



Facultad de
Ciencias Agrarias
y Forestales

Carrera Agronomía

MICROBIOLOGIA AGRICOLA

TRABAJO FINAL DE CARRERA

RESPUESTA DEL CULTIVO DE SOJA A LA INOCULACIÓN CON DOS AISLADOS DE *B. JAPONICUM* CON ALTO POTENCIAL DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

ALUMNO: Matías Alberto Marchesotti

LEGAJO: 27777/0

DNI: 38.861.224

EMAIL: matiasmarchesotti@hotmail.com

TEL: 2345-660432

DIRECTOR: Lic. Virginia Martínez Alcántara

CO-DIRECTOR: Pedro A. Balatti

2021

INDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	El cultivo de soja en la Argentina.....	2
2.2	Morfología, fenología y requerimientos del cultivo.....	6
2.3	Fertilidad en el cultivo de soja.....	9
2.4	Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) en el cultivo de soja.....	9
2.4.1	La formación de nódulos.....	10
2.4.2	Factores que influyen en la Fijación Biológica del Nitrógeno.....	13
2.5	Inoculación del cultivo de soja.....	18
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	20
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1	Sitio del ensayo.....	21
4.2	Material biológico y preparación de inoculantes.....	22
4.3	Inoculación y siembra.....	22
4.4	Evaluación del efecto de la inoculación.....	25
4.5	Análisis estadístico.....	25
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6	CONCLUSIONES.....	28
7	REFERENCIAS.....	29
8	ANEXO 1. REPORTE INFOSTAT ANOVA. TEST DE TUKEY.....	36

1 RESUMEN

La soja (*Glycine max* [L.] Merr), pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae) y su importancia a nivel mundial, radica en la riqueza proteica y el contenido nutricional que tiene la semilla, siendo la Argentina el tercer país productor de grano. La soja es una planta que tiene una alta demanda de Nitrógeno (N) que es provista por el N del suelo y por las bacterias fijadoras del N atmosférico que tienen la capacidad asociarse con la soja. Si bien se conocen otras especies bacterianas que también establecen simbiosis con la soja, *Bradyrhizobium japonicum* es el simbiote por excelencia y, en la Argentina, la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum* es la recomendada para la fabricación de inoculantes comerciales. En estudios previos se demostró que los aislados 163 y el 366, que se obtuvieron a partir de suelos cultivados con soja en la Argentina fijan nitrógeno eficientemente en ensayos in vitro, en comparación con la cepa inoculante comercial *B. japonicum* E109. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación en el cultivo de soja, en condiciones de campo, con los aislados de *B. japonicum* E163 y E366. El ensayo se realizó en el partido de 25 de Mayo, Provincia de Buenos Aires y se determinó la nodulación y el rendimiento. Los suelos en los que se realizó el ensayo presentaron una población competitiva y eficiente fijadora de N. El número de nódulos, de los tratamientos inoculados con E109, E163 y E366 fueron estadísticamente diferentes, el aislado E109 produjo un mayor número de nódulos que E163 y que E366 que tuvo la menor cantidad de nódulos. Si bien hubo una tendencia a que las plantas inoculadas con E109 y con E163 rindan más que las inoculadas con E366, estos rindes no fueron distintos.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 El cultivo de soja en la Argentina.

La soja (*Glycine max* [L.] Merr), pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae), sub-familia Papilionoidea originaria del continente asiático (Qiu & Chang, 2010). Esta es la segunda familia en importancia de las plantas con flor que incluye aproximadamente unas 20.000 especies (Peix et al., 2015). Un porcentaje importante de ellas establece, con bacterias Gram (-) del suelo conocidas como rizobios, una asociación simbiótica por medio de la cual las bacterias fijan el N atmosférico y se lo entregan a la planta. Este proceso, denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN), se lleva a cabo en los nódulos que se desarrollan en la raíz de la planta como resultado de su interacción con los rizobios.

La importancia a nivel mundial del cultivo de la soja, radica en la riqueza proteica y el contenido nutricional que tiene la semilla (Ridner, 2006). El grano de soja posee una composición química única, y por ello se encuentra entre los cultivos alimenticios con alta calidad nutricional. Tiene un alto contenido proteico (40%) y de aceite (20%), por lo que los principales productos de la soja, son la harina con un alto tenor proteico y el aceite (Hayes, 2000). Estas cualidades nutricionales sumadas a la capacidad de adaptación a diferentes condiciones agroecológicas, han hecho que el cultivo de soja se extienda por todo el mundo y que tenga una posición privilegiada como uno de los commodities de mayor valor (SAGPyA, 2019). De acuerdo al Informe Soja, campañas 2019-2020 (MAGyP, 2020) en la Argentina, las semillas de este cultivo se procesan para obtener aceites para el consumo humano y harinas, que constituyen un ingrediente básico en la formulación de los compuestos con los que se alimenta a la ganadería industrializada. Dentro del contexto latinoamericano, el cultivo de la soja se concentra en Argentina, Brasil y Paraguay, y aunque es originaria del sudeste asiático, los tres países mencionados y Estados Unidos absorben más de las tres cuartas partes de la producción mundial, más del 75% (MAGyP, 2020).

Según Lacelli e Ybran (2016), entre los principales países productores al año 2016 se encontraban: Estados Unidos, Brasil y la Argentina. En este escenario mundial, la Argentina se ubica como el tercer país productor de grano (Figura 1).

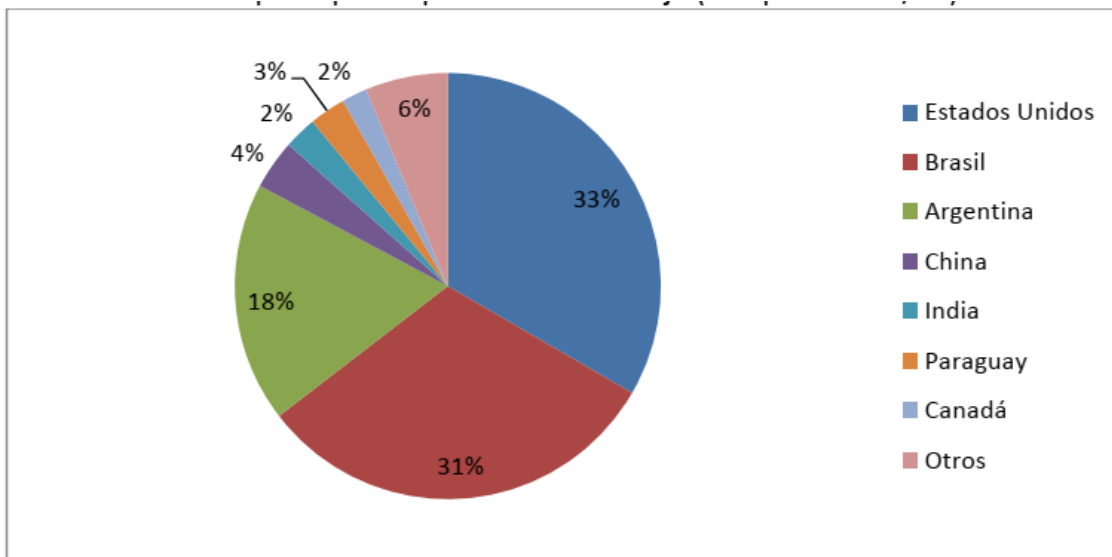


Figura1. Principales países productores de soja (campaña 2015/16). Lacelli e Ybran, 2016.

En el año 2019, en la Argentina se cosecharon 58,5 mill. tn. en una superficie sembrada de 19,5 mill. de hectáreas distribuidas en zonas con diferentes características climáticas y de suelo (Figura 2), siendo el primer exportador de aceite y de harina con un 30% y 27% de participación en el mercado mundial respectivamente (SAGPyA, 2019).

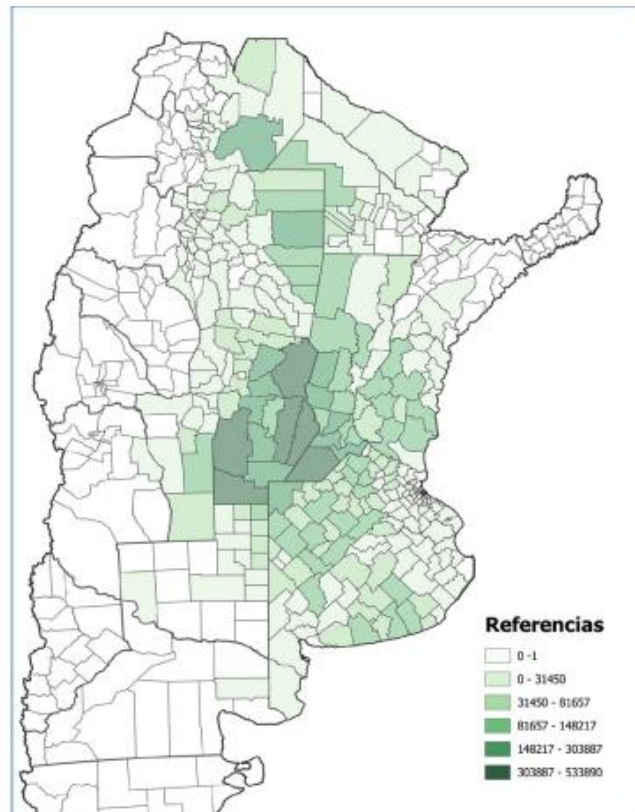


Figura 2. Distribución geográfica de la superficie informada por departamentos Campaña 2019 - 2020. Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Semillas (INASE). Sistema de Información Simplificado Agrícola SISA. Informe Soja 2019-2020.

La siguiente Figura, muestra la relación existente entre la superficie sembrada por provincia y su porcentual sobre la superficie total en la campaña 2019/2020, siendo las principales provincias: Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe (MAGyP, 2020).

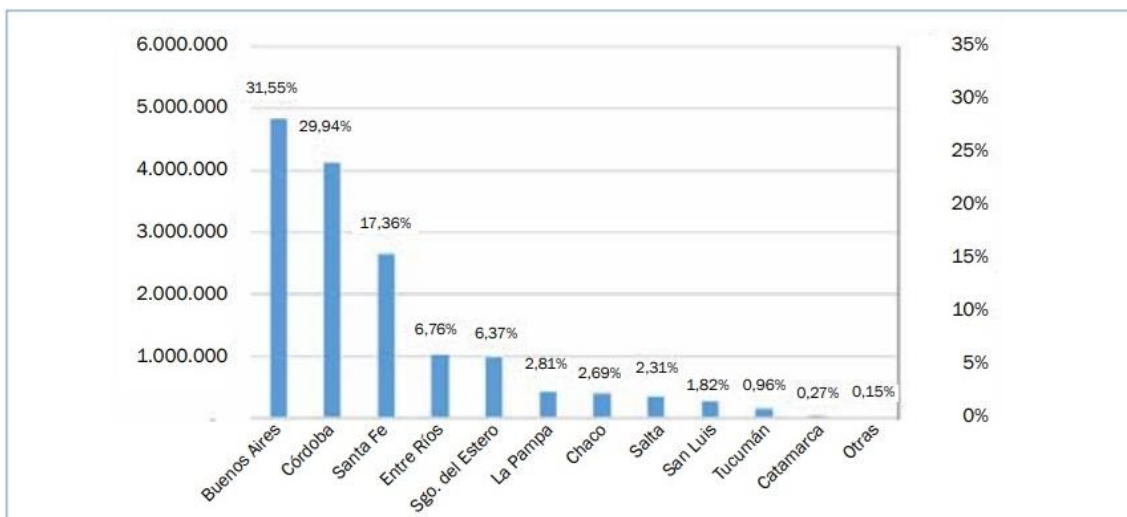


Figura 3. Superficie Sembrada por Provincia y su porcentaje sobre la superficie total Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Semillas (INASE). Sistema de Información Simplificado Agrícola SISA. Informe Soja 2019-2020.

En el país, casi el 90% de la superficie cultivada con soja se realiza bajo siembra directa (Aapresid, 2019), manejo que se ha incrementado notablemente en los últimos años (Figura 4).

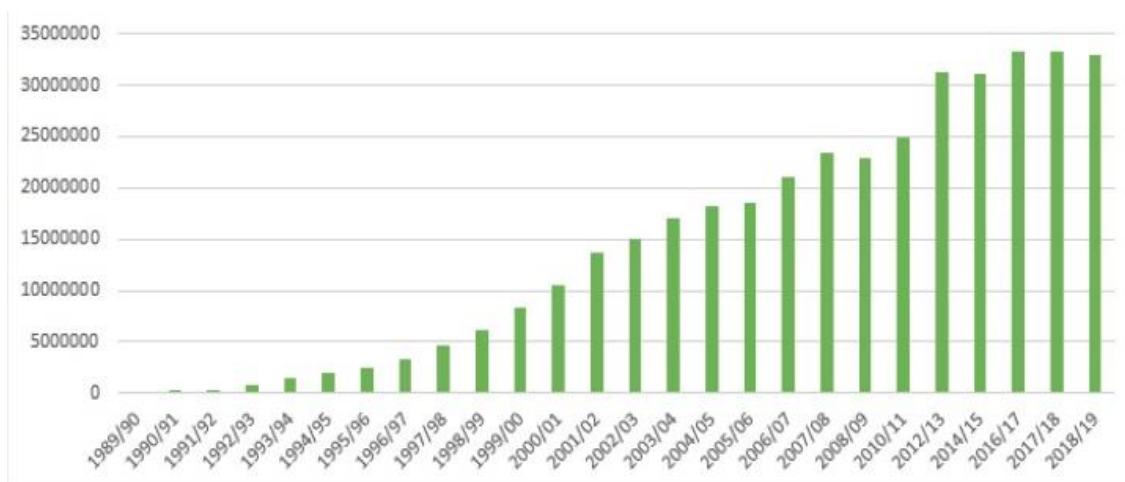


Figura 4: Evolución de la superficie en Siembra Directa Campañas 1989/90 a 2018/19(hectáreas). Fuente: Informe de evolución de siembra directa en Argentina Campaña 2018/2019

Este aumento sostenido se puede explicar, al menos en parte, a las diferencias de productividad, los rendimientos de los cultivos y beneficios económicos frente a los conducidos bajo labranzas tradicionales. La siembra directa se basa en la implantación del cultivo sin arar el suelo y con la presencia de una cobertura permanente del suelo con residuos de cosecha (INTA EEA Manfredi, 2011), además se hace con una sembradora, que deposita la semilla y los fertilizantes en una sola pasada y permite el empleo de menos mano de obra y el uso de menos combustible (MAGyP, 2020).

2.2 Morfología, fenología y requerimientos del cultivo

La soja es un cultivo anual, de ciclo primavera-estival posee un porte erecto y puede alcanzar una altura que varía entre 0,2 m y 1,5 m, presenta pubescencia en las vainas, tallos y hojas se encuentran cubiertas por finos pelos marrones o grises. El sistema radical es pivotante y la raíz principal puede alcanzar hasta un metro de profundidad, aunque lo normal es que no sobrepase los 40-50 cm (Ritchie y Benson, 1999). Las hojas, son trifoliadas y los folíolos son de 6-15 cm de longitud y de 2-7 cm de ancho; éstas movilizan los nutrientes antes de caer, lo que ocurre antes de que el grano alcance la madurez. Las flores son grandes, inconspicuas, autógamas y desarrollan en la axila de las hojas, suelen ser de color púrpura, blancas o rosas. El fruto es una legumbre, que habitualmente desarrollan en grupos de 3 a 5 y contienen entre 2 y 4 semillas (CREA, 1997) (**Figura 5**).

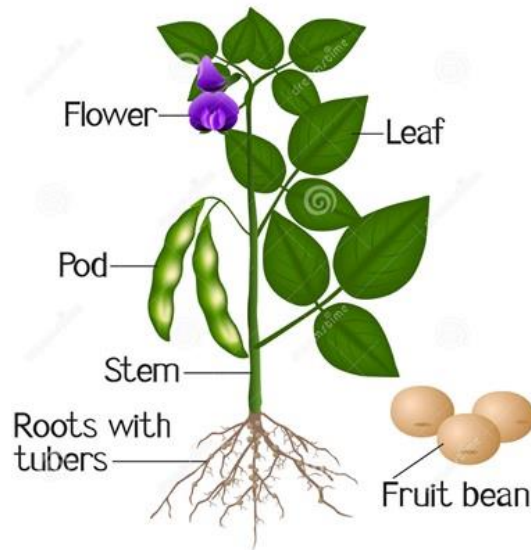


Figura 5: morfología de la planta de soja. Fuente: <https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-un-ejemplo-que-muestra-partes-de-una-planta-de-soja-image97060107>

Se distinguen dos etapas principales en los estadios fenológicos externos del cultivo de soja (Figura 6); una que describe los estados vegetativos (V) y la otra los reproductivos (R) (Fehr et al., 1971).



Figura 6: Escala de Fehr y Caviness, 1971

En nuestro país la soja se cultiva desde Salta con cultivares de ciclo largo (Grupo VI VII VIII) con requerimientos en horas de oscuridad mayores, umbral fotoperiódico más bajo y mayor sensibilidad fotoperiódica; pasando por las provincias centrales del país con requerimientos intermedios hasta el sur de la provincia de Buenos Aires con cultivares de ciclos cortos (Grupo III IV) con requerimientos menores en horas de oscuridad, umbral fotoperiódico más alto y menor sensibilidad fotoperiódica. Esta amplia distribución geográfica del cultivo se debe a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones y a la existencia de una amplia gama de cultivares, los cuales se diferencian básicamente en su comportamiento fenológico (Rizzo, 2011). El patrón de desarrollo fenológico es un indicador de la adaptación de los cultivos al ambiente y, su reconocimiento permite comprender el efecto de los factores ambientales sobre el control del desarrollo (Hanway, 1999).

Las variedades de soja se clasifican por su hábito de crecimiento (forma y estructura) y por los requerimientos térmicos y fotoperiódicos que desencadenan el desarrollo reproductivo (Ritchie y Benson, 1999). El tipo indeterminado se caracteriza porque el cultivo pasa del estado vegetativo al estado reproductivo gradualmente. Es decir, se superponen la diferenciación y el crecimiento de estructuras vegetativas (ramificaciones y hojas) y reproductivas (flores y vainas) en una misma planta. Si bien en el cultivo de la soja siempre se superponen al menos parcialmente el período vegetativo con el período reproductivo, los materiales determinados se caracterizan porque la floración se inicia una vez que el crecimiento vegetativo ha finalizado.

La variable ambiental de importancia que afecta la duración de una fase de desarrollo y en especial la iniciación floral, es la longitud del día o fotoperíodo (Ritchie y Benson, 1999). La soja es una especie de días cortos, puesto que la floración tiende a atrasarse cuando la longitud del día es mayor que el fotoperíodo denominado crítico. La clasificación de los grupos de soja por madurez se basa en la capacidad de una variedad para utilizar el ciclo de crecimiento de una región en forma eficiente. Se

distinguen 12 grupos de madurez que van del 00 hasta el X. Los cultivares 00 son insensibles al fotoperiodo y su ciclo de vida es corto y, en la medida que el número de los grupos aumenta, se incrementa la sensibilidad de los cultivares al fotoperíodo. Los grupos 00 y 0 tienen ciclos de crecimiento muy cortos y se adaptan a altas latitudes, son de crecimiento determinado y de pequeño porte. Los cultivares de grupos VI, VII, VIII o IX son de un ciclo de vida muy largo, se adaptan a bajas latitudes, son de crecimiento indeterminado y tienen un gran porte (Ritchie y Benson, 1999).

2.3 Fertilidad en el cultivo de soja

Actualmente la utilización de fertilizantes es una práctica común y adoptada por los productores argentinos, en el cultivo de soja. El principal fertilizante utilizado en la producción de soja es el superfosfato simple (SPS) aplicado en el momento de la siembra, que aporta P (fósforo), S (azufre) y Ca (calcio) al cultivo y se aplica en dosis que oscilan entre 50 y 100 kg por ha (Galarza, 2000). El nitrógeno (N), es junto con el fósforo (P) el elemento clave para el crecimiento de los cultivos, por lo cual cuando se producen deficiencias de este elemento, se ven afectados los rendimientos.

La soja es una planta que tiene una alta demanda de N que además se hace aún más importante durante el periodo reproductivo, lo que está ligado a la demanda de N de los granos que se encuentran creciendo (Galarza, 2000), con requerimientos que oscilan entre 60 y 80 kg de N por tonelada de grano (Andrade et al., 1996; EMBRAPA, 1993; Ferraris 2001; García, 2000; González, 2000; Scheiner et al., 1999). Esta demanda es provista por el N del suelo y por la capacidad de la soja de asociarse a bacterias fijadoras del N atmosférico (Racca, 2002).

2.4 Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) en el cultivo de soja.

La soja tiene una importante demanda de nutrientes comparado con otros cultivos (Yamada, 1999), siendo el nitrógeno (N) el elemento que la planta requiere en mayor cantidad y que limita el rendimiento de los cultivos (Sinavimo - MAGyP, 2012). Si bien

los nitratos del suelo que proviene de la mineralización del N orgánico que lleva a cabo la microflora del suelo son una relevante fuente de N del elemento (García, 1996), otra de similar importancia es la fijación biológica del N, que es el resultado de la capacidad de la soja de establecer simbiosis con bacterias Gram (-) del suelo conocidas como rizobios, una simbiosis que fija el N atmosférico en un proceso conocido como Fijación Biológica de N₂ (Kumudini, 2010). En el caso de la soja, el simbionte ampliamente distribuido es *Bradyrhizobium japonicum*, si bien se conocen otras especies que también establecen simbiosis con la soja como: *Bradyrhizobium elkanii*, *Sinorhizobium (Ensifer) fredii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Sinorhizobium xinjiangense*, y *Mesorhizobium tianshanense*.

Como resultado de la interacción entre los rizobios y la planta, los microorganismos inducen en la raíz la formación de estructuras conocidas como nódulos, dentro de los cuales el N es reducido a amonio, que luego es incorporado a cadenas carbonadas y transportado como amidas o ureidos en el citoplasma de las células de la raíz de la planta. En esta simbiosis se producen beneficios mutuos ya que las bacterias proveen de N a plantas, en tanto que las bacterias, reciben de las plantas la energía, es decir las sustancias carbonadas necesarias para realizar sus funciones (De Felipe Antón, 2009).

2.4.1 La formación de nódulos.

El proceso de nodulación abarca una serie de eventos de reconocimiento que ocurren entre la planta y la bacteria que hacen a la interacción específica (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Este proceso, no sólo resulta de la interacción del genoma de la bacteria y de la planta, sino que está influenciado por las condiciones edáficas y ambientales (Rodríguez-Navarro et al., 2011). La soja secreta sustancias químicas (flavonoides) a través de las células de la raíz, y en respuesta a ellos, en los rizobios se activan un conjunto de genes de nodulación que conduce a la liberación de factores

de nodulación que al ser detectados por las plantas desencadenan el inicio del proceso de nodulación (Figura 7). Muchas de las sustancias que intervienen en estos procesos de comunicación se han identificado, aislado y se han incluido en los formulados de inoculantes con resultados beneficiosos sobre la producción de soja y la eficiencia en la FBN (Smith y Díaz Zorita, 2005).

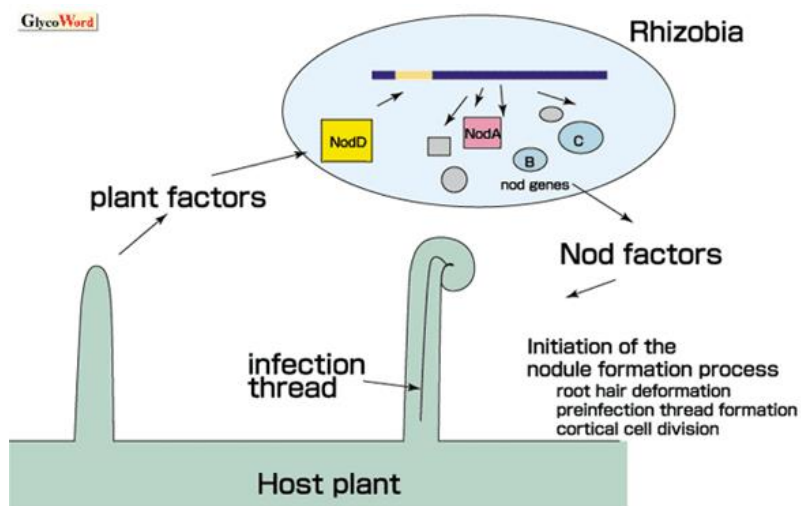


Figura 7. Proceso de nodulación. Fuente: F. tarocco agrobacterias // rhizobium: factores de nodulación; quorum – sensing

Luego del reconocimiento planta-rizobio, como resultado del intercambio de señales bioquímicas, se produce el contacto físico entre ambos, el cual depende de múltiples factores, tanto de la bacteria, de la planta, como del ambiente (Lodeiro et al., 2003). Los rizobios secretan polisacáridos que se unen a proteínas de la planta (lectinas), que se encuentran en los extremos de los pelos radicales a los que se adhieren. Allí, los rizobios secretan los factores de nodulación, compuestos con actividad hormonal que desencadenan la formación del nódulo (factores nod) (Fernández Canigia, 2003). Sintéticamente, el crecimiento de los pelos radiculares se detiene y estos se deforman y enrulan. Los rizobios quedan atrapados en la curvatura del pelo y penetran al mismo formando un hilo de infección longitudinal en dirección a las células subcorticales de la raíz donde se dividen las células y se forma el meristema que da origen al nódulo (Lodeiro et al., 2003).

La última etapa de la infección consiste en la invasión de los nódulos en formación por parte de los rizobios que provienen del hilo de infección y la diferenciación de éstos en bacteroides, que son los que fijan N_2 (Lodeiro et al., 2003). En la Figura 8 se muestra un esquema general de la formación del nódulo, el esquema inferior corresponde a la formación de nódulos para el caso de la soja.

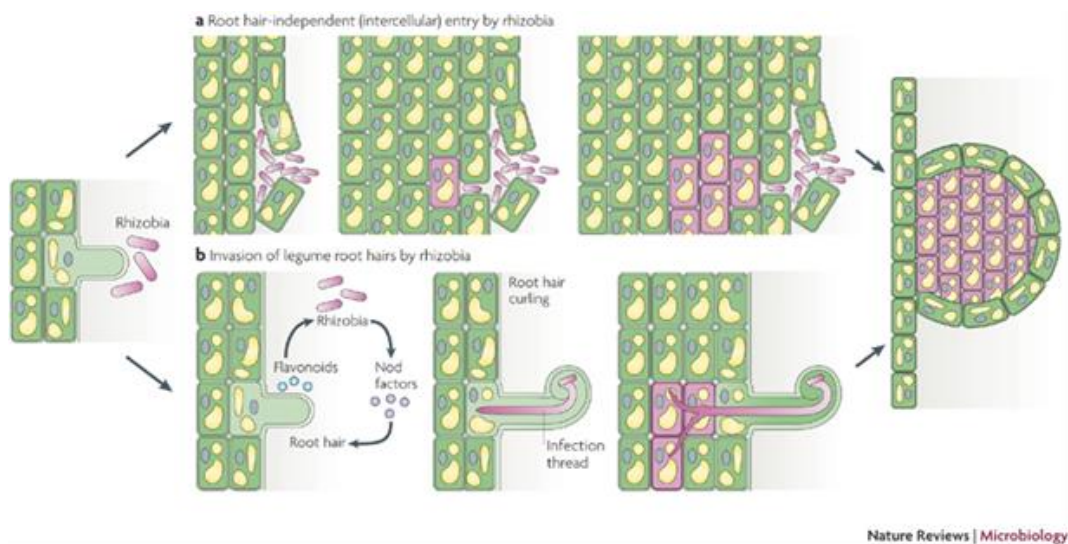


Figura 8: Esquema de la formación del nódulo.

Fuente: Nature reviews/ Microbiology

El nódulo comienza a fijar N_2 sólo cuando terminó el desarrollo de los bacteroides, el nódulo desarrolla un sistema vascular que está conectado con el de la planta que transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. En las células de la planta se expresan nodulinas tardías como la leghemoglobina, que es una proteína que regula el nivel de oxígeno dentro del nódulo (Fernández Canigia, 2003). Además, se sintetiza la proteína con actividad enzimática la nitrogenasa que es un complejo multienzimático que cataliza la reducción de N_2 a amonio (Lodeiro et al., 2003).

Los nódulos de la soja son determinados, poseen un aspecto esferoide y albergan las células más jóvenes en la periferia, mientras que hacia el centro se encuentran las células maduras y luego las senescentes. Por lo tanto, la actividad fijadora de N es mayor en las capas intermedias y menor en el centro.

2.4.2 Factores que influyen en la Fijación Biológica del Nitrógeno.

En un marco conceptual de agricultura sustentable, es deseable una leguminosa que obtiene la máxima cantidad de N de la atmósfera, de manera de preservar el N edáfico. La presencia de formas disponibles de N en el suelo, afectan drásticamente la fijación biológica ya que para la planta es energéticamente menos costoso utilizar el N del suelo que el N de la atmósfera, es decir que, estas dos fuentes, aunque complementarias para que la planta exprese su potencial de rendimiento, no son aditivas (Díaz Zorita 2003). Esto explica que los suelos ricos en nitrógeno no contribuyen al establecimiento y funcionamiento de la simbiosis rizobios-soja. Los suelos de las explotaciones agrícolas, frecuentemente debido a la sobreexplotación son deficitarios en N, lo que lleva a que se establezcan relaciones simbióticas que suelen fijar cantidades relevantes de N. De cualquier manera, está claro que la fuente de N tanto como la de la atmósfera y el suelo son complementarias

La relación Carbono/Nitrógeno (C/N) del suelo y de la planta es un elemento clave que regula el proceso: altas relaciones del suelo conducen a un aumento de las interacciones simbióticas mientras que relaciones bajas no son favorables. Por ejemplo: Una planta de soja aislada de la línea de cultivo (sin competencia), dispone de mucha luz y aprovecha una abundante fotosíntesis, eso resulta en una C/N alta y presenta una abundante nodulación. En cambio, una leguminosa inoculada en un suelo de desmonte con mucho N disponible en el suelo y por lo tanto una baja C/N, resulta en una pobre nodulación (Ferraris, 2011).

La FBN es costosa para la planta en términos de energía. Si consideramos el proceso como 100% eficiente, la ecuación podría ser:



Es decir, existe total dependencia entre el aprovisionamiento de energía (Fotosíntesis - Respiración) y la reducción del N₂ atmosférico a NH₄⁺ dentro de los nódulos (Arborno y

Luque, 2008). Por ello, el proceso de nodulación está regulado por la planta (Bhuvaneswari et al.1980), pero también por la fijación biológica de N, procesos que demandan alta cantidad de energía.

Los nódulos de las leguminosas fijan N en cantidades hasta 10 veces superiores a su propio peso y este N es transferido vía xilema, desde las raíces a la parte superior de la planta. Al mismo tiempo, en sentido contrario, los nódulos reciben por el floema los fotosintatos que los nutren y que son producidos en las partes verdes de la planta (Arborno y Luque, 2008).

En síntesis, cuando el suelo bajo cultivo tiene una baja dotación de nitrógeno, las leguminosas aportan N al sistema, pero si el suelo es rico en N el cultivo de la soja no realiza aportes importantes y es lo extrae del suelo (Díaz Zorita 2003).

Otro aspecto a considerar en lo que respecta al éxito de la práctica de inoculación, son las interacciones que ocurren entre las cepas introducidas con los inoculantes comerciales y las que se encuentran naturalizadas en el suelo. La nodulación es inducida por la/las cepas que tienen capacidades particulares para colonizar los sitios infectivos de la raíz, si bien la nodulación también se encuentra en función del estadio de desarrollo de la planta (Ferraris, 2011). Así, al introducir poblaciones de (bradi) rizobios año a año con la repetida biofertilización, se van introduciendo al suelo bacterias que logran naturalizarse, estas bacterias sufren cambios que les permiten adaptarse mejor a las condiciones del suelo y las hace también más competitivas o infectivas, pero, a su vez, pueden perder o disminuir su capacidad de fijación de N. Esto llevaría a que en cada nueva biofertilización los (bradi)rizobios introducidos por medio de los inoculantes se encuentren con una población de rizobios adaptada y más competitiva para ocupar los sitios de infección de las raíces, esto conduce a generar cierta falta de eficiencia en la nodulación por las bacterias del inoculante y de esta manera la cantidad final de N fijado disminuye y se reduce así el rendimiento (Thies et al. 1991, González 2007, Peticari et al. 2007, Pérez-Giménez et al. 2010).

En síntesis, se puede decir que las cepas naturalizadas en relación a las que se introducen son más competitivas, menos sensibles a los estreses ambientales, pero también menos eficientes para fijar N.

Las cepas introducidas al suelo con los inoculantes que se colocan sobre la superficie de la semilla, se encuentran con la radícula emergente e inducen la formación de nódulos tempranamente. Si bien los rizobios son bacterias móviles, su desplazamiento está en función del contenido de agua en los microporos, lo que podría generar una zona con un mayor número de rizobios alrededor de la radícula. La nodulación proveniente de los rizobios introducidos se refleja con el desarrollo de nódulos en el cuello de la raíz (raíz principal y primeros centímetros de las laterales), ya que son el resultado de infecciones tempranas. A medida que la raíz crece y desarrolla, la zona de elongación de la raíz y desarrollo de pelos radiculares se aleja de la semilla y su cobertura que es la zona que contiene los rizobios introducidos por la inoculación. En síntesis, en los nódulos que desarrollan en el cuello de la raíz (raíz principal y primer parte de las laterales) predominan las cepas eficientes introducidas. Las raíces laterales desarrollan más tardíamente y por eso interactúan con los rizobios del suelo lo que explica que los nódulos de las raíces secundarias y terciarias sean menos eficientes. La nodulación en la corona de la raíz (sobre un cilindro imaginario de 2 a 3 cm alrededor de la raíz principal sin considerar el tallo) sugiere que los nódulos provienen mayormente del inoculante (inoculación exitosa). La ausencia de nódulos en la corona y presencia de nódulos en los extremos de las raíces laterales sugiere que nodulación proviene fundamentalmente de las cepas naturalizadas (fallas en la inoculación)

El cultivo bajo la modalidad de siembra directa, es una técnica de cultivo conocida como labranza cero que no realiza la remoción intensa de suelo que hace el arado, por eso la labranza mínima o cero incrementa la cantidad de agua que se infiltra en el suelo, aumenta la retención de materia orgánica y la conservación de nutrientes en el

suelo. En muchas regiones agrícolas, este tipo de labranza evita la erosión del suelo y previene organismos causantes de plagas, ya que se mantiene el equilibrio ecológico del suelo debido a que también se protegen los organismos antagonistas de los patógenos de los cultivos. El beneficio más importante de la siembra directa es la preservación de las características físicas, químicas y biológicas de los suelos, haciendo que estos adquieran más resiliencia. Las labranzas, que conducen a suelos más aireados y con mayor disponibilidad de agua y mejor oxigenación a la siembra, favorecen a la germinación del cultivo y con ello una eficiente nodulación por parte de las estirpes inoculadas que se aplican sobre la superficie de la semilla (Hayes et al 2000). Toda labranza que aumente la relación C/N del suelo produce inmovilización temporaria del N por asimilación de las bacterias, y se favorece por lo tanto la FBN (Díaz Zorita 2003). Una inmovilización inicial con posterior liberación permitirá aumentar la complementariedad de las fuentes (Díaz Zorita 2003). Los rastrojos del cultivo antecesor influyen decididamente al modificar la relación C/N del substrato. Los rastrojos que resultan del cultivo de los cereales tienen generalmente cerca de 0,5 % de N, mientras que los provenientes de un cultivo de soja tienen un promedio de 1,7 % de N; un residuo de alfalfa tiene más de 3 %, por lo tanto, cada uno de éstos tres escenarios afectan de manera diferente a la FBN. Es decir que la tasa de FBN varía según la disponibilidad de N en el suelo, ya que cuando es alta, la planta privilegia, por razones de economía energética, la incorporación del N de este medio por sobre el derivado de la atmósfera (Racca y Collino, 2005). Además, comparadas con los microorganismos del suelo las plantas no son buenas competidoras cuando la disponibilidad de N del suelo es baja.

Una vez que la bacteria inoculada infecta la raíz e induce la formación de nódulos, se debe analizar la eficiencia de fijación de N. Esta, depende las de condiciones de crecimiento de la planta y de las condiciones ambientales. Es decir, la temperatura, radiación, tenor de oxígeno y muy especialmente la disponibilidad hídrica, entre otros

condicionan el proceso (Ferraris 2011). Esto último se debe a que la FBN es extremadamente sensible al estrés hídrico. La razón principal es que el estrés hídrico resulta en un gasto energético mayor y la planta privilegia su economía del agua antes que alimentar a los nódulos (Ferraris 2011).

Cada vez que el agua útil disminuye por debajo del 60 %, que es un umbral crítico para el llenado de granos de la soja, se compromete el llenado de granos y con esto la demanda de N por lo que también se compromete la fijación de N, que siempre es máxima en esta etapa de alta demanda de N. Es decir que estreses en estos momentos conducen a reducciones en el rendimiento de la soja. Frecuentemente, la capacidad de fijación de los nódulos se restablece si las condiciones de sequía no son tan severas o duran muchos días, no obstante, llega un punto (menos del 10 % del agua útil) que, aunque los nódulos, y el cultivo, recuperen su humedad al llover o regarse, la capacidad de fijación de los nódulos no se recupera (Ferraris 2011).

El cultivo de soja puede obtener el 30 y 94 % de sus requerimientos de N a partir de esta simbiosis (Hungria & Campo, 2004; Peticari, 2005). Las variaciones de estos porcentajes están sujetos al efecto que tienen los diversos factores sobre la FBN. Primariamente, la nodulación se ve afectada tanto por carencias de P, K, Ca, S y de micronutrientes, por falta de aireación en el suelo, por falta de agua y/o por la presencia de sales y las bajas temperaturas como 15 C o superiores a 40 C retrasan el proceso de infección (Lodeiro et al., 2003). Por otro lado, el ciclo del cultivo influye sobre la FBN, en los estadios vegetativos la fijación suele ser baja, uno de los motivos es que la plántula se nutre del N remanente en la semilla y el N que aporta el suelo dado que la demanda de N en la etapa vegetativa es bajo comparado con las etapas de llenado de grano. La mayor tasa de FBN se produce durante la etapa reproductiva (llenado de grano) que es la etapa en que ocurre la mayor demanda de N. Luego la tasa disminuye hasta hacerse nula antes de la madurez fisiológica, lo cual ocurre porque la planta por un lado destina la mayor cantidad de hidratos de carbono, hacia

los granos y por otro lado porque la raíz deja de exportar N hacia la parte aérea (Guiamet et al., 1991). Por último, los nódulos sin energía dejan de fijar, senescen y se desprenden (Fernández Canigia, 2003).

2.5 Inoculación del cultivo de soja

La práctica de la inoculación consiste en adicionar a la semilla, en el momento de la siembra, bacterias fijadoras de N formuladas sobre un soporte sólido o en forma líquida, lo cual deviene en diferentes metodologías de aplicación. Según el art. 8 de la resolución del SENASA N° 310/1994, los inoculantes deben contener no menos de 10^9 rizobios.g⁻¹ o ml⁻¹ a la fecha de elaboración y no menos de 10^8 . g⁻¹ o ml⁻¹ a la fecha de vencimiento. En el caso de los inoculantes para soja éstos deben proveer el equivalente a no menos de 80.000 bacterias viables específicas por semilla. Según Burton 1984, para la soja una semilla bien inoculada puede contener entre 10^5 y 10^6 bacterias estos números con frecuencia no coinciden necesariamente con las indicaciones del fabricante de un inoculante comercial.

A diferencia de lo que ocurre con la fertilización, los productores de soja argentinos tienen un alto grado de conciencia de la importancia y el impacto que la inoculación en el resultado económico del cultivo y por ello, la inoculación de la soja está ampliamente difundida (Díaz-Zorita et al., 1999; Rubione et al., 2002). Según Hungría et al. 2006 y Ferraris et al. 2006, la inoculación con *B. japonicum* aporta cantidades considerables de N provocando aumentos en los rendimientos de entre 200 y 900 kg.ha⁻¹ en cultivos desarrollados en lotes con y sin historia del cultivo de la soja. Según Peticari et al. 2007, en condiciones ideales, la soja inoculada con (bradi)rizobios podría fijar hasta 450 kg de N.ha⁻¹ más. Sin embargo, en regiones como de Concepción del Uruguay o Tucumán, el aporte de la FBN rondó entre 26 y 70 % respectivamente (Gonzalez et al. 2007). Estos resultados pueden estar relacionados con el historial del cultivo de soja en dichas zonas de cultivo. Cuando los niveles de N del suelo son bajos y no hay limitaciones nutricionales, se esperan aumentos del

rendimiento mínimos del 50 % gracias a la biofertilización, pero si los suelos presentan historial de cultivo de soja e inoculación, dichas respuestas a la biofertilización resultan muy variables (Peticari et al. 2007). Si bien la mayoría de los suelos cultivados con soja presentan poblaciones naturalizadas de rizobios, abundan los estudios que muestran aumentos de rendimiento de aproximadamente el 8% (Hungría et al. 2006, Peticari, 2005). Esta variabilidad en el rendimiento en respuesta a la inoculación puede deberse a que, como proceso biológico, la FBN está condicionada por otros factores como: las características del inoculante, la influencia de las condiciones del ambiente edáfico incluyendo las prácticas de labranza y la presencia de rizobios establecidos en el suelo. Es decir que disponemos de las herramientas para llevar adelante una agricultura sustentable en la que se reduzca el uso de fertilizantes nitrogenados (Baigorri y Croatto, 2000).

En la Argentina, la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum* es la que el INTA recomienda para la formulación de inoculantes comerciales, que es un derivado de la cepa USDA 138 (redefinida como USDA 6, a partir de la secuenciación de su genoma). Esta cepa desarrolla una considerable cantidad de nódulos que fijan N eficientemente con los cultivares de soja que se siembran en el país lo que conduce a buenos rendimientos del cultivo (Peticari, 2018). Adicionalmente, en estudios previos se demostró que dos aislados de *B. japonicum*, el aislado 163 y el 366, que se obtuvieron a partir de suelos cultivados con soja en la Argentina (Pastorino, 2016), fijan nitrógeno eficientemente en comparación con la cepa inoculante comercial *B. japonicum* E109 (López et. al, 2018). Se reportó que estos aislados se caracterizan por una alta capacidad de fijación pero presentaron dos estrategias. La cepa 366 desarrolló una gran cantidad de nódulos altamente eficientes para fijar N, mientras que el aislado 163 además de desarrollar un alto número de nódulos, estos presentaron una senescencia demorada en relación a los nódulos inducidos por el resto de las cepas (López et al., 2018).

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

En base a todo lo expuesto hasta aquí se plantea la siguiente hipótesis y objetivo de trabajo.

Hipótesis

La inoculación a campo con los aislados de *B. japonicum* 163 y 366 provocan un aumento de los rendimientos, la primera cepa debido a la senescencia demorada de los nódulos que aumenta la disponibilidad de N para la planta y, la segunda porque induce la formación de un mayor número de nódulos fijadores de nitrógeno, respectivamente.

Objetivo

Disponer de las evidencias del efecto de la inoculación del cultivo de la soja con los aislados de *B. japonicum* 163 y 366, en condiciones de campo.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sitio del ensayo.

El ensayo se realizó en el establecimiento “EL CHAJA”, ubicado en la localidad de San Enrique (35° 44'51''S; 60°18'19''O), partido de 25 de Mayo, Provincia de Buenos Aires (Figura 9).

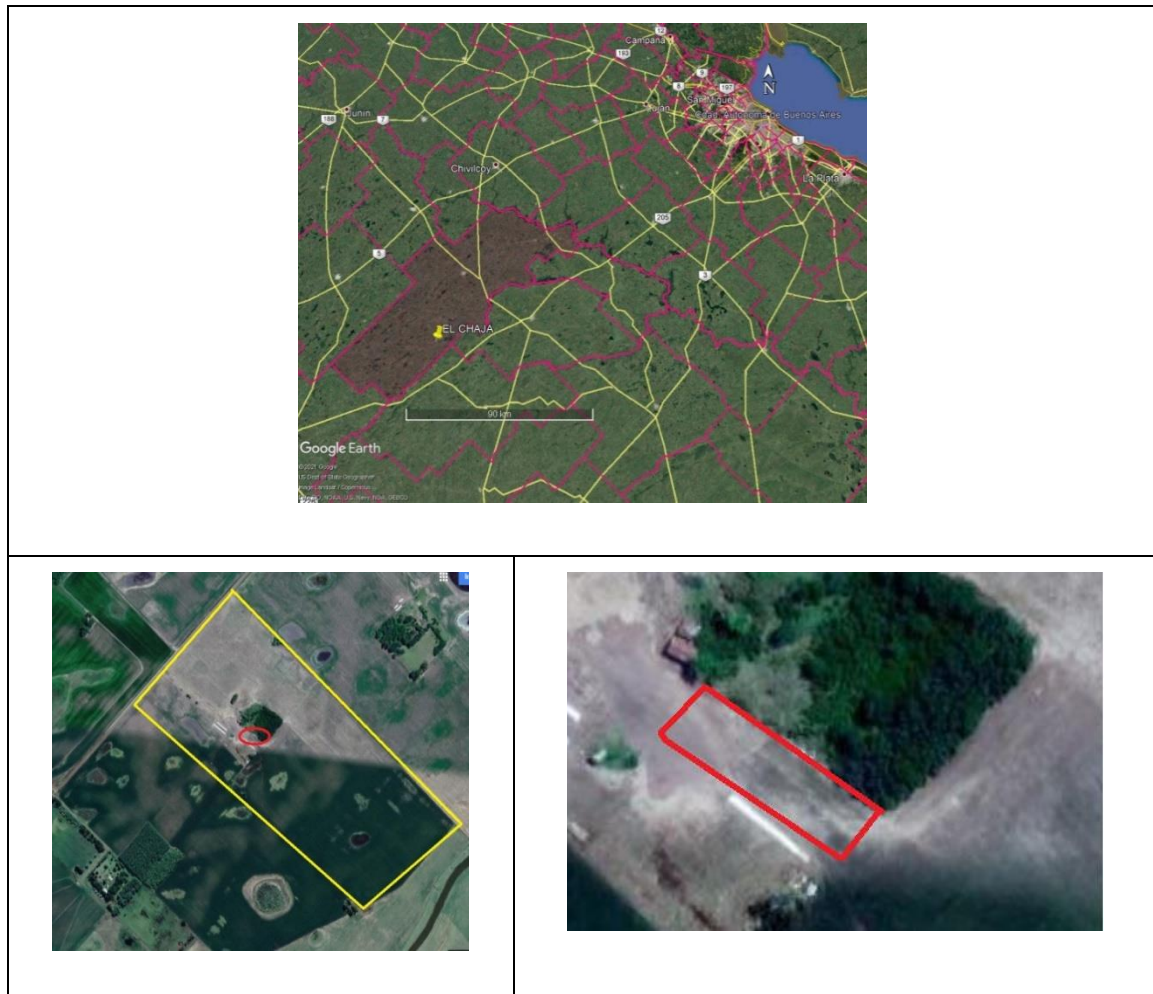


Figura 9. Ubicación del establecimiento El Chaja en el partido de 25 de mayo, límites del establecimiento (amarillo) y ubicación del ensayo (rojo). Elaboración propia en base a Google earth.

El cultivo antecesor al ensayo fue trigo, y luego de su cosecha en el mes de diciembre se dejó sobre el suelo un remanente conformado por sus tallos denominando rastrojo de trigo. El sitio experimental registra una rotación agrícola continua con varios cultivos de soja en la secuencia, la que en cada campaña se inocula.

4.2 Material biológico y preparación de inoculantes.

Los cultivos de rizobios para formular los inoculantes para el ensayo se realizaron en medio YEM (extracto de levadura, manitol, agar) (Vincent, 1970). A partir de tubos pico de flauta conteniendo las cepas *B. japonicum* E109, *B. japonicum* 163 y *B. japonicum* 366, se inocularon tubos con medio YEM líquido de 5 ml y una vez que los mismos alcanzaron una concentración aproximada de 1×10^9 cél.mL⁻¹. se utilizaron para inocular erlemeyers con 250 ml de medio YEM líquido. Se utilizaron semillas de soja del cultivar Don Mario 4615 STS (cultivar RR de ciclo IV corto).

4.3 Inoculación y siembra.

Las semillas de soja se inocularon en el momento de la siembra, con una suspensión de rizobios de 1×10^6 rizobios por semilla. Se utilizó una suspensión de rizobios de 1×10^9 cél.ml⁻¹ que se adicionó a 10 kg de semilla, a la que además se agregó un polímero de azúcares para adherir las bacterias a la semilla y proteger a los rizobios de la desecación. La dosis de inoculante fue de 4ml/ kg de semillas de soja más 2 ml. de coadyuvante PREMAX/ kg de semilla. El cultivo se realizó bajo la modalidad de siembra directa. Para llevar a cabo el trabajo en el campo se siguieron los siguientes pasos:

- a) Se realizaron los cálculos de la cantidad de semilla a inocular con cada tratamiento (Figura 10).



Figura 10. Cálculo de semilla a inocular

- b) Se inoculó la semilla con cada tratamiento y se procedió a su posterior embolsado e identificación, con la finalidad de que no se mezcle en el campo (Figura 11).



Figura 11. Bolsas con cada uno de los tratamientos

- c) Se procedió a la siembra de las parcelas con su semilla correspondiente, para lo cual se limpió con una aspiradora y desinfectó con alcohol la máquina entre los distintos tratamientos. Se utilizó una sembradora de siembra directa (ERCA) de 6 metros de ancho dividida en dos módulos, por ello el ensayo tuvo un dimensionamiento de 3 metros de ancho por 70 metros de largo, con una subdivisión de 8 subparcelas (8 m. x 2,5 m.) para cada tratamiento. Se sembró a chorrillo (84 kg/ha) con una distancia entre surcos de 0,21m, logrando una cantidad promedio aproximada de 8 semillas por metro lineal, consiguiendo de esta manera una densidad de 380.000 plantas/ha.
- d) Se delimitaron con estacas los límites de cada parcela indicando con carteles cada tratamiento.

Se realizaron 5 tratamientos (Figura 12 y 13) que consistieron en:

- 1) Tratamiento control Semilla sin fertilizar y sin inocular (control)
- 2) Tratamiento con E109 Semilla inoculada con la cepa E109 + coadyuvante, sin fertilizar
- 3) Tratamiento con E163 Semilla inoculada con la cepa 163+ coadyuvante, sin fertilizar

- 4) Tratamiento con E366 Semilla inoculada con la cepa 366+ coadyuvante, sin fertilizar
- 5) Control Fertilizado Semilla sin inocular y fertilizada con arrancador de fosforo.



Figura 12. Vista del ensayo a los 25 días desde la siembra.

Cada uno de los tratamientos dentro de la “maquinada”, tuvo 8 réplicas o subparcelas (Figura 13).

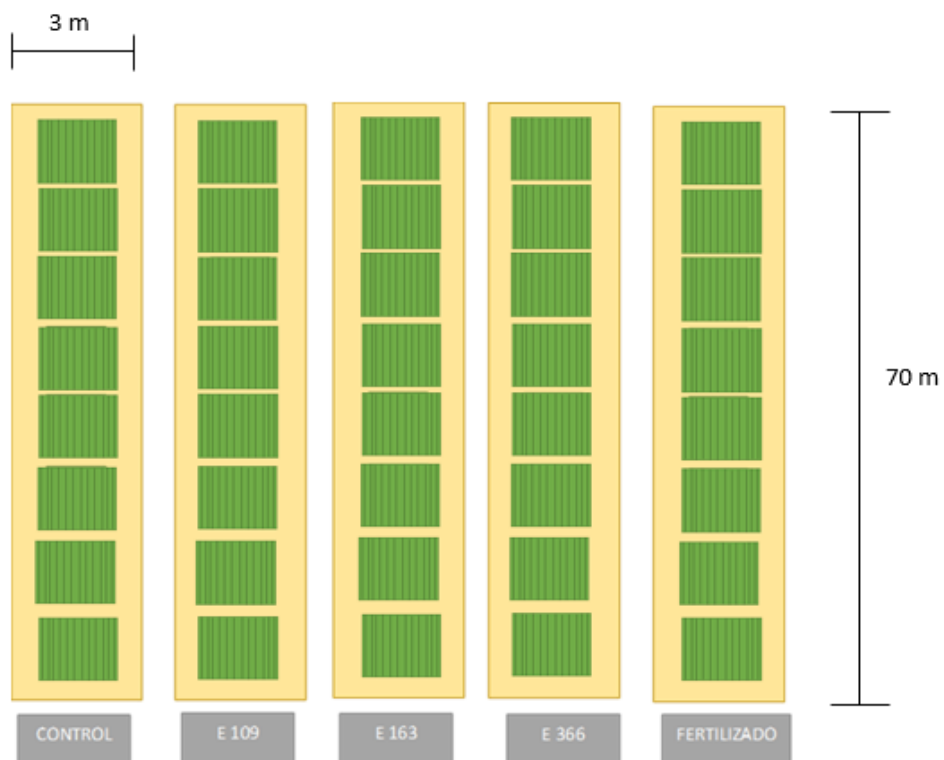


Figura 13. Diseño experimental

4.4 Evaluación del efecto de la inoculación

Se determinó la respuesta del cultivo de soja a los tratamientos en las siguientes variables:

N° de nódulos/planta (Infectividad). A los 45 de la siembra, en el estado de madurez R1, se descalzaron 5 plantas por cada subparcela por tratamiento, N=200 (5 plantas*8 réplicas*5 tratamientos) y n=40 (5 plantas*8 réplicas*1 tratamiento). Se limpiaron las raíces y se contó el número de nódulos por planta, en la raíz principal y raíces secundarias. La suma de ambos generó el valor de número de nódulos total.

Rendimiento (efectividad). Cumplido el ciclo (5 meses), en el estado de madurez R8 se determinó el rendimiento en kilos de grano /hectárea, para lo cual se pesó con una balanza electrónica el grano trillado de cada tratamiento y de cada subparcela. Para realizar el cálculo del rendimiento por hectárea se realizó el muestreo, de las subparcelas se realizó tomando plantas a lo largo de distintos surcos para obtener un total de 10 metros lineales. Las plantas se trillaron y luego se pesó la semilla en balanza granataria para cada muestra individualmente y con este dato se calculó el rendimiento por Ha.

4.5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA) estableciéndose las diferencias significativas entre los tratamientos con el test de Tukey ($p < 0,05$), utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2015 (Di Rienzo et al., 2015). Los datos se analizaron bajo el diseño en bloques completos al azar.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de todos los tratamientos incluidos ambos controles sin inoculación, presentaron nódulos (Figura 14). La presencia de nódulos en estos tratamientos se debería a los rizobios naturalizados del suelo, ya que el sitio presenta historia de cultivo con soja inoculada.

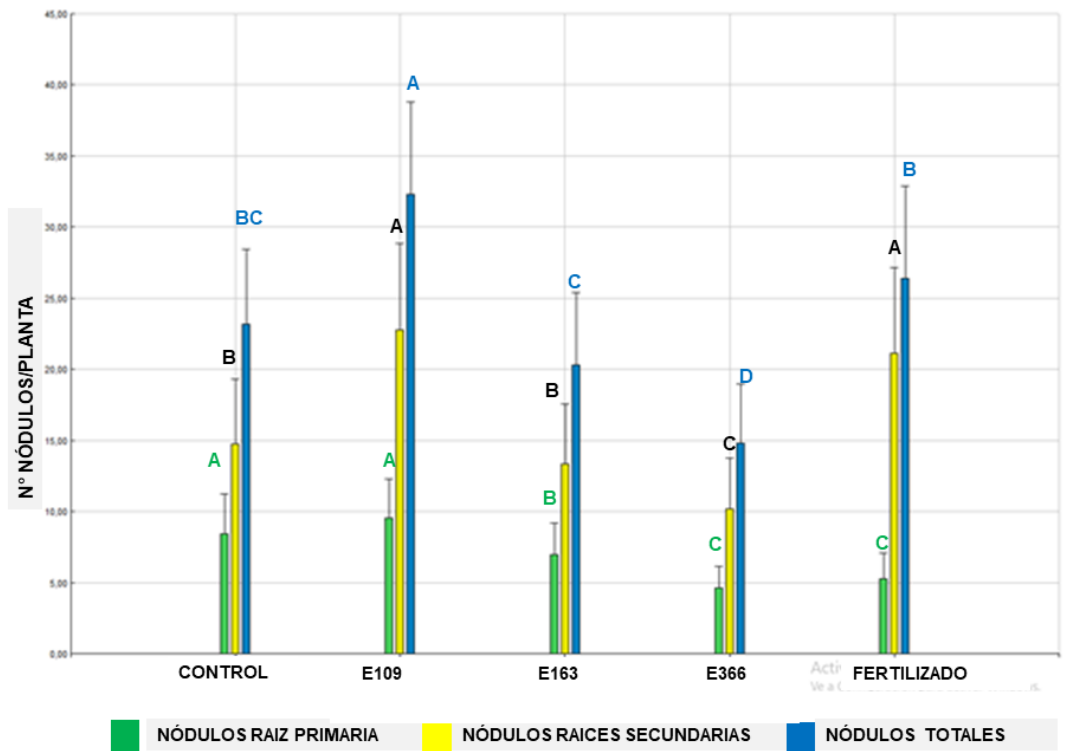


Figura 14. Número de nódulos.planta⁻¹. Las barras representan las medias aritméticas (n=40) del número de nódulos en cada tratamiento. Las barras de error representan el desvío estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias al ser comparadas mediante el análisis de la varianza y el test de Tukey (p< 0,05).

El número de nódulos en la raíz principal, secundarias y el total por planta, de los tratamientos inoculados con E109, E163 y E366 fueron estadísticamente diferentes (p<0.05). El aislado E109 produjo un mayor número de nódulos que las otras dos estirpes inoculadas, E163 y E366, presentando esta última la menor cantidad de nódulos (Figura 14). Es importante destacar que, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de nódulos producido por los los aislados E163 y E366 (Figura 14).

En relación a la fijación biológica del N, esta conduciría a lograr altos rendimientos manteniendo los niveles de los nutrientes del suelo. Dado que la demanda de N

durante el llenado de granos es alta, la disponibilidad del elemento en ese momento se ve reflejada en el rendimiento. Por ello, se determinó el rendimiento en grano de los distintos tratamientos. De este modo, se dispone de una estimación indirecta de la fijación de N. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 15.

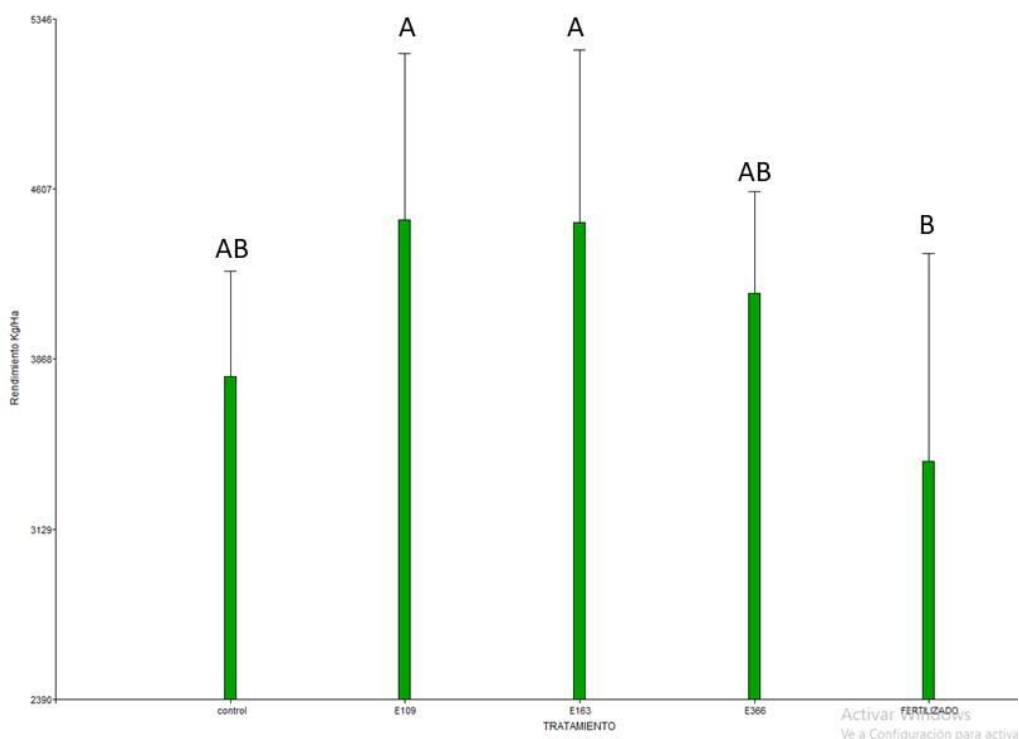


Figura 15. Rendimiento (Kg.Ha^{-1}) para cada tratamiento. Las barras representan las medias aritméticas ($n=8$). Las barras de error representan el desvío estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias al ser comparadas mediante el análisis de la varianza y el test de Tukey ($p < 0,05$).

Los resultados indican que, las plantas inoculadas con los aislados E109, E163 y E366 y más aún el control sin fertilizar, presentaron rendimientos estadísticamente iguales (Figura 15 y Tabla 2). Si bien hay una tendencia a que las plantas inoculadas con la cepa E109 ($4.472,63 \text{ Kg.Ha}^{-1}$) y la cepa E163 ($4.463,13 \text{ Kg.Ha}^{-1}$) rindan más que las inoculadas con E366 ($4152,88 \text{ Kg.Ha}^{-1}$), estos rindes no fueron estadísticamente distintos. Llama la atención el alto rendimiento de los controles no inoculados ($3794,38 \text{ Kg.Ha}^{-1}$ para el control sin inocular y $3425,63 \text{ Kg.Ha}^{-1}$ para el control fertilizado), sin

embargo las raíces de estos tratamientos contuvieron un alto número de nódulos lo que podría explicar la disponibilidad de N. En lo que hace a la nodulación y el rendimiento, se puede decir que los mismos no estuvieron directamente relacionados.

Vale la pena destacar de que el rendimiento en general para la zona donde se ubicó el ensayo fue alto lo cual refleja que fue un muy buen año en lo que hace a las condiciones conducentes al rendimiento como es disponibilidad de agua en el suelo, radiación y temperatura. Junto a lo mencionado tener en cuenta que, al momento de la cosecha, la misma al ser totalmente manual, las pérdidas se disminuyen casi en su totalidad obteniendo de esta forma un mayor rinde.

6 Conclusiones

Los suelos en los que se realizó el ensayo contienen una población competitiva y eficiente fijadora de N.

En el caso del aislado E163 su inoculación generó rendimientos similares a E109 sugiriendo que los nódulos desarrollados por esta estirpe fijaron cantidades similares a la cepa E109 que es de alta eficiencia. Como la nodulación inducida por E163 fue menor existen dos formas de proveer la misma cantidad de N que E109, o tuvo una mayor fijación de N por nódulo (actividad específica) o los nódulos fijaron N por un periodo de tiempo más largo.

Si bien E366 se seleccionó por su capacidad para inducir nódulos in vitro, en el ensayo a campo no demostró provocar un alto número de nódulos.

Ensayos localizados en distintas zonas, con distintos cultivares, condiciones de manejo, determinación del número de rizobios establecidos en el suelo y de largo término (repeticiones en el tiempo en el mismo sitio), serían necesarios para conocer y comparar el comportamiento simbiótico de los aislados E163 y E366 con el de la cepa E109.

7 REFERENCIAS

- Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (**Aapresid**). (2019). Disponible en: <http://www.aapresid.org.ar>. Martin Rainado: Informe de evolución de siembra directa en Argentina Campaña 2018/2019
- **Burton, J.C. 1984**. Legume inoculant production. Niftail,Hawaii, 200pp.
- **CREA**. 1997. Soja. Cuaderno de Actualización Técnica N° 58.
- **De Felipe Antón, M. R.** 2009. Biotecnologías limpias en agricultura: Fijación Biológica de nitrógeno. Estructura-función de la simbiosis Rhizobium-Leguminosa. In R. A. N. de F. (España) (Ed.), Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXII. Contaminación y Salud.
- **Díaz Zorita M.** 2003. Inoculación del cultivo de soja. INTA Villegas.
- **EMBRAPA**. 1993. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. Recomendaciones técnicas para a cultura da soja no Paraná. 1993/94. Londrina: OCEPAR/EMBRAPA - CNPSo, 128p. (Embrapa-CNPSo. Documentos, 62).
- **F. Tarocco** agrobacterias // rhizobium: factores de nodulación; quorum – sensing
- **FAO** Tabla de Estadísticas de cultivos <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Ultimo acceso: 23/09/2020
- **Fernández Canigia, M. V.** 2003. Manual de Nodulación. Ed. Nitragin Argentina. pp.53.
- **Ferraris, G.N.** 2001. Nutrición: La cosecha que se lleva el carretón del lote. Revista Fertilizar, VI(24): 28-29.
- **Ferraris. G.** 2011. Eficacia de la inoculación. 14 jornada de actualización técnica en soja.

- **Galarza, C.** 2000. Área de suelos y producción vegetal. INTA EEA Marcos Juárez.
- **García, F.** 2000. Requerimientos nutricionales de los cultivos. En: Jornada de actualización técnica para profesionales "Fertilidad 2000", pp 40-43. INPOFOS, Rosario.
- **García, F. O.** 1996. EL CICLO DEL NITROGENO EN ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS. En: Curso de capacitación y actualización para profesionales en fertilidad de suelos y fertilización. Trenque Lauquen: EEA General Villegas. General Villegas. Vol. 2, pp. 30-39.
- **González N.** 2007. Fijación de nitrógeno en soja inoculantes: situación actual y perspectivas en la Argentina. De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, A, Cassan, F, & Olmedo, C, eds), pp. 161– 173. Río Cuarto
- **González, N.** 2000. Inoculación e inoculantes. Fertilizar, V (21): 18-21.
- **Hanway, John.** 1999. Ecofisiología del cultivo de soja. Universidad de ciencia y tecnología del estado de Iowa.
- **Hayes KC.** 2000. Dietary fatty acids, cholesterol, and the lipoprotein profile. Br J Nutr; 84(4):397-9.
- Instituto Nacional de Semillas, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca presidencia de la Nación. 2019. SOJA 2018 – 2019 Sistema de información Simplificado Agrícola (**SISA**).
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Manfredi (**INTA EEA Manfredi**). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP). 2011. Siembra Directa. Actualización Técnica N° 58. Ed. Maita Jorge, Oncativo, Córdoba, Argentina. 28 pp.

- **Kumudini, S.** 2010. Soybean growth and development. In G. Singh (Ed.), The soybean: botany, production and uses, UK, pp. 48-73.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP). Instituto Nacional de Semillas (INASE). **Sistema de Información Simplificado Agrícola SISA. Informe Soja 2019-2020.** <https://www.argentina.gob.ar/sisa/informes>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Sistema de Información Simplificado Agrícola (**SISA**) 2019. Soja 2018-2019.
- **Pastorino GN.** 2016. Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos de la Pampa húmeda e identificación de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales. Doctoral disertación, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. <http://hdl.handle.net/10915/55778>
- **Perticari, A.** 2003. Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. En: Microbiología agrícola: un aporte de la investigación argentina. Ed. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Santiago del Estero, Argentina, pp. 159-193.
- **Perticari, A.** 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Congreso Mundo Soja. Buenos Aires. p. 121-126
- **Perticari, A.** 2018 ¿La inoculación de soja aún mantiene vigencia? En: Revista Técnica de la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. Soja SD. Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (eds.) ISSN 1850-0633
- **Racca, R.** 2002. Fijación biológica del nitrógeno. En: Actas 1er Simposio de Fertilidad de Suelos y Fertilización en Siembra Directa. X Congreso Nacional de AAPRESID. pp 197-208.
- **Ridner E.** 2006. Propiedades nutricionales de la soja y su impacto en la salud. Grupo Sociedad Argentina de Nutrición. 98 p. ISBN: 987-23125-0-8

- **Ritchie Steven W.** 1998. Morfología y descripción del cultivo de soja. Universidad de ciencia y tecnología del estado de Iowa.
- **Rizzo, F.** 2011. Fecha de siembra, grupos de madurez, genotipo y arreglo espacial en diferentes ambientes. 14º jornada de actualización técnica en soja. Don Mario semillas.
- **SAGPYA.** 2019. Estadísticas actualizadas del cultivo de soja.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa)
SANIDAD VEGETAL- FERTILIZANTES BIOLÓGICOS -
COMERCIALIZACION. Resolución 310/1994
- **Vincent, J.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- **Yamada, T.** 1999. Adubacao balanceada da soja. En: INPOFOS Cono Sur, Jornada de Actualización Técnica para profesionales “Fertilización de Soja”, pp. 12-17.
- **Arborno and S.M. Luque,** 2008. Effects of different management practices on nodulation and on the yield of soybean crops. Agriscientia XXV (2): 81-87.
- **Baigorri, H.; Croatto, D.** 2000. Manejo del cultivo de soja en Argentina. Marcos Juárez, INTA. 28 p
- **Díaz Zorita, M. y M.V. Fernández Canigia.** 1999. Patrones de nodulación de soja en relación con propiedades del suelo bajo tres sistemas de labranza. Rev. Fac. Agronomía, La Plata 104(1): 53-60.
- **Ferraris, G. y L. Couretot.** 2006. Evaluación de nuevos desarrollos en inoculación en soja. Campaña 205/06. pp 75-79. En: Experiencias en Soja 2006. Proyecto Regional Agrícola. Área de Desarrollo Rural EEA Pergamino y General Villegas. 301 p.
- **Lacelli G. A. e Ybran R. G.** 2016. Informe sobre Mercados de Soja. Voces y Ecos N° 35, 22-24.

- **Ritchie Steven W., y Benson Garren O.** 1999. Desarrollo y ecofisiología del cultivo de soja. Reporte especial N° 53. Universidad de ciencia y tecnología del estado de Iowa.
- **Smith, S. y Díaz Zorita, M.** 2005. Nuevas tecnologías para mejorar el crecimiento de soja y sus rendimientos en grano. Actas del Congreso Mundo Soja, Buenos Aires, Argentina, pp. 127-133.
- **Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J.** 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* 59: 124-42.
- **Andrade, F., H. Echeverría, N. González, S. Uhart, y N. Darwich.** 1996. Requerimientos de Nitrógeno y Fósforo de los cultivos de Maíz, Girasol y Soja. Boletín técnico N° 134. INTA EEA Balcarce, 17 p.
- **Bhuvanewari TV, Turgeon BG, Bauer WD** (1980). Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiol* 66: 1027-1031
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- **Fehr, W.; Caviness, C.; Burmood, D.; Pennington, J.** 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *glycine max* (L.) Merrill. En: *Crop Science* 11: 929-931.
- **Guamet, JJ.; Balatti, P.; Sodek, L.** 1991. Leaf senescence and nitrogen metabolism in soybeans switched from low to high nitrate. *Revista Brasileira de Botânica*, vol.14, p.15-20,
- **Guo, J., Wang, Y., Song, C., Zhou, J., Qiu, L., Huang, H., y Wang, Y.** 2010. A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (*Glycine max*): implications from microsatellites and nucleotide sequences. *Annals of botany*, 106 (3), 505-514.

- **Hungria, M., R.J. Campo, I.C.Mendes, 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. Studium Press, LLC, Houston (TX, USA), 43-93.
- **Lodeiro, A. R.; López García, S. L.; Mongiardini, E.; Quelas, J. I. y**
- **López, S.M.Y., Sánchez, M.D.M., Pastorino, G.N.** 2018. Nodulation and Delayed Nodule Senescence: Strategies of Two *Bradyrhizobium Japonicum* Isolates with High Capacity to Fix Nitrogen. *Curr Microbiol* 75, 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1478-0>
- **Magrin, G. O.; Travasso, M. I.; López, G. M.; Rodríguez, G. R. y Lloveras, A. R.** 2005. Vulnerabilidad de la Producción Agrícola en la Región Pampeana Argentina. Informe Final. 2da Comunicación Nacional Argentina sobre el Cambio Climático. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Argentina. 84 pp.
- **Peix A, Ramirez-Bahena M H., Velazquez E, Bedmar E J.** 2015. Bacterial Associations with Legumes .*Critical Reviews in Plant Sciences*, 34:17-42.
- **Pérez-Giménez J, Quelas J.I. & Lodeiro A. R.** 2010 Competition for Nodulation. *Soybean Physiology and Biochemistry*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978- 953-307-534-1, InTech
- **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.
- **Rodríguez-Navarro, D. N.; Margaret Oliver, I.; Albareda Contreras, M.; J. E. R.-S.** (2011). Review article Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agron. Sustain. Dev.* 31: 173-190.

- **Rubione C, P. Hernández y E. Tronfi.** 2002. Fertilización de soja en la provincia de Córdoba. Resultados de ensayos, campaña 2001/02. Informaciones agronómicas del Cono Sur 15:1-6. INPOFOS Cono Sur. Acassuso, Buenos Aires, Argentina.
- **Scheiner, J., R. Lavado y F. Gutiérrez Boem.** 1999. Dinámica de la absorción de nutrientes en un cultivo de Soja. En: Mercosoja 99: Resumen de trabajos y conferencias presentadas, pp 6-8. Rosario.
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (**Sinavimo**). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP). 2012. El cultivo de la soja (*Glycine max L.*) en Argentina. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/soja>.
- **Thies JE, Singleton PW & Bohlool B.** N 1991 Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. Applied and Environmental 57: 19–28.

8 ANEXO 1. REPORTE INFOSTAT ANOVA. TEST DE TUKEY

Análisis de la varianza NÓDULOS RAIZ PRIMARIA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N°NODULOS RAIZ PRIMARIA	200	0,43	0,40	32,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	732,00	11	66,55	13,12	<0,0001
TRATAMIENTO	676,02	4	169,01	33,31	<0,0001
BLOQUE	55,98	7	8,00	1,58	0,1447
Error	953,82	188	5,07		
Total	1685,82	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,37639

Error: 5,0735 gl: 188

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
E 109	9,53	40	0,36	A
control	8,43	40	0,36	A
E 163	6,98	40	0,36	B
FERTILIZADO	5,28	40	0,36	C
E 366	4,65	40	0,36	C

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,93505

Error: 5,0735 gl: 188

BLOQUE	Medias	n	E.E.	
parecla6	8,08	25	0,45	A
parcela8	7,44	25	0,45	A
parcela2	6,96	25	0,45	A
parcela1	6,88	25	0,45	A
parcela7	6,84	25	0,45	A
parecla5	6,68	25	0,45	A
parecla3	6,68	25	0,45	A
parecla4	6,20	25	0,45	A

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

N° NODULOS RAIZ SECUNDARIA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N°NODULOS RAIZ SECUNDARIA	200	0,54	0,51	29,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5104,15	11	464,01	20,18	<0,0001
TRATAMIENTO	4542,95	4	1135,74	49,39	<0,0001
BLOQUE	561,20	7	80,17	3,49	0,0015
Error	4322,73	188	22,99		
Total	9426,88	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,93013

Error: 22,9932 gl: 188

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
E 109	22,75	40	0,76	A
FERTILIZADO	21,13	40	0,76	A
control	14,75	40	0,76	B
E 163	13,33	40	0,76	B
E 366	10,18	40	0,76	C

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,11944

Error: 22,9932 gl: 188

BLOQUE	Medias	n	E.E.	
parcela1	19,20	25	0,96	A
parcela2	18,04	25	0,96	A B
parcela8	17,12	25	0,96	A B C
parecla3	16,88	25	0,96	A B C
parecla6	16,08	25	0,96	A B C
parcela7	15,76	25	0,96	A B C
parecla5	14,72	25	0,96	B C
parecla4	13,60	25	0,96	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**N° NODULOS TOTALES**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N°NODULOS TOTALES	200	0,59	0,56	22,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7570,55	11	688,23	24,19	<0,0001
TRATAMIENTO	6838,27	4	1709,57	60,08	<0,0001
BLOQUE	732,28	7	104,61	3,68	0,0010
Error	5349,25	188	28,45		
Total	12919,80	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,25952

Error: 28,4535 gl: 188

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
E 109	32,28	40	0,84	A
FERTILIZADO	26,40	40	0,84	B
control	23,18	40	0,84	B C
E 163	20,30	40	0,84	C
E 366	14,83	40	0,84	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,58253**

Error: 28,4535 gl: 188

BLOQUE	Medias	n	E.E.	
parcela1	26,08	25	1,07	A
parcela2	25,00	25	1,07	A B
parcela8	24,56	25	1,07	A B
parecla6	24,16	25	1,07	A B C
parecla3	23,56	25	1,07	A B C
parcela7	22,60	25	1,07	A B C
parecla5	21,40	25	1,07	B C
parecla4	19,80	25	1,07	C

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

RENDIMIENTO

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento Kg/Ha	40	0,63	0,48	13,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14168098,98	11	1288009,00	4,27	0,0009
TRATAMIENTO	6514946,60	4	1628736,65	5,40	0,0024
BLOQUE	7653152,38	7	1093307,48	3,62	0,0066
Error	8449951,00	28	301783,96		
Total	22618049,98	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=800,26153

Error: 301783,9643 gl: 28

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
E109	4472,63	8	194,22	A
E163	4463,13	8	194,22	A
E366	4152,88	8	194,22	A B
control	3794,38	8	194,22	A B
FERTILIZADO	3425,63	8	194,22	B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1136,20067

Error: 301783,9643 gl: 28

BLOQUE	Medias	n	E.E.	
Parcela 6	4657,00	5	245,68	A
Parcela 8	4598,00	5	245,68	A
Parcela 7	4558,20	5	245,68	A
Parcela 5	3920,20	5	245,68	A
Parcela 1	3895,20	5	245,68	A
Parcela 3	3711,40	5	245,68	A
Parcela 4	3605,20	5	245,68	A
Parcela 2	3548,60	5	245,68	A

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