

NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO EN EL CULTIVO DE LA SOYA *

Raúl Varela G. **

1. IMPORTANCIA DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

El suministro de nitrógeno requerido en la agricultura mediante fertilizantes comerciales está afectado por la crisis energética mundial, dado que el déficit de gas natural interfiere con la producción de amonio, por lo cual los fertilizantes nitrogenados son caros (Ayala, 1977).

El suelo de donde la planta obtiene ordinariamente su nitrógeno, rara vez llega a poseer el 1% de este elemento, no pasando por lo general de 0,5%, por esto, uno de los problemas más generales y constantes para el crecimiento de la planta, es la obtención de la cantidad de nitrógeno adecuada. (Bonner y Galston, 1973).

Por otro lado, el nitrógeno es un elemento abundante que constituye casi el 80% de la atmósfera terrestre (Child, 1976; Brill, 1977).

Un cultivo de soya que produce 2.500 Kg/Ha utiliza aproximadamente 200 Kg de N/Ha de los cuales entre 135 y 150 Kg de N/Ha están contenidos en la semilla, y las demás partes de la planta requieren de 60 a 70 Kg de N/Ha. La planta puede obtener dicho Nitrógeno de

* Contribución del Programa de Leguminosas de Grano del ICA.

** Ing. Agr. M.Sc. Instituto Colombiano Agropecuario. ICA. Programa de Leguminosas de Grano. A.A. 233 - Palmira.

tres fuentes: El suelo, El fertilizante nitrogenado o de la simbiosis con el *Rhizobium*.

Hay que tener en cuenta que los fertilizantes nitrogenados se lixivian fácilmente a través del suelo, por lo tanto la cantidad de fertilizante nitrogenado que hace falta para que las plantas absorban 200 Kg N/Ha varía según el medio ambiente (Hinson y Hartwig, 1978).

Debido a las anteriores consideraciones, se destaca la importancia económica de la fijación biológica de nitrógeno en la producción de soya, ya que es básicamente un proceso de "autofertilización" o sea que las plantas pueden elaborar parcialmente su propio fertilizante nitrogenado y además se conservan los niveles de este elemento combinado en el suelo.

También mejora la fertilidad de los suelos pues al fijar el nitrógeno del aire, favorece un mayor desarrollo radicular, que contribuye a mejorar la estructura del suelo, a la vez que deja un remanente de nitrógeno que queda en el terreno una vez terminado el cultivo de la leguminosa y que beneficia positivamente al cultivo que le sigue en rotación.

2. CAPACIDAD QUE TIENE LA SOYA PARA REALIZAR LA SIMBIOSIS CON EL RHIZOBIUM

Las raíces de la planta de soya se infectan con ciertas bacterias que viven en el suelo llamadas *Rhizobium japonicum*, las cuales causan el engrosamiento de ciertas áreas de la raíz. Las bacterias que se alojan en estos abultamientos llamados "Nódulos" reciben energía, en forma de carbohidratos, procedente de la fotosíntesis; parte de esa energía se utiliza en la transformación del nitrógeno atmosférico en forma de nitrógeno orgánico que la planta puede utilizar muy eficazmente.

En los carbohidratos translocados a los nódulos predomina: Sacrosa, Glucosa y algunos ácidos orgánicos (Bergersen, 1971).

Esto indica que la soya (Glycine max) tiene capacidad para formar la simbiosis con la bacteria (Rhizobium japonicum).

La siguiente pregunta lógica es: Puede la fijación de N satisfacer las necesidades de las plantas o debe complementarse con un abono nitrogenado?

Algunos investigadores han encontrado los siguientes resultados de cantidad de N fijado en Kg/Ha/cosecha en el cultivo de la soya: 40-80 (Erdman, 1959); 94 (Stewart, 1966); 84 (Weber, 1966 a y b); 40-120 (Sundara Pao, 1971); 33-40 (Hardy, 1971); 80 (Hardy y otros, 1971); 100 (Weber y otros, 1971); 93 (Vest y otros, 1973); 57-94 (CIAT, 1976); 98 (Belalcazar, 1977); 263-311 (Bezdicsek y otros, 1978).

Como se dijo anteriormente para un rendimiento de 2500 Kg/Ha se necesitan aproximadamente 200 Kg de N/Ha y para que las plantas absorban esta cantidad, probablemente se necesitan aplicaciones de por lo menos 300 a 400 Kg de N/Ha; por lo tanto la fijación biológica puede suplir gran parte de las necesidades de nitrógeno a la planta con un costo mínimo y sin lugar a dudas será utilizado más eficientemente.

Allos y Bartholomew (1959) afirman que con el proceso de fijación nunca se suple el total de N necesario para el crecimiento de la planta de soya y que aparentemente la planta tiene capacidad para suplir, por fijación, solamente la 1/2 o 3/4 partes del total de N que va a ser usado.

Streeter, (1973) demostró que los nódulos generalmente contribuyen con un porcentaje que varía entre 30 y 60% del nitrógeno total requerido por un cultivo de soya; el resto de nitrógeno necesario proviene del disponible en el suelo.

Bajo condiciones normales de campo, donde el nitrógeno fijado está presente en el suelo, aproximadamente 1/4 parte del nitrógeno

requerido proviene del proceso simbiótico (Hardy y Havelka 1975).

Besdizeck y otros (1978) informan que en sus experimentos, la cantidad de nitrógeno de la planta obtenido por fijación fluctuó entre 71 y 80%.

Deibert y otros (1979) fertilizaron isolfneas de soya noduladora y Noduladora con ^{15}N , y demostraron que cuando la soya crece en suelos con modesta fertilidad de N es capaz de fijar las 2/3 partes del N requerido por el cultivo.

Kohl y otros (1980) estudiaron la contribución del N obtenido biológicamente respecto al N total requerido por la soya, por el método de la diferencia en el contenido de N entre isolfneas noduladora y no noduladora y por la diferencia en el contenido de ^{15}N entre las dos isolfneas. Ambas estimaciones demostraron un alto nivel de fijación de N_2 . Por el primer método la contribución fué del 31% y por el segundo fué de 44%.

En Japón Kato (1981) estudió la relativa contribución del Nitrato y el N atmosférico, sobre el crecimiento vegetativo y reproductivo de la soya y encontró que la máxima fijación de N_2 se alcanza al inicio del llenado de las vainas y en este estado la cantidad de N derivado de la fijación simbiótica fué casi igual al tomado de los nitratos. Posteriormente a medida que se va formando la semilla, la actividad de fijación de N_2 va disminuyendo mientras que la toma de nitratos continúa casi al máximo hasta la formación total del grano. En la maduración la contribución del N simbiótico al N total de la planta se redujo a un 26%.

El hecho de que la fijación simbiótica resulte una fuente menos costosa de nitrógeno es indudable. Por consiguiente todo plan para suplementar la fijación de N con fertilización nitrogenada debe también considerar la forma de mantener un nivel elevado de fijación de N_2 .

3. EL PROCESO DE LA FORMACION DE NODULOS

El proceso de la nodulación empieza cuando una cepa específica de Rhizobium japonicum encuentra un sistema radicular de soya.

El desarrollo de la simbiosis entre R. japonicum y la soya, involucra una serie de interacciones entre la bacteria y el hospedero, en la que se distinguen una fase de pre-infección o sea la colonización de la Rizosfera; la formación de los nódulos y una fase intracelular que incluye la fijación del nitrógeno en sí.

Cuando no hay compatibilidad entre la bacteria y el hospedero se debe a que hay un bloqueo en una cualquiera de las etapas mencionadas y puede disminuir o anular la fijación. Cuando la incompatibilidad sucede en la etapa pre-infectiva se debe a la ausencia de especificidad entre el hospedero y la bacteria mientras que, si ocurre en cualquier estado de desarrollo de los nódulos se debe a la interferencia de factores ambientales o a cambios genéticos de uno de los componentes del sistema simbiótico (Nutman, 1963).

3.1. COLONIZACION DE LA RIZOSFERA

Generalmente la Rizosfera de una leguminosa estimula más el crecimiento del Rhizobium que la Rizosfera de la no-leguminosa. Elkan (1962) trabajó con isofeas de soya; no-noduladora y noduladora y encontró a los 40 días después de la germinación que había mayor número de R. japonicum, actinomicetos y microorganismos totales en la Rizosfera de las plantas no-noduladas que en la Rizosfera de las plantas noduladas. Sin embargo cuando las plantas maduraron la población total microbiana y los actinomicetos disminuyeron.

La infección temprana y el proceso de la nodulación generalmente son promovidos por alta densidad de células de Rhizobium en la Rizosfera. En un estudio se encontró que se necesitaban diez bacterias para producir un solo nódulo, cuando la Rizosfera estaba saturada con una población de 10^4 bacterias por mililitro de Rhizosfera (Vest y otros, 1973).

En el estado de pre-infección, varias interacciones entre el hospedero y la bacteria ocurren en la Rhizosfera, y también involucran la inducción y emisión de algunas sustancias. El hospedero aparentemente secreta o exuda triptofano, el cual es transformado por la bacteria en ácido indolacético (AIA).

Parece que el AIA estimula la deformación y rizada de los pelos radicales de la soya como preludio de la infección. La primera reacción específica del hospedero parece ser causada por polisacáridos extracelulares producidos por la bacteria, los cuales inducen en el hospedero la producción de poligalacturonasa. Esta enzima, conjuntamente con el AIA, afecta la plasticidad de la pared primaria de los tejidos radiculares jóvenes del hospedero y facilita la penetración de la bacteria (Nutman, 1963; Graham, 1973; Blondeau, 1977).

3.2. INFECCION DE LA RAIZ DEL HOSPEDERO

La infección de la raíz por el R. japonicum como en otras leguminosas ocurre a través de los pelos radiculares.

En 1974 en la Universidad de Minnesota encontraron una proteína de la soya que se enlaza con las células de R. japonicum. Esta proteína es una LECTINA y lanzaron la hipótesis de que esta proteína actúa como puente entre la bacteria y la planta (Brill, 1977). El pelo radicular se invagina en su parte apical, lo que permite que algunas células de Rhizobium pasen a través de esta sección invaginada (Graham, 1973; Vest y otros 1973). También el Rhizobium puede penetrar por las células epidermales de los pelos radiculares (Holsten y otros 1971).

En el pelo radicular se forma un hilo de infección y el Rhizobium que ha penetrado se moviliza hacia la parte basal del pelo radicular, penetrando a la corteza de la planta (Graham, 1973).

3.3. FORMACION DEL NODULO

Después de la penetración de la bacteria, algunas células de la región cortical del meristemo de la raíz infectada se transforman en tetraploides. Cuando el filamento de la infección se aproxima a alguna célula tetraploide, ésta se divide repetidamente generando una masa celular que se transforma en "Nódulo" (Nutman, 1963).

Graham (1973), dice que cuando el hilo de infección penetra, las células tetraploides, comienzan a romperse y los Rhizobios aún cubiertos por un mucilago, son liberados dentro del citoplasma celular; empiezan a multiplicarse y el AIA producido causa la multiplicación de las células tetraploides y de las diploides alrededor de ellas. Esta multiplicación de células conduce a la estructura llamada "Nódulo".

3.4. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL NODULO

La fase intracelular se inicia cuando bacterias portadoras de Rhizobium formadas del filamento de infección se rompen y las bacterias liberadas invaden las células tetraploides de la zona central del nódulo. La bacteria en una nueva cápsula, se multiplica antes de transformarse en "bacteroide", que es la forma rhizobiana fijadora de nitrógeno. La transformación incluye cesación de la división, aumento de tamaño, cambio de forma, síntesis de nitrogenasa, fragmentación de cromatina, aumento de la región perinuclear y modificación mitocondrial (Nutman, 1963).

Cuando los Rhizobios son liberados dentro de las células, aún son de forma "bacilar", pero ellas pierden rápidamente esta forma cilíndrica y se convierten en bacteroides y en esta forma inician la fijación de N (Graham, 1973).

Conjuntamente con la formación de bacteroides, entre estos y la membrana de la cápsula, se desarrolla el pigmento leghemoglobina e inicia la función fijadora de nitrógeno. En condiciones ambientales

compatibles, la fijación iniciada experimenta un aumento, para luego decrecer hasta su extinción. (Nutman 1963).

Sustancias reguladoras de crecimiento presente en el tejido infectado parecen ser las responsables de la estimulación del tejido y la formación del nódulo. Una Cytoquinina de P. japonicum fué reportada como estimulante de la división celular en tejidos callosos de soya. (Phillips y Torrey, 1970).

Durante la activa fijación, en el nódulo se distinguen cuatro zonas bien diferenciadas:

- a. La corteza del nódulo, que es la parte de afuera o tejido cortical no-infectado por la bacteria.
- b. La zona meristemática, es una región de activo crecimiento donde las células están infectadas pero el Rhizobium aún está en forma bacilar.
- c. El tejido central, que es el sitio donde "Los bacteriosis" realizan el proceso de la fijación simbiótica de nitrógeno.
- d. El área de degeneración del tejido nodular (Graham, 1973; Vest y otros, 1973).

Las células de R. japonicum son poliploides (Phillips y Torrey, 1970).

La hemoglobina se presenta en los nódulos como pigmentos rojos y se le denomina como Leghemoglobina; funciona como almacén y como transportadora de oxígeno. La leghemoglobina se produce únicamente en los nódulos eficientes ya maduros, durante las fases activas de fijación del nitrógeno. Si se interrumpe la fijación del nitrógeno, la leghemoglobina se convierte en legcoleglobina, que es de color verde. (Gómez, 1978).



FIGURA 1. Nodulación de la soya en el Valle del Cauca.

3.5. TIEMPO DE FORMACIÓN DEL NÓDULO Y LONGEVIDAD

Bergersen (1958) observó en ensayos de invernadero que la vida activa de los nódulos de soya inducidos por una cepa de R. japonicum era de 6 - 7 semanas. La rata de fijación de nitrógeno en estos nódulos permanecía constante desde 2 - 3 semanas después de su aparición hasta pocos días antes de que empiece a deteriorarse el nódulo o sea 7 semanas después de haber sido formado.

El desarrollo de los nódulos de soya que crecen en condiciones de campo empieza a observarse desde los 6 días después de la siembra y dependiendo de las condiciones de crecimiento, la fijación de nitrógeno puede detectarse 2 a 3 semanas más tarde. Se ha demostrado que la fijación de nitrógeno en soya que crece en condiciones de campo se extiende de 3 - 4 semanas después de la siembra hasta cerca a la maduración o sea 12 - 13 semanas más tarde (Hardy y otros, 1968; Weber y otros, 1971).

Este período no es funcional a un solo nódulo sino que debe estar en función de todos los nódulos. Diez semanas después de la siembra se pueden encontrar varios nódulos deteriorados sobre la raíz principal pero no en las raíces laterales (Caldwell y Weber, 1970).

Belalcazar, (1977) encontró que la máxima fijación de nitrógeno en líneas de soya ocurre al inicio de la formación de vainas, 60 días después de la siembra, debido a la necesidad de la planta de abastecer sus tejidos de N y aumentar la cantidad de Leghemoglobina en los nódulos. La fijación de nitrógeno declina marcadamente, al término medio de la formación del grano, como consecuencia de la movilización de nutrientes.

Deibert y otros (1979) concluyeron que la mayor fijación de nitrógeno fué obtenida en el estado R 5 (empezando la formación del grano); de aquí en adelante los nódulos comienzan a envejecer y a disminuir su actividad; consecuentemente empieza a incrementarse la dependencia del N del suelo o del N del fertilizante aplicado.

En condiciones de invernadero y en soya sembrada sobre agar nutritivo se observó que la iniciación de la nodulación ocurre entre 2 - 3 semanas después de la inoculación por lo cual esta es una etapa crítica para el cultivo ya que no hay fijación de nitrógeno. Varela (1977).

4. INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD INEFICIENCIA Y EFICIENCIA

4.1. DEFINICION

Las investigaciones sobre la forma como el Rhizobium fija el nitrógeno atmosférico y los factores que afectan la simbiosis, permiten concluir que para que la bacteria fije nitrógeno del aire se requieren condiciones especiales de "infectividad" y "efectividad" o sea que existen Rhizobios específicos para cada tipo de leguminosa las cuales no pueden producir nódulos en otra clase de leguminosa y que no todos los Rhizobios capaces de nodular necesariamente pueden fijar nitrógeno.

La "infectividad" se refiere específicamente a la capacidad de virulencia que tiene la bacteria para penetrar dentro de la raíz, formar el hilo de infección e inducir la formación del nódulo. En cambio la efectividad es la capacidad que tiene la bacteria para fijar el nitrógeno atmosférico en el interior del nódulo (Blondeau, 1977).

Los límites que existen entre los factores que afectan la nodulación y los de la fijación de nitrógeno son a veces definidos. Por ejemplo al aumentar un factor, como el fósforo puede originar una buena fijación. Es aconsejable definir separadamente el efecto de cada factor teniendo en cuenta las correlaciones esenciales implicadas.

Por otro lado, otros factores que no afectan la formación del nódulo, intervienen sin embargo en el proceso de fijación por

anormalidades desarrolladas posteriormente en el estado de simbiosis, o por restricciones en el desarrollo normal de la planta y como consecuencia en la translocación de los productos fotosintéticos al nódulo. Puede ocurrir también alguna inhibición en la translocación de los productos del nódulo a la planta y a su turno, se inhabilita para proveer todos los factores necesarios para la simbiosis.

Se considera que la nodulación es efectiva cuando fija el nitrógeno atmosférico a la planta de soya y se reconoce porque presenta nódulos grandes, de poco número y de color rojo o rosado al hacer un corte transversal del nódulo, también es apreciable la efectividad por el vigor y el color verde intenso de la planta. Se dice que la nodulación es inefectiva cuando fija muy poco o casi nada, siendo los nódulos pequeños y de color blanquecino. (Date, 1970; Gómez, 1978).

La presencia de un gran número de nódulos no ha de tomarse necesariamente como garantía de una fijación eficiente de nitrógeno (Gómez, 1978).

Vest, Weber y Sloger (1973) han clasificado la nodulación en la siguiente forma:

CLASIFICACION	DESCRIPCION
I. No-nodulado	Sin nódulos. No hay evidencia externa de que se haya iniciado la formación de nódulos en la raíz. Plantas pequeñas y cloróticas. Síntoma típico de deficiencia de nitrógeno.
II. Nodulado	En la raíz se observa que se ha iniciado la formación de nódulos.

CLASIFICACION	DESCRIPCION
A. Inefectiva	La raíz muestra una proliferación cortical de pequeñas estructuras nodulares de color blanco, verde ó rosado por dentro. Plantas pequeñas y cloróticas. Síntomas típicos de la deficiencia de nitrógeno.
B. Efectiva	Raíces noduladas.
1. Ineficiente	Nódulos verdes o blancos por dentro y algunas veces rosado. Plantas de pequeñas a medianas con cierto grado de clorosis dependiendo del grado de ineficiencia.
2. Eficiente	Nódulos rojo-rosado por dentro. Plantas verde-oscuro y aparentemente sanas y vigorosas.

Genotipos no-noduladores y su aislínea noduladora han sido usadas como herramientas para medir la fijación de nitrógeno y el nitrógeno residual en el suelo (Vest, 1971).

En Colombia el Programa de Leguminosas del Grano del ICA también tiene dos aislíneas: noduladora y no noduladora que son la ICA-Tarao con nódulos y la ICA-Tarao sin nódulos.

La mayoría de las interacciones entre genotipo de soya-cepa de R. japonicum dan como resultado una nodulación efectiva y fijación eficiente. Sin embargo, algunas de estas interacciones son más efectivas en la formación del nódulo y más eficientes en la fijación de nitrógeno que otras (Vest y otros, 1973).

4.2. COMPETENCIA ENTRE CEPAS DE Rhizobium japonicum

Se ha pensado que la competencia entre las cepas de R. japonicum es por el sitio de localización del nódulo, pero el genotipo de la planta hospedera también tiene un efecto sobre la inducción de la nodulación por cierta cepa de R. japonicum (Vest y otros, 1973).

Caldwell (1969), encontró que las cepas de R. japonicum difieren en su habilidad competitiva en un suelo libre de R. japonicum. La cepa 110 fué encontrada en un 98% de los nódulos cuando se aplicó en competencia con la cepa 38 y en un 76% de los nódulos cuando estaba en competencia con la cepa 76. La cepa 76 produjo el 95% de los nódulos cuando se aplicó en competencia con la cepa 38.

Miller (1970) encontró que en semillas inoculadas con turba donde el inóculo llevaba más de 10^6 bacterias/semilla aumentó la recuperación de la cepa 110, pero la recuperación nunca pasó del 12% del total. Evidencias obtenidas de dos fechas de muestreo indicaron que las cepas nativas de R. japonicum se encontraron en mayor porcentaje en nódulos muestreados a los 30 días, en cambio las cepas aplicadas fueron más numerosas en el muestreo a los 60 días después de la siembra.

Caldwell y Vest (1970) afirman que solamente del 5-10% de los nódulos de la planta provienen del inóculo aplicado al suelo en la semilla, cuando en el campo hay establecidas poblaciones de R. japonicum.

Cuando se siembra soya en suelos que contienen altas poblaciones naturales de R. japonicum solamente el 10% de los nódulos son formados por la cepa inoculada; el rendimiento y el % de proteína en el grano no aumenta significativamente con la inoculación (Ham, Caldwell y Johnson, 1971).

En Colombia Belalcazar (1977) comprobó que la población de R. japonicum nativo, es capaz de fijar igual cantidad de nitrógeno en la planta, que las cepas que se pretenden naturalizar.

Las investigaciones realizadas sobre la competencia entre cepas de R. japonicum permite concluir que es poco el éxito que se logra al inocular en áreas de producción de soya donde las poblaciones de R. japonicum están casi establecidas (Vest y otros, 1973).

4.3. VARIABILIDAD ENTRE LAS CEPAS DE R. japonicum

No solamente el genotipo de la soya difiere en susceptibilidad a la nodulación ya que las cepas de R. japonicum también difieren en su habilidad para inducir nodulación y fijación de nitrógeno (Vest y otros, 1973).

Allen y Baldwin, citado por Vest y otros (1973) clasificó en dos grupos (efectivos e inefectivos), diferentes cepas de R. japonicum de acuerdo a la inducción de cierto tipo de nodulación. Las cepas efectivas producen nódulos grandes alrededor de la raíz principal, en cambio las cepas inefectivas producen muchos nódulos pequeños esparcidos en todo el sistema radicular. Las plantas con nodulación efectiva eran verdes y vigorosas, mientras que las que tenían nodulación inefectiva eran pequeñas y cloróticas y no se diferenciaban del testigo no-inoculado.

5. FACTORES AMBIENTALES QUE LIMITAN LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO

El conocimiento de los factores que limitan la fijación de nitrógeno en el cultivo de la soya es de mucha importancia en la producción de esta leguminosa ya que frecuentemente se están usando las inoculaciones artificiales con Rhizobium para reemplazar en parte los fertilizantes nitrogenados minerales, debido a que el costo es cada día más alto.

5.1. SUMINISTRO DE NUTRIENTES

5.1.1. Nitrógeno.

La influencia del suministro de nutrientes, sobre la fijación

de N en soya ha sido estudiada por varios investigadores. Han demostrado que la fertilización de N reduce el número, el tamaño o la eficiencia de los nódulos y la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico. Allos y Bartholomew (1959); Weber (1966 b); Hinson (1975 a y b); Harper y Cooper (1971) y Streeter (1973).

Gibson y Nutman (1960) reportaron que hay efecto detrimental del fertilizante nitrogenado sobre la nodulación y dicen que altas dosis de nitrógeno aplicado al momento de la siembra reducen la nodulación.

Vincent (1965) afirma que la máxima fijación de nitrógeno en la soya está asociada con bajos niveles de fertilización nitrogenada y Weber (1966 b) sostiene que altos niveles de N tienden a reducir el número de nódulos y a inhibir el desarrollo de la nodulación y la fijación de N; esta reducción depende de la cantidad y forma de N combinado que se aplique.

Bear y Hoover (1971) también estudiaron el efecto del N sobre la nodulación y rendimiento de la soya y concluyeron que no había aumento de rendimiento y también que el N reduce el número y tamaño de los nódulos cuando se aplica en dosis muy cercana al total necesario para el máximo crecimiento.

Vest y otros (1973) indican que en suelos pobres en nitrógeno, la soya nodulada obtiene este elemento esencialmente de la fijación simbiótica, sin embargo, el uso de cantidades altas de fertilizantes nitrogenados puede disminuir notoriamente la fijación de nitrógeno atmosférico.

Harper (1974) sostiene que la soya requiere tanto del nitrógeno del suelo (principalmente nitritos) como del nitrógeno atmosférico y que la fijación simbiótica es mayor en presencia de cantidades bajas de nitrato que en ausencia del mismo; también encontró que dosis de 200 Kg/Ha de nitrógeno inhiben completamente la fijación de nitrógeno.

Olsen y otros (1975) encontraron que la aplicación de un fertilizante nitrogenado sobre la superficie del suelo en condiciones de campo no aumenta el rendimiento de la variedad Bragg y el nivel más alto (448 Kg/Ha) lo redujo y que puede o no haber una disminución significativa en la nodulación y altura de la planta de soya. En una variedad de soya no noduladora, sí hubo aumento de altura y peso seco de planta con aplicaciones de fertilizante nitrogenado.

Semu y Hume (1979) también encontraron que dosis de 50, 100 ó 200 Kg de N/Ha disminuyen el número de nódulos, la masa nodular y la fijación de N_2 (C_2H_2) en el cultivo de la soya.

Jiménez y Villalobos (1980) indican que dosis de 60 y 120 Kg de N/Ha afectan negativamente el número de nódulos/planta de soya.

Barthakur (1980) trabajando en un suelo ácido (pH 5) arenoso-arcilloso (inseptisol) encontró que la aplicación de 40 Kg de N/Ha en forma de sulfato de amonio, aumentó el 28% del peso seco de la planta de soya pero disminuyó la nodulación en un 150%.

5.1.2. Fósforo.

El fósforo es necesario principalmente para el suministro de energía al nódulo y en su ausencia, los nódulos son pequeños y no fijan nitrógeno (Loteró, 1974).

Algunos investigadores han registrado el efecto posible de la aplicación de fósforo con respecto a la producción de materia verde; materia seca de la parte aérea; de las raíces y peso de los nódulos; el contenido de nitrógeno tanto en las raíces como en los nódulos (Neme 1965; Jones y Freitas 1970).

Ross y Gilliam (1973) recomiendan la inoculación con micorrizas para que realice la toma del fósforo y así contrarrestar las necesidades de suministro de este elemento.

En experimentos de campo, Ham y Caldwell (1978) encontraron que soya no-noduladora fertilizada con 100 Kg de N/Ha y 35 de P/Ha había casi doblado la eficiencia de uso del fertilizante fosforado en comparación con soya noduladora fertilizada con la misma dosis de P, pero sin fertilización nitrogenada.

Sampet (1978) estudió la aplicación de 30 y 60 Kg de N/Ha como NH_4NO_3 y el fósforo en dosis de 50, 100 y 150 de P/Ha en forma de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; en un suelo de pH 4,8; 5,5% de M.O y 7,5 p.p.m. de P disponible y encontró que el fósforo, hasta 50 Kg/Ha estimuló fuertemente el crecimiento y la nodulación de la soya a todos los niveles de nitrógeno. No hubo respuesta adicional a los niveles más altos de fósforo.

Hanson (1979) presenta aumentos en la nodulación de la soya como respuesta a dosis de P_2O_5 hasta de 800 Kg/Ha.

Cassman y otros (1980) indican que en plantas de soya fijadoras de N crecidas en niveles altos de P (2,0 ug/ml), el peso seco de nódulos constituyen el 9% del total del peso seco de la planta y 65% del peso seco de la raíz a los 35 días de edad. Al disminuir el suministro de P se inhibe el crecimiento nodular relativamente más que el crecimiento de la raíz.

Jiménez y Villalobos (1980) encontraron que en un suelo arcilloso (Ustropept), dosis de 150 y 300 Kg de P_2O_5 /ha; no mostraron ningún efecto sobre el número de nódulos a los 24 días de la siembra; pero a los 98 días sí hubo aumento altamente significativo, esto posiblemente se debe a la solubilidad lenta del fósforo y también a la alta fijación del fósforo en dicho suelo; de tal manera que solamente en el segundo muestreo de nódulos se pudo detectar el aprovechamiento de este elemento en la nodulación.

5.1.3. Potasio.

Bajo condiciones adecuadas de fósforo, el potasio estimula la fijación y fijación de nitrógeno. De Mooy y Peseck (1966) encontraron

que la nodulación máxima de la soya requiere altas aplicaciones de fósforo y potasio.

Jones y otros (1977) estudiaron en condiciones de campo el efecto de la fertilización con fósforo y potasio, sobre el número y peso de los nódulos de soya (Glycine max) y encontraron que tanto el P como el K aplicados solos aumentaban el número de nódulos por planta y por unidad de volumen de suelo. El K aumentó más que el P, el número y peso de nódulos, pero el incremento fué mayor cuando se aplicó el P junto con el K (60 Kg de P/Ha + 112 Kg de K/Ha).

El potasio normalmente puede asumir un papel específico en la simbiosis, por su función en la regulación osmótica y en la actividad de las enzimas.

5.1.4. Calcio.

Banath, Greenwood y Loneragan (1966) estudiaron el efecto de la deficiencia moderada de calcio en el metabolismo del nitrógeno de la planta en simbiosis. Ellos establecieron que la deficiencia del calcio hace desviar el abastecimiento del nitrógeno fijado por los nódulos, hacia otros órganos. Sin embargo, la concentración de nitrógeno de los nódulos también decrece, aunque el peso de estos, es independiente del calcio y tiene poco efecto en la concentración de los carbohidratos solubles en el nódulo, este hecho está demostrado por el aumento de la concentración de almidón.

Blevins y otros (1977) estudiaron el efecto de tres concentraciones de calcio (0,1 - 0,5 - 1,0 mM) y tres semanas después de la inoculación con R. japonicum encontraron que con la más baja dosis de Ca se redujo significativamente el número y peso de nódulos, la reducción de acetileno y el peso fresco de la raíz; y se aumentó la longitud del 2o. y 3o. internudo; en cambio no hubo diferencias significativas en los parámetros antes mencionados, entre las dosis de 0,5 y 1,0 mM de Ca.

5.1.5. Azufre.

Ashford y Bolton (1961) sugieren que la deficiencia de azufre restringe el crecimiento de las plantas como resultado de su deficiente nutrición y que la deficiencia no ejerce inhibiciones en las bacterias.

Parece que el azufre no tiene efecto en el proceso simbiótico de la fijación de nitrógeno y que más bien su efecto es a través de la síntesis de proteína, a partir del nitrógeno disponible para las plantas, porque el azufre es componente de ciertas vitaminas y enzimas esenciales; es necesario en la síntesis de clorofila o sea que se requiere para una activa fotosíntesis (Vincent, 1965).

Sampet (1978), aplicó en un suelo franco arenoso (pH 4,8) dosis de 0,20 y 40 Kg de S/Ha en forma de Na_2SO_4 , en combinación con varias dosis de nitrógeno y fósforo y concluyó que solo hubo respuestas infimas al azufre en el crecimiento y nodulación de la soya.

5.1.6. Elementos Menores.

Muchos desórdenes debido a las deficiencias de elementos menores han demostrado que afectan el crecimiento de las leguminosas, pero la mayoría de ellos limitan la fijación de nitrógeno. Se ha demostrado que los tres que juegan el papel más importante en la fijación del nitrógeno son Mo, Co y B (Vincent 1965).

5.1.6.1. Molibdeno.

El Mo es un componente de la enzima nitrogenada y por lo tanto es indispensable en la actividad de esta enzima para la fijación de nitrógeno. El Mo tiene la tendencia de ser menos disponible en suelos ácidos (Burns y otros, 1970; Hardy y otros, 1971).

El efecto del Molibdeno parece ser más importante en el proceso de fijación que en el de la nodulación. Stewart (1966) indica que bajo condiciones deficientes de molibdeno, la mayor proporción del

elemento se acumula en los nódulos, especialmente en el "tejido bacterioidal".

Rao y otros (1978) efectuaron aplicaciones foliares de Mo en forma de Molybdato de amonio en concentraciones de 10, 50 y 100 p.p.m. a los 35 días de edad de la planta de soya. Observaron que 10, y 50 p.p.m. aumentaron significativamente el tamaño y número de nódulos; el peso seco de la planta; el número de vainas/planta y el rendimiento/planta. El mayor incremento de rendimiento se obtuvo con 50 p.p.m. (16,4%). La concentración más alta (100 p.p.m.) produjo toxicidad manifestada por un color verde amarillento en las hojas y reducción en el rendimiento de grano/planta (-1,3%). No hubo diferencia significativa en el % de proteína de la semilla.

Weeraratna (1979) estudió en un suelo laterítico de pH 5,3 la forma de aplicación y la concentración del Molybdeno en forma de Molybdato de Amonio y encontró que respecto al peso de materia seca, contenido de nitrógeno en el follaje y rendimiento de la soya; una solución al 2% fué significativamente mejor que al 1% e igual a la de 5%. La aplicación al 2% fué más efectiva tratando la semilla que aplicando al suelo. Además encontró que dicha solución al 2% aplicada en plantas inoculadas, el rendimiento y contenido de nitrógeno, fué significativamente más alto que en plantas no-inoculadas y estas fueron iguales al testigo sin inocular y sin aplicación de Molybdeno. En esta forma demostró que el efecto benéfico de la aplicación del Molybdato de amonio se debe a su influencia sobre la fijación de nitrógeno.

Barthakur (1980) en un suelo ácido (pH 5) ensayó tres niveles de Molybdeno 0, 200 y 400 grs/ha como Molybdato de Amonio, aplicado a la semilla de soya en combinación con dos niveles de Cal: 0 y 2 Tons/Ha; encontró aumentos altamente significativos en el peso seco de la planta (6%); en el número de nódulos/m² y en el rendimiento del grano en quintales/Ha. La aplicación de Cal incrementó el número de nódulos en un 300% y el rendimiento del grano en 30%. La

Interacción Cal x Molybdeno sobre el peso seco de la planta fué altamente significativa. El Molybdeno incrementó más el peso seco de la planta en ausencia de Cal que con 2 Tons de Cal y fué más efectiva la dosis de 200 que la de 400.

Tripathi y Edward (1978) estudiaron el efecto de 1 Kg/Ha de Zn y 1 Kg/Ha de Mo separadamente o en combinación, en forma de sulfato de zinc y molibdato de Amonio. La aplicación del Mo solo, produjo el más alto peso seco de la planta, peso seco de raíz, % de nitrógeno en el follaje y rendimiento del grano. El tratamiento con Zn produjo el más alto número de nódulos/planta pero solamente con inoculación; esto posiblemente se debe a que el zinc induce aumentos en el número de pelos radiculares. La combinación de Mo + Zn no produjo beneficios adicionales, comparado con lo obtenido con Zinc solo.

5.1.6.2. Cobalto.

El Cobalto está presente en los nódulos, principalmente como vitamina B₁₂; un aumento en la fijación está asociado con un aumento en vitamina B₁₂ y en el contenido de Leghemoglobina en el nódulo (Stewart, 1966).

Ahmend y Evans (1960) encontraron que las plantas de soya que crecen en ausencia de Cobalto muestran un severo retardo en el crecimiento y síntomas similares a los de la deficiencia de nitrógeno, mientras que la soya que crece en presencia de 0,1 a 1,0 p.p.b. de cobalto se desarrollan normalmente; las plantas sanas muestran una cantidad mayor de vitamina B₁₂ en los nódulos que las plantas que crecen en soluciones deficientes de cobalto. Es rara la deficiencia de este elemento por sus requerimientos tan pequeños.

Kliewer y Evans (1963) postularon que los organismos que fijan nitrógeno requieren cobalto como un factor coadyuvante en las diversas etapas de los procesos metabólicos, no directamente relacionados con el proceso de fijación; o puede actuar en el proceso satisfaciendo las necesidades crecientes de cobalto cuando el proceso de fijación

está en funcionamiento. En esta última explicación puede esperarse un aumento en la síntesis de coenzimas que contienen cobalto.

Rao y otros (1980) aplicaron foliamente el cobalto en forma de nitrato de cobalto, en dosis de 50, 100 y 200 p.p.m., en soya de 35 días de edad. Concluyeron que la concentración más baja produjo el mayor: número de nódulos/planta; volumen de nódulos/ml (tamaño); peso seco/planta y rendimiento/planta, este último parámetro se incrementó en un 7,3%.

El % de proteína en la semilla no tuvo diferencia significativa. La concentración de 200 p.p.m. produjo toxicidad manifestada por un color verde amarillento en las hojas y disminución del rendimiento por planta de -9,3%.

5.1.6.3. Boro.

Según Hallsworth (1958) el hecho de que el Boro es esencial para la división celular explica su efecto en la nodulación; sino existe suficiente boro, la división celular que surge alrededor del hilo de infección no ocurre y en consecuencia el nódulo no se desarrolla.

La formación de nódulos es restringida por deficiencias de Boro, estos efectos son reducidos y se confunden con deficiencias de otros microelementos. Se sugiere que el requerimiento de Boro para la planta está relacionado con el desarrollo del nódulo (Munns 1977).

5.1.6.4. Hierro.

El hierro es necesario para el crecimiento sano de las leguminosas, sea que ellas utilicen el nitrógeno elemental o combinado, pero existe un requerimiento adicional de este elemento cuando las plantas dependen del nitrógeno fijado. (Stewart, 1966).

El hierro está íntimamente relacionado con la fijación de nitrógeno como constituyente de la Leghemoglobina, importante en el funcionamiento de los nódulos posiblemente facilitando la difusión del

oxígeno en la respiración. También es componente de la nitrogenasa (Bergersen, 1962).

5.1.6.5. Cobre.

Deficiencia de cobre en nódulos puede ocasionar la presencia de pocos bacteroides y más pequeñas pero su papel bioquímico es poco conocido (Munns, 1977).

Hallsworth, Greenwood y Yates (1964) sugieren que el incremento en la fijación de nitrógeno a niveles altos de cobre, pueden atribuirse a un mejoramiento en el abastecimiento de los metabolitos de las hojas, como también a su actuación en las funciones previamente mencionadas, pero no a un efecto directo en el proceso de fijaciones de nitrógeno.

5.1.6.6. Manganeso.

Mask y Wilson (1978) en condiciones de invernadero no encontraron respuestas significativas en el crecimiento de la raíz principal, fijación de nitrógeno y medidas de nodulación de la soya al adicionar bajas dosis de manganeso, mientras que la más alta dosis (50 mg de Mn/g.) causó solamente mediana toxicidad en términos de crecimiento de la raíz principal y contenido de nitrógeno.

5.1.6.7. Aluminio.

Sartain y Kamprath (1977) estudiaron el efecto de la saturación del aluminio intercambiable del suelo sobre los nódulos de la soya y encontraron que el crecimiento de la raíz principal y el número de nódulos aumentó significativamente al disminuir la saturación de aluminio desde 28 a 4%.

5.2. CARACTERISTICAS DEL SUELO

5.2.1. Aireación.

Muchos suelos tropicales son susceptibles a compactación debido

a la humedad. Esta compactación puede restringir severamente el crecimiento de la leguminosa debido a la pobre aireación en la zona de raíces y por lo tanto limita la fijación de nitrógeno. Un control cuidadoso de las operaciones en la preparación del suelo y el riego pueden minimizar este problema (Whitney, 1975).

El tráfico de la maquinaria agrícola puede afectar la nodulación de la soya; se ha encontrado que surcos con tráfico de maquinaria por ambos lados dieron de 20-30% menor número de nódulos y 36% menos masa nodular que surcos con tráfico de maquinaria agrícola por un solo lado. Los efectos indirectos de la compactación del suelo sobre la nodulación están relacionados con el oxígeno del suelo y la cantidad de agua. (Voorhees y otros, 1976).

Una buena estructura del suelo es favorable para los Rhizobium. Cuando hay carencia de O_2 en el suelo no se forma la Leghemoglobina (Gómez, 1978).

5.2.2. Humedad.

La supervivencia del Rhizobium en el suelo, como en la semilla inoculada, es muy delicada. Es muy sensible a la sequía y un exceso de agua puede limitar la aireación y, por lo tanto, la viabilidad de la bacteria (Gómez, 1978).

El proceso de fijación dentro del nódulo requiere condiciones anaerobicas. Pero el nódulo en sí necesita suficiente O_2 de allí que el exceso de humedad afecta la adecuada aireación de las raíces y afecta la actividad de los nódulos y su formación. (Nutman, 1972). También afecta por la reducción del oxígeno disponible que es requerido por los nódulos, el cual se reduce grandemente en suelos de pobre estructura. El agua en exceso interfiere en la ventilación de los tejidos de los nódulos restringiendo la difusión del oxígeno (Bergersen, 1971).

Sprent (1972) trabajando con Glycine max encontró que la fijación de nitrógeno se detiene cuando la planta se aproxima al punto

de marchitamiento pero rápidamente se recupera cuando el agua está de nuevo aprovechable.

Klucas (1975) encontró que en parcelas no irrigadas los nódulos de diferentes variedades de soya producían una disminución del 60% en la actividad específica de la nitrogenasa, entre los 68 y 75 días después de la siembra.

Pankhurst y Sprent (1975) trabajaron con nódulos de soya desprendidos de la raíz y al bajar el potencial de agua de los nódulos de $-1 \times 10^5 P_a$ (nódulos turgidos) hasta $-9 \times 10^5 P_a$ (nódulos moderadamente secos) encontraron que se perdía el 75% de la actividad fijadora de nitrógeno (medida por reducción de acetileno) y el 50% de la actividad respiratoria.

Sprent y Gallacher (1976) también de sus investigaciones concluyeron que los nódulos de soya sometidos tanto a deficiencia de agua como a exceso puede disminuir la actividad de la nitrogenasa (Reducción de C_2H_2).

Smith y del Río Escurra (1979) evaluaron diferentes tipos y dosis de inoculantes en un suelo libre de R. japonicum sometiéndolos a condiciones de sequía e irrigación y encontraron que el número de nódulos en la raíz principal, el número total de nódulos y el peso seco de nódulos por planta se aumentó significativamente en condiciones de irrigación. Todos los valores de nodulación fueron mínimo 3 veces mejores bajo condiciones de irrigación que bajo condiciones de sequía. El número de nódulos en la raíz principal fué 6 veces mayor bajo condiciones de irrigación que en condiciones secas.

5.2.3. Temperatura.

Son diferentes los efectos de la temperatura sobre la nodulación y sobre la fijación de nitrógeno. En general una temperatura óptima para la nodulación no lo es para la fijación.

La temperatura del suelo influye no solamente en la supervivencia de las células de *Rhizobium*, sino también en la nodulación y la fijación; en la mayoría de las variedades de leguminosas la temperatura óptima para la nodulación está entre 28 y 32°C (Graham y Hubell, 1975).

La fijación de N_2 parece ser menos sensitiva a la temperatura que la nodulación (Dart y Day, 1971).

La nodulación de varias leguminosas tropicales es muy sensible a "bajas" temperaturas de la raíz, siendo pobre o ausente a 18 - 21°C pero buena a 24°C (Dart y Harris, 1972). Nutman (1972), afirma que el rango máximo de tolerancia a condiciones extremas varía ampliamente de acuerdo a la especie, siendo óptimo para la soya entre 20 y 30°C.

Galleti y otros (1972), encontraron en condiciones de invernadero, que temperaturas diurnas máximas por encima de 33°C perjudican la iniciación de la nodulación de la soya y restringe la fijación de nitrógeno.

Lindemann y Hamm (1979) investigaron la influencia de las siguientes temperaturas de raíz: 15-20-25 y 30°C en plantas de soya, sobre altura y peso de la planta, número y peso de nódulos y reducción de acetileno. El máximo peso seco de planta y número de nódulos/planta ocurrió a 25°C. Mayor peso seco de nódulos y reducción de acetileno se obtuvo a 25°C pero a las 3 - 4 semanas después de la siembra, ya que a las 5 - 6 semanas, estos dos parámetros fueron más altos a 20°C que a 25°C. Los nódulos se degeneraron más rápidamente a 25°C.

Trang y Giddens (1980) evaluaron el efecto de 15-20-25 y 30°C de temperatura de raíz y 0-15,30 y 45 p.p.m. de N sobre el crecimiento y fijación de N_2 , en plantas de soya. El aumento de temperatura desde 15°C hasta 30°C dió como resultado un incremento en la tasa relativa de crecimiento de la planta y en el contenido de N del follaje, mientras que en las raíces el N total y los carbohidratos no -

estructurales fueron disminuidos. No hubo efecto significativo al incrementar la temperatura, sobre el crecimiento de raíces sobre el número y masa de nódulos. La fertilización nitrogenada aumentó el contenido de N del follaje pero disminuyó el número y la masa de nódulos.

Munevar y Wollum II (1981) estudiaron el efecto de altas temperaturas en la raíz 28-34 y 40°C con 13 cepas de Rhizobium japonicum, sobre la nodulación y fijación de nitrógeno y la producción de materia seca en plantas de soya. El aumento de temperatura desde 28 hasta 40°C, tuvo efecto detrimental sobre el número de nódulos, actividad específica de la nitrogenasa, el contenido de N y el peso seco de follaje y raíces. La magnitud de este efecto depende altamente de la cepa de Rhizobium utilizada; por lo tanto en regiones donde el factor limitante en la simbiosis es la alta temperatura del suelo, una buena herramienta es la selección de cepas de R. japonicum, que sean afectadas en menor intensidad.

5.2.3. pH.

Stewart (1966) dice que uno de los efectos de la acidez del suelo en la fijación, puede manifestarse a través de su acción sobre la disponibilidad de algunos nutrientes, como el molibdeno o por el aumento de la toxicidad de algunos elementos tales como el Manganeso y el aluminio; también afirma que la mayoría de las leguminosas fijan nitrógeno en un rango de pH comprendido entre 5,0 y 8,0.

Gómez (1978) indica que el pH crítico para el Rhizobium en el suelo varía entre 3 y 4,9.

Weaver, Frederick y Dumenil (1972) encontraron que en una variación de pH desde 5,0 hasta 8,0 no afectó la total población de R. japonicum, pero que determinada cepa puede tener una ventaja competitiva a un determinado pH.

Mengel y Kamprath (1978) estudiaron el efecto del pH y el encalamiento sobre el crecimiento y nodulación de la soya en suelos

orgánicos (Histosoles) cuyo pH fluctuaba entre 4 y 5 y encontraron que el número y peso de los nódulos aumentó significativamente al aumentar el pH del suelo. El pH crítico para el crecimiento de los nódulos fluctuó entre 4,6 y 4,8. La respuesta del crecimiento al encañamiento se atribuyó a la disminución del aluminio soluble intercambiable y al aumento del calcio soluble lo cual produjo un pH favorable para la actividad del Rhizobium.

Suelos de alta salinidad generalmente coinciden con altos contenidos de sodio, bicarbonatos y boratos, además de pH alto. Los principales efectos de la fijación de nitrógeno son producidos por los incrementos tan fuertes en la concentración de sales en las hojas y la reducción de los niveles de fósforo, inhibiéndose el crecimiento de los nódulos (Munns, 1977).

5.3. LUZ

La luz y otros factores como la concentración de CO_2 que afectan la fotosíntesis influyen tanto en la formación del nódulo como en su funcionamiento. (Vincent, 1965).

Según Whitney (1975) la radiación solar es útil para la fijación de nitrógeno solamente cuando hay disponible una adecuada humedad, pero en épocas lluviosas la radiación solar puede ser limitante durante la época de crecimiento debido a la nubosidad.

Generalmente el peso de los nódulos y la nodulación se incrementan con mayor intensidad de luz y longitud del día (Norris y Date, 1976).

Brose y Freire (1976) estudiaron en condiciones de invernadero el efecto de la humedad y la luminosidad sobre la actividad de los nódulos de soya y encontraron que la mayor actividad total y específica de los nódulos se obtuvo con 75-100% de la capacidad de campo y en presencia de luz. La oscuridad inhibió no solo la actividad específica de los nódulos sino también la fijación total, comprobando

que la luminosidad al estimular la actividad fotosintética favorece indirectamente la mayor actividad fijadora de los nódulos, la cual está relacionada con una mayor producción de granos y de materia seca.

Hardy y otros (1968), encontraron que la máxima actividad de fijación de nitrógeno en soya se obtiene cerca del período de máxima intensidad de luz. 50% de sombrero impuesto al final de floración en soya disminuyó la fijación de 125 a 91 Kg de N/Ha/cosecha, mientras que iluminación suplementaria aumentó la fijación a 165 Kg de N/Ha/cosecha (Brun, 1972). Estas observaciones muestran una relación directa entre la intensidad de luz y la fijación de nitrógeno y se interpretan con una expresión de la cantidad de fotosintatos.

Schweitzer y Harper (1979), sugieren que la penetración limitada de luz debido a ambientes sombreados puede limitar la fijación de N_2 (reducción de acetileno), la nodulación y la reducción de nitrato en hojas, como también la acumulación de materia seca y la producción de semilla de soya.

Trang y Giddens (1980) estudiaron el efecto de: 0-18-40 y 62% de sombrero y 0 y 30 p.p.m. de N, sobre el crecimiento y fijación de N_2 en soya. Plantas sin sombra produjeron mayor cantidad de materia seca y más alto contenido de N, más altos carbohidratos no - estructurados (tanto en el follaje como en la raíz); mayor número y masa de nódulos, que en plantas con diferentes grados de sombra. La mayor actividad nodular (reducción de acetileno) se obtuvo con 18% de sombrero. La fertilización con N, incrementó los carbohidratos y la actividad específica nodular, pero disminuyó el número y masa de nódulos y la actividad total del nódulo.

5.4. ENFERMEDADES Y PARASITOS

Estos limitan principalmente el crecimiento de la planta, pero parece que en algunos casos los bacteriófagos reducen la población de *Rhizobium* (Whitney, 1975).

En el Centro Nacional de Investigación Palmira (Valle del Cauca) se ha observado penetración de larvas de coleópteros en nódulos de soya pero no se ha medido su efecto.

Almeida y otros (1979), estudiaron el efecto de tres cepas del virus causante del mosaico común en tres variedades de soya (Santa Rosa, Hill, UFV-1 y Campos gerais) sobre el crecimiento vegetativo y la nodulación. Todas las cepas redujeron significativamente el peso seco/planta, el número de nódulos/planta y el peso promedio de nódulos/planta. Este último parámetro fué reducido entre 31,3% y 42,5%.

Dhingra y Chenulu (1980), encontraron que en la variedad de soya Bragg, el virus del mosaico redujo el número de nódulos/planta en un 68,76% y el peso seco de nódulos/planta en un 63,24%.

Mc Ginnity y otros (1980) estudiaron el efecto del nemátodo Heterodera glycines Ichinohoe en variedades susceptibles y resistentes de soya y encontraron que en algunas variedades susceptibles se disminuye significativamente la nodulación y la fijación de N_2 y esto es parcialmente causante de la reducción del rendimiento; pero en otras variedades como la Williams y la Wayne a pesar de ser altamente susceptibles produjeron buena nodulación y alta fijación de N_2 .

Pugashetti y otros (1982) indican que el éxito de la inoculación de un suelo con Rhizobium japonicum depende en parte de microorganismos antagónicos existentes en el suelo como son los Actinomicetos, bacterias y hongos rhizobiofagos. En sus estudios encontraron poblaciones entre $1,3 \times 10^3$ y $4,5 \times 10^5$ actinomicetos antagónicos al Rhizobium/grano de suelo seco y estos representaban el 90% del total de los actinomicetos; en otra muestra de la Rhizosfera de soya encontraron un poco más del 70% de actinomicetos antagónicos del total de actinomicetos. Respecto a bacterias antagónicas al Rhizobium encontraron un poco menos del 10% del total de bacterias. Encontraron muy pocos hongos Rhizobiofagos.

5.5. SUSTANCIAS TOXICAS

El notable incremento en la utilización de sustancias tóxicas para controlar plagas, enfermedades y malezas en leguminosas, hace necesario determinar que productos y dosis son compatibles con una exitosa nodulación y un eficiente funcionamiento del proceso simbiótico. Es muy probable que algunos fracasos de la inoculación artificial se deban al hecho de no tomar en cuenta el efecto de los biocidas. Se han realizado varios estudios sobre el efecto de pesticidas en la nodulación y en el proceso de fijación de nitrógeno.

Los fertilizantes pueden ser tóxicos al *Rhizobium* por las siguientes razones: Por el residuo ácido, como el de superfosfato; por el contacto con metales pesados de elementos menores o por un severo efecto osmótico local. Vincent (1965).

Algunos insecticidas del suelo reducen la nodulación posiblemente porque matan al *Rhizobium* en las cercanías de la plántula. Los herbicidas hormonales, generalmente afectan el *Rhizobium* en concentraciones bajas; aunque se ha citado algunas excepciones donde se ha observado que se reduce la nodulación en una concentración a la cual el crecimiento de la planta no fué afectado. Se ha reportado reducción en la fijación de nitrógeno, aunque el crecimiento del *Rhizobium* y la nodulación no fueron afectados (Vincent, 1965).

Hamdi y Tewfik (1969) verificaron que cuando se aplica Trifluralina al momento de la siembra de soya inoculada, se inhibe la nodulación y el crecimiento de la planta pero aplicado 27 días antes de la siembra actúa como estimulante.

Lorenzi y Araujo (1974) estudiaron la influencia de siete herbicidas sobre fijación de nitrógeno en soya y encontraron que: DCPA, Fluorodifen, Trifluralin y Linuron reducen significativamente el peso seco de nódulos producidos por cepas nativas en parcelas no inoculadas, y que solamente el Linuron (4 Kg/Ha) reduce significativamente el porcentaje de nitrógeno en el follaje de la planta.

Duningan, Allen y Frey (1970) indican que de siete herbicidas ensayados ninguno afectó el número de nódulos, ni la eficiencia de la fijación en soya cultivada en condiciones de campo, pero si la dosis es cinco veces mayor que la normal, si disminuye la nodulación.

De Olivero y otros (1974) ensayaron el efecto del herbicida Cloramben en dosis de 10 - 20 y 30 litros/Ha sobre la fijación de nitrógeno en soya y encontraron que en dos ensayos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de producción de grano y contenido de nitrógeno. En el primer ensayo con la dosis de 30 litros/Ha se produjo 9% menos que en el testigo inoculado sin tratar. En el segundo ensayo las dosis de 20 y 30 lt/Ha produjeron 15,5 y 31% respectivamente menos que el testigo.

López, Giardini y Deuber (1977) estudiaron el efecto de Trifluralina, Vernolate y Alaclor en dosis comerciales sobre la nodulación de la soya y encontraron que la producción de grano no fué significativamente mayor y la nodulación fué normal.

Nelson y Hedrick, (1976), ensayaron en condiciones de laboratorio la influencia de varias concentraciones del herbicida experimental Trifluorometil sobre bacterias fijadoras de nitrógeno y otros microorganismos. Observaron aumentos en la tasa de crecimiento de R. japonicum y como resultado de estos bio-ensayos concluyeron que el herbicida puede ser utilizado como única fuente de carbono por las células de R. japonicum y sin efectos tóxicos observados en las concentraciones ensayadas. Ellos sugieren que de acuerdo a estos hallazgos la adición de este herbicida experimental a suelos que se cultivan con soya, posiblemente puede influenciar la actividad metabólica del R. japonicum en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Muchos fungicidas muestran toxicidad al Rhizobium y pueden ocasionar fallas en la nodulación. Los productos que contienen mercurio o cobre son los más peligrosos mientras que los carbamatos como Thiram muestran menos toxicidad.

La Tabla 1 indica la influencia de algunos fungicidas sobre la nodulación de la soya y se observa que el Thiram es el único fungicida compatible con el inoculante (Curley y Burton, 1975).

TABLA 1. Número de nódulos por planta en la raíz principal de la soya inoculada y tratada con fungicidas.

Fungicidas	Hora de contacto entre el fungicida y el inoculante antes de la siembra		
	1	4	24
Testigo	6,8 a	5,6 a	4,8 a
Thiram	6,6 a	4,5 a	4,8 a
Carboxin	4,5 b	3,1 b	0,8 b
Captan	0,4 c	0,4 c	1,0 b
PCNB	0,6 c	0,4 c	0,3 b

Fuente: Curley y Burton (1975).

Cuando la soya, maní o frijol, es necesario tratar la semilla para eliminar problemas de enfermedades del suelo o en la semilla, se debe tener mucho cuidado de que no sufra el inoculante. La eliminación del contacto con fertilizantes tales como superfosfato o las escorias Thomas es importante porque también pueden ser tóxicos (Graham, 1976).

Toro y Zambrano (1977) encontraron que los herbicidas Prometrina, Diuron, Metribuzina, Alaclor + Linuron, Alaclor y Bentazon redujeron el número de nódulos en 13%, 8%, 2%, 1%, 0,5% y 28% respectivamente. Prometrina, Diuron y Bentazon produjeron fitotoxicidad, por lo cual el efecto de los herbicidas sobre la nodulación parece ser indirecto ya que al afectar los procesos fisiológicos, reduce la capacidad de nodulación.

Kapusta y Rouwenhorst (1973) ensayaron 24 pesticidas en condiciones de campo y ninguno influyó sobre la nodulación de la soya.

Varela y De la Cruz (1978) evaluaron el comportamiento de algunas dinitroanilinas, usadas en el control de malezas en soya, sobre la nodulación, producción de materia verde, concentración de nitrógeno en el follaje y rendimiento del grano. Encontraron que Butralina, Diniramina y Vernolate no afectan la nodulación pero sí disminuyen el rendimiento; Pendimetalina y Trifluralina reducen tanto la nodulación como el rendimiento; Orizalina es el herbicida que más reduce la nodulación, pero no reduce el rendimiento del grano; ninguno de estos herbicidas afectaron la producción de materia seca de follaje, ni el porcentaje de Nitrógeno en la parte aérea de la planta.

Varela (1982) evaluó la compatibilidad de cepas naturales de Rhizobium japonicum con protectores químicos de la semilla de soya y encontró que las cepas naturales existentes en el Valle del Cauca (Colombia) resisten a la toxicidad de vitavax (Carboxin); Arazan (Thiram); Captan - moly (captan); Captan-25 (captan); Brassicol-Thiodan (PCNB - Endosulfan) y Orthocide (Captan); estos no afectan ni la nodulación ni la fijación de nitrógeno.

6. EL INOCULANTE

Es una sustancia o medio-portador que contiene células de Rhizobium. Una de las formas más comunes que se ofrecen en el comercio es empacado en bolsas de polietileno con 100 a 200 grs de inoculante de grano fino y húmedo que contiene la bacteria en un portador llamado turba.

Los inoculantes se emplean para inocular el suelo, pero las semillas se emplean como portadoras. Una dosis normal de inoculante es, 400 grs de turba húmeda molida fina, por cada 100 kilos de semilla de soya, el cual contiene miles de millones de células de R. japonicum (Burton, 1975).

También el inoculante puede estar en forma de caldo, pero casi no se utiliza. A partir de 1972, algunos fabricantes de inoculantes,

empezaron a venderlo granulado y en caldo congelado y concentrado, para inoculación directa al suelo. Los inoculantes granulados y en caldo son más caros y exigen técnicas especiales de aplicación, pero también son más eficientes en medios donde la inoculación del suelo con semillas como portadoras, resulta difícil o poco segura (Hinson y Hartwing, 1978).

7. FACTORES QUE AFECTAN LA INOCULACION Y ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS

La cantidad de nódulos producidos por la inoculación difiere grandemente de acuerdo a la dosis de inóculo, métodos de aplicación y el establecimiento de las poblaciones de R. japonicum (Johnson y otros, 1965).

7.1. CALIDAD DEL INOCULO

Una precaución evidente, pero que algunas veces se desatiende, es identificar que el inoculante sea para soya, para no confundirse con otros inoculantes de otras especies de leguminosas, que no actúan en soya; y dentro de la especie R. japonicum, el inoculante debe estar fabricado con la cepa más eficiente, por ejemplo para suelos del Tolima (Colombia) las cepas CIAT-1 y CIAT-51 son las más recomendables para la elaboración de un inoculante (Varela y Munevar, 1978).

Hay que utilizar el inoculante antes de la fecha de vencimiento, impresa en el empaque. Los inoculantes son viables aproximadamente hasta un máximo de 6 meses (Gómez, 1978).

La viabilidad del inoculante en turba se puede obtener mediante el método del número más probable que consiste en:

- a. Pesar 30 grs de inoculante en turba.
- b. Disolverlo en 300 cc de agua para un dilución de 10^{-1}
- c. A partir de la dilución 10^{-1} hacer diluciones hasta 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} .

- d. De las anteriores se toman alícuotas de 0,2 cc y se asperjan en la superficie de un medio de levadura-manitol-agar.
- e. Posteriormente se hace el recuento de las colonias y la estimación del número más probable de *Rhizobium* viables en el inoculante.

La calidad de un inoculante se puede clasificar según Date (1970) en:

De Rechazo 10^7 *Rhizobiums/g*
 dudoso entre 10^7 y 10^8 *Rhizobiums/g*
 satisfactorio entre 10^8 y 10^9 *Rhizobiums/g*
 muy satisfactorio 10^9 *Rhizobiums/g*

Un punto que merece más investigación es el relacionado con el *Rhizobium* componente del inoculante. Inoculantes con varias cepas han sido producidos por la industria, para cubrir un rango más amplio de variedades y de condiciones ambientales (Burton, 1975).

Vincent (1965 y 1970) está en desacuerdo con el uso de inoculantes con varias cepas.

Recientemente Skrdleta (1973); Caldwell y Vest (1970) encontraron mejor comportamiento del inoculante con una sola cepa que el inoculante con varias cepas.

De acuerdo con las anteriores consideraciones, cuando se usa un inoculante con una sola cepa, vale la pena preguntar:

- a. Estamos seguros de que esa cepa colonizará un suelo bajo todas las condiciones ambientales posibles en áreas de producción o en áreas nuevas?
- b. Más tarde no será dominada por cepas menos eficientes?
- c. Tendrá esta cepa el mismo comportamiento con un amplio rango de variedades comerciales?

Por lo tanto en una región determinada se debe investigar la interrelación cepa x variedad x ambiente.

7.2. EFECTO DE LA DOSIS DE INOCULO

Como muchos factores interfieren sobre el inóculo aplicado, la recomendación podría ser aplicar el mayor número de Rhizobiums por semilla, pero desde un punto de vista práctico es importante tener una información más precisa.

Date (1970) asegura que en la mayoría de las leguminosas noduladas las experiencias han demostrado que 100 Rhizobiums por semilla son suficientes para la nodulación en condiciones favorables, pero si las condiciones son adversas se necesitaría 100 veces más. En Australia un inoculante para soya que está para la venta debe tener un standar mínimo de 2×10^6 Rhizobiums por gramo de turba.

En Brasil la ley federal exige que para la venta de un inoculante debe tener un mínimo de 1×10^6 Rhizobiums por gramo, lo cual daría un promedio de 7000 células por semilla de soya. Por esto el fabricante debe proporcionar al inoculante 5 ó 10 veces más Rhizobiums que el standar exigido, debido a que las condiciones de transporte y almacenamiento son deficientes y además transcurre largo tiempo antes de usarse en el campo. Freire, (1976).

Donde el suelo es caliente y seco que es de común ocurrencia en siembras tardías o donde el suelo no ha sido encalado, se recomienda aumentar la cantidad de inóculo. Freire (1976).

Burton (1975) indica que un inoculante de alta calidad debe suministrar entre 10^5 y 10^6 células viables por semilla; un mínimo de 2×10^5 Rhizobiums/semilla se necesitan para una efectiva y eficiente nodulación, bajo condiciones moderadamente buenas y se necesita más inóculo para condiciones menos favorables.

Respecto a inoculaciones en suelos donde hay poblaciones naturales de R. japonicum, Weaver (1974) en sus investigaciones concluyó

que para producir el 50% o más de nódulos, se debe usar una dosis de inóculo 1000 veces mayor que la población existente en el suelo y que los inoculantes comerciales, probablemente no suministran un número adecuado de *Rhizobium* para obtener una exitosa nodulación competitiva en áreas previamente sembradas de soya.

7.3. EFECTO DE CONDICIONES ADVERSAS SOBRE LA INOCULACION

Muchos factores del suelo interactúan para influir sobre la supervivencia del *Rhizobium*, colonización de la raíz y competencia por la localización de los nódulos. Es evidente que cuando se siembran semillas inoculadas en suelos con condiciones adversas puede ser extremadamente dañina para la supervivencia y desarrollo de la bacteria y por lo tanto para la nodulación. Siembras hechas a fines de la primavera o comienzos del verano cuando la temperatura es alta y las lluvias son escasas, se retrasa la germinación por varios días aún hasta 1 - 2 semanas y el número de nódulos y la eficiencia son afectadas dependiendo de la intensidad de estas condiciones adversas. (Freire, 1976).

En muchas regiones en verano, la temperatura máxima de la superficie del suelo excede generalmente de la temperatura óptima para la fijación de nitrógeno. Wilson (1975), observó en experimentos de invernadero que a una temperatura moderada ni la profundidad de inoculación ni la humedad de la superficie del suelo afectaba la cantidad de nitrógeno fijado, mientras que a temperaturas relativamente altas, plantas con baja humedad del suelo fijaron menos de 25% que con alta humedad.

La ocurrencia de condiciones extremas (stress) que actúan sobre la bacteria y/o la planta pueden limitar el desempeño del inóculo, inhibiendo además la formación del nódulo y/o la adecuada fijación de nitrógeno por los nódulos que han sido ya formados.

Algunas veces cuando la restricción es solamente sobre la formación inicial del nódulo, opera un mecanismo de compensación, con el

cual los nódulos crecen más allá del tamaño normal y la planta es su- plida con suficiente nitrógeno. En suelos secos y calientes, el uso de dosis masivas de inóculo y/o colocándolo profundo o usando inócu- lo granular, asegurará mejor nodulación (Freire 1976).

7.4. MANEJO Y CONSERVACION DEL INOCULO

Hay que utilizar el inoculante antes de la fecha de vencimiento, impresa en el empaque y almacenarlo hasta su empleo en un lugar fres- co, en un ambiente por debajo de 20°C; un refrigerador es ideal para este almacenamiento. La exposición al sol o al calor es suamente perjudicial. Los inoculantes son viables aproximadamente hasta un máximo de 6 meses.

No hay que abrir el paquete hasta que llegue el momento de ino- cular las semillas. Cuando la temperatura atmosférica y del suelo sean elevadas en el momento de sembrar la soya, habrá que utilizar dos o tres veces la cantidad recomendada en las instrucciones del empaque, especialmente en suelos arenosos (Hinson y Hartwing, 1978).

8. METODOS PARA LA INOCULACION

La inoculación es la técnica de poner en contacto las células de la bacteria (Rhizobium japonicum), contenidas en un medio portador, ante el huésped que es la semilla de soya (Glycine max) para que se realice la asociación simbiótica capaz de fijar nitrógeno at- mosférico.

Se hace una suspensión del inoculante en agua o con un adhesivo que puede ser leche, melaza, agua de azúcar, goma arábiga neutra o un producto comercial. Varma y Subba Rao (1973), recomiendan el uso de solamente el 5% de sucrosa, porque un porcentaje más alto puede perjudicar la germinación de la semilla.

La proporción de la suspensión es de 25 grs de inoculante por cada 100 cc de agua o agua-adhesivo. No se debe usar exceso de

suspensión para aumentar la adherencia porque se ablanda la testa de la semilla y se tienen problemas con la sembradora porque la semilla no fluye bien y además se puede dañar el embrión y disminuir germinación.

Los procedimientos normales consisten en humedecer las semillas con la suspensión antes mencionada y revolver hasta que queden impregnadas uniformemente con el inoculante. Las semillas deben inocularse en la soga y sembrarse inmediatamente después.

No siembre si la humedad del suelo es deficiente; una humedad apropiada se requiere para que los *Rhizobiums* sobrevivan hasta que se desarrollen las raíces de la plántula.

En regiones donde nunca se ha sembrado soya se puede inocular directamente el suelo con inoculante granular o con inoculante en caldo concentrado y congelado. Estos dos tipos de inoculantes son igualmente eficaces. Se colocan en el suelo dosis masivas de células de *R. japonicum*, a la profundidad de siembra o algo más abajo con una sembradora-abonadora. La dosis de inoculante granular es de 6 Kg/Ha.

8.1. CONTACTO DEL INOCULANTE CON FERTILIZANTES Y PESTICIDAS

No aplique fertilizantes en banda muy cerca a la semilla inoculada, es preferible que el fertilizante esté a 7 cm a un lado y abajo de la semilla. Las cantidades que hacen falta en el suelo de Molibdeno son tan pequeñas que con frecuencia se puede utilizar la semilla como portadores. Las sales de molibdeno pueden matar también al *Rhizobium* por lo tanto es mejor aplicar el Molibdeno en otra forma.

Los fungicidas que se aplican a las semillas para combatir microorganismos dentro y sobre las semillas pueden matar también muchas células de *Rhizobium* cuando se utilizan las semillas como portadoras del inóculo; aunque como se dijo anteriormente el Thiram es mucho

más compactible con el *Rhizobium* que otros fungicidas. Cuando la semilla tratada con fungicidas se emplea como portador del inoculante, es sumamente importante utilizar la cantidad máxima de inoculante que pueda adherirse a la semilla.

La supervivencia del *Rhizobium* en las semillas inoculadas y la multiplicación del inóculo aplicado depende de los factores antes mencionados; al respecto se ha demostrado que en condiciones ambientales favorables, cien *Rhizobiums* por semilla pueden producir nodulación eficiente en cambio cien mil *Rhizobiums* por semilla pueden ser insuficientes en donde las condiciones son desfavorables, como en el caso de suelos ácidos o donde hay una competencia con *Rhizobium* nativo (Gómez, 1978).

9. IMPORTANCIA Y VENTAJAS DE LA INOCULACION

Es importante inocular cuando se va a sembrar soya, especialmente en lotes nuevos, que provienen de bosques, de pastos, de caña de azúcar, o después de un período de rotación, donde se estima que la población de *R. japonicum* está ausente o en cantidad reducida.

Burton (1975) enfatiza que es muy importante usar el *Rhizobium* más efectivo disponible, cuando se siembra soya por primera vez, porque una bacteria inefectiva puede hacer que el suelo sea desventajoso para la producción de soya hasta que se introduzca una mejor cepa que se sobreponga a la población indeseable. Freire (1976) indica también que un *Rhizobium* inefectivo puede ser introducido en un inoculante malo o puede existir en el suelo y esa población indeseable se puede aumentar por no inocular o por aplicar un inoculante inadecuado al hacer la primera siembra.

El *Rhizobium* solo vive cierto número de años en su ambiente natural y su número suele disminuir rápidamente en ausencia de la planta de soya, sobre la cual conviven.

La inoculación artificial es ventajosa por el bajo costo del inoculante, en comparación con el costo del fertilizante nitrogenado.

De acuerdo con todos los conceptos anteriormente emitidos se puede concluir lo siguiente:

- a. La simbiosis Rhizobium - leguminosa es probablemente la mayor fuente de fijación de nitrógeno para el cultivo, el cual equivale a una gran cantidad de fertilizante nitrogenado y por lo tanto una gran economía con la utilización de este insumo; esto destaca la importancia de la fijación biológica.
- b. Es importante conocer todas las interacciones que ocurren entre la bacteria y el hospedero, en el proceso de formación de los nódulos.
- c. Seleccionar una cepa eficiente de R. japonicum, entre las existentes, comparada con las cepas introducidas y naturalizadas, es la forma más práctica y viable para fabricar un buen inoculante, por lo tanto es necesario tener bien claros los conceptos de infectividad, efectividad, ineficiencia y eficiencia.
- d. Las características de nodulación: peso, posición, color, tamaño y número de nódulos son los parámetros para evaluar la eficiencia de la fijación de las cepas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AHMED, S.; EVANS, H.J. Cobalt: a micronutrient element for the growth of soybean plants under Symbiotic conditions. Soil Science. v. 90, p. 205-210. 1960.
2. ALLOS, H.F.; BARTHOLOMEW, W.V. Replacement of symbiotic fixation by available nitrogen. Soil Science. v. 87, p. 61-66. 1959.

3. ALMEIDA, A.M.R.; WANG, G.M.; DITTRICH, R.C. e CAMPOS, R.J. Efeito de Estirpes do virus do mosaico comum da soja sobre crescimento vegetativo, nodulacao e teor de florofila EM quatro cultivares de soja. *Fitopatologia Brasileira*, v. 4, no. 3, p. 461-465, 1979.
4. ASFORD, R.; BOLTON, J.L. Effects of sulphur and nitrogen fertilization and inoculation with Rhizobium meliloti on the growth of sweet clover. *Canadian Journal Plant Science*. v. 14, p. 81-90. 1961.
5. AYALA, L. Proyección Agronómica de algunos aspectos metodológicos de la Rhizobiología. *Revista Latinoamericana de Ciencias Agrícolas*. ALCA, v. 13, p. 3-14. 1977.
6. BANATH, C.L.; GREENWOOD, E.A.; LONERAGAN, J.F. Effects of calcium deficiency on Symbiotic nitrogen fixation. *Plant physiology* v. 41, p. 760-763. 1966.
7. BARTHAKUR, B.C. Effect of Rhizobium inoculant on, application of molybdenum, lime and nitrogen on soybean (Glycine max (L.) Merril). *Journal Research Assam Agricultural University*. v. 1, no. 1, p. 19-23. 1980.
8. BEARD, B.H.; HOOVER, R.H. Effect of nitrogen on nodulation and yield of irrigated soybeans. *Agronomy Journal*, v. 63, p. 815-816. 1971.
9. BELALCAZAR, D.J. Inoculación con Rhizobium japonicum en soya intercalada con caña de azúcar en el Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, 1977. 116 p. (Tesis Ing. Agr.).
10. BERGERSEN, F.J. The Bacterial component of soybean root nodules; changes in respiratory activity, cell dry weight and nucleic acid content with increasing nodule age. *J. Gen. Microbial*, v. 19, p. 312-323. 1958.

11. BERGERSEN, F.J. Oxigenation of Leghemoglobin in soybean root-nodules in relation to the external oxygen tension, *Nature*, v. 194, p. 1059-1061. 1962.
12. _____. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation on legumes *Am. Rev. of Plant Physiology*, v. 27, p. 121-140, 1971.
13. BESDIZECK, D.F.; EVANS, D.W.; ABEDE, B.; WITTERS, R.E. Evaluation of peat and granular inoculum for soybean yield and N fixation under irrigation. *Agronomy Journal*, v. 70, p. 865-868. 1978.
14. BLEVINS, D.G.; BARNETT, N.M.; BOTTINO, P.J. The effects of Calcium and the Ionophore A 23187 on Nodulation, Nitrogen fixation and growth of soybean. *Physiology Plant* v. 41, p. 235-238. 1977.
15. BLONDEAU, R. La Symbiose Rhizobium-legumineuses. *Anne. Biologique T. XVI*, v. 11-12. p. 481-516. 1977.
16. BONNER, J.; GALSTON, A. *Principios de Fisiología Vegetal* 5a. ed. EE.UU. 1973. s.p.
17. BRILL, W.J. Fijación biológica del nitrógeno. *Investigación y Ciencia*. v. 8, p. 44-54. 1977.
18. BROSE, E.; FREIRE, J.R.J. Efeito da Umidade e Luminosidade sobre Actividade dos nodulos de soja (*Glycine merr*) En VIII Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Cali, Colombia. 1976, p. 8.
19. BRUN, W.A. Nodule activity of soybeans as influenced by photosynthetic source - Sink manipulations. *Agronomy abstracts*. 1972. p. 31.
20. _____. Problems in obtaining adequate inoculation of soybeans. *Proceedings of the world soybean Research conference*. Interstate Printers and Publishers, Inc. Danville, 11 (in press), 1975.

21. BURNS, R.C.; HOLSTEN, R.; HARDY, R.W.F. Insolation by crystallization of the Mo-Fe protein of *Azotobacter nitrogenase*. *Biochemical Biophys, Res. Commum.* v. 39, p. 90, 1970.
22. BURTON, J.C. Problems in obtaining adequate inoculation of soybeans. *Proceedings of the World Soybean Research Conference.* Interstate Printers and Publishers. Inc. Danville, Illinois. 1975.
23. CALDWELL, B.E. Initial competition of root-nodule bacteria on soybeans in a field Environment. *Agronomy Journal*, v 61, p. 813-815. 1969.
24. _____ and VEST, G. Effects of *Rhizobium japonicum* Strains in soybean yields. *Crop Science*, v. 10. p. 19-21. 1970.
25. CALDWELL, B.E. and WEBER, D.F. Distribution of *Rhizobium japonicum* Serogroups in soybean nodules as effected by planting dates. *Agronomy Journal*. v. 62, p. 12-14. 1970.
26. CASSMAN, K.G.; WHITNEY, A.S. y STOCKINGER, K.R. Root growth and dry matter distribution of soybean as affected by phosphorus stress, nodulation and nitrogen source. *Crop Science*, v. 20 no. 2, p. 239-244. 1980.
27. CURLEY, R.L.; BURTON, J.C. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agronomy Journal*. v. 67, p. 807-808. 1975.
28. CIAT. Sistemas de producción de frijol. Separata de informe anual del CIAT, 1976. p. 25.
29. CHILD, J.J. New developments in nitrogen fixation research. *Bio-Science*. v. 26, no. 10, p. 614-617. 1976.
30. DART, P.J.; DAY, J. Effect of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenasa activity of legume root nodules. *Plant soil sp.* p. 167-184. 1971.

31. DART, P.J.; HARRIS, D. Assay of nitrogen activity by acetylene reduction. Institute Atomic Energy. Publication V. 149, p. 85-100. 1972.
32. DATE, R.A. Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. Plant Soil. v. 32 p. 655-673. 1970.
33. DEIBERT, E.J.; BIJERIEGO, M.; OLSON, R.A. Utilization of ^{15}N fertilizer by nodulating and Non- Nodulating soybean Isolines. Agronomy Journal. v. 71, p. 717-723, 1979.
34. DE MOOY, C.J.; PESECK, J. Nodulation responses of soybeans to added phosphorus, potassium and calcium salts. Agronomy Journal. v. 58, p. 275-280. 1966.
35. DE OLIVERO, E.; PACHECO, J.C.; DIEGUEZ, R.N. Efecto de diversos insecticidas y herbicidas sobre leguminosas inoculadas cultivadas en el campo. En VII Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Universidad Nal. de Nordeste. Resistencia, p. 275-277. 1974.
36. DHINGRA, K.L.; CHENULU, V.V. Effect of soybean mosaic virus on yield and nodulation of soybean Cv. Bragg. Indian Phytopathology. v. 33, no. 4, p. 586-590. 1980.
37. DUNINGAN, E.P.; ALLEN, L.D.; FREY, J.P. Effects of selected herbicides on the nodulation of soybeans. Agriculture Louisiana, v. 13, no. 3, p. 6-7. 1970.
38. ELKAN, G.H. Comparison of Rhizosphere microorganisms of genetically related Nodulating and non- nodulating soybean isolines. Canadian Journal Microbiology, v. 8, p. 78-87, 1962.
39. ERDMAN, L.W. Legume inoculation. Washington U.S.D.A. 1959. (Farmers bulletin, 2003).

40. FREIRE, J.R.J. Inoculation of soybeans. Paper presented at the workshop on "Exploiting the legume- Rhizobium symbiosis in Tropical Agriculture". Kahului. Maui, Hawaii (Mimeografia do). 1976.
41. GALLETI, P.; FRANCO, A.A.; AZEVEDO, H.; DOBEREINER, J. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soya anual. Pesquisa Agropecuaria Brasileira Ser. Agron. v. 6 p. 1-8. 1972.
42. GIBSON, A.H.; NUTMAN, P.S. Studies on the physiology of nodule formation. VII. A reappraisal of the effects of pre-planting. Ann. Bot. v. 24, p.420-433. 1960.
43. GOMEZ, J. La importancia de las bacterias nitrificantes. La inoculación de la semilla. En curso sobre cultivo de la soya para técnicos Agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Alimentación. Perú, 1978. p. 111-116.
44. GRAHAM, P.H. Plant. Rhizobium interacción and its importance to Agriculture. En Srb. A.M. ed, Genes Enzymes and populations, New York. Plenum, 1973. p. 321-330.
45. _____ and HUBELL, D. Legume- Rhizobium relationship in Tropical Agriculture. Florida Agricultural Experimental Station. Journal Series. 5439. p. 9-21. 1975.
46. _____. Problemas de la nodulación en las leguminosas. En VIII Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Cali. Colombia. 1976. 132-152 p.
47. HALLSWORTH, E.G. Nutritional factors affecting nodulation. In Nutrition of the legumes. Ed. E.G. Hallsworth Butterworths Scientific Publications. London, p. 183-201. 1958.
48. _____; GREENWOOD, E.A.; and YATES, M.G. Studies on the nutrition of forage legumes. III The Effect of cooper on nodulation of Trifolium subterraneum and T. repens. Plant Soil, v. 20. p.17-33. 1964.

49. HAM, G.E.; CALDWELL, V.B.; JOHNSON, H.W. Evaluation of Rhizobium japonicum inoculants in soil containing naturalized populations of rhizobia. Agronomy Journal. v. 63 p. 301-303. 1971.
50. HAM, G.E.; CALDWELL, A.C. Fertilizer placement effects on soybean yield, Nitrogen fixation, and ³³P. uptake. Agronomy Journal. v. 70, p. 779-784. 1978.
51. HAMDI, Y.A.; and TEWFIC, M.A. Effect of the herbicide Trifluralin on nitrogen fixation in Rhizobium japonicum and Azotobacter and on nitrification. Acta Microbial. Pol. (Ser-E) 1, Ministry of Agriculture Cairo. v. 18, p. 53-57. 1969.
52. HANSON, R.G. Soybeans need for phosphorus for adequate nodulation. Better crops with plant food. Potash & Phosphate Institute. v. 62, p. 26-27. 1979.
53. HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The Acetylene-ethylene Assay... for N₂ fixation: Laboratory and Field evaluation. Plant Physiology. v. 43, p. 1185 - 1207. 1968.
54. _____. Biological nitrogen fixation, a key to world protein Plant and Soil, v. 34, p. 561-590. 1971.
55. _____; BURNS, R.C.; HEBERT, R.R.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E. K. Biological nitrogen fixation a key to world protein. Plant Soil spec. p. 561-590. 1971.
56. HARDY, R.W.F.; HAVELKA, U.D. Nitrogen fixation research; a key to world food. Science. v. 188, p. 633-643. 1975.
57. HARPER, J.E.; COOPER, R.L. Nodulation responses of soybean (Glycine max(L) Merrill to application rate and placement of combined nitrogen. Crop. Science, v. 11, p. 438-440. 1971.

58. HARPER, J.E.. Soils and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybeans productions. *Crop. Science.* v. 14, p. 255-266. 1974.
59. HINSON, K. Nodulation responses from nitrogen applied to soybean half-root systems. *Agronomy Journal.* v. 67, p. 799-804. 1975 a.
60. _____. Nitrogen fertilization of soybeans (Glycine max (L) Merr) in Peninsular Florida. *Soil and Crop Science Soc. Fla. Proc.* v. 34, p. 97-101. 1975 b.
61. _____; HARTWING, G.E. La producción de soya en los trópicos. Estudio FAO. Producción y protección vegetal 4 Roma. 1978. p. 52-59.
62. HOLSTEM, R.D.; BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F.; HEBERT, R.R. Establishment of symbiosis between Rhizobium and plant, cells in vitro. *Nature.* v. 323, p. 173-175. 1971.
63. JIMENEZ, T.; VILLALOBOS, E. Respuesta del frijol-soya a la inoculación con Rhizobium japonicum y a la fertilización con nitrógeno y fósforo en Costa Rica. *Agronomía Costarricense.* v. 4, no. 1, p. 1-8. 1980.
64. JOHNSON, M.W.; MEANS, U.M.; WEBER, C.R. Competition for nodule sites between strains of Rhizobium japonicum applied as inoculum and strains in the soil. *Agronomy Journal*, v. 57, p.179-183. 1965.
65. JONES, M.B.; FREITAS, L.M. Responsta de quatro Leuminosas Tropicais a fosforo, potasio e calcarionum latosol vermeho amavelode campo cerrado. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira.* v. 5, p. 92, 1970.
66. JONES, G.D.; LUTZ, Jr., J.A.; SMITH, T.J. Effects of phosphorus and potassium on soybean nodules and seed yield. *Agronomy Journal*, v. 69, p. 1003-1006. 1977.

67. KAPUSTA, G.; ROUWENHORST, D.L. Interaction of selected pesticides and Rhizobium japonicum in pure culture and under field conditions. *Agronomy Journal*, v. 65, p. 112-115, 1973.
68. KATO, Y. Studies of nitrogen metabolism of soybean plants. VI utilization and distribution of nitrogen derived from nitrate and symbiotic fixation. *Japanese Journal of Crop Science*, v. 50, no. 3, p. 282-288. 1981.
69. KLIWER, W.M.; EVANS, H.J. Combamide coenzyme contents of soybean nodules and nitrogen fixing bacteria, in relation to Physiological conditions. *Plant Physiology*, v. 38, p. 33-104. 1963.
70. KLUCAS, R.V. The Physiology of soybean nodule senescence. Fifth Australian Legume Nodulation Conference. *Rhizobium Newsletter*, v. 20, p. 153-160.
71. KOHL, D.H.; SHEARER, G.; HARPER, J.E. Estimates of N_2 fixation based on differences in the natural abundance of ^{15}N in nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. *Plant Physiology*, v. 66, p. 61-65. 1980.
72. LINDEMANN, W.C.; HAM, G.E. Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperature. *Soil Science Society of America Journal*, v. 43, no. 6, p. 1134-1137. 1979.
73. LOPEZ, E.S.; GIARDINI, A.R.; DEUBER, R. Influencia de herbicidas na nodulacao da soja. En Simposio Internacional sobre limitacoes a potenciais de fixacao de nitrogeno nos tropicos um de Brasilia. Brasil, 1977.
74. LORENZI, M.J.; ARAUJO, S.C. Estudo da acao de algunos herbicidas na fixacao simbiotica do nitrogenio em plantas de soja (Glycine max) In VII Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Resistencia Argentina Univ. Nac. del Nordeste, p.222-231. 1974.

75. LOTERO, J.C. Absorción de fósforo y sus funciones en la planta. En Suelos Ecuatoriales. Fósforo en zonas tropicales. s.f. 422 p.
76. MASK, P.L.; SILSON, D.O. Effect of Mn growth, nodulation and nitrogen fixation by soybeans, grown in the greenhouse. Common in soil science and plant analysis, v. 9, no. 8, p. 653-666. 1978.
77. MCGINNITY, P.J.; KAPUSTA, G.; MYERS, Jr., O. Soybean cyst nematode and Rhizobium strain influences on soybean nodulation and N₂-fixation. Agronomy Journal. v. 72, no. 5, p. 785-789. 1980.
78. MENGEL, D.B.; KAMPRATH, E.J. Effect of soil pH and liming on growth and nodulation of soybeans in Histosols. Agronomy Journal, v. 70, p. 959-963. 1978.
79. MILLER, R.H. Studies on the distribution of serogroups of Rhizobium japonicum in field plots. Abstracts X Congreso Internacional de Microbiología, México D.F., 1970.
80. MUNEVAR, F.; WOLLUM II, A.G. Effect of high root temperature and Rhizobium strain on nodulation, Nitrogen fixation and growth of soybeans. Soil Science Society of American Journal. v. 45, p. 1113-1120. 1981.
81. MUNNS, D.N. Mineral nutrition and the legume symbiosis. A treatise on Dinitrogen fixation. Ed. R. W. F. HARDY and A. H. GIBSON. 1977. p. 353-391.
82. NELSON, L.M.; HEDRICK, M.G. Influence of an Experimental herbicide on soil nitrogen fixing bacteria and other microorganisms. Soil Science, v. 122, no. 4, p.206-215. 1976.
83. NEME, N.A. Adubos fosfatado y calcario, na producao de forrajens de soja perenne (Glycine javanica) en terra rosa-misturada. Anais IX Congr. Intern. de Pastagens. D. P. A. Sao Paulo Brasil. 1965. v. 1. 677 p.

84. NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. En Tropical Pasture research - Principles and methods. Ed. N.H. Shaw and N. W. Bryam. England, p. 134-174. 1976.
85. NUTMAN, P.S. Factors influencing the balance of natural advantage in legume symbiosis. 13th Simposium of the Soc. For. Gen. Microbial. the syndics of the Cambridge Univ. Press, 1963, v. 51, p. 71.
86. _____. The influence of physical envyromental factors on the activity of rhizobium in soil and symbiosis. Institute Atomic Energy Agency Publication. v. 149, p. 55-84. 1972.
87. OLSEN, F.J.; HAMILTON, G. and ELKINS, D.M. Effect of nitrogen on nodulation and yield on soybean. Expl. Agric. v. 11, p. 289-294. 1975.
88. PANKHURST, C.E.; SPRENT, J.I. Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. Journal of Experimental Botany, v. 26, no. 91, p. 287-304. 1975.
89. PHILLIPS, D.A.; TORREY, J.G. Cytokinin production by Rhizobium japonicum. Plant Physiology. v. 23, p. 1057-1063. 1970.
90. PUGASHETTI, B.K.; ANGEL, J.J.; WAYNER, G.H. Soil microorganism antagonistic towards Rhizobium japonicum. Soil biology Biochemistry. v. 14, p. 45-49. 1982.
91. RAO, A.V.; SHARMA, R.L.; DUA, I.S. Effect of foliar aplication of molybdenum and cobalt on soybean Rhizobium simbiosis. Legume Research. v. 1, no. 2, p. 97-100. 1978.
92. ROSS, J.P.; GILLIAM, J.W. Effect of Endogone mycorrhiza en phosphorus uptake by soybeans with inorganic phosphate. S. S.S.P. v. 37, no. 1, p. 237-239. 1973.

93. SAMPET, C. Efecto del nitrógeno, el fósforo y el azufre, sobre el crecimiento, la nodulación y el estado de los nutrientes en la soya en el suelo de Khun Wang (Tailandia). *Thai Journal of Agricultural Science*. v. 11, no. 2, p. 121-128. 1978.
94. SARTAIN, J.B.; KAMPRATH, E.J. Effect of soil Al-saturation on nutrients concentration of soybean tops, roots and nodules. *Agronomy Journal*, v. 69, p.843-845. 1977.
95. SCHWETZER, L.E.; HARPER, J.E. Effect of light enhancement on nitrogen assimilation and dry matter, production by field grown soybeans. En abstracts of II world soybean research conference. Nitrogen fixation et Caldwell, B.E. y Corbin, F.T. Raleigh North Carolina. March 26-29. p. 11-16. 1979.
96. SEMU, E.; HUME, D.J. Effects of inoculation and fertilizer N levels on N_2 fixation and yields of soybeans in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science*. v. 59, p. 429-1137. 1979.
97. SKRDLETA, U. Competition between inoculum strains of Rhizobium japonicum in the process of soybean nodulation during three planting periods. *Folia Microbiologica*, v. 18, p.341-347. 1973.
98. SMITH, R.S.; DEL RIO ESCURRA, G.A. Evaluation of soybean inoculant types and rates under dry and irrigated field conditions. Conference on irrigated soybean production in arid and semi-arid regions Cairo Egypt. September 1-6 (mimeografiado) 1979.
99. SPRENT, J.I. The effects of water stress on N-fixing root nodules. 4 effect on whole plants of Vicia faba and Glycine max. *New Phytology*. v. 71, no. 4, p.603-611. 1972.

100. SPRENT, J.I.; GALLACHER, A. Anaerobiosis in soybean root nodules under water stress. *Soil Biol. Biochem*, v. 8, p.317-320. 1976.
101. STEWART, W.D. Nitrogen fixation in plants. The athrolone press. University of London, 1966. 168 p.
102. STREETER, J.G. Nitrogen nutrition of soybeans, Persistent paradox. *Ohio Report*, v. 58, no. 2, p. 37-40. 1973.
103. SUNDARA RAO, W.U.B. Field experiments on nitrogen fixation by nodulated legumes. *Plant and Soil*, v. 34, p. 287-291. 1971.
104. TORO, J.; ZAMBRANO, O. Influencia de los herbicidas sobre la nodulación inducida por (Rhizobium japonicum) en soya. *En Resúmenes del VIII Seminario de Comalfe, Barranquilla*. Enero 28-30. p.15, 1977.
105. TRANG, M.K.; GIDDENS, J. Shading and temperature as environmental factors affecting growth, nodulation and symbiotic N₂ fixation by soybeans. *Agronomy Journal*. v, 72, no. 2, p.305-308. 1980.
106. TRIPATHI, S.K.; EDWARD, J.C. Response of Rhizobium culture inoculation, zinc and molybdenum application to soybean (Glycine max Merrill). *Indian Journal of Plant Physiology*. v. 21, no. 3, p. 248-252. 1978.
107. VARELA, R. Comportamiento de algunas cepas de Rhizobium japonicum en tres variedades de soya (Glycine max). *Revista ICA*, v. 12, no. 4, p. 588-590. 1977.
108. _____. Compatibilidad de cepas naturales de Rhizobium japonicum con protectores químicos de la semilla de soya Glycine max (L.) Merr. Programa de Leguminosas de grano. ICA-Palmira. Informe no publicado. 1982.

109. VARELA, R.; DE LA CRUZ, R. Efecto de algunas dinitroanilinas sobre la nodulación de la soya Glycine max (L.). En Memorias IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. México 23-26 Octubre, 1978. p. 170-203.
110. VARELA, R.; MUNEVAR, F. Comportamiento de cepas de Rhizobium japonicum asociadas con variedades de soya (Glycine max) seleccionadas para el departamento del Tolima. Revista ICA, v. 13, no. 2, p.249-255. 1978.
111. VARMA, A.K.; SUBBA RAO, N.S. Sucrose and application of Rhizobium on seed. Plant and Soil, v. 38, p. 227-230. 1973.
112. VEST, G.D. Nitrogen increase in a non-nodulating soybean genotype grown with nodulating genotypes. Agronomy Journal, v. 63, p. 356-359. 1971.
113. _____; WEBER, E.; SLOGER, C. Nodulation and nitrogen fixation. In Soybean, Improvement, production and uses. CALDWELL, B.E. (Editor) American Society Agronomy. no. 16 Agronomy, Madison, wis. U.S.A. 1973. p. 353-390.
114. VINCENT, J.M. Environmental factors in the fixation of nitrogen by legumes. En BARTHOLOMEW, W.U. ed. soil nitrogen Madison, Wisconsin, American Society Agronomy. 1965. p. 345-389.
115. _____. A Manual for the practical study of the root-nodule Bacteria. Handbook No. 15 I.B.P. /Blackwell Sci. Publ. Oxford and Edinburgh, 1970. p. 164.
116. VOORHEES, W.B.; CARLSON, V.A.; SENST, C.G. Soybean nodulation as affected by wheel traffic. Agronomy Journal, v. 68 p.976-979. 1976.
117. WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R.; DUMENIL, L.C. Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of Rhizobium japonicum in Iowa soils. Soil Science, v. 114, p.137-141. 1972.

118. WEAVER, R.W. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max (L) Merril. II field Studies. Agronomy Journal, v. 66, p. 233-236. 1974.
119. WEBER, C.R. Soybean nodules work for you Iowa farm Sci, v. 20, no. 11, p.3-5. 1966 a.
120. _____. Nodulating and non-nodulating soybean isolines: II Response to applied nitrogen and modified soil conditions. Agronomy Journal, v. 58, p.46-49. 1966 b.
121. WEBER, D.F.; CALDWELL, B.E.; SLOGER, C.; VEST, H.G. Some USDA studies on the soybean - Rhizobium symbiosis. Plant Soil Special. p. 293-304. 1971.
122. WEERARATNA, C.S. Studies on mylybdenom application to soybean. En Abstracts of II world soybean research conference. Nitrogen fixation. ed. Caldwell, B.E. y Corbin, F.T. Raleigh, North Carolina. March 26-29. p.11-16. 1979.
123. WHITNEY, A.S. Symbiotic and non symbiotic nitrogen fixation as viewed by an Agronomist. Hawaii Agricultural Experiment Station 1975. 6 p. (Reprint).
124. WILSON, D.O. Nitrogen fixation by soybean as influenced by inoculum placement: Greenhouse estudies. Agronomy Journal, v. 67, p. 76-78. 1975.