas entre los 25-30 °C y a pH 6-7 (Werner, 1992).

Características de las cepas desnitrificantes

Los microorganismos capaces de llevar a cabo la desnitrificación (reducción de nitrato a N_2), son muy escasos ya que la mayoría de ellos sólo realizan una desnitrificación parcial o incompleta, lo que se debe a que no poseen o no expresan el equipo enzimático necesario para llevar a cabo todos y cada uno de los procesos de reducción que conforman la desnitrificación (Bruno, 2017).

La capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios, ya que sólo *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 (Delgado *et al.*, 2007).

Fernandez *et al.*, (2008) aislaron cepas desnitrificantes de los suelos donde se cultiva soja en el país, en Pergamino (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba), las cuales han sido diferenciadas en tres categorías, de acuerdo a la producción de N_2O :

Grupo I: cepa de referencia *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110.

Grupo II: cuatro aislamientos de *Bradyrhizobium japonicum* de los suelos de Pergamino.

Grupo III: cuatro *Bradyrhizobium* sp. con menor capacidad de producción de N_2O .

El grupo I tiene la máxima actividad desnitrificadora. La habilidad del grupo II fue cinco veces mayor que la del grupo III. Las cepas que se utilizaron son:

Per 3.64 grupo II.

Per 1.12 grupo II.

Per 3.61 grupo III.

Rizobios naturalizados

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 FBN (González *et al.*, 1997).

Competencia entre rizobios naturalizados e inoculados

La reiterada inoculación de los cultivos de *Glycine max* a lo largo de varios años llevó al establecimiento de poblaciones autóctonas de rizobios en los suelos de la Argentina. Estos están adaptados a las condiciones edafoclimáticas locales y por ello suelen ser lo que preferentemente ocupan los nódulos de *Glycine max*, aun cuando el cultivo se haya inoculado con un inoculante de buena calidad (Peticari *et al.*, 2007).

La FBN de una planta depende tanto de la eficacia de cada nódulo como del número total de estos. Si la mayor parte de los nódulos está ocupada por rizobios provenientes de la población autóctona del suelo, la tasa de fijación en general es inferior a la de la cepa seleccionada que se usó para inocular. Por otro lado, esto está indicando una ineficiencia importante del proceso de la inoculación (Lodeiro, 2015).

Efecto del nitrato sobre la fijación biológica del nitrógeno

La base fundamental del manejo del N en el cultivo de *Glycine max*, es la optimización del proceso de FBN. El manejo del cultivo debe estar dirigido a optimizar 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. El éxito de esta práctica se verá potenciada si el manejo del cultivo y del suelo están dirigidos a optimizar el ambiente para la simbiosis rizobio-*Glycine max* (Salvagiotti *et al.*, 2009).

La fuente más económica y ecológica de N es la FBN, cuya eficiencia depende de muchos factores relacionados con la planta, las bacterias, la simbiosis y el medio ambiente (González, 2006).

La presencia de nitratos en el suelo ejerce un efecto represor sobre la FBN. En consecuencia, la magnitud del aporte de N a través de la FBN se verá afectada por la aplicación de fertilizantes nitrogenados, por el aporte de N a través de la mineralización de la materia orgánica, o en lotes que presentan una fuerte intensidad de fertilización nitrogenada en cultivos antecesores que dejan altos contenidos residuales de nitratos. La FBN disminuye exponencialmente cuando se incrementa la dosis de fertilizante nitrogenado en el área de mayor desarrollo de los nódulos (Salvagiotti *et al.*, 2009). Algunas especies de rizobios, entre

ellas *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110, son capaces de desnitrificar en simbiosis, siendo esto de gran interés ya que las cepas de rizobios caracterizadas por una elevada actividad nitrato reductasa son menos susceptibles a la inhibición por nitrato (Chamber-Pérez *et al.*, 1997).

Diversos ensayos de fertilización nitrogenada muestran una sustitución del N fijado por el aportado por el fertilizante, sin un aumento neto en la asimilación del nutriente. Esto significa que, al aumentar la cantidad de N absorbido del fertilizante, paralelamente disminuye la cantidad de N fijado (Ferraris, 2016).

En estudios realizados por el INTA en el Oeste de Buenos Aires, se observó que la diferencia en el rendimiento de *Glycine max* del tratamiento testigo fertilizado y tratamiento inoculado, disminuyó a medida que se aplicó N. El uso de 20 u 80 kg ha⁻¹ de N no permitieron aumentar los rendimientos del cultivo y deprimieron la contribución del tratamiento de inoculación (Díaz Zorita *et al.*, 2004).

Experiencias realizadas por la Asociación Argentina de Productores de Siembra Directa (AAPRESID), sostiene que las prácticas de inoculación y fertilización producen aumentos de rendimiento en *Glycine max*, y la combinación de ambas produjo los mayores incrementos. A pesar del bajo coeficiente de correlación obtenido entre el rendimiento y el número de nódulos por planta (en raíces primarias y secundarias), se observó una tendencia que indica que a medida que éstos aumentan, crece el rendimiento (Syilvestre Begnis y Bianchini, 2004; Muñoz, 2011).

Monza y Palacios (2004), demostraron que el efecto inhibitorio producido por la presencia de nitrato depende fundamentalmente de la leguminosa y no del *Bradyrhizobium*. La razón de esta inhibición no se conoce a nivel molecular, aunque parece ser un efecto que se ejerce a nivel local, no sistémico, según se observó en experimentos realizados con sectores de sistemas radicales expuestos por separado y simultáneamente a distintas concentraciones de nitrato.

En ensayos realizados por Salvagiotti *et al.*, (2008), se analizó un conjunto de datos de 637 campos de *Glycine max* con un rendimiento promedio de más de 4.5 toneladas ha⁻¹, y se observó que el promedio de la captación total de N por las plantas de *Glycine max* fue igual a 219 kg ha⁻¹. Los análisis de los datos indicaron que el 52% de la captación de N resultó del proceso de FBN; sin embargo, para los campos, que recibieron menos de 10 kg ha⁻¹ N de fertilizante, el 58% de la captación se relacionó con el proceso de FBN (Miransari, 2016).

En un ensayo interesante, Chen *et al.*, (1992), investigaron los efectos de la fertilización química en el crecimiento y rendimiento del cultivo, en las condiciones climáticas de Quebec, Canadá. Observaron que la fertilización nitrogenada disminuyó el proceso de FBN, sin embargo, mejoró el crecimiento y rendimiento en condiciones de bajo N en el suelo (Miransari, 2016).

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados, sería interesante determinar si la inoculación con cepas de *Bradyrhizobium* spp. incrementa el número de nódulos y el rendimiento del cultivo de *Glycine max*.

HIPÓTESIS

La inoculación con cepas de *Bradyrhizobium* spp., incrementa el número de nódulos y el rendimiento del cultivo de *Glycine max* en presencia de altas concentraciones de nitrato del suelo.

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el comportamiento de diferentes cepas de *Bradyrhizobium* spp. en el cultivo de *Glycine max* fertilizado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de la inoculación de diferentes cepas de *Bradyrhizobium* spp. en el peso seco de nódulos y peso seco aéreo de *Glycine max* en el estadio fenológico R5.
- Cuantificar el número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias en *Glycine max* en el estadio fenológico R5.
- Determinar el rendimiento de *Glycine max* en el estadio fenológico R8.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del sitio experimental:

La experiencia se desarrolló en el campo experimental (CAMDOCEX) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto (33° 07' S, 64° 14' O, 421 m s.n.m), que se encuentra ubicado sobre la Ruta Nacional N° 36, Km 601, Río Cuarto, Córdoba.

El clima del sitio experimental, está caracterizado por un régimen de precipitaciones monzónico, que concentra el 80% de las lluvias en el período de octubre a abril. La precipitación media anual es de 784 mm para la serie 1981-2010 (Cátedra de Agrometeorología U.N.R.C., 2018).

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 9.9 °C, con una mínima absoluta de -11.6 °C. La amplitud térmica media anual es de 12.5 °C (Cátedra de Agrometeorología U.N.R.C., 2018). La fecha media de la primera helada es el 25 de mayo y la de última es el 12 de septiembre, siendo el período libre de heladas 255 días en promedio (Seiler *et al.*, 1995).

El suelo sobre el cual se realizó el ensayo está clasificado como Hapludol típico, franco arenoso muy fino, presenta relieve normal, es profundo, bien drenado, desarrollado a partir del material loésico, con baja diferenciación horizontal y características de buen suelo agrícola (Uberto, 2008). Para establecer los requerimientos de fertilización se realizó un análisis de suelo que consistió en la toma de una muestra compuesta representativa en los estratos 0-20 y 20-40 cm para analizar las propiedades físico-químicas del suelo midiendo los siguientes parámetros: pH (1:2,5 suelo/agua) (Mc Lean, 1982); Materia orgánica (Método Walkley – Black, 1934); Fósforo (Bray y Kurtz, 1945); N-NO₃ por el método de reducción de cadmio (Lambert y Dubois, 1971), y contenido de humedad.

También, previo a la siembra, se determinó el número de rizobios naturalizados por gramo de suelo mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) (Somasegaran y Hoben, 1994). Se utilizó la siguiente formula:

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

Donde:

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

d: dilución de la primera dilución considerada

v: volumen inoculado (1 ml)

n: peso del suelo (10 g)

Establecimiento de las condiciones edáficas y climáticas para el desarrollo del cultivo de *Glycine max*

Los ensayos se realizaron en el campo experimental de la universidad durante la campaña 2017-2018. Previo a la siembra, se evaluaron las propiedades físico-químicas del suelo mostrando una buena condición de fertilidad por el contenido de N disponible para el cultivo ($48,02 \text{ kg ha}^{-1}$), calculado a partir de la DAp y el Npc. En la tabla 2 se observan los resultados del análisis del suelo que se realizó previo a la siembra.

Tabla 2. Características generales del sitio experimental (2017-2018).

Propiedades	0-20 cm	20-40 cm
Materia orgánica (%)	1,4	-
Nitrógeno de nitratos (ppm)	9,22	8,97
Nitratos (ppm)	40,84	39,72
Fósforo (ppm)	17,80	-
Humedad (%)	17,44	22,92
pH	6,57	-

Los resultados obtenidos del análisis del suelo, mostraron una disponibilidad de fósforo (P) de 47 kg ha^{-1} , siendo su requerimiento de 7 kg Tn^{-1} de grano (García y Correndo, 2012). Numerosos ensayos de fertilización fosforada realizados en la región pampeana desde fines de los '70, mostraron una mayor respuesta cuando el suelo tenía menos de 9 ppm de P

(Melgar *et al.*, 1995). 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, cabe destacar que el valor hallado en el ensayo, se encuentra dentro del rango establecido (Picone, 2014). Por otra parte, se estimó la población naturalizada de rizobios nodulantes de *Glycine max* con valores de $6,9 \times 10^3$ rizobios g. suelo⁻¹. En suelos de nuestro país se ha encontrado que los rizobios autóctonos fluctúan entre 10^2 y 10^5 rizobios g. suelo⁻¹ (González *et al.*, 1997). La presencia de dichos rizobios 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 baja tasa de fijación. Los valores de población naturalizada superiores al orden de 10^3 g. suelo⁻¹, 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 la figura 1 queda representada de manera gráfica las precipitaciones y temperaturas máximas, mínimas y medias registradas en el período de evaluación del cultivo, correspondiente a partir del mes de noviembre del 2017 a mayo del 2018 (Cátedra de Agrometeorología, 2018).

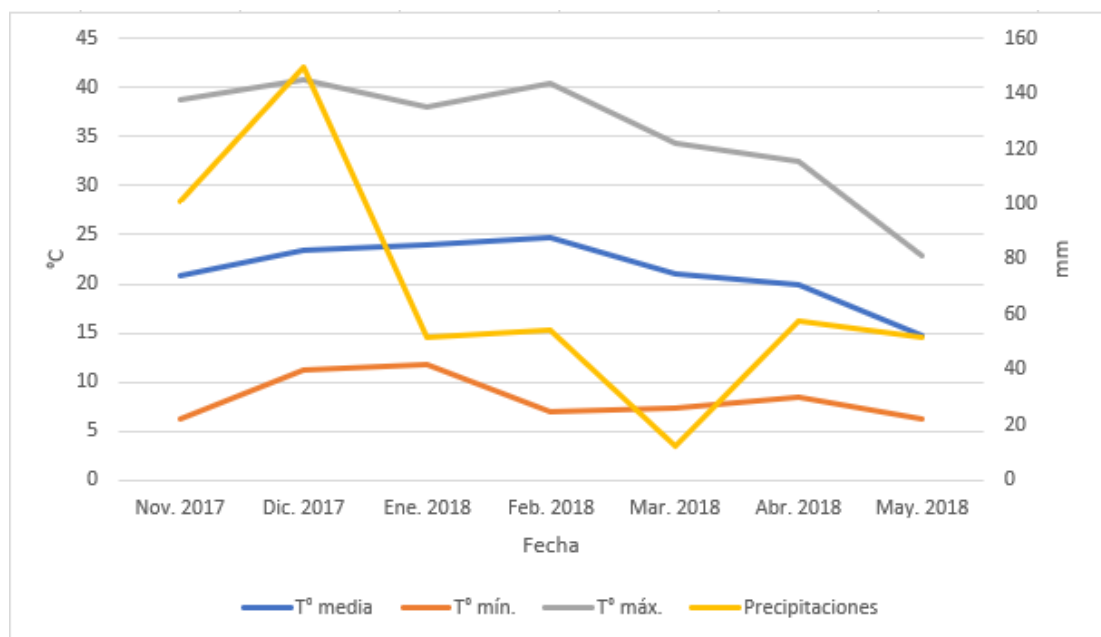


Figura 1. Precipitaciones y temperaturas registradas durante el ciclo del cultivo de *Glycine max*. Fuente: Cátedra de Agrometeorología, 2018.

Diseño experimental y tratamientos:

Se utilizó el modelo de diseño completamente al azar (DCA) con siete tratamientos. El tamaño de las parcelas fue de 15 m de largo y 5 surcos de ancho distanciados a 0,52 m, con una densidad de siembra de 24 semillas por metro lineal de surco. El sistema de labranza utilizado fue siembra directa, sobre un rastrojo de *Zea mays*, y el desarrollo fue bajo condiciones de secano. Previo a la siembra del cultivo se aplicó glifosato, en una formulación estándar líquida soluble de la sal isopropilamina a una concentración del 48% (1200 g i.a. ha⁻¹). La fecha de siembra fue el 18 de diciembre de 2017. La inoculación de las semillas de *Glycine max* se hizo al momento de la siembra, aplicando la suspensión de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium* spp. (tabla 3), para alcanzar una densidad estimada de 10⁵ células por semilla. La cosecha se realizó manualmente el día 15 de mayo de 2018.

Los tratamientos fueron:

1. Testigo sin inocular y sin fertilizar.
2. Testigo fertilizado (180 kg ha⁻¹ de urea).
3. Inoculado con *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110, fertilizado con urea.
4. Inoculado con *Bradyrhizobium* spp. Per 3.64, fertilizado con urea.
5. Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* E 109, fertilizado con urea.
6. Inoculado con *Bradyrhizobium* spp. Per 3.61, fertilizado con urea.
7. Inoculado con *Bradyrhizobium* spp. Per 1.12, fertilizado con urea.

Tabla 3. Características de las cepas de *Bradyrhizobium* spp.

<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Descripción	Referencia
USDA 110	Cepa de referencia	Belstville, USDA, Estados Unidos
E 109	Cepa de referencia	INTA CASTELAR, Argentina
Per 3.64 Per 3.61 Per 1.12	Aislamientos nativos de suelos de Pergamino	Cedida por la Dra. Leticia Fernández, UNS-Bahía Blanca

Fuente: Efectos del nitrato sobre la siombiosis *bradyrhizobium japonicum*-soja: rol de la nitrato reductasa en la fijación de nitrógeno. Bruno, 2017.

Cultivar

La variedad de *Glycine max* empleada fue NIDERA A 5009 RG (Tabla 4). Presenta gran adaptabilidad a distintas zonas, con un excelente perfil sanitario (Tabla 5) y buen potencial de rendimiento. Posee el evento RG con lo cual le confiere genes de resistencia al herbicida glifosato.

Tabla 4. Características del cultivar de *Glycine max*.

Posicionamiento	Zona núcleo sojera y ambientes de alta productividad del Centro de Córdoba, Santa Fé y Entre Ríos.
Grupo de madurez	V corto
Hábito de crecimiento	Indeterminado
Ciclo (días a R1)	49
Ciclo (días a R8)	147
Color de flor	Blanca
Color de pubescencia	Castaña oscura
Peso de 1000 semillas (gr).	200
Altura	100
Comportamiento a vuelco	Muy bueno
Ramificación	Alta
Porte	Medio

Tabla 5. Perfil sanitario del cultivar de *Glycine max*.

Cancro de tallo	R
<i>Phytophthora sojae</i>	MR
Mancha ojo de rana	MS

Determinaciones realizadas

✖En la etapa vegetativa VE (emergencia) se midió:

- **Número de plántulas emergidas**

Finalizada la emergencia del cultivo, se procedió a la medición del número de plántulas emergidas por m². Se cuantificó el total de plántulas en 1,92 metros lineales de surco, lo cual representa 1 m² de superficie, con 3 repeticiones por tratamiento.

✖En la etapa reproductiva R5, se midió:

- **Número de nódulos en raíz principal**

Se contabilizó el número de nódulos ubicados en la raíz principal sobre 4 muestras, de 4 plantas cada una, elegidas al azar por tratamiento.

- **Número de nódulos en raíces secundarias**

Se contabilizó el número de nódulos ubicados en raíces secundarias sobre 4 muestras, de 4 plantas cada una, elegidas al azar por tratamiento.

- **Peso seco de nódulos**

Se extrajeron los nódulos de raíz principal y raíces secundarias de 4 muestras, de 4 plantas cada una, elegidas al azar por tratamiento y se secaron en estufa a 70°C hasta peso constante.

- **Peso seco de biomasa vegetal aérea (g planta⁻¹)**

Se extrajo la biomasa aérea de 4 muestras, de 4 plantas cada una, elegidas al azar por tratamiento y se secaron en estufa a 70° C hasta peso constante.

×En la etapa reproductiva R8, se midió:

- **Número de vainas por planta**

Se contabilizaron el número de vainas por plantas en un total de 5 plantas elegidas al azar por tratamiento.

- **Número de granos por planta**

Se contabilizaron el número de granos por planta, en un total de 5 plantas elegidas al azar por tratamiento.

- **Peso de 1000 granos**

Se cuantificó el peso de 1000 granos en un total de 3 muestras de 1 m² por tratamiento.

- **Rendimiento**

Para la determinación del rendimiento en kg ha⁻¹, se tomaron 3 muestras de 1m² por tratamiento.

Análisis estadístico:

Una vez obtenidos los resultados de cada tratamiento con sus repeticiones, se compararon entre sí, utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y el test de DGS con un nivel de significación del 5%. El análisis estadístico se realizó usando el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de plántulas emergidas

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos por el conteo de plántulas emergidas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Anexo Tabla 2). En contra posición, Ferraris y Courerot (2014), en ensayos realizados en Colón y Pergamino, observaron que el tratamiento inoculado con la cepa E 109, presentó mayor número de plántulas emergidas.

Número de nódulos en raíz principal

El número de nódulos en raíz principal medido en la etapa fenológica R5, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre el tratamiento 1 (testigo sin inocular y sin fertilizar) y 3 (inoculado con *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110, fertilizado con urea), en relación al resto de los tratamientos (Figura 2 y Anexo Tabla 3).

Bruno (2017), obtuvo resultados diferentes en ensayos realizados en Río Cuarto. Los tratamientos USDA 110 y Per 3.61, se caracterizaron por tener mayor número de nódulos en raíz primaria. Mc Dermott y Graham (1989) informaron que, en el cultivo de *Glycine max*, 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 del desarrollo de la plántula. Estos nódulos contribuirían en mayor medida al contenido de N en la planta derivado de la FBN ya que tendrán mayor actividad entre R1 y R5, etapas en las cuales las tasas de FBN son más altas (Balatti, 2007).

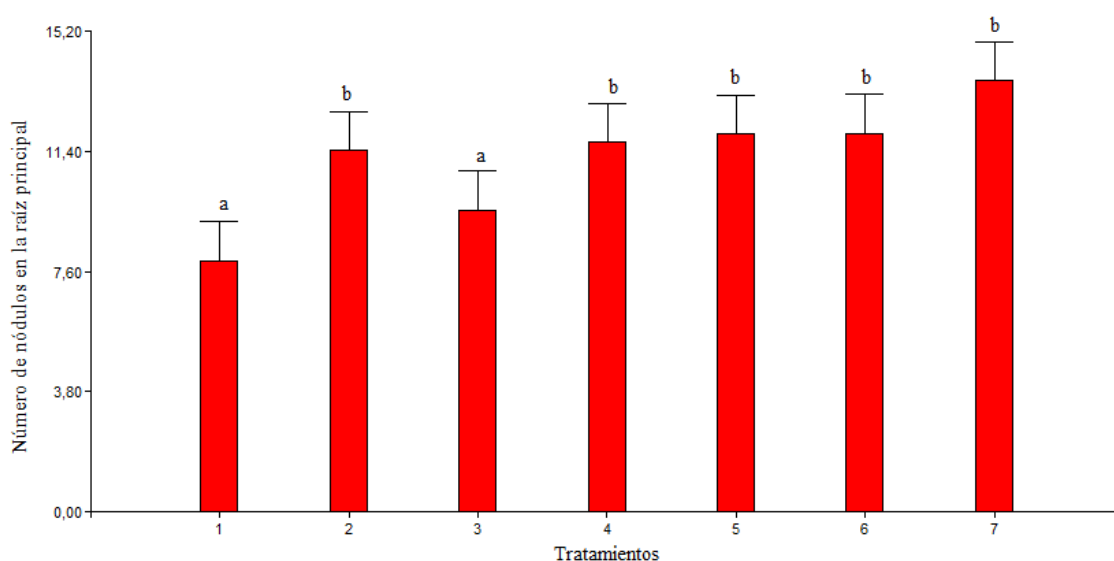


Figura 2. Comparación de medias del número de nódulos en raíz principal.

Número de nódulos en raíces secundarias

El número de nódulos en raíces secundarias evaluado en la etapa fenológica R5, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a favor del tratamiento Per 1.12 + N (tratamiento 7) (Figura 3 y Anexo Tabla 4).

Bruno (2017) observó en ensayos realizados en la localidad de Río Cuarto, que los tratamientos Per 3.61 y USDA 110, presentaron mayor número de nódulos en raíces secundarias. Mc Dermott y Graham (1989) han observado que la actividad de los nódulos ubicados en las raíces laterales tendría una mayor importancia durante el llenado de granos, cuando las tasas de FBN decrecen. Berisso (2014) en Aldea Asunción, determinó que el tratamiento inoculado con la cepa E 109 tenía el 29% más de nódulos con respecto al testigo.

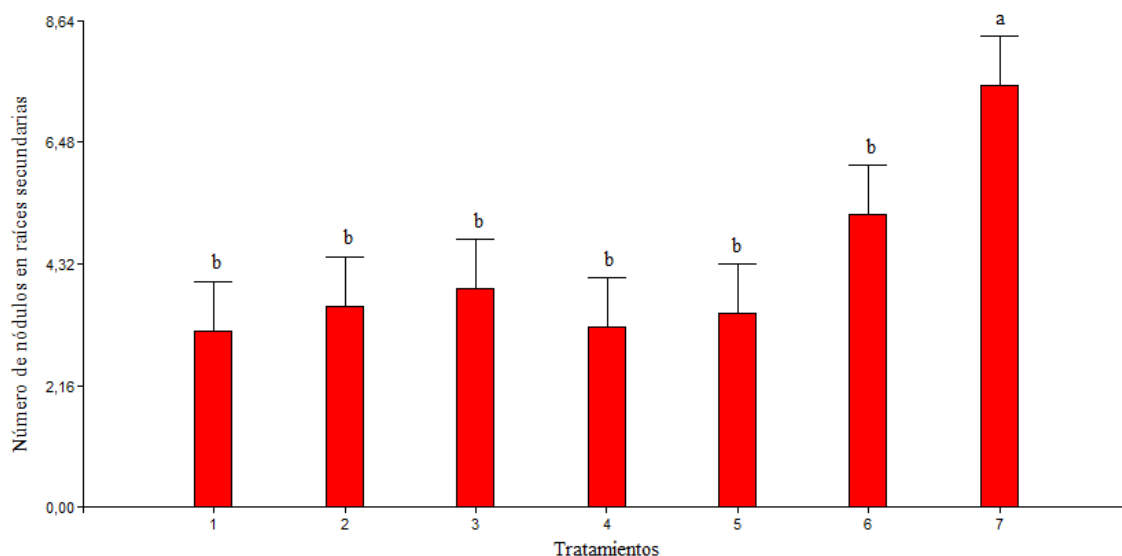


Figura 3. Comparación de medias del número de nódulos en raíces secundarias.

Peso seco de nódulos

El tratamiento testigo fue el que presentó menor peso seco de nódulos de raíz principal y raíces secundarias, determinado en la etapa fenológica R5, y el de mayor peso seco de nódulos fue el tratamiento 7 (Per 1.12+N) (Figura 4 y Anexo Tabla 5).

En ensayos realizados en la provincia de Entre Ríos, por Benintende *et al.*, (1997), se observó una gran diferencia en el peso seco de nódulos a favor del tratamiento con la cepa E 109, con respecto al testigo. Resultados semejantes también fueron observados en un ensayo a campo realizado por Toresani *et al.*, (2007), en Cañada de Gómez, en el cual el tratamiento inoculado se diferenció del testigo en un 54%. Bruno (2017) observó que el mayor peso seco

de nódulos en raíz primaria y secundarias pertenecieron al tratamiento con la cepa Per 3.61 y USDA 110.

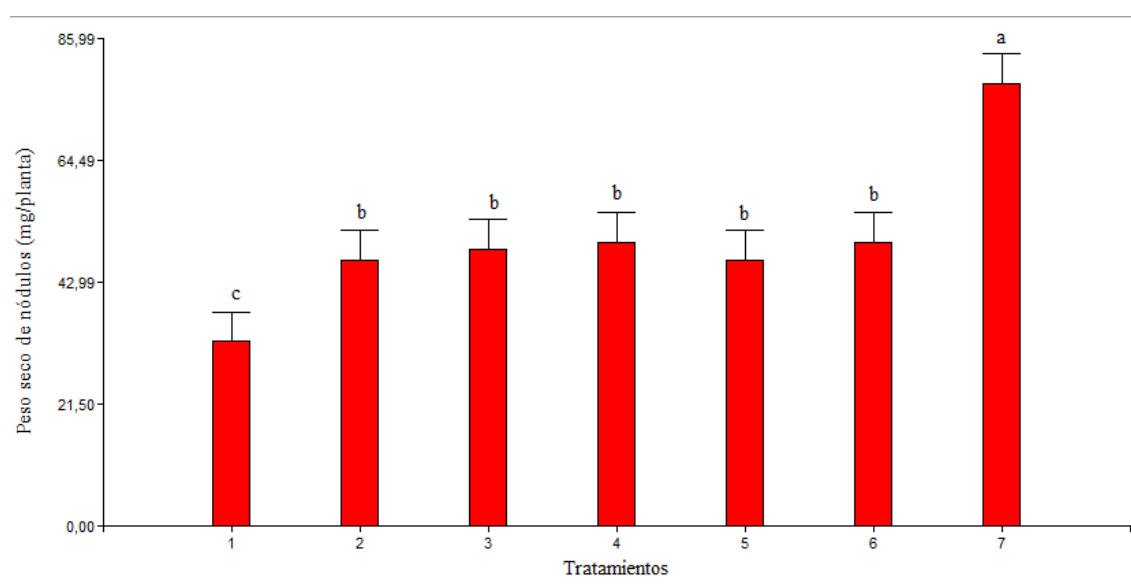


Figura 4. Comparación de medias del peso seco de nódulos.

Peso seco de biomasa aérea

En la figura 5 se observa el peso medio de biomasa aérea de cada tratamiento. En las determinaciones consideradas, los tratamientos 6 (Per 3.61 + N) y 7 (Per 1.12 + N) se caracterizaron por presentar menor peso (Anexo Tabla 6).

Veronesi (2014), trabajando en un ensayo en la localidad de Gualaguaychú, provincia de Entre Ríos, al medir la biomasa aérea en el estadio fenológico V4 del cultivo de *Glycine max*, no detectó evidencias significativas entre el tratamiento inoculado con la cepa E 109 y el testigo. Resultados semejantes fueron observados por Gonzales Fiqueni *et al.*, (2011) en un ensayo realizado en la localidad de Chacabuco bajo siembra directa, no logrando detectar diferencias significativas entre los tratamientos. En contra posición, Berisso (2014), en ensayos realizados en la localidad de Aldea Asunción (Entre Ríos), observó que el tratamiento inoculado presentó un aumento del 11% de biomasa aérea, con respecto al testigo.

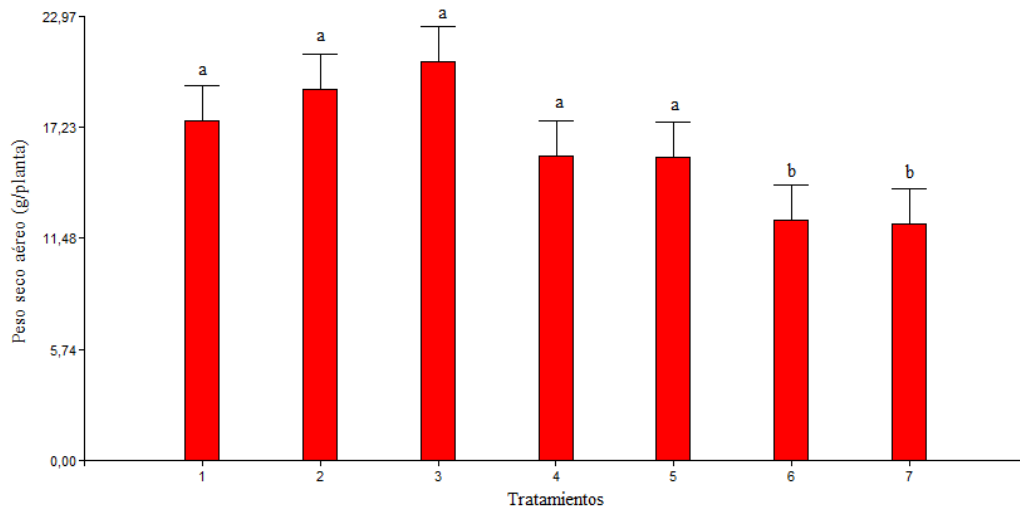


Figura 5. Comparación de medias de la biomasa aérea.

Número de vainas por planta

En la etapa fenológica R8, los tratamientos 2 (Testigo + N), 5 (E 109 + N), y 7 (Per 1.12 + N), presentaron valores superiores en el número de vainas por planta (Anexo Tabla 7). En la figura 6 se observa la comparación de medias entre los tratamientos.

Los datos evaluados en este trabajo no concuerdan con los presentados por Ventimiglia y Torrens Baudrix (2012), en un ensayo realizado en el INTA 9 de Julio, quienes no encontraron evidencias significativas en el número de vainas por planta, entre el tratamiento inoculado con la cepa E 109 y el testigo.

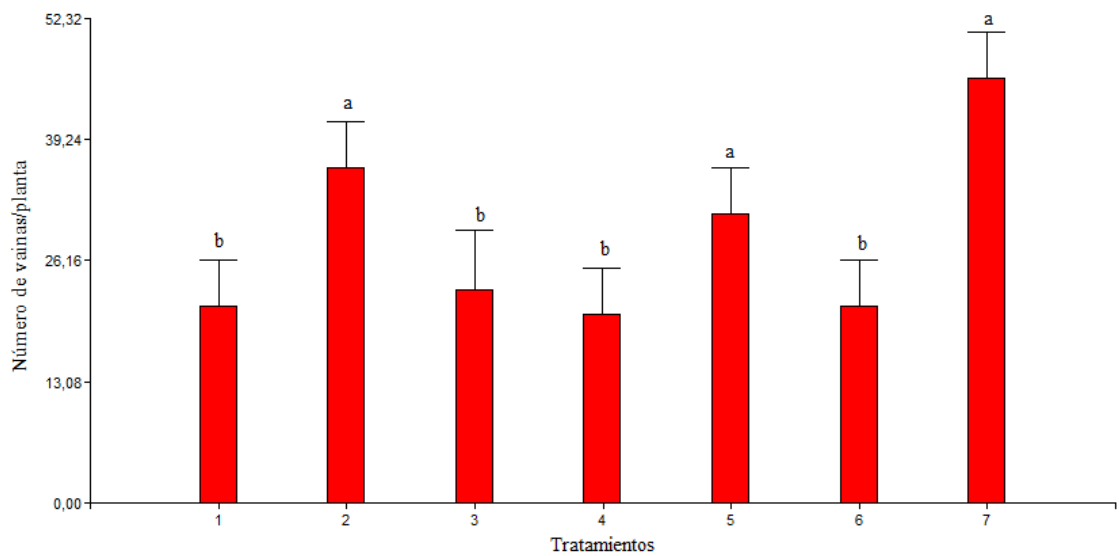


Figura 6. Comparación de medias del número de vainas por planta.

Número de granos por planta

De acuerdo al análisis de los resultados provisto por el programa estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Anexo Tabla 2). Resultados similares obtuvieron Piatti y Ferreyra (2015) en ensayos realizados en la E.E.A. Manfredi, no encontrando diferencias en el número de granos por planta, entre el tratamiento inoculado con la cepa E 109 y el testigo.

Peso de 1000 granos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Anexo Tabla 2), en el peso de 1000 granos entre los tratamientos. Resultados semejantes fueron observados en un ensayo realizado en Gualeguaychú por Veronesi (2014), no encontrando diferencias entre el tratamiento inoculado y el testigo.

Rendimiento en grano

Varios son los factores agronómicos que influyen en el rendimiento, algunos de los cuales pueden ser manejados como fecha, densidad de siembra y genotipo, entre otros, mientras que otros dependen de las condiciones del suelo (disponibilidad de nutrientes) y clima (temperatura, radiación y precipitaciones). De acuerdo a las precipitaciones y distribución de las mismas registradas durante el ciclo del cultivo, se podría destacar que éste se desarrolló en un ambiente con un marcado déficit hídrico en los primeros dos meses de su ciclo ontogénico.

Como se aprecia en la figura 7, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. El que presentó mayor rendimiento fue el 7 (Per 1.12 + N), seguidos de los tratamientos 2 (testigo + N), 3(USDA 110 + N), 4 (Per 3.64 + N) y 5 (E 109 + N), mientras que el de menor rendimiento fue el tratamiento testigo (Anexo Tabla 8).

Bruno (2017) encontró diferencias significativas en el rendimiento entre los tratamientos inoculados con diferentes cepas de *Bradyrhizobium* spp. y fertilizado con respecto al control. Por el contrario, Berisso (2014), en ensayos realizados en la localidad de Aldea Asunción, provincia de Entre Ríos, no encontró diferencias entre el tratamiento inoculado y el testigo. Resultados semejantes fueron observados por Ventimiglia y Torrens Baudrix (2012), en un ensayo realizado en el INTA 9 de Julio, campo franco arenoso, con varios años de cultivo de *Glycine max* no encontrando diferencia significativa entre los tratamientos

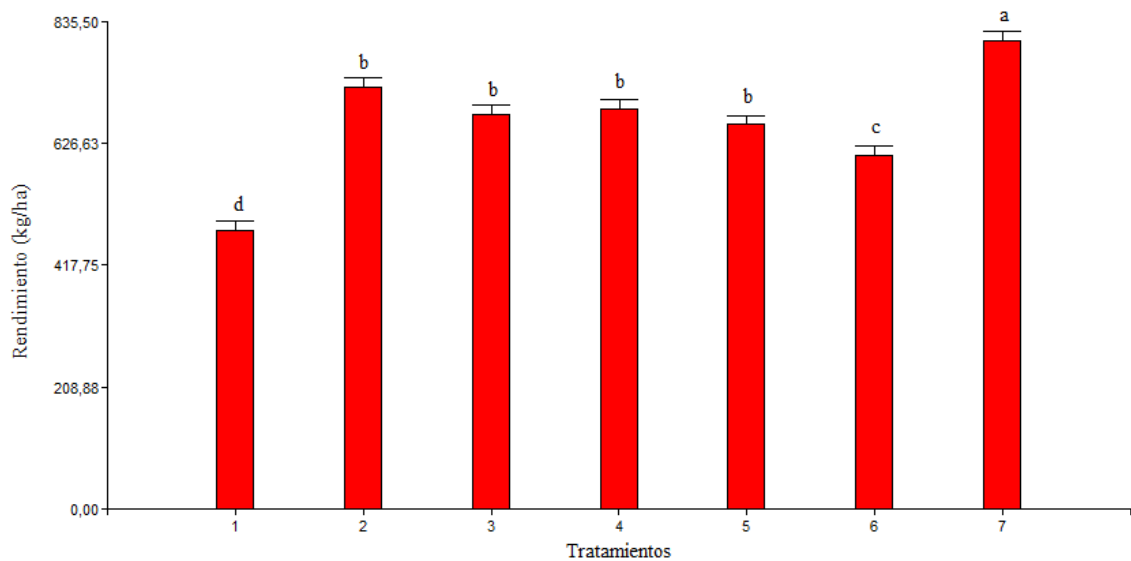


Figura 7. Comparación de medias del rendimiento en granos.

Análisis multivariado entre las variables estadísticamente significativas

Las variables analizadas fueron:

- Número de nódulos en la raíz principal (Nod. 1°)
- Peso seco de nódulos
- Peso seco aéreo
- Rendimiento

Analizando la figura 8 se observa una correlación positiva entre número de vainas por planta y rendimiento (ρ_{xy} : 0,7) (Anexo Tabla 10) y número de nódulos en raíz principal con peso de nódulos (ρ_{xy} : 0,85) (Anexo Tabla 9). Además, se observa una correlación negativa entre peso de nódulos y peso aéreo (ρ_{xy} : -0,52) (Anexo 13), y positiva con respecto al rendimiento (ρ_{xy} : 0,43) (Anexo Tabla 12).

Bruno (2017) obtuvo resultados similares, observando que el número y peso seco de nódulos se encontraban correlacionados positivamente. Además, Berisso (2014) concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. También, Benintende *et al.*, (1997) determinó que un mayor peso seco de nódulos, generaba un aumento en la producción del cultivo de *Glycine max.*

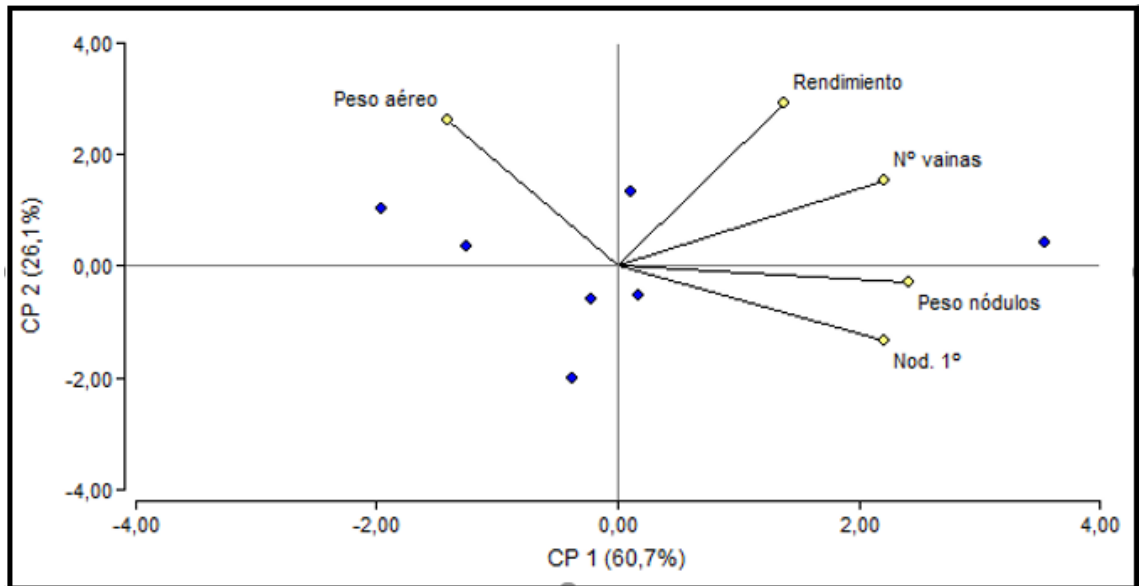


Figura 8. Análisis multivariado entre las variables estadísticamente significativas.

CONCLUSIÓN

El estrés hídrico, la temperatura y la radiación, son factores que pueden haber generado una disminución en la eficiencia de la FBN, y el crecimiento de la planta.

Por otro lado, se observó que la fertilización nitrogenada (180 kg de urea por hectárea), en las condiciones climáticas en la que se desarrolló el cultivo, no afectó de forma negativa la FBN, obteniendo mejores resultados en el tratamiento *Bradyrhizobium* spp. Per 1.12 fertilizado.

El rendimiento del cultivo de *Glycine max* inoculado con la cepa Per 1.12 fue superior a los demás tratamientos. Por lo cual se puede concluir que la cepa, caracterizada por su actividad desnitrificante, mejora la FBN en el cultivo de *Glycine max*, para lograr mayor producción, y mantener la calidad del recurso suelo.

La importancia de este trabajo radica en la necesidad de contar con herramientas que permitan obtener altos niveles productivos en el cultivo de *Glycine max* de la forma más sustentable posible. Los resultados obtenidos constituyen una evidencia empírica de la contribución que la FBN hace a la economía de la nutrición nitrogenada del cultivo de *Glycine max* en un suelo con alta fertilidad.

La inoculación es una práctica económica que colabora con la agricultura sustentable. Uno de los objetivos que persigue esta práctica, es el manejo eficiente del N. El uso exitoso del N en sistemas agropecuarios a través de la FBN resulta en prácticas económicamente viables para el medio ambiente. Sobre la base de estos antecedentes, la FBN en el cultivo de Glycine max resulta ser una herramienta muy útil para mantener una agricultura sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

- BAIGORRI, H.; A. PERTICARI; N. ARIAS; J. J. DE BATISTA; L. LETT; M. MONTECCHIA; J. C. PACHECO BASURCO; A. SIMONELLA; S. TORESANI; L. VENTIMIGLIA y R. VICENTINI. 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. En: Satorre, E. (Ed.). El Libro de la Soja. Buenos Aires: Servicios y Marketing Agropecuario. Cap. 7. p: 69-78.
- BALATTI, P. (2007). De la biología del Suelos a la Agricultura. (Thuar, A., Cassan, F., y Olmedo, C., eds). La diversidad de los rizobios que nodulan soja. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. pp:53-62.
- BENINTENDE, S.; SANCHEZ, C.; BARBABIANCA, A.; PACHECO BASURCO, J. Y PERTICARI, A. 1997. Ensayos de campo de cepas de *bradyrhizobium japonicum* de eficiente comportamiento en argiudoles verticos de entre ríos. Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos.
- BERISSO, C. E. 2014. Evaluación de inoculantes y promotores de crecimiento en un cultivo de soja en Aldea Asunción, provincia de Entre Ríos. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- BIANCO, C.A.; T.A. KRAUS y C.O. NUÑEZ. 2007. *Botánica agrícola*. 2da edición actualizada, Editorial Universidad Nacional de Río Cuarto.
- BOLSA DE CEREALES ROSARIO. 2017. En: <http://www.bcr.com.ar/default.aspx>. Consultado: 25/09/2017.
- BRAY, R., Y KURTZ, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science* 59:9-45.
- BRUNO, C. 2017. EFECTOS DEL NITRATO SOBRE LA SIOMBiosis *Bradyrhizobium japonicum*-SOJA: ROL DE LA NITRATO REDUCTASA EN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO. Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. pp: 1-4.
- CADENAZZI, G. 2009. La historia de la soja en Argentina. De los inicios al boom de los '90. En: *XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociología. VII jornadas de Sociología de la Universidad de Buenos Aires*. Asociación Latinoamericana de Sociología, Buenos Aires. Cap. 1. pp: 1-5.
- CARPENA, R., ESTEBAN, E., LUCENA, J., PEÑALOZA, J., VÁZQUEZ, S., ZORZONA, P., Y GÁRATE, A. 2006. Simbiosis y recuperación de suelos. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

- Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada. pp: 255-268.
- CÁTEDRA AGRO METEOROLIGIA, Universidad Nacional de Río Cuarto. 2018. Material Inédito.
- CHAMBER-PÉREZ, M., CAMACHO-MARTÍNEZ, M., SORIANO-NIEBLA, J. (1997). Nitrate reductase activities of *Bradyrhizobium* spp. in tropical legumes: effects of nitrate on O₂ diffusion in nodules and carbon costs of N₂ fixation. *Journal Plant Physiology* 150:92-96.
- CHEN, Z., MACKENZIE, A.F., FANOUS, M.A., 1992. Soybean nodulation and grain yield as influenced by N-fertilizer rate, plant population density and cultivar in southern Quebec. *Can. J. Plant Sci.* 72, 1049-1056.
- DELAMUTA, J.R., RIBEIRO, R.A., ORMEÑO-ORILLO, E., MELO, I.S., MARTÍNEZ-ROMERO, E., HUNGRIA, M., 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 9), pp.3342–3351.
- DELGADO, M., CASELLA, S., Y BEDMAR, E. (2007). Denitrification in rhizobia-legume symbiosis. Bothe H, Ferguson S. J; Newton WE (eds). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier. The Netherlands. pp:83-93.
- DIAZ ZORITA, M., R BALIÑA Y M. FERNÁNDEZ CANIGIA. 2004. Inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en cultivos de soja. En: campaña 2003-04. Resumen de resultados de investigación y desarrollo aplicado. Nitragin Argentina S.A. p:7-12.
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. BALZARINI, L. GONZALES, M. TABLADA, C. ROBELADO. 2013. Infostatversión . Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>. Consultado:01/10/2017.
- FEHR, W., Y CAVINESS, C. (1977). Stages of soybean development. Economics Experiment Station-Iowa State University. Ames, Iowa. Special Report. Agriculture and Environment Extension Publications. *Agriculture and Natural Resources* 80:11.
- FERNÁNDEZ, L., PEROTTI, E., SAGARDOY, M., Y GÓMEZ, M. (2008). Denitrification activity of *Bradyrhizobium* sp. isolated from argentine soybean cultivated soils. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24:2577-2585
- FERRARIS, G., Y COUREROT, L. 2014. Respuesta de la soja a la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en lotes con antecedentes de soja previa. Publicado por la estación experimental INTA Pergamino.
- FERRARIS, G. N. 2016. Fertilización del cultivo de soja. Publicado por la estación experimental INTA Pergamino.

- GARCÍA, F., Y CORRENDO, A. (2012). Cálculo de requerimientos nutricionales. IPNI. Programa Latinoamérica. Cono Sur. <http://lacs.ipni.net/article/LACS-2014>.
- GONZÁLEZ FIQUENI, M. F., S. DURMAN, E. MORETTI, I. PUEYO, M. VACCA Y T. BOSCO. 2011. Mercosoja. Co-inoculación en soja: efecto sobre la nodulación, crecimiento y rendimiento.
- GONZÁLEZ, N.; PERTICARI, A.; STEGMAN, B. Y RODRÍGUEZ CÁCERES E. 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- EEA. p. 188- 198.
- GONZÁLEZ, N. 2006. Fijación de nitrógeno en soja. 3º Congreso de Soja del Mercosur, Workshop de Fijación Biológica de nitrógeno. Rosario. p.335.
- GRAHAM, P.H., 2008. Ecology of root-nodule bacteria of legumes. In W. E. Dilworth, M.J. James, E.K., Sprent, J.I., Newton, ed. Nitrogenfixing. Leguminous Symbioses. p. 419.
- GUTIÉRREZ-BOEM, F., Y SALVAGIOTTI, F. 2014. Soja. Capítulo 16. *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivo*. (Echevarría, H., Y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp: 479-508.
- LAMBERT, R., Y DUBOIS, R. (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), pp.261–273.
- MASGRAU, A. 2006. Ensayo de fertilización con Cobalto y Molibdeno en soja. AAPRESID. ATR regional Monte Cristo.
- MC DERMOTT, T., Y GRAHAM, P. (1989). *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Applied Environmental Microbiology* 55: 2493-2498.
- MC LEAN, E. (1982). Soil pH and lime requirement. In *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition.* Page AL (ed) American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA
- MELGAR, R., E. FRUTOS, M.L. GALETTO, H. VIVAS. 1995. El análisis de suelos como predictor de la respuesta de la soja a la fertilización fosfatada. En: AIANBA, 1er Congreso Nacional de Soja y 2da Reunión Nacional de Oleaginosas, Pergamino (Bs.As., Argentina), I:167-174.
- MIRANSARI, M. (2016). Soybean production and N fertilization. Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production. *Soybean Production*. pp:241-260.
- MONZA, J., Y PALACIOS, J. (2004). El Metabolismo del Nitrógeno en las plantas. Fijación Biológica de Nitrógeno en la simbiosis rizobio -leguminosa. (Monza, J., y Márquez, A. eds.). Córdoba, Almuzara. pp:15-38.

- MULIN, E. y K. ALVAREZ. 2004. El gran libro de la siembra directa. Editorial Facultad de Agronomía. UBA. pp 142-147.
- MUÑOZ, S. A. 2011. Efectos de la fertilización foliar sobre la nodulación y componentes del rendimiento en el cultivo de soja. Tesis para optar al grado de Ing. Agrónomo. Fac. de Agronomía y Veterinaria, Universidad nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- OHLROGGE, R. Y E. KAMPRATH., 1968. Fertilizer use in soybeans. En Nelson L.B.(ed) Changing pattern in fertilizer use. Soil Science Society of America, Madison, WI. P: 273-295.
- PERTICARI A., PUENTE M, ECHEGARAY R & PICCINETTI C. (2007) Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica de nitrógeno. De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, AM, Cassan, f. D, & Olmedo, CA, eds), pp. 277–291. Río Cuarto.
- PIATTI, F. Y L. FERREYRA., 2015. Evaluación de rendimiento al usar diferentes inoculantes y fungicidas en semillas de soja. Publicado por la estación experimental INTA Manfredi.
- PICONE, L. (2014). El ambiente físico-químico del suelo relacionado con la fertilidad. Capítulo 1. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. (Echeverría, H., y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp:3151.
- SAGPyA. 2009. Estimaciones Agrícolas Mensuales. En: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>. Consultado: 28/09/2017.
- SALVAGIOTTI, F., CASSMAN, K., SPECHT, J., WALTERS, D., WEISS, A., DOBERMANN, A., 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. *Field Crops Res.* 108, 1-13.
- SALVAGIOTTI, F., J. CAPURRO, JM. ENRICO. 2009. El manejo de la nutrición nitrogenada en soja, para mejorar la producción. INTA EEA Oliveros, No. 42:45-51.
- SATORRE, E. H., R. L. BENECH ARNOLD, G. A. SLAFER, E. B. DE LA FUENTE, D. J. MIRALLES, M. E. OTEGUI y R. SAVIN. 2010. *Producción de Granos, Bases funcionales para su manejo*. 2da reimpresión. Ed Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 783p.
- SEILER, R., FABRICIUS, R., ROTONDO, V., VINOCUR, M., Y BONACCI, B. (1995). *Agroclimatología de Río Cuarto 1974/1993*. Volumen: 1. Cátedra de Agrometeorología- Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.
- SOMASEGARAN, P., Y HOBEN, H. (1994). *Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer-Verlag. New York. Inc. Sección III. pp:382.
- SYLVESTRE BEGNIS, A. y A. BIANCHINI 2004. Respuestas productivas a la inoculación y su interacción con la fertilidad química en el cultivo de soja en siembra directa. *Revista Técnica AAPRESID*, octubre 2004. p: 79-81. Tesis fertilización foliar.

- TONIUTTI, M.; E. ASTEGIANO y L. FORNASERO 2004. Respuesta al cultivo de soja a la inoculación con *Bradyrhizobium* en lotes de alta productividad en la región central de Santa Fe. Revista Técnica AAPRESID, octubre 2004. p: 82-86.
- TORESANI, S., BODRERO, M., Y ENRICO, J. (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. Año VII-Nº 11. pp: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. pp:123.
- VENTIMIGLIA, L. Y L. TORRENS BAUDRIX. 2012. Inoculación en soja: Dosis de inoculante y complementación de *Bradyrhizobium* con PGPR. Agromercado. 171:14-15.
- VERONESI, M. (2014). Evaluación de inoculantes y promotores de crecimiento en un cultivo de soja en Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos. Trabajo final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- WALKLEY A. Y BLACK A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37:29-38.
- WERNER, D. (1992). Rhizobium-legumesymbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63:968-989.

ANEXO

1: Prueba de homogeneidad de varianzas

		Suma de cuadrados	gl1	CM	F	Sig.
N.º de plántulas emergidas	Modelo	34,67	7	4,95	1,45	0,2537
	Total	89,33	23			
N.º de nódulos en raíz principal	Modelo	65,99	7	9,43	0,9	0,5054
	Total	1316,51	127			
Peso seco de nódulos	Modelo	1,2E-03	7	1,7E-04	1,09	0,3709
	Total	0,02	127			
Peso seco de biomasa aérea (g planta ⁻¹).	Modelo	0,13	6	0,02	1,92	0,0846
	Total	1,31	111			
N.º de vainas por planta	Modelo	915,29	7	130,76	2,41	0,0421
	Total	2650,04	39			
N.º de granos por planta	Modelo	3142,78	7	448,97	2,46	0,0385
	Total	8975,2	39			
Peso de 1.000 granos	Modelo	41,22	6	6,87	0,72	0,6426
	Total	175,38	20			
Rendimiento	Modelo	180,95	6	30,16	0,13	0,9899
	Total	3382,95	20			

2: ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	CM	F	Sig.
N.º de plántulas emergidas	Modelo	104,96	7	14,99	1,09	0,4139
	Total	324,96	23			
N.º de nódulos en raíz principal	Modelo	327,39	6	54,56	2,26	0,0435
	Total	2817,05	109			
N.º de nódulos en raíces secundarias	Modelo	241,71	6	40,29	3,27	0,0055
	Total	1535,96	111			
Peso seco de nódulos	Modelo	16993,90	6	2832,32	6,38	<0,0001
	Total	63196,40	110			
Peso seco de biomasa aérea (g planta ⁻¹).	Modelo	972,33	6	162,06	3,02	0,0093
	Total	6615,21	111			
N.º de vainas por planta	Modelo	2900,08	6	483,35	3,97	0,0057
	Total	6188,03	33			
N.º de granos por planta	Modelo	7060,9	6	1176,82	2,02	0,0981
	Total	22814,5	33			
Peso de 1.000 granos	Modelo	361,64	6	60,27	1,92	0,1467
	Total	800,14	20			
Rendimiento	Modelo	183612,67	6	30602,11	39,21	<0,0001
	Total	194538,67	20			

3: DGC número de nódulos en raíz principal

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=3,3888

Error: 24,1715 gl: 103

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	7,94	16	1,23	A
3	9,53	15	1,27	A
2	11,44	16	1,23	B
6	11,69	16	1,23	B
5	11,93	15	1,27	B
4	11,94	16	1,23	B
7	13,63	16	1,23	B

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

4: DGC número de nódulos en raíces secundarias

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,5559

Error: 12,3262 gl: 105

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
7	7,50	16	0,88	A
3	5,19	16	0,88	B
6	3,88	16	0,88	B
2	3,56	16	0,88	B
5	3,44	16	0,88	B
4	3,19	16	0,88	B
1	3,13	16	0,88	B

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

5: DGC peso seco de nódulos

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=15,3443

Error: 444,2548 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
7	78,00	15	5,44	A
4	50,00	16	5,27	B
5	50,00	16	5,27	B
3	48,75	16	5,27	B
6	46,88	16	5,27	B
2	46,88	16	5,27	B
1	32,50	16	5,27	C

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

6: DGC peso seco aéreo

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=5,3369

Error: 53,7417 gl: 105

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
2	20,63	16	1,83	A
3	19,19	16	1,83	A
1	17,58	16	1,83	A
4	15,76	16	1,83	A
5	15,66	16	1,83	A
6	12,44	16	1,83	B
7	12,24	16	1,83	B

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

7: DGC número de vainas por planta

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=15,1557

Error: 121,7759 gl: 27

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
7,00	45,80	5	4,94	A
2,00	36,20	5	4,94	A
5,00	31,20	5	4,94	A
3,00	21,25	4	5,52	B
4,00	21,20	5	4,94	B
1,00	21,20	5	4,94	B
6,00	20,40	5	4,94	B

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

8: DGC rendimiento

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=53,2094

Error: 780,4286 gl: 14

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
7	802,33	3	16,13	A
2	722,67	3	16,13	B
4	685,67	3	16,13	B
3	675,67	3	16,13	B
5	659,00	3	16,13	B
6	606,33	3	16,13	C
1	477,67	3	16,13	D

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

9: Análisis de correlación entre número de nódulos en raíz principal y peso de los mismos

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Nod. 1°	Peso nódulos
Nod. 1°	1,00	0,02
Peso nódulos	0,85	1,00

10: Correlación entre número de vainas por planta y rendimiento

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	N° vainas	Rendimiento
N° vainas	1,00	0,08
Rendimiento	0,70	1,00

11: Correlación entre peso de nódulos y número de vainas

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Peso nódulos	N° vainas
Peso nódulos	1,00	0,04
N° vainas	0,77	1,00

12: Correlación entre peso de nódulos y rendimiento

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Peso nódulos	Rendimiento
Peso nódulos	1,00	0,34
Rendimiento	0,43	1,00

13: Correlación entre peso de nódulos y peso seco aéreo

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Peso nódulos	Peso aéreo
Peso nódulos	1,00	0,23
Peso aéreo	-0,52	1,00