EVALUACION DEL EFECTO DE LA INOCULACION CON CEPAS DE *Ensifer meliloti* PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN CULTIVO DE ALFALFA EN EL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Trabajo Final de Grado
de la alumno

ANDRÉS MORENO

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Ingeniero Agrónomo

Carrera

Ingeniería Agronómica

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Junín, 8 de septiembre de 2023

EVALUACION DEL EFECTO DE LA INOCULACION CON CEPAS DE *Ensifer meliloti* PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN CULTIVO DE ALFALFA EN EL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Trabajo Final de Grado

del alumno

ANDRÉS MORENO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido) **Evaluador/a**	(Nombre y Apellido) **Evaluador/a**	(Nombre y Apellido) **Evaluador/a**

Ing. Ag. Juan Pablo de Benedetto	Lic. Ricardo Gracía
(Nombre y Apellido) **Co-Director**	(Nombre y Apellido) **Director**

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Junín, 8 de septiembre de 2023

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos aquellos que me acompañaron en este camino, que no fue fácil, pero disfruté transitarlo.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, quien me dio la posibilidad de llevar adelante mis estudios sin presiones y con la responsabilidad que ameritaba.

A Juan Pablo de Benedetto y Ricardo García por darme un espacio en su catedra de Microbiología Agrícola como ayudante externo y así poder aprender sobre los trabajos ejercidos de los cuales me enriquecí mucho, por sus consejos y apoyo en este proyecto.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), la cual valoro mucho por brindarme los medios para la realización de este trabajo y formarme académicamente.

A mi pareja, Eliana, que supo contener, ser paciente y gran compañera en este camino largo y sinuoso.

A mi familia en general que estuvieron apoyándome y disfrutando tanto como yo de mis logros.

A Gustavo Barbero y Agustín Carbone por ayudarme a recolectar datos y aportar en la confección del proyecto.

A los amigos de la universidad con los que compartí extensas horas de estudio y con los que viví muchos momentos de alegrías como algunos otros de tristezas pero que no me dejaron caer.

A todos los profesores que de alguna u otra manera contribuyeron con sus conocimientos y enseñanzas a realizarme como persona y profesional.

Muchas gracias a todos los que aportaron su granito de arena para que pueda llegar a esta meta tan importante en la vida de un estudiante para poder ser realmente un profesional.

Índice 4
Abreviaturas utilizadas 5
1. Resumen 6
2. Introducción 7
1.2 Situación problema 7
2.2 Marco teórico 7
2.2.1 En relación al cultivo 7
2.2.2 En relación al inoculante 8
2.2.3 En relación a la interacción del inoculante y el cultivo 9
2. Hipótesis 10
3. Objetivo general 10
4. Objetivos específicos 10
5. Materiales y métodos 10
5.1 Ensayo a campo 11
5.1.1 Sitio experimental 11
5.1.2 Preparación de suelo y siembra 12
5.1.3 Inoculación de las semillas 12
5.1.4 Diseño del ensayo y procedimiento 13
5.1.5 Toma de datos 13
6. Resultados 14
6.1 Resultados a campo 14
6.1.1 Emergencia a campo 14
6.1.2 Resultado de los cortes 15
6.1.2.1 Primer corte, peso húmedo 15
6.1.2.2 Primer corte, peso seco 16
6.1.2.3 Segundo corte, peso húmedo 17
6.1.2.4 Segundo corte, peso seco 18
6.1.2.5 Sumatoria de cortes 19
5.2. Ensayo en laboratorio 21
5.2.1 Materiales y métodos 21
5.2.2 Condiciones de cámara 21
5.2.3 Diseño del ensayo y procedimiento 22
5.2.4 Toma de datos 23
6.2. Resultados en laboratorio 23
6.2.1 Recuento de emergencia 23
6.2.2 Nodulación 24
6.2.3 Análisis estadístico 25
7. Discusión 27
8. Conclusión 28
9. Bibliografía 30

Abreviaturas

FBN: Fijación biológica de nitrógeno

E. meliloti: Ensifer meliloti

MS: materia seca

PB: proteína bruta

kg: Kilogramo

IB: inoculante biológico

Has: hectáreas

GRI: Grado de reposo invernal

CRI: Con reposo invernal

CRIM: Con reposo invernal moderado

SRI: Sin reposo invernal

1. Resumen

En Argentina la adopción del cultivo de alfalfa como uno de los más eficientes para el pastoreo vacuno, genera que en planteos ganaderos exigentes se busque maximizar los recursos y convertirlos en materia seca lo más rápido posible, optimizando la productividad. Se trata, por tal motivo, de generar las mejores condiciones posibles para que ésta pastura potencie su rendimiento. En el país la extensión de este cultivo es muy amplia, habiendo en la actualidad unas 3,2 millones de has destinadas a la pastura de alfalfa, de las cuales 1 millón se utilizan para la henificación como forraje conservado, práctica que se ve incrementada año tras año generando reservas por un lado para suministrar como complemento a la dieta del animal y por otro para momentos críticos del año donde la escases de comida se acentúa como lo es en invierno en gran parte del territorio argentino.

El objetivo del trabajo fue determinar la eficiencia de la inoculación de la semilla de alfalfa con bacterias promotoras de crecimiento para mejorar el aprovechamiento de los recursos. El estudio se realizó en el campo experimental de la UNNOBA y en cámara de crecimiento en laboratorio de Microbiología. Los tratamientos fueron: 6 cepas de *Ensifer meliloti* identificadas por un número de código y un testigo no inoculado. Se observaron diferencias entre los tratamientos en la emergencia, la altura, el vigor y la nodulación de las plantas entre el testigo y los distintos tratamientos y se estableció que la asociación entre la planta y las bacterias que se traduce en una mejor producción del cultivo.

Se concluye que el tratamiento de la semilla de alfalfa con bacterias promotoras del crecimiento brinda una mejor performance de rendimiento del cultivo, mejorando la disponibilidad de forraje al ganado principalmente en los primeros cortes.

Palabras clave: nodulación, inoculado, promotores de crecimiento, bacteria, alfalfa.

2. Introducción

2.1. Situación problema

En los últimos 20 años, muchas de las regiones que hoy son exclusivamente productoras de granos experimentaron enormes transformaciones. Esas tierras eran identificadas como mixtas con una relación equilibrada entre la producción de granos y la ganadería, o incluso eran netamente ganaderas. Con el paso del tiempo el área sembrada aumentó cerca del 35% y la participación relativa de los cultivos se modificó bruscamente. Como resultado, se extendió la superficie agrícola y se relegó la actividad ganadera. Se produjo un aumento en la producción de soja, lo que la convirtió en el cultivo dominante en gran parte de Argentina, por ello, en suelos agrícolas, el antecesor más común cuando se siembra una pastura es la soja. (Satorre, 2005).

El cultivo de soja determina que las fechas de siembra de las pasturas se establezcan en su mayoría desde mayo en adelante, con cantidades variables de material muerto en superficie y condiciones ambientales subóptimas para la emergencia de plántulas (Scheneiter et al, 1996).

Un aporte para mejorar en la producción pecuaria es lograr una mayor y mejor producción de la alfalfa, ya que los kg de MS de alfalfa que no se producen, son litros de leche o kilogramos de carne perdidos en la producción. (Yenerich, 2014. a).

2.2 Marco teórico

2.2.1 En relación al cultivo

El cultivo de alfalfa es muy demandante de agua y nutrientes, por lo que en su producción deben asegurarse esos dos recursos. Si el agua no es suficientemente provista por las precipitaciones, tendrá que ser de riego, o de una napa. Además, la fertilidad del suelo es de suma importancia para que el cultivo disponga de los nutrientes y pueda expresar su mejor rendimiento y potencial (Yenerich, 2014. b).

Otro de los factores que debe tenerse en cuenta, y que define el tipo de cultivar a implantar, es la temperatura. La alfalfa requiere niveles medios de temperatura, de allí que es muy buena su producción y sin latencia en la zona centro de la Provincia de Buenos Aires, y más limitada en la zona sur, sin embargo hay variedades que se adaptan mejor a las bajas temperaturas y a la menor longitud del día durante los meses invernales.

Para clasificar las variedades de alfalfa, se utiliza el grado de reposo invernal (GRI), que combina resistencia al frío, crecimiento (rebrote) otoñal y latencia invernal. En la Argentina se utilizan alfalfas con GRI de 4 a 10. A los fines prácticos, teniendo en cuenta los valores de GRI de las variedades de alfalfa, pueden clasificarse en tres grupos:

a) con reposo invernal (CRI), que incluye a las variedades con GRI de 4 y 5
b) con reposo invernal moderado (CRIM), que abarca a las variedades con GRI de 6 y 7
c) sin reposo invernal (SRI), que incluye a las variedades con GRI de 8 a 10.

En líneas generales, las variedades SRI se recomiendan para el NOA, Cuyo y toda la Región Pampeana. Las variedades CRIM se recomiendan para toda la Región Pampeana y para algunas zonas de la Región Patagónica y finalmente, las CRI se aconsejan para la Región Pampeana Sur y la Región Patagónica (Basigalup y Rossanigo, 2007).

Para el cultivo en condiciones controladas de laboratorio, es recomendable mantener ciertos parámetros de temperatura en cultivares CRIM como el que utilizamos en el trabajo.

Temperaturas		Especies de ciclo otoño-invierno (alfalfa)
Máximas		25°C
Mínimas	Diurnas	20°C
	Nocturnas	15-20°C

2.2.2 En relación al inoculante

Algunas bacterias asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de generar mecanismos mediante los cuales promueven su crecimiento y desarrollo. Estos mecanismos se clasifican en **directos e indirectos** (Ahmad *et al*., 2006).

Los mecanismos **directos** se relacionan con la producción de fitohormonas del tipo auxinas y giberelinas, la regulación de la producción de hormonas por parte de la planta, o bien mejoran la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fosforo, hidrogeno y otros elementos por mecanismos de solubilización, aumentando la absorción o produciendo la fijación biológica de nitrógeno. En este último caso el nutriente puede ser incorporado directamente de la atmósfera.

Los mecanismos **indirectos** de promoción del crecimiento se refieren a la mejora del estado sanitario del cultivo por control de fitopatógenos. Ocurren mediante la inducción de la resistencia sistémica a fitopatógenos, el control biológico de enfermedades, la producción de antibióticos y de sideróforos, etc. (Voinnet, 2005; Rao *et al*., 2000).

En una revisión de lo ocurrido en los últimos años, puede observarse una marcada tendencia en la adopción de nuevas tecnologías de producción, en busca de reducir el impacto ambiental y de los costos en sistemas agropecuarios sustentables. Ante esta necesidad surge la aplicación de microorganismos a los cultivos, utilizados bajo la forma

de inoculantes o biofertilizantes como herramientas alternativas de fertilización y control de fitopatógenos.

Un inoculante biológico (IB) es un producto a base de organismos vivos como hongos, bacterias o algas, que, aplicados en el cultivo, facilitan el crecimiento vegetal y aumentan o mantienen su rendimiento (Cárdenas y Sánchez-Yáñez, 2004).

Entre los microorganismos que forman parte de estos inoculantes biológicos se encuentran los rhizobios, bacterias Gram negativas del suelo que fijan nitrógeno después de haberse establecido endosimbióticamente dentro de nódulos radiculares de las leguminosas. No todos los rhizobios pueden formar nódulos y/o fijar nitrógeno con todas las leguminosas. *Ensifer meliloti* es la bacteria específica para la alfalfa.

La aplicación correcta de estos microorganismos complementa a la fertilización convencional apuntando a una reducción de las dosis de fertilizantes químicos (Perticari *et al*, 2009).

2.2.3 En relación a la interacción del inoculante y el cultivo

El tipo de respuesta a la inoculación con rhizobios en alfalfa, es dependiente de los antecedentes del área a sembrar, de la implantación previa de leguminosas, del tipo de suelo, del nivel de compactación, el nivel de acidez, de la fertilidad y de la magnitud y calidad de las poblaciones naturalizadas de rhizobios capaces de nodular alfalfa.

Estudios ya realizados han comprobado que, si bien es posible que existan rhizobios en el suelo, la inoculación con cepas seleccionadas en leguminosas forrajeras aumenta la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la calidad de la producción del cultivo y en muchos casos los rendimientos y los niveles de proteína del forraje (Perticari *et al*, 2011).

En suelos con pocos años dedicados a la agricultura o con producción de pastizales naturales, los efectos son evidentes, con incrementos de rendimiento de materia seca (MS) y proteína bruta (PB) que van desde el 20 al 200 %. En cambio, en suelos con historia previa de leguminosas, con frecuencia se observan menores incrementos en el rendimiento de PB y en algunos casos efectos positivos sobre los rendimientos en MS sobre todo en los primeros cortes. En muchas otras ocasiones los cultivos inoculados muestran una mejor implantación (Perticari *et al*, 2011).

En este trabajo se decide probar diferentes cepas experimentales de *Ensifer meliloti* contra un testigo no inoculado para evaluar la respuesta de la inoculación y cuál de las cepas es la más eficiente.

3. Hipótesis

La aplicación de inoculantes producidos a partir de cepas del género *Ensifer* seleccionadas por mayor capacidad de FBN, sobre la semilla de alfalfa (*Medicago sativa*), incrementa la producción de materia seca y el crecimiento del cultivo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de inoculantes elaborados con cepas experimentales de *Ensifer meliloti* sobre el crecimiento y la producción de materia seca en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*).

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Evaluar a campo la respuesta a la aplicación de los inoculantes en semilla de alfalfa sobre la emergencia y la producción del cultivo.

4.2.2 Evaluar, en condiciones controladas, el efecto de la inoculación con las cepas experimentales de *E. meliloti* sobre la nodulación y emergencia de las plantas de alfalfa.

5. Materiales y Métodos

El proyecto de investigación se llevó a cabo a través de dos ensayos, uno en campo y otro en cámara de crecimiento. El primero fue destinado a una evaluación de la interacción planta-inoculante, a nivel de población del cultivo y producción de MS en condiciones de secano.

En el laboratorio (cámara de crecimiento en condiciones controladas), se evaluó la performance del inoculante a nivel de cada planta individual determinando su capacidad infectiva determinada por su nodulación.

Las cepas experimentales de *Ensifer meliloti* que se utilizaron como inoculantes en evaluación de su capacidad como PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas), fueron provistas por el Ingeniero Alejandro Perticari del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) de INTA Castelar.

Se evaluaron 6 cepas de *Ensifer meliloti* identificadas por un número de código, preparadas como inoculante en base de turba, y se utilizó una dosis de 10 g de turba/kg de semilla y un testigo no inoculado.

Tratamientos:

- ***T0: Testigo***

- ***T1: E. meliloti.*** **399**
- ***T2: E. meliloti.*** **494**
- ***T3: E. meliloti.*** **499**
- ***T4: E. meliloti.*** **501**
- ***T5: E. meliloti.*** **502**
- ***T6: E. meliloti.*** **514**

El cultivar de alfalfa utilizado fue Victoria INTA con un GRI 6 sin tratamiento previo sobre la semilla por el proveedor.

5.1 Ensayo a campo

5.1.1 Sitio experimental:

Foto 1: Campo experimental de la Universidad Nacional del NO de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA) "Las Magnolias", donde se realizarán los ensayos a campo, sobre un suelo hapludol típico (34°28´56,43" S, 60°52´41,44"O).

El campo experimental de la UNNOBA "Las Magnolias" ubicado en Agustín Roca, partido de Junín, provincia de Buenos Aires en el kilómetro 146,5 de la Ruta Nacional 188, fue el predio donde se realizó el ensayo en condiciones de secano.

El campo presenta una carta de suelo Hoja 3560 – 8 – 1, se halla en una zona de suelos de textura franco-arenoso representada en un (60%) serie Junín (Hapludol típico) de fase moderadamente bien drenada; (20%) serie Tiburcio (Hapludol acuico) y (20%) serie Rancagua (Natracualf típico), formando una asociación.

Capacidad de uso: IIIws.

Índice de productividad: 50,8_A.

5.1.2 Preparación del suelo y siembra

Se inició la actividad de este proyecto a finales de febrero de 2016 cuando en el equipo de investigación de Microbiología Agrícola empezó a planificar y diagramar el trabajo que debía realizarse.

Se trabajó en una de las parcelas experimentales ya delimitadas por el campo experimental de la UNNOBA donde el cultivo antecesor fue raigras (*Lolium multiflorum*). Al estar este cultivo muy avanzado en su madurez y semillado, se decidió realizar un barbecho convencional el 28/02/2016 con la aplicación de rastra de discos luego de cosechado el raigrás. Posteriormente, ante las primeras apariciones de malezas, una aplicación química el 21/03/2016 utilizando Glifosato, 2,4 D y Preside para asegurar una adecuada emergencia y establecimiento del cultivo sin sufrir competencias con malezas.

La siembra se realizó el 13/05/2016, por razones de logísticas del equipo de siembra contratado para dicha labor la fecha se distancia por algunas semanas del momento óptimo de implantación de la pastura, que se encuentra por mediados del mes de marzo. Se utilizó una sembradora Gherardi de 25 surcos que presentaba una distancia entre líneas de 17,5 cm, cada parcela contó con 12 surcos (mitad de maquina con un tratamiento y mitad con otro) y se tapó el dosificador del medio de la máquina para hacer visible la separación de los tratamientos. La densidad de siembra fue de 8,5 kg/ha de semilla.

Las parcelas con una dimensión de 2,10 metros de ancho por 10 metros de largo generan una superficie total de 441 m^2 de siembra (2,10 m x 10 m x 7 tratamientos x 3 bloques = 441m^2). Entre cada bloque se dejó una distancia de 2 metros.

Se efectuó una fertilización con 80 kg/ha de fosfato diamónico (PDA) al voleo antes de la siembra para evitar posible toxicidad sobre las cepas con una concentración de 7-39-0-S5-Ca29.

Se efectuaron dos pulverizaciones más con herbicidas, una el 01/08/16 con Cletodim por la presencia de malezas gramíneas como el raigrás principalmente y otra el 26/8/16 con Imazetapir por presencia de malezas de hoja ancha.

5.1.3 Inoculación de las semillas

Se realizó la inoculación colocando las semillas en bolsas de nylon agregando el inoculante provisto en forma de turba (3 g/300 g de semilla) + agua azucarada al 20 % (50 ml/300 g de semilla). Al testigo se le suministró solamente agua azucarada.

5.1.4 Diseño del ensayo y procedimiento

La siembra se realizó de acuerdo a un diseño en bloques completos al azar con 7 tratamientos y 3 bloques.

Para lograr la densidad deseada de 8,5kg/ha de semilla, se utilizaron 300 g por parcela, por lo tanto, se sembró un total de 6,3 kg de semilla.

Superficie total de cada tratamiento: 2,10 m x 10 m x 3 repeticiones = 63 m^2.

Luego de un crecimiento bueno y sostenido del cultivo se realizó el primer corte el día 14/11/2016. El mismo se realizó colocando un aro en un sitio al azar de 0,27m^2 cortando el forraje que quedaba dentro con tijeras de podar, dejando un remanente suficiente para un buen rebrote. Cabe destacar que los cortes en una alfalfa deben llevarse a cabo cuando el cultivo se encuentre en 10% de floración, o cuando los rebrotes basales alcancen entre 3 y 5 cm de altura fuera de la época estival. En este caso se implementaron los cortes como la primera opción con 10% de floración.

El siguiente corte se hizo el día 4/1/2017, se repitió de la misma manera luego del rebrote y crecimiento del cultivo, una vez alcanzado las condiciones necesarias mencionadas anteriormente.

En estos estadios el cultivo maximiza su relación rendimiento-calidad obteniendo mayor digestibilidad, más proporción de hojas/tallos y un gran volumen de forraje. Si se demora el corte se produce un autoraleo natural en el lote perdiendo eficiencia en los próximos cortes, por lo tanto, hay que generar más cortes, más tiernos, con más calidad de forraje, lo que generará más gastos de producción, pero a la vez mayor rentabilidad. (Kallenbach *et al*, 2002)

Diseño del ensayo:

Tratamientos	**T0**	**T3**	**T1**	**T6**	**T5**	**T2**	**T4**	**T0**	**T4**	**T2**	**T1**	**T3**	**T5**	**T6**	**T4**	**T2**	**T0**	**T6**	**T5**	**T3**	**T1**
Bloques	**1**							**2**							**3**						

Tabla 1: Disposición y Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado

5.1.5 Toma de datos

Para la **evaluación a campo** se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- 01/09/2016 **Emergencia** (plantas/ha). La medición se realizó en 4 metros lineales contando las plantas emergidas y bien establecidas, tomando los surcos centrales

de cada parcela y luego se calculó el resultado de plantas emergidas por hectárea. Se efectuó a los 30 días de sembrado el cultivo, asegurándose que esté totalmente establecido.

- **Producción de forraje** (kg/ha) obtenidos en cada uno de los 2 cortes a 10% de floración del cultivo o con rebrotes basales entre 3 y 5 cm de altura fuera de la época estival. Se evaluó la producción de materia verde de cada tratamiento y luego las muestras fueron llevadas a estufa durante 72 horas a 65–70 °C para realizar el cálculo de materia seca (kg MS/ha).

Los datos registrados durante el experimento fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó la comparación de medias con la prueba de Fisher a un nivel de significancia del 5%. Para ello se utilizó el software estadístico InfoStat/profesional (versión 1.1).

6. Resultados

6.1 Resultados en campo

A lo largo del ciclo ontogénico del cultivo de alfalfa se evaluaron diferentes variables que son determinantes en el rendimiento

6.1.1 Emergencia a campo

Se observó que todos los tratamientos a los que se le aplicaron el inoculante elevaron el número de emergencias de plantas, pero no generaron diferencias significativas quedando así reflejado en el análisis de varianza.

TRATAMIENTOS / BLOQUES	Nº de plantas/m²						
	T0	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**
Bloque 1	90	90	116	100	119	112	111
Bloque 2	100	76	99	107	142	70	65
Bloque 3	76	127	73	120	93	158	115
Promedio de emergencia	**88,6**	**97,6**	**96**	**109**	**118**	**113,3**	**97**

Tabla 2: Obtención de datos de emergencia en 4 metros lineales por cada parcela a campo.

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Emergencia	21	0,25	0,00	26,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2979,33	8	372,42	0,51	0,8271
Bloques	882,67	2	441,33	0,60	0,5621
Tratamientos	2096,67	6	349,44	0,48	0,8118
Error	8759,33	12	729,94		
Total	11738,67	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=48,06392

Error: 729,9444 gl: 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T0	88,67	3	15,60	A
T6	96,00	3	15,60	A
T2	96,00	3	15,60	A
T1	97,67	3	15,60	A
T3	109,00	3	15,60	A
T5	113,33	3	15,60	A
T4	118,00	3	15,60	A

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

Observando los datos, si bien el análisis estadístico nos demuestra que no hay respuestas significativas, se observa importantes diferencias entre el testigo y algunas de las cepas. Probablemente no se refleje en el análisis estadístico por la alta variabilidad de los datos por una labranza demasiado cercana a la siembra y no tan bien lograda.

6.1.2 Resultado de los cortes

Los datos obtenidos de cada corte fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de la varianza y la comparación de medias mediante el test de Fisher (p menor de 0,05%), aplicando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2014).

Área de cosecha: aro de 0.27 m2.

Los resultados reflejados en un gráfico en Kg de MS/ha.

Se analizaron los 2 cortes por separados.

6.1.2.1 Primer corte, peso húmedo

El 14/11/2016 se obtuvo el peso húmedo: Primer corte de la alfalfa a 10% de floración.

	Bloques (gr)				
Tratamientos	1	2	3	Promedio (gr/0,27 m^2)	Promedio Kg/ha
T0	628	639	649	**638**	**23630**
T1	623	755	562	**640**	**25185**
T2	593	829	624	**682**	**25260**
T3	749	692	771	**737**	**27296**
T4	633	705	689	**676**	**25037**
T5	515	612	425	**517**	**19148**
T6	532	703	579	**605**	**22407**

Tabla 3: Peso húmedo del primer corte.

Se destacó el T3 sobre el resto y a su vez el T5 quedó bastante por debajo de los demás tratamientos en cuanto a su producción, pero con mucha variabilidad de la producción en cada bloque.

6.1.2.2 Primer corte, peso seco

El 17/11/2016 se midió el peso seco del primer corte de la alfalfa que se obtuvo luego de 72 horas en estufa a 65-70°C.

Las bolsas fueron pesadas en 100 gramos de materia húmeda y luego se pesaron las mismas después de estar en estufa a 65°C durante 72hs, de esta manera se obtuvo el porcentaje de materia seca dejando un resultado en Kg/ha que se demuestra en la siguiente tabla.

	Bloques (gr)				
Tratamientos	1	2	3	Promedio (gr/0,27 m2)	Promedio (Kg/ha)
T0	238,64	272,69	279,07	**263,47**	**9758,02**
T1	249,2	332,2	263,56	**281,65**	**10431,60**
T2	225,34	348,18	279,18	**284,23**	**10527,16**
T3	299,6	297,56	316,11	**304,42**	**11274,94**
T4	237,91	292,98	297,45	**276,11**	**10226,42**
T5	200,85	257,04	187	**214,96**	**7961,60**
T6	207,48	281,2	260,55	**249,74**	**9249,75**

Tabla 4: Peso seco del primer corte.

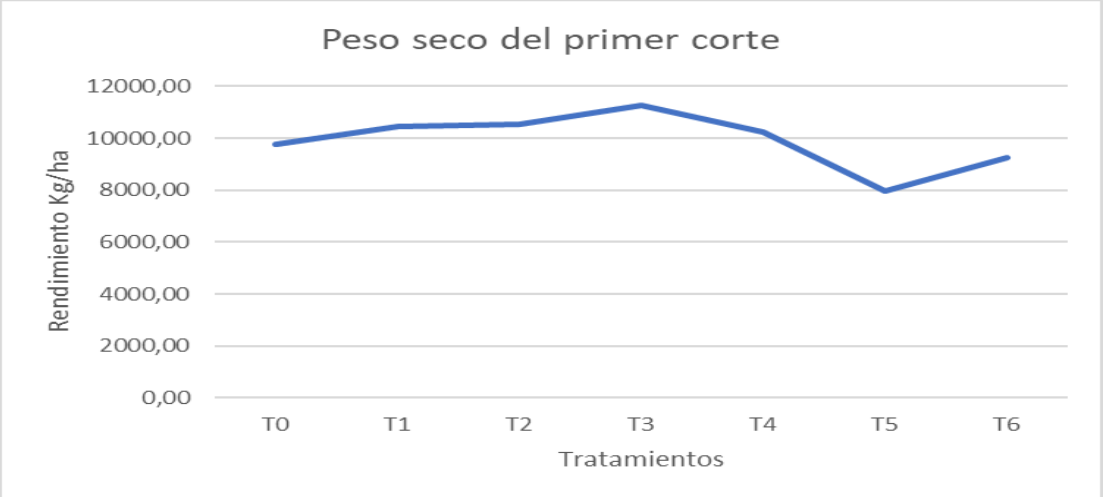

Gráfico 1: Incidencia de cada uno de los tratamientos sobre el rendimiento del cultivo expresados en Kg de MS por hectárea.

En este caso quedó en evidencia la menor producción del testigo junto con algunas de las cepas como la del T5 y T6 y la mayor producción de T3 en relación al resto de los tratamientos.

Primer corte peso seco

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
MATERIA SECA	21	0,78	0,64	9,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	27811,87	8	3476,48	5,40	0,0048
BLOQUES	12785,22	2	6392,61	9,93	0,0029
TRATAMIENTOS	15026,65	6	2504,44	3,89	0,0217
Error	7728,63	12	644,05		
Total	35540,49	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=45,14761

Error: 644,0522 gl: 12

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
T5	214,96	3	14,65	A	
T6	249,74	3	14,65	A	B
T0	263,47	3	14,65		B C
T4	276,11	3	14,65		B C
T1	281,65	3	14,65		B C
T2	284,23	3	14,65		B C
T3	304,42	3	14,65		C

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

Vemos que el test agrupa las combinaciones en 3 grupos. **T3** que corresponde a la cepa **B 399** fue la de mayor producción de MS con diferencia significativa sobre todos los demás. Ahora también tenemos un grupo intermedio que se diferencia significativamente sobre un último grupo, caracterizado por los tratamientos más débiles, produciendo inclusive menos que el testigo.

6.1.2.3 Segundo corte, peso húmedo

El 04/01/2017 se realizó el segundo corte de alfalfa en 20% de floración. Se destacó T1 ampliamente.

	Bloques (gr)				
Tratamientos	1	2	3	Promedio (gr/27 m^2)	Promedio (Kg/ha)
T0	711	804	737	**750**	**27777**
T1	1059	1072	838	**990**	**36666**
T2	678	837	738	**751**	**27814**
T3	826	810	857	**818**	**30296**
T4	636	906	696	**746**	**27630**
T5	733	808	729	**757**	**28037**
T6	666	894	636	**732**	**27111**

Tabla 5: Peso húmedo del segundo corte.

6.1.2.4 Segundo corte, peso seco

El 11/01/2017 se obtuvo el peso seco luego de estar en estufa a 65°C procediendo de la misma manera que en el primer corte.

Los pesos fueron parejos, sobresaliendo el T1 y también se notó un cambio positivo en T3.

	Bloques (gr)				
Tratamientos	1	2	3	Promedio (gr/0,27 m^2)	Promedio (Kg/ha)
T0	265,5	253,12	384	**300,87**	**11143,46**
T1	413,01	407,36	326,82	**382,40**	**14162,84**
T2	264,42	351,54	287,82	**301,26**	**11157,78**
T3	322,14	300,3	351,37	**324,60**	**12022,35**
T4	241,68	380,52	271,44	**297,88**	**11032,59**
T5	285,87	323,2	277,02	**295,36**	**10939,38**
T6	233,1	389,6	254,4	**292,37**	**10828,40**

Tabla 6: Peso seco del segundo corte.

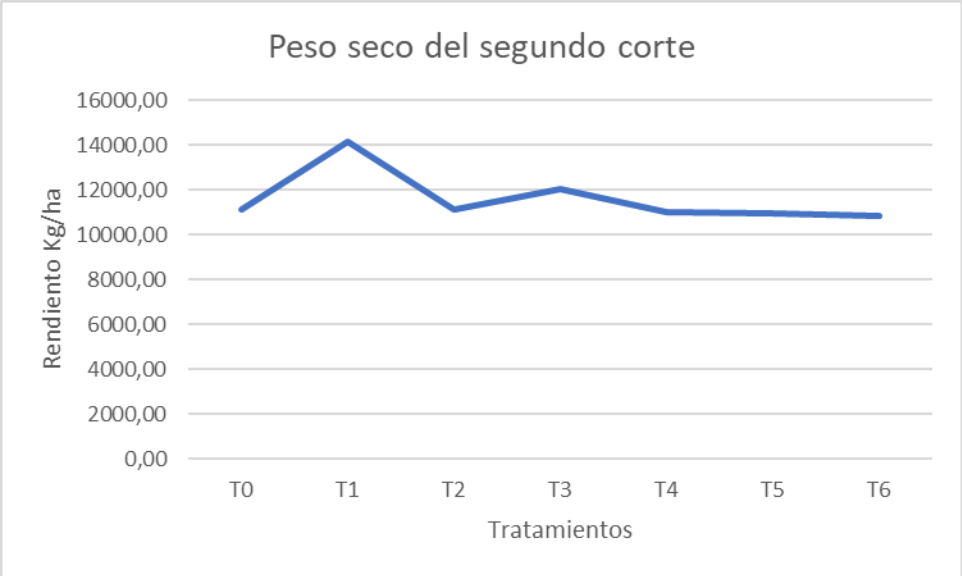

Grafico 2: Rendimiento de los tratamientos en Kg de MS por hectárea.

Segundo corte peso seco

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
MATERIA SECA	21	0,45	0,08	17,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29282,12	8	3660,26	1,22	0,3660
BLOQUES	10685,67	2	5342,83	1,78	0,2109

TRATAMIENTOS	18596,45	6	3099,41	1,03	0,4516
Error	36080,90	12	3006,74		
Total	65363,02	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,10 DMS=79,79583

Error: 3006,7419 gl: 12

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
T6	292,37	3	31,66	A	
T5	295,36	3	31,66	A	
T4	297,88	3	31,66	A	
T0	300,87	3	31,66	A	
T2	301,26	3	31,66	A	
T3	324,60	3	31,66	A	B
T1	382,40	3	31,66		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,10)

Aquí queda reflejado una diferencia significativa según el ANOVA dejando una marcada producción en dos de las parcelas con tratamientos de inoculación respecto al testigo.

En este segundo corte pasó a tener una destacada diferencia significativa T1 sobre el resto de los tratamientos, y es acompañado por T3 con algo menos de potencial pero que puede ser útil para seguir estudiándolo.

6.1.2.5 Producción total (2 cortes)

Podemos calcular una producción total de los tratamientos sumando ambos cortes, marcando claramente las diferencias entre los tratamientos.

	Producción total		
Tratamientos	1er corte	2do corte	TOTAL de MS (Kg/ha)
T0	9758,02	11143,46	**20901,48**
T1	10431,60	14162,84	**24594,44**
T2	10527,16	11157,78	**21684,94**
T3	11274,94	12022,35	**23297,28**
T4	10226,42	11032,59	**21259,01**
T5	7961,60	10939,38	**18900,99**
T6	9249,75	10828,40	**20078,15**

Tabla 7: Calculo de peso total de MS en los dos cortes

Se puede visualizar en el siguiente gráfico, el comportamiento de las cepas en estudio a lo largo de todo el trabajo realizado.

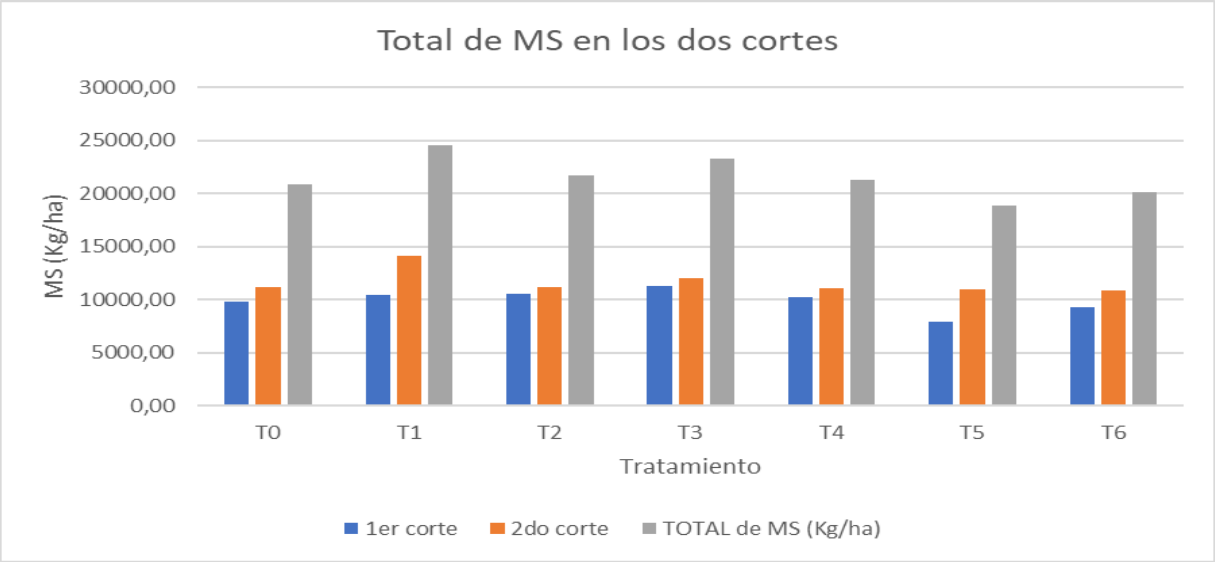

Gráfico 3: Rendimiento de los tratamientos en Kg de MS por hectárea comparando cada corte y su respectiva sumatoria.

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
TOTAL de MS (Kg/ha)	14	0,83	0,63	7,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21055654,56	7	3007950,65	4,14	0,0518
Bloque	10042557,17	1	10042557,17	13,82	0,0099
Tratamiento	11013097,38	6	1835516,23	2,53	0,1421
Error	4361002,25	6	726833,71		
Total	25416656,80	13			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2086,10307

Error: 726833,7080 gl: 6

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
T5	9450,49	2	602,84	A		
T6	10039,08	2	602,84	A	B	
T0	10450,74	2	602,84	A	B	C
T4	10629,51	2	602,84	A	B	C
T2	10842,47	2	602,84	A	B	C
T3	11648,65	2	602,84		B	C
T1	12297,22	2	602,84			C

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

Podemos ver en el ANOVA que hay diferencia entre bloques mostrando una mejor performance de los tratamientos en el segundo corte, probablemente por la mejor actividad de los nódulos con el paso del tiempo en la FBN.

En este test, siguiendo una línea similar al segundo corte, podemos confirmar que la cepa B 399 INTA del T1 se destacó sobre el resto y superó significativamente al control al nivel de p 0.05 (5%). También se puede resaltar la buena performance que tuvo B 499

INTA del T3 dentro del grupo que no resulto con diferencias significativas pudiendo tener una mejor producción que todos ellos. Por tal motivo sería recomendable seguir estudiando también este material para corroborar su comportamiento.

5.2 Ensayo en laboratorio

Se realizó un ensayo en cámara de crecimiento del laboratorio de Microbiología Agrícola de la UNNOBA sede Junín, en un ambiente controlado de humedad, fotoperiodo y temperatura, para realizar la evaluación de la infectividad y nodulación generada por cada uno de los diferentes inoculantes en la planta de alfalfa.

5.2.1 Materiales y métodos

I. Semilla de Alfalfa sin tratar. Se utilizó el mismo cultivar que en campo: Victoria con GRI 6.
II. Inoculante en base turba con las 6 cepas experimentales (las mismas que fueron evaluadas a campo)
III. Recipientes de plástico (macetas) de 2 Kg de capacidad, con tres perforaciones en el fondo de aproximadamente dos milímetros de diámetro.
IV. Bolsas plásticas.
V. Bandejas de material plástico, con una altura no inferior a dos centímetros.

VI Tierra del campo experimental tindalizada (técnica de esterilización que consiste en elevar la temperatura de la tierra a 100ºC, tres veces seguidas a intervalos de 24 horas). Con ello se consigue la destrucción de los microorganismos sin alterar la composición química del material, para partir de un sustrato estéril y que no influyan bacterias propias del suelo en la semilla.

VI. Solución Buffer para riego:

K_2PO_4H…….	0,5 g
KPO_4H_2.....	0,7 g
Agua destilada…..	1 l

5.2.1 Condiciones de cámara

I. Fuente de Luz: 6 tubos Growth-lux por m^2 y tubos de luz día en una relación 2/1.
   a- Altura: 40 cm al borde de las macetas.
   b- Luminosidad: aproximadamente 4600 lux.
   c- Fotoperíodo: 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

II. Temperaturas: Por medio de un Split (aire acondicionado frio/calor) se graduó la temperatura teóricamente óptima para la producción del cultivar en condiciones controladas asemejándose a la estación otoño-invierno en la etapa inicial de crecimiento. De esta manera pudimos manejar temperaturas máximas de 25°C y mínimas entra 15 y 20°C dependiendo del momento del día. En 20°C durante el día y entre 15-20°C durante la noche.

III. Humedad relativa: mínima de 65%.

IV. Riego: al comienzo y por arriba, regando con solución buffer (ph: 7) aproximadamente 25 ml, luego se mantuvo 1 cm en la bandeja con agua destilada, cuidando que el estrato superior del sustrato permanezca húmedo.

5.2.2 Diseño del ensayo y procedimiento

Se evaluó la infectividad de 6 cepas del género *Ensifer* (las mismas utilizadas en el ensayo a campo) en su capacidad de nodular alfalfa en condiciones controladas, más un testigo no inoculado como control.

Se empleó un diseño en bloques completos al azar (BCA) con 7 tratamientos y 9 bloques.

I. Inoculación: Se prepararon 7 bolsas de polietileno con 100 g de semillas de alfalfa en cada una. Se agregó a cada bolsa convenientemente rotulada, 1 g de cada uno de los inoculantes (en base turba) y 15 ml de solución de glucosa al 20%. Se mezcló la semilla con el inoculante durante 10 minutos, al testigo se le agregó solo la solución de glucosa.

II. Se efectuó un cuarteo y luego se separaron por medio de una policubeta 10 semillas para cada maceta.

    Se prepararon 9 macetas con 1 Kg de sustrato de tierra tindalizada, para cada uno de los 7 tratamientos se agregó aproximadamente 130 ml de solución de riego hasta saturación. Para ser equitativo en los próximos momentos de riego se llevaron a un peso de 1,1 kg c/u de las macetas una vez regadas. Este peso fue constante durante todo el trabajo para poder corroborar que todas las macetas estuvieron bajo las mismas condiciones de humedad, de manera que se pesó cada maceta antes y después de cada momento de riego.

III. El 19/09/2017 se realizó la siembra. Se colocaron 10 semillas tratadas por maceta, efectuando previamente un orificio a una profundidad no mayor a 2 veces el tamaño de la semilla. Luego se cubrió con el sustrato y se compactó ligeramente.

IV. Se colocaron las macetas sobre las bandejas plásticas, 9 macetas por tratamiento un total de 63 macetas.
V. Las macetas fueron colocadas en la cámara de crecimiento, en oscuridad hasta inicio de germinación.
VI. 24/09/2017 germinaron las plantas con 19°C y se empezó a utilizar la luz artificial.
VII. Se incubaron respetando el fotoperiodo y las condiciones de temperatura con riego a peso constante.

5.2.3 Toma de datos

Se contó el número de emergencia y establecimiento de las 10 semillas utilizadas por cada maceta.

- Recuento de emergencia

Se produjo el conteo de las semillas emergidas por cada maseta, teniendo en cuenta que previamente se habían sembrado 10 semillas en cada recipiente.

Este dato se tomó a los 8 días de la siembra.

- Nodulación

Se obtuvo el dato una vez alcanzado el tamaño considerable cada planta, dejando pasar unos 30 días desde la emergencia. Solo se contaron nódulos en la raíz principal que son quienes aportan mejores beneficios a la planta.

6.2 Resultado en laboratorio

Los resultados se expresarán como cantidad de plantas emergidas y porcentaje de plantas noduladas satisfactoriamente en cada tratamiento.

6.2.1 Recuento de emergencia

Se realizó el día 27/09/2017.

Se pudo observar que el testigo fue quien menor emergencia tuvo, demostrando un efecto positivo al inocular la semilla con *Encifer meliloti.*

Datos de emergencia

TRATAMIENTOS / BLOQUES	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	Nº de plantas	Nº de plantas	Nº de plantas	Nº de plantas	Nº de plantas	Nº de plantas	Nº de plantas
Bandeja Arriba Izquierda	4	10	10	9	7	10	9
Bandeja Arriba Medio	10	10	9	8	10	8	10
Bandeja Arriba Derecha	10	10	9	10	9	8	10
Bandeja Medio Izquierda	9	9	10	9	9	7	9
Bandeja Medio Medio	9	10	10	7	10	9	10
Bandeja Medio Derecha	7	9	8	8	8	8	10
Bandeja Abajo Izquierda	10	7	10	10	8	7	10
Bandeja abajo Medio	7	9	10	9	9	10	8
Bandeja Abajo Derecha	7	7	9	9	8	9	10
Total plantas emergidas	**73**	**82**	**84**	**77**	**77**	**74**	**84**

Tabla 7: Se consigna en la tabla el número de plantas emergidas por maceta a partir de las 10 semillas sembradas en cada una y un número de emergencia total sumando los bloques por cada tratamiento representado en porcentaje.

6.2.2 Nodulación

Se determinó número, localización y peso de nódulos a los 30 días de crecimiento de las plántulas. Hubo una respuesta muy positiva en los tratamientos inoculados destacándose ampliamente la cepa del T1.

Tratamientos / Bloques	T0		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
Bandeja Arriba Izquierda	4	0	7	7	4	5	5	2	2	1	0	0	4	3
Bandeja Arriba Medio	8	0	9	11	5	5	9	11	6	10	8	14	6	4
Bandeja Arriba Derecha	7	0	5	9	9	11	5	5	6	7	5	0	10	11
Bandeja Medio Izquierda	7	0	0	0	1	1	1	1	7	3	7	8	1	1
Bandeja Medio Medio	4	0	6	10	10	12	6	9	7	5	7	10	8	6
Bandeja Medio Derecha	0	0	9	17	3	3	6	7	2	1	4	1	6	9
Bandeja Abajo Izquierda	4	0	2	2	1	0	3	1	4	5	7	1	4	1
Bandeja abajo medio	0	0	6	6	0	0	3	2	2	0	4	3	2	2
Bandeja Abajo Derecha	5	0	4	5	2	3	5	3	4	2	6	5	0	0
TOTAL	39	0	48	67	35	40	43	41	40	34	48	42	41	37
Nódulos por plantas en raíz pivotante	**0**		**1,2**		**0,91**		**0,99**		**0,75**		**0,70**		**0,78**	

Tabla 8: Nodulación de las plantas en la raíz principal

Referencias
P: número de plantas estudiadas
N: número total de nódulos en las plantas estudiadas

6.2.3 Análisis estadístico

Los datos, al igual que en el trabajo a campo, son analizados estadísticamente por medio de análisis de la varianza y del test de Fisher para la diferencia de medias (p menor de 0,05%), aplicando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2014).

Se puede observar en los análisis estadísticos la lógica diferencia que reflejan los tratamientos inoculados con respecto al testigo, dejando en evidencia la influencia positiva que genera en cuanto al mejor número de plantas emergidas y a la mayor nodulación que se produce en la raíz principal, promoviendo de esta manera una mejor producción del cultivo.

Emergencia en laboratorio

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Emergencia	63	0,26	0,04	13,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24,32	14	1,74	1,20	0,3054
Bloque	9,71	8	1,21	0,84	0,5725
Tratamiento	14,60	6	2,43	1,68	0,1455
Error	69,40	48	1,45		
Total	93,71	62			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,13966

Error: 1,4458 gl: 48

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
T0	8,11	9	0,40	A	
T5	8,44	9	0,40	A	B
T4	8,67	9	0,40	A	B
T3	8,78	9	0,40	A	B
T1	9,00	9	0,40	A	B
T2	9,44	9	0,40		B
T6	9,56	9	0,40		B

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

En el análisis de varianza la probabilidad asociada (valor p) es mayor al nivel de significancia α al 5% (0,05) en ambos casos, para las repeticiones y para los tratamientos.

De esta forma confirmamos que no hay heterogeneidad, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre los tratamientos según el ANOVA.

Si se puede ver que en el test de Fisher se genera una diferencia significativa pudiendo diferenciarse con una mejor emergencia los tratamientos T2 y T6, también queda en evidencia la baja emergencia en el T0.

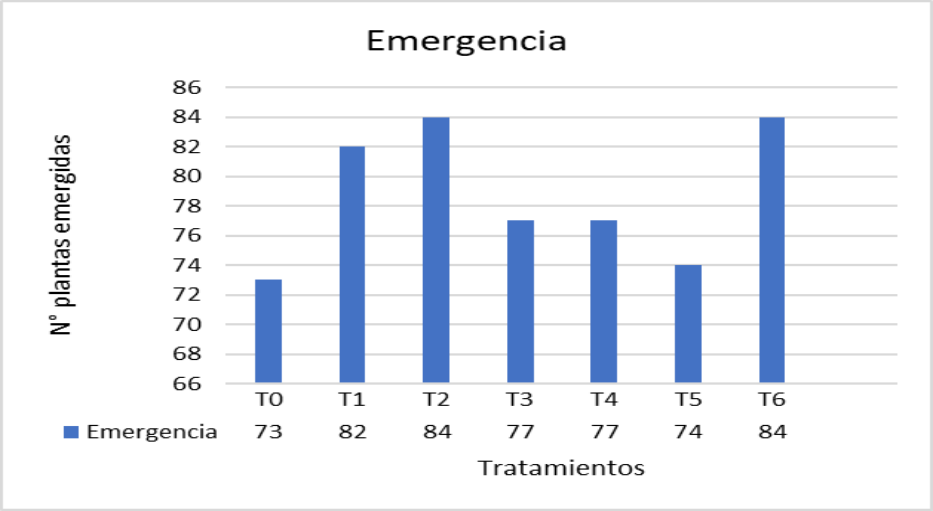

Gráfico 4: Muestra la influencia de las cepas con respecto a la emergencia ocurrida

Nodulación

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Nodulación	63	0,51	0,37	61,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10,85	14	0,77	3,55	0,0005
Bloque	3,17	8	0,40	1,82	0,0965
Tratamiento	7,67	6	1,28	5,86	0,0001
Error	10,47	48	0,22		
Total	21,32	62			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,44271

Error: 0,2182 gl: 48

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
T0	0,00	9	0,16	A		
T5	0,70	9	0,16		B	
T4	0,75	9	0,16		B	
T6	0,78	9	0,16		B	C
T2	0,91	9	0,16		B	C
T3	0,99	9	0,16		B	C
T1	1,20	9	0,16			C

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

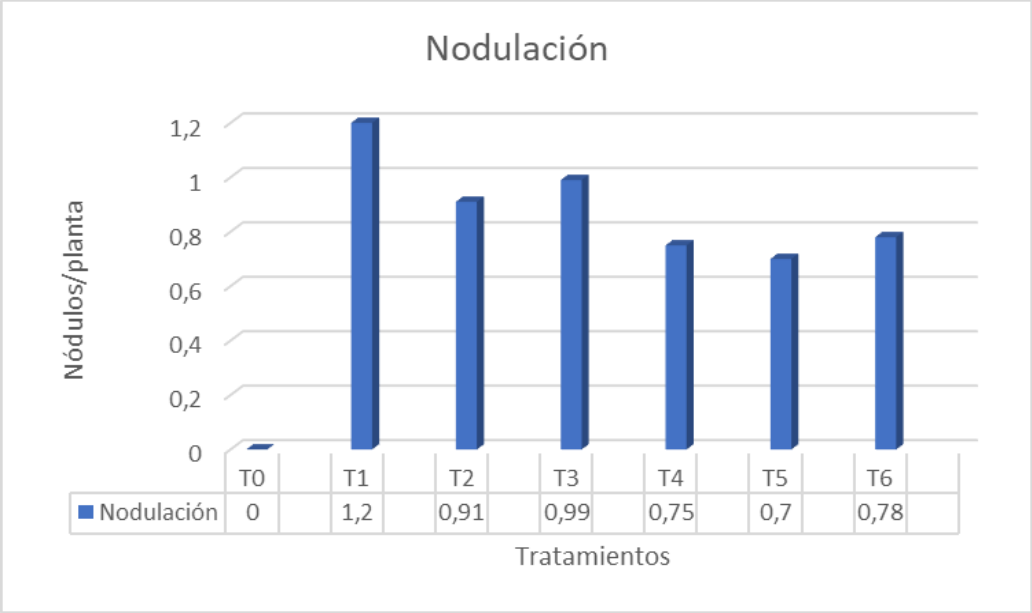

Grafico 5: Promedio de nódulos por plantas ocurridas en cada tratamiento

Una vez analizado los resultados obtenidos en la nodulación, queda en evidencia la nula aparición de nódulos en el T0, por lo que vemos el efecto que produjo la tindalización. Pudiendo de esta manera expresar mejor el estudio de las cepas en cuestión y no hubo contaminación de cepas naturalizadas en el suelo.

Se corrobora tal como se hizo en el ensayo a campo, que la cepa B 399 del T1 se destaca sobre el resto, visualizándose una diferencia significativa en la cantidad de nódulos producidos en la raíz principal, pudiendo de esta manera estar estrechamente relacionado a la mayor y mejor producción de forraje.

Se puede ver que hay un grupo intermedio de tratamientos que tuvieron una mejor performance que otros y que T0, que como ya dijimos, quedó con 0 nódulos. De estos, queda evidenciado que el T3 con la cepa B 499, al igual que en ensayo a campo, podría ser considerado para tener en cuenta en próximos estudios

7 Discusión

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación de cepas de *Ensifer meliloti* promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) sobre la semilla de Alfalfa al momento de la siembra con el objetivo de mejorar la producción del cultivo.

La aplicación de diferentes cepas de *Ensifer meliloti* promovió la nodulación en todos los casos y una leve mejora en la emergencia como así también la mayor producción de forraje en los cortes realizados a campo coincidiendo con antecedentes publicados (Perticari *et al*, 2011).

La emergencia se vio mejorada cuando existió tratamiento de inoculación tanto en el ensayo a campo como en el laboratorio. Por lo tanto, podemos ver una relación positiva en este aspecto. De todas maneras, éste no es el principal motivo para incentivar el tratamiento de semilla, sino el de producción de MS total por hectárea.

El ensayo en laboratorio fue convalidado por la ausencia de nódulos en el control sin tratar. Todas las cepas promovieron la nodulación pudiéndose destacar en cantidad de nódulos la cepa B 399 siendo superior al resto de cepas evaluadas, consistente con la información presentada en estudios realizados por otros investigadores (Perticari, 2006).

En los primeros momentos de producción de esta forrajera, la actividad simbiótica en sus raíces es baja al principio, lo que se atribuye a la demora en el establecimiento de los nódulos (Vance et al, 1988), esto podría explicar el salto de producción de MS que se genera para la cepa B 399 y B 499 en el segundo corte, lo que no se manifiesta en el primer corte del cultivo.

En cuanto la producción de forraje, principal componente de estudio, se pudo corroborar la significativa mejora que hubo en la cepa B 399 y también en la B 499 coincidiendo con los resultados obtenidos por investigaciones publicadas (Perticari *et al*, 2006).

8 Conclusión

Según datos experimentales obtenidos en el trabajo de investigación del ensayo a campo realizado en la campaña 2016/17 en el ambiente del Campo Experimental de la UNNOBA Junín y en la cámara de crecimiento del laboratorio se concluye que la inoculación con la cepa B 399 INTA es la de mejor performance, siendo la más estable y con buena producción a largo del ciclo del cultivo en la producción de materia seca de alfalfa. Así mismo, podemos afirmar que la cepa B 499 INTA también marcó diferencias significativas con respecto al testigo en el segundo corte, otorgando un diferencial de rendimiento positivo.

La utilización de PGPR sobre el cultivo de Alfalfa demuestra las mejoras antes mencionadas con un costo de aplicación muy bajo teniendo una relación costo/beneficio muy buena y mejora el impacto ambiental siendo amigable con el medio ambiente. Por tal motivo es muy importante seguir investigando y ensayando diferentes cepas a modo de obtener la más eficiente.

9. Bibliografía

- Ahmad, F; Ahmad, I y Khan, MS. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their múltiple plant growth promoting activities. Microbiol Res 36:1-9.

- Basigalup, D. y Rossanigo, R. (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En: El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. Editor: Basigalup, D. Ediciones INTA. pp: 13-25. (ISBN: 978-987-521-242-8)

- Cárdenas, R y Sánchez-Yáñez JM. (2004). Aportes de nitrógeno a la agricultura. Revista de Horticultura 10:173-176.

- Di Rienzo, J.A; Balzarini, M.G; Casanoves, F; Gonzalez, L; Tablada, M y Robledo, C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

- Kallenbach, RL; Nelson, CJ; Coutts, JH (2002) Rendimiento, calidad y persistencia de alfalfa tipo pastoreo y heno bajo tres frecuencias de cosecha. *Agron. J. 94* , 94–103.

- Perticari, A. (2006). Pasturas de alfalfa: Importancia de una adecuada inoculación. Segundo Congreso Nacional de Conservación y Uso de Forrajes. *IMYZA- CICVyA - INTA Castelar.

- Perticari, A; Garcia, J y Puente, M: (2009). Prólogo. En: Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz. Proyecto Inocular PGPM. ISBN978-987-1623-46-4.

- Perticari, A; Puente, M; y García, J. (2011). Inoculación de leguminosas forrajeras con rhizobios eficientes. Producir XXI, Bs. As. 19(232):68-71.

- Racca, R; Collino, D; Dardanelli, J; Basigalup, D; Gonzáles, N; Brenzoni, E; Hein, N. Y M. Balzarini. (2001). Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA 56 pág.

- Rao, M Lee H; Creelman, R; Mullet, J y Davirs, K. (2000). Jasmonic acid signaling modulates-induced hypersensitive cell death. Plant Cell 12:1633-1646.

- Satorre, E. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. Ciencia Hoy, Vol 15, N 87, Buenos Aires: 24-31.

- Scheneiter, O, Ferrari M y Ostojic J. 1996. Época de siembra y cultivo antecesor en el establecimiento de pasturas en suelos agrícolas degradados INTA, EEA. Revista de tecnología Agropecuaria. Vol. I (3): 39-44.

- Vance C.P.; Heichel G.|H.; Phillips D.A.1988, Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. In Alfalfa and Alfalfa improvement. Handson A.A. et al ed. ASA, CSSA, SSS., Madison Wisconsin Usa. 229-257

- Voinnet O. (2005). RNA silencing compared with innate immunity. Nature Rev Gen 6:206-220.

- Yenerich, D. (2014). a. Tratar a la alfalfa como un cultivo agrícola. Biblioteca Forratec. Forratec Argentina S.A. Disponible en http://www.forratec.com.ar/manuales/pdfs/46-20141219153800-pdfEs.pdf

- Yenerich, D. (2014). b. El buen cultivo de alfalfa. Biblioteca Forratec. Forratec Argentina S.A. Disponible en https://www.forratec.com.ar/manuales/pdfs/14-20140327095305-pdfEs.pdf

BEYRNE
Maria
Andrea

Digitally signed by BEYRNE Maria Andrea
Date: 2023.09.22 10:33:56 -0300