

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



TRABAJO FINAL DE GRADO

**“EFECTO DE LA BIOFERTILIZACION CON AZOSPIRILLUM
BRASILENSE Y NITROGENO DE SINTESIS QUIMICA SOBRE LA
CANTIDAD Y CALIDAD DE MATERIA SECA DE *LOLIUM
MULTIFLORUM* LAM. “**

ALUMNO: SALGADO, MAXIMILIANO

DIRECTORA: OLIVERA, MARIA ELENA

2019

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	1
INDICE DE TABLAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
<i>Material biológico:</i>	19
<i>Sitio experimental:</i>	19
Tratamientos:	21
<i>Variables respuesta:</i>	22
<i>Metodología para la determinación de cantidad de materia seca:</i>	22
<i>Metodología para la determinación de calidad de materia seca</i>	23
<i>Diseño experimental y análisis estadístico:</i>	24
RESULTADOS	26
Año 2009	26
<i>Cantidad de materia seca (kg MS ha⁻¹)</i>	27
<i>Porcentaje de Materia Seca (%MS)</i>	28
<i>Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (%FDN)</i>	29

<i>Porcentaje de Fibra Detergente Acido (%FDA)</i>	30
<i>Porcentaje de Digestibilidad de la materia seca (% DMS)</i>	31
<i>Porcentaje de Proteína Bruta (%PB)</i>	32
Año 2011	33
<i>Cantidad de materia seca (kg MS ha⁻¹)</i>	34
<i>Porcentaje de Materia Seca (%MS)</i>	35
<i>Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (%FDN)</i>	36
<i>Porcentaje de Fibra Detergente Acido (%FDA)</i>	37
<i>Porcentaje de Digestibilidad de la materia seca (% DMS)</i>	38
<i>Porcentaje de Proteína Bruta (%PB)</i>	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	48
PUBLICACIONES DE ESTE TRABAJO	49
BIBLIOGRAFÍA	50

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1: A - Temperaturas máximas, mínimas y medias mensuales del año 2009 así como también los datos de B - Precipitaciones medias mensuales del año 2009
- Figura 2: A - Temperaturas máximas, mínimas y medias mensuales del año 2011 así como también los datos de B - Precipitaciones medias mensuales del año 2011.
- Figura 3. Cantidad de materia seca (kg MS ha^{-1}) producida por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.
- Figura 4. Porcentaje de Materia Seca ($\% \text{MS kg}^{-1}$) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.
- Figura 5. Porcentaje de Fibra Detergente Neutro ($\% \text{FDN}$) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.
- Figura 6. Porcentaje de Fibra Detergente Acido ($\% \text{FDA}$) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

- Figura 7. Porcentaje de Digestibilidad de la Materia Seca (%DMS) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.
- Figura 8. Porcentaje de Proteína Bruta (%PB) de un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.
- Figura 9. Producción de Materia Seca (kg MS ha⁻¹) de un cultivar diploide y otro tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles de fertilización (Urea y *Azospirillum*) durante el estadio de macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.
- Figura 10. Porcentaje de Materia Seca (% MS ha⁻¹) de un cultivar diploide y otro tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles de fertilización (Urea y *Azospirillum*) durante el estadio de macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.
- Figura 11. Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (% FDN) de un cultivar diploide y otro tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles de fertilización (Urea y *Azospirillum*) durante el estadio de macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.
- Figura 12. Porcentaje de Fibra Detergente Acido (%FDA) de un cultivar diploide y otro tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles de fertilización (Urea y *Azospirillum*) durante el estadio de macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

- Figura 13. Porcentaje de Digestibilidad de la Materia Seca (%DMS) de un cultivar diploide y otro tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles de fertilización (Urea y *Azospirillum*) durante el estadio de macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.
- Figura 14. Porcentaje de Proteína Bruta (%PB) de un cultivar diploide y otro tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles de fertilización (Urea y *Azospirillum*) durante el estadio de macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados de análisis de suelo de las parcelas donde se sembraron ellos ensayos.

RESUMEN

En muchos sistemas intensivos de producción de carne y leche, *Lolium multiflorum* Lam. (Raigrás anual) juega un rol clave por su alta acumulación de materia seca de calidad en las épocas críticas de otoño e invierno. Una característica de los suelos ganaderos de la región templada húmeda y subhúmeda es la escasa presencia de varios nutrientes esenciales, entre ellos el nitrógeno. Actualmente, la necesidad de fertilizar los cultivos se transformó en algo totalmente normal con el objetivo de poder obtener mejores rendimientos de cosecha, pero toda modificación del ambiente productivo puede tener consecuencias beneficiosas y perjudiciales al mismo tiempo.

Si bien la fertilización con altas dosis de fertilizante nitrogenado de síntesis química produce altas respuestas productivas tanto en pasturas anuales como en pasturas perennes, conlleva el riesgo de contaminación ambiental con nitratos y amoníaco de pérdidas por lixiviación haciendo que se conviertan en tecnologías peligrosas para la salud de los ecosistemas e ineficientes desde el punto de vista económico.

Existen alternativas tecnológicas, basadas en la inoculación de las semillas antes de la siembra con microorganismos como el *Azospirillum brasilense* resultando en una “biofertilización”, que pretenden emular a la naturaleza en su equilibrio ecológico reduciendo el costo y la contaminación al mínimo. Por lo tanto, en este trabajo se planteó como hipótesis que la biofertilización con *Azospirillum brasilense*, como facilitador de la absorción de nitrógeno en suelos, permite reducir a la mitad la cantidad óptima de fertilizante nitrogenado de síntesis química aplicado sin producir

diferencias significativas sobre la calidad del forraje acumulado de *Lolium multiflorum* Lam. respecto de la fertilización nitrogenada óptima.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos tratamientos de la nutrición nitrogenada (biológica y de síntesis química) sobre las variables relacionadas con la calidad de la materia seca obtenida a través de diferentes cortes.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, biofertilización, calidad de la materia seca, *Lolium multiflorum* Lam., macollaje, nitrógeno, pre-encañazón.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, biofertilization, dry matter quality, *Lolium multiflorum* Lam., tillering, nitrogen, pre-stem elongation.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas ganaderos de la Región Pampeana y extra Pampeana Argentina los principales recursos forrajeros los constituyen los pastizales naturales y las pasturas cultivadas. Sin embargo, dichos recursos no presentan una distribución homogénea de la oferta a lo largo del año, sino que existe una disminución en el periodo invernal (Schrauf y col., 1995). Para mejorar la oferta de forraje en épocas de déficit, la utilización de verdeos invernales, en las cadenas de pastoreo, permitirían aumentar la eficiencia global de utilización de las pasturas plurianuales (De Battista y Costa, 2002) mediante la entrega de forraje en cantidad de alta calidad.

El raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) es el verdeo de invierno más utilizado en todo el país (Scheneiter, 1989) luego de la avena (*Avena sativa* L.). En las últimas décadas se ha convertido en una especie clave para los sistemas ganaderos de producción de leche y carne, que requieren contar con una fuente de alimento alternativa en el período de bajas tasas de crecimiento de las pasturas perennes en invierno (Castaño, 2005). Es originario del sur de Europa y actualmente se encuentra naturalizado en la región pampeana húmeda (Maddaloni y Ferrari, 2005).

Los materiales disponibles en el mercado combinan básicamente biotipos itálicos o westerwoldicum (anual y bianuales, respectivamente) y diploides o tetraploides, con diferente precocidad. Cada variedad representa una determinada combinación de biotipos los cuales se adaptaran a diferentes situaciones de producción. Las características más sobresalientes que presenta esta especie en

relación con el resto de los verdes invernales utilizados tradicionalmente (avena, centeno, cebada, triticale, trigo) son su excelente plasticidad de manejo que le permite rebrotes vigorosos y sin pérdida de plantas aún con defoliaciones muy intensas y frecuentes, elevada longitud de su ciclo productivo, excelente calidad nutricional y altas tasas diarias de acumulación de forraje durante el invierno siempre que la fertilidad edáfica sea la adecuada (Vernengo y col., 1996).

A pesar de que la mayoría de las gramíneas forrajeras cultivadas tienen altos requerimientos de nitrógeno, los suelos donde se las cultiva generalmente son bajos en materia orgánica y presentan cantidades bajas de nitrógeno (Robinson y col., 1988). Lo mismo ocurre con raigrás anual, que para expresar su elevada producción de forraje necesita ambientes con buena humedad y fertilidad (Castaño, 2005).

Sumado a esto, la disponibilidad de nitrógeno en forma de nitrato (una de las formas en que lo toma la planta, ya que también puede ser absorbido como amonio) se halla aún más limitado en invierno donde las bajas temperaturas, propias de la estación, hacen más lenta la liberación de nitrógeno a partir de la mineralización de la materia orgánica (Fernández Grecco y col., 1995; Marino y col., 2003). Desde este enfoque, el alto porcentaje del crecimiento del forraje de las especies invierno primaverales se halla limitado en invierno por una severa deficiencia del nitrógeno disponible (Fernández Grecco y col., 1995), por lo cual resulta necesario el agregado de nitrógeno para optimizar la producción de forraje (Viglizzo, 1981; Melgar y Straziscar, 2004).

La fertilización nitrogenada, produce un alto impacto sobre el crecimiento del forraje invierno primaveral pudiendo atenuar el déficit forrajero. Por otra parte,

estimula el crecimiento hacia el final del invierno del forraje, anticipando así la producción primaveral en gramíneas templadas (Whitehead, 1995; Díaz Zorita, 1997) lo que comúnmente se conoce como “adelantar la primavera”.

Una forma de agregar nitrógeno al cultivo es la utilización de fertilizantes de síntesis química, siendo la urea la fuente de fertilizante más utilizada en la Argentina. Dentro de las razones que explica la generalización de su utilización, se destaca su accesibilidad económica, su elevada concentración de nitrógeno por unidad de producto (46%N) y la gran solubilidad en la solución edáfica (Melgar y col. 2004). Las pasturas de gramíneas puras responden positivamente al agregado de nitrógeno, mientras que el agua y otros nutrientes no sean limitantes (Scheneiter y Bertin, 1989; Mazzanti y col., 1997).

Varios autores, entre ellos, Remy (1982) y Tucker y col. (1983) Vernengo y Piroddi (1996); Mazzanti y col. (1997); Fernández Grecco (2001); Marino y col. (2003); Fernández y col. (2003), Muller y col. (2006); França (2007); Cid (2008); Santos (2009); Herrera y col. (2011); Rincon (2012) demuestran que al incrementarse la fertilización nitrogenada aumentan los rendimientos. Ellos analizaron el efecto de las dosis de nitrógeno aplicado en forma de urea en cultivos de raigrás anual en la pradera pampeana húmeda. Estos autores destacan el incremento lineal de la acumulación de forraje a dosis crecientes de nitrógeno. Los máximos valores de materia seca se alcanzaron con niveles de 200 a 250 kg N ha⁻¹. Los distintos niveles de acumulación de forraje entre tratamientos de fertilización podrían atribuirse primariamente a una mayor densidad de macollos (Mazzanti y col., 1994). Mazzanti y col. (1997) y Lattanzi y col. (1997) encontraron que con dosis superiores a 150 kg N ha⁻¹ la velocidad de aparición de hojas aumento un 30% y el

número de hojas vivas por macollo en un 25% con respecto a dosis menores. De acuerdo con Gastal y col. (1992) es posible afirmar que los distintos niveles de fertilización nitrogenada generan diferente longitud foliar, lo cual se refleja en capacidades diferenciales para captar una mayor energía lumínica con el consiguiente incremento en la acumulación de forraje (Gastal y Lemaire, 1988; Mazzanti y col., 1997). Estas variables morfo fisiológicas se encuentran estrechamente relacionadas con la producción de forraje.

Por otra parte, la fertilidad de los suelos tiene una gran influencia sobre la calidad del forraje, en especial con referencia a su contenido de proteína cruda (Robinson y col., 2005). La gran mayoría de los resultados publicados coinciden en que al incrementar la fertilización nitrogenada, aumenta el contenido de agua de la planta como consecuencia de una mayor actividad fisiológica, al mismo tiempo que disminuye el contenido de fibra debido a un retardo de madurez fisiológica y se eleva el de proteína bruta (Herrera, 1979; Xandé, 1979; Lizárraga y Zambrano, 1980; Tucker y col. 1985). Ello ocurre como consecuencia del incremento del tamaño de las hojas y el volumen de las células y el protoplasma, con lo cual aumenta la actividad fotosintética y por lo tanto el contenido de nitrógeno de la planta.

En condiciones no limitantes de humedad y de otros nutrientes, la fertilización con nitrógeno en invierno determinó aumentos en la concentración de proteína en el forraje, casi duplicando la concentración de proteína bruta (Mazzanti y col., 1997). Llamas y col. (2016) reportaron incrementos en el porcentaje de proteína bruta con el agregado de urea al inicio del rebrote en *Setaria sphacelata* cv. Narok. También Remy (1982) y Tucker y col. (1983), Muller y col. (2006); França (2007); Cid (2008); Santos (2009); Herrera y col. (2011); Rincon (2012) demostraron que la fertilización

nitrogenada no solo permite el incremento de los rendimientos de forraje sino también su calidad nutritiva en términos de energía y sustancias nitrogenadas, y llega a producirse más del doble en algunos casos.

Si bien existen suficientes evidencias del efecto de la fertilización nitrogenada en el aumento del porcentaje de proteína bruta en la mayoría de las gramíneas forrajeras, el efecto sobre el contenido de fibras y la digestibilidad de la materia seca son poco evidentes. McIlroy (1967) ha señalado que la fertilización nitrogenada puede aumentar el contenido de nitrógeno y disminuir el de carbohidratos solubles; sin embargo, el contenido total de la célula no sufre variación, ni tampoco la composición de la pared celular, por lo que no debía afectar la digestibilidad y el consumo de materia seca.

Según Whitehead (1995), Wilson (1982) y Van Soest (1982) el cambio en la digestibilidad de la materia seca debido al fertilizante nitrogenado ha sido positivo, negativo o insignificante, respectivamente. Lamas y col. (2016) no encontraron cambios en las fracciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) con el agregado de urea al inicio del rebrote en *Setaria sphacelata* cv. Narok. Sin embargo, sí fueron afectados por el estado de madurez de la planta. Por otra parte, Mazzanti y col. (1997) observaron que la fertilización con nitrógeno en invierno no modificó la digestibilidad de la materia seca, incrementó el contenido de fibra detergente neutro y redujo el contenido de carbohidratos no estructurales durante la etapa inicial del rebrote invierno primaveral.

A pesar de las ventajas enumeradas, según Tilman y col. (2002) el aumento del rendimiento de los cultivos con la aplicación de altas dosis de fertilizantes de

síntesis química, representa una práctica onerosa que puede generar impactos ambientales negativos para el ecosistema.

El exceso del uso de fertilizantes nitrogenados puede traer asociado desequilibrios en el suelo que perjudiquen su fertilidad además de provocar contaminación en el medio ambiente, donde las aguas utilizadas para el consumo humano, animal y vegetal pueden verse afectadas. El problema ambiental más importante relativo al ciclo del nitrógeno es la acumulación de nitratos en el subsuelo que, por lixiviación, pueden incorporarse a las aguas subterráneas o bien ser arrastrados hacia los cauces y reservorios superficiales. Al aumentar la dosis de fertilizante se aumenta la lixiviación de los nitratos (García y Dorronsoro, 2007). Quintero y Boschetti (2007) estiman que entre el 50 y el 80 % del N aplicado es aprovechado por el cultivo, lo que implica que entre 50 y 20 % del N se puede perder del sistema, con un consecuente perjuicio económico y ambiental.

Es por ello que resulta importante buscar y mejorar las prácticas agronómicas tendientes a aumentar y mantener los altos niveles productivos de manera más sostenible (Altieri y Nicholls, 2000; Tilman y col., 2002).

Una alternativa al reemplazo parcial o total de fertilizantes minerales es la utilización de los biofertilizantes basados en cultivos de microorganismos benéficos. Esto podría constituir la “nueva revolución verde”, basada en el incremento de rendimiento mediante el conocimiento y la utilización de dichos microorganismos (Den Herder y col., 2010; Gewin, 2010), entre otras estrategias (Aeron y col., 2011). El estudio de estos microorganismos que viven en intercambio con las plantas es una de las áreas de estudio que más ha impactado a la agricultura en las dos

últimas décadas, debido a que son una alternativa emergente a los productos químicos, para incrementar la fertilidad y producción de cultivos en agro ecosistemas sustentables (Franco Correa, 2009; Rueda y col., 2009).

Una fuente enorme de nitrógeno en la naturaleza es el nitrógeno contenido en la atmósfera (N_2). La fijación del mismo únicamente puede ser reducida y fijada hasta amonio y nitrato por bacterias, cianobacterias y actinomicetos, los cuales pueden fijar el nitrógeno viviendo libremente en el suelo o formando asociaciones con las raíces de las plantas (Mayz Figueroa, 2004). Un ejemplo de ellos son las bacterias del género *Azospirillum* (Postulka y col., 2009; Galián y col., 2009), que en asociación con las plantas, pueden fijar N atmosférico (García de Salamone y col., 1996). Estas bacterias constituyen uno de los principales grupos de organismos beneficiosos en los sistemas suelo-planta (Barea, 2004) comúnmente llamados PGPR (plant growth promoting rhizobacteria).

Además de fijar nitrógeno atmosférico, este género también interviene en la producción de fitohormonas, principalmente ácido indol acético y giberelinas (Dobbelaere y col., 1999; Flores y col., 2010) las cuales modifican el metabolismo y la morfología de los vegetales y conducen a una mejor captación de agua y minerales (Flores y col., 2010). Según Kapulnik y col. (1981) dichas sustancias favorecen el crecimiento y rendimiento en gramíneas.

Numerosos trabajos muestran incrementos en el crecimiento y rendimiento de distintas especies como trigo (Díaz Zorita y Fernández Canigia, (2009); Naiman y col., 2009) y maíz (García de Salamone y Döbereiner (1996); Caballero-Mellado (2004), sorgo (Naiman, y col., 2009), arroz (Ruiz, y col., 2011), brachiaria

(*B.decumbens* y *brizantha*) (Reis-Junior y col., 2004) entre otros cultivos. Estos autores atribuyen este efecto a que las bacterias aumentan el rendimiento de la materia seca al aumentar la disponibilidad de nitrógeno y promover la acumulación de materia seca de la planta en las partes vegetativas. Por otra parte, esta asociación permite aumentar la cantidad y/o longitud de pelos radicales y raíces adventicias (Okon y Vanderleyden, 1997), lo que redundará en una mejora en la absorción de agua y nutrientes (Bashan y col., 2007).

Según Bashan, (1999) el nivel de respuesta a la inoculación depende de las interacciones entre los microorganismos nativos del suelo y los microorganismos inoculados, y entre éstos últimos y el cultivo. Además es importante también la disponibilidad de nutrientes (Dobbelaere y col., 2001) tanto para el cultivo y para los microorganismos.

En este sentido, Naiman (2009) encuentra aumentos de la biomasa aérea en trigo biofertilizado con *Azospirillum* con respecto a testigos. Lestingi y col (2007) en triticale, encontraron que la biofertilización con *Azospirillum* logró respuestas positivas en el incremento de materia seca producida equivalentes a una dosis de 50 KgN ha⁻¹. Garcia y col. (2007) no encuentran diferencias en maíz con el testigo al biofertilizar con *Azospirillum*.

En combinaciones *Azospirillum*-fertilización química, Ciolfi y col (2017) encuentran aumentos en el peso seco de hojas y macollos en cebada independientemente del contenido de nitrógeno en el suelo con combinaciones Az+fertilizante químico. También Hungría y col (2016) reportaron aumentos en la producción de biomasa forrajera de *Brachiaria brizanta* (cv.Marandu) y *Brachiaria*

ruzizensis debido a la fertilización con urea en combinación con *Azospirillum* sobre el testigo en los dos primeros cortes del primer año y los dos cortes del segundo año o en todos los cortes según la localidad ensayada.

Con respecto a la mejora en la calidad nutritiva del forraje, Lestingi y col (2007) no encontraron diferencias entre la biofertilización y la fertilización química para el porcentaje de materia seca, de proteína cruda, de fibras (FDN, FDA) y de lignina (LDA) en triticale.

Cioffi y col (2017) encuentran que la co-inoculación *Azospirillum* y fertilizante de síntesis química modifica el flujo de nitrógeno en plantas jóvenes de cebada aumentando el contenido de nitrógeno en hojas destino cuando los niveles de nitrógeno en el suelo son deficientes aumentando su contenido de proteínas. Si el contenido de nitrógeno en el suelo es mayor aumentan los contenidos de proteínas en raíces y hojas fuente. Por otra parte, Cardenas Caró (2009) en pasto guinea (*Panicum maximun*) encuentran aumentos del 26% en el contenido de proteína cruda y 45,67% en MS foliar con inoculación simple con *Azospirillum* o combinado con fertilización nitrogenada comparado con plantas tratadas solo con fertilización nitrogenada o testigos

Este trabajo se enfocó en generar información acerca de los posibles efectos de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* solo o en combinación con fertilizantes de síntesis química (urea) sobre la cantidad y la calidad de la materia seca acumulada de *Lolium multiflorum* Lam. durante su ciclo de producción y en estadios claves como el macollaje y pre-encañazón.

HIPÓTESIS

La biofertilización con *Azospirillum brasilense* permite reducir a la mitad la cantidad de fertilizante nitrogenado de síntesis química medido a través de la mejora en la acumulación de forraje y la calidad nutricional de *Lolium multiflorum* Lam. respecto de la fertilización nitrogenada óptima.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los tratamientos de la nutrición nitrogenada (biológica y de síntesis química) sobre las variables relacionadas con la calidad de la materia seca en diferentes cortes de *Lolium multiflorum* Lam.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar la interacción entre el efecto de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* y la aplicación de nitrógeno de síntesis química sobre la cantidad de la materia seca (acumulación de forraje) obtenida mediante cortes durante dos años a campo.

- ✓ Evaluar la interacción entre el efecto de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* y la aplicación de nitrógeno de síntesis química sobre la calidad nutricional de la materia seca obtenida mediante cortes durante dos años a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico:

Se utilizaron semillas de dos cultivares de *Lolium multiflorum* Lam. representativos del biotipo anual uno diploide (Eclipse) y otro tetraploide (Bill).

Sitio experimental:

Los ensayos se sembraron el 16 de marzo del 2009 y el 15 de Marzo del 2011 en el campo experimental “La Catalina” perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, UNLZ, ubicada en la localidad de Virrey del Pino, provincia de Buenos Aires. El suelo utilizado se caracterizó como Argiudol típico.

Previo a la siembra se tomaron muestras de suelo para su análisis, en el potrero donde se implantó el ensayo, arrojando los siguientes valores:

Profundidad	pH (1:2,5 agua)	CE (1:2,5 agua)	Carbono oxidable (W-B)	MO Total	Nitrógeno total (Kjedahl)	Fósforo extractable (B-K1)
cm		dS/m	%	%	%	mg/kg
20	7,69	0,31	1,05	2,0	0,15	4,40

Tabla 1: Resultados de análisis de suelo de las parcelas donde se sembraron ellos ensayos.

Se aplicó a la siembra superfosfato triple para lograr 20 ppm en suelo. Además, se realizaron los laboreos correspondientes para la preparación de la cama de siembra. Se trabajó sobre parcelas de 4,5 m², con una densidad de siembra de

600 semillas viables/m². Las mismas fueron sembradas a mano y en líneas distanciadas a 17,5 cm.

Para caracterizar cada año evaluado (2009 y 2011) se relevaron los datos meteorológicos de la zona (debido a que no existen estaciones Agro meteorológicas en Virrey del Pino, se tomó por proximidad la estación de Ezeiza del Servicio Meteorológico Nacional).

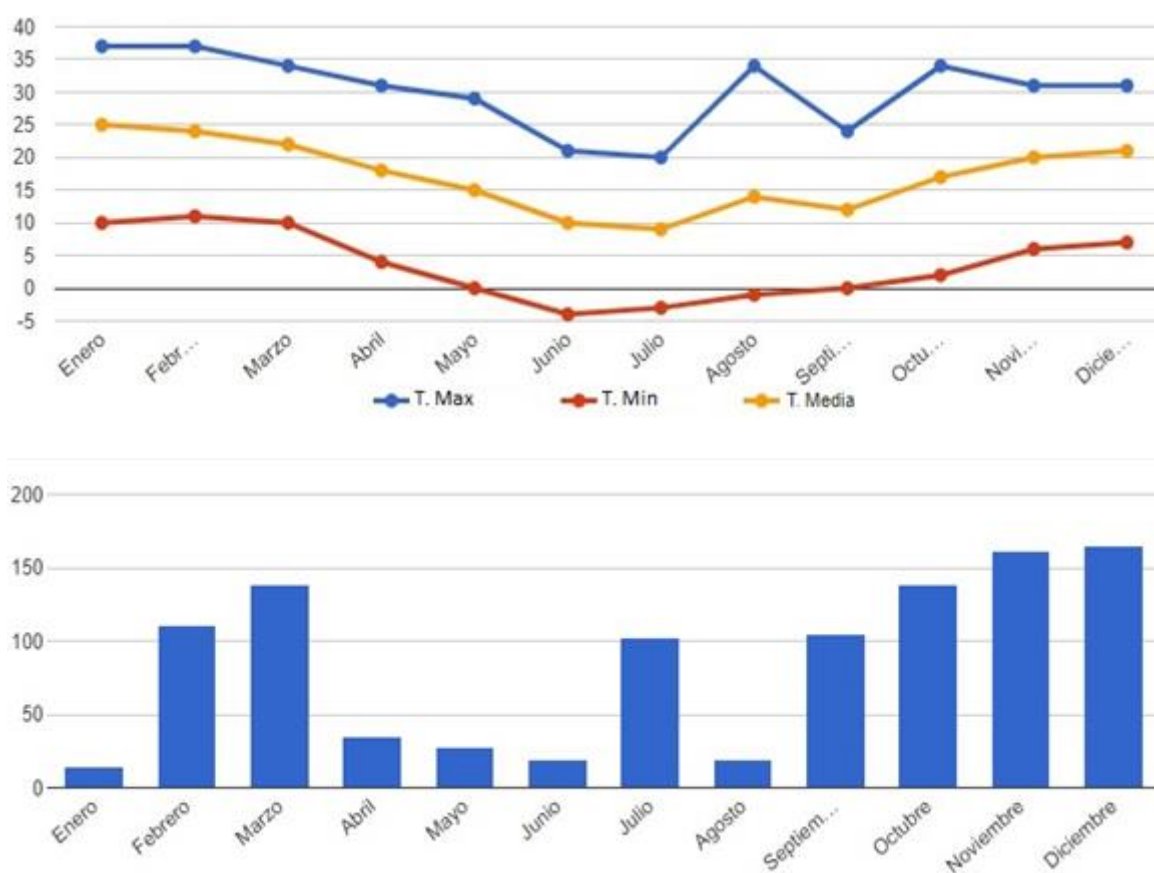


Figura 1. Datos climáticos del año 2009, A: temperatura máxima (T.Max), mínima (T.Min) y media (T.Media) mensual y B: precipitaciones medias mensuales registradas durante el año 2009

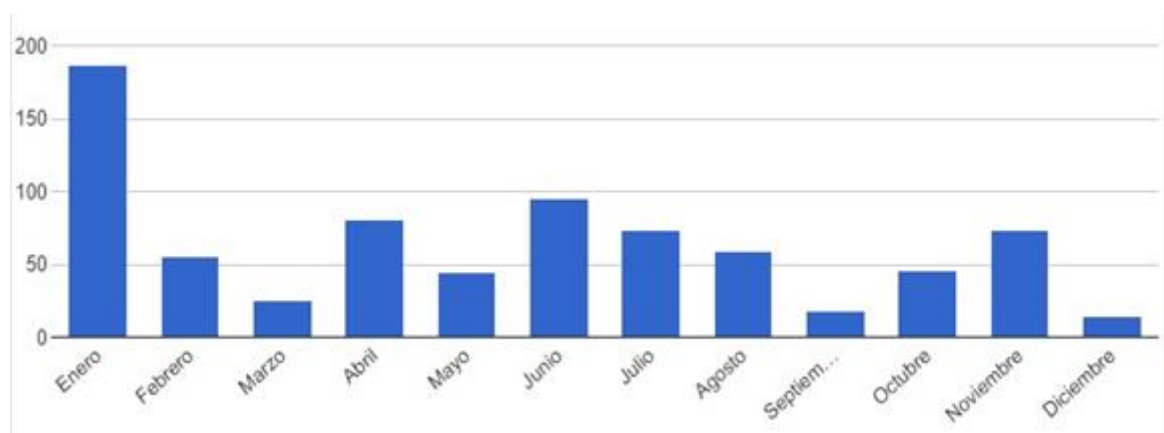
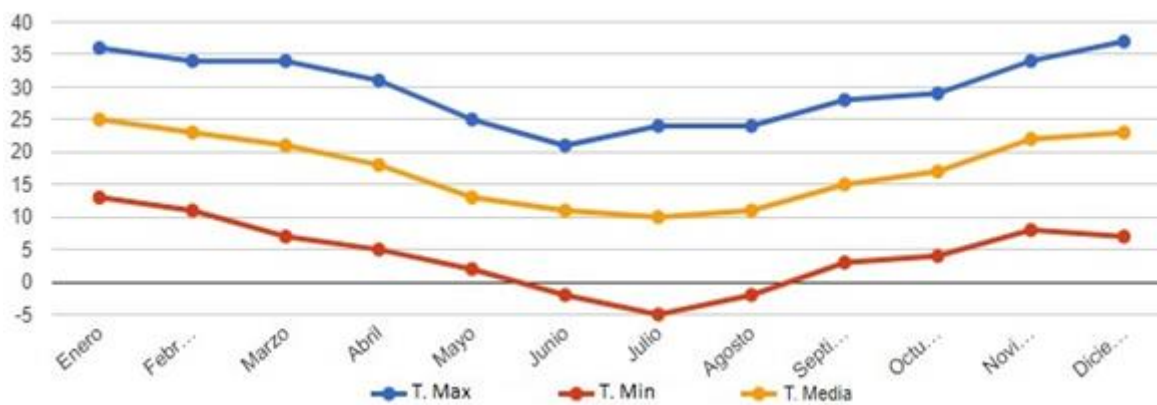


Figura 2. Datos climáticos del año 2011, A: temperatura máxima (T.Max), mínima (T.Min) y media (T.Media) mensual y B: precipitaciones medias mensuales registradas durante el año 2011.

Tratamientos:

Para realizar los tratamientos se requirieron los siguientes materiales:

- **Biofertilizante:** inoculante comercial de *Azospirillum brasilense* (Az) (cepa Az39). Se aplicó a las semillas de ambos cultivares previo a la siembra una dosis de 440 UFC/semilla.
- **Fertilizante nitrogenado (N) de síntesis química:** se aplicó en forma de urea. La dosis total de nitrógeno fue aplicada mitad a la siembra y la otra mitad en pleno macollaje (principios de agosto).

La combinación de ambos permitió obtener los siguientes tratamientos:

- **TESTIGO** sin inocular ni fertilizar.
- **Az:** *Lolium multiflorum* Lam. sin fertilizar + *Azospirillum brasilense*.
- **100N:** *Lolium multiflorum* Lam. fertilizado (50 kg N ha⁻¹ a la siembra + 50 kg N ha⁻¹ macollaje).
- **200N:** *Lolium multiflorum* Lam. fertilizado (100 kg N ha⁻¹ a la siembra + 100 kg N ha⁻¹ macollaje macollaje).
- **Az+100N:** *Lolium multiflorum* Lam. + *Azospirillum brasilense* + ½ dosis de fertilización (50 kg N ha⁻¹ a la siembra + 50 kg N ha⁻¹ macollaje)
- **Az+200N:** *Lolium multiflorum* Lam. + *Azospirillum brasilense* + dosis completa de fertilización (100 kg N ha⁻¹ a la siembra + 100 kg N ha⁻¹ macollaje macollaje).

Variables respuesta:

Metodología para la determinación de cantidad de materia seca:

A campo:

En sectores al azar, en cada parcela para cada tratamiento, se realizaron las defoliaciones utilizando cuadrados de corte de 0,25 m² de superficie dejando un remanente de 2,5 cm (intensidad) y cuando la altura modal de las plantas llegó a 30 cm (frecuencia). Así se obtuvieron cuatro cortes en total durante el período de producción. El material vegetal delimitado por el cuadrado fue cortado con tijera de mano y colocado en bolsas de nylon debidamente rotuladas. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Forrajicultura de la FCA-UNLZ.

El material vegetal analizado fue el obtenido de los cortes correspondientes a macollaje (M) y pre-encañazón o espiga a 10 cm (PE).

En laboratorio:

Sobre el material cosechado, se clasificó cada muestra en las siguientes fracciones:

- ✓ material verde de *raigrás anual* (MV) (peso fresco)
- ✓ broza (de la especie)
- ✓ malezas

Una vez separadas, se pesó solo el material verde registrándose los valores en gramos de cada fracción/0,25m². Esta fracción fue la utilizada para la de terminación de materia seca y los diferentes análisis de calidad.

Metodología para la determinación de calidad de materia seca

Una vez pesada la fracción de MV se colocó en bolsa de papel debidamente rotulada. Cada sub muestra fue llevada a estufa de aire forzado a 65°C. Allí el material permaneció hasta peso constante para obtener finalmente el dato de cantidad de materia seca (g MS /0,25 m²) informado como kg MS/ha (MS).

a. Para el cálculo de porcentaje de materia seca contenido en el forraje se utilizó la siguiente formula:

$$\%MS = (100 - (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso fresco})$$

Una vez alcanzado un peso constante cada muestra fue molida para la determinación de: se puede poner que de la muestra molida se tomaron dos submuestras y que de cada submuestra se analizaron por duplicado, o solo esto último y lo sacas de cada determinación

b. Porcentaje de proteína bruta (%PB): se realizó según las condiciones establecidas anteriormente mediante el método de Kjeldhal (AOAC, 2000).

c. Porcentaje de fibra detergente neutro (%FDN y Porcentaje fibra detergente ácido (%FDA): según técnica de Goering y Van Soest, (1982) con equipo Ankom 2000 (Ankom, 2007).

d. Digestibilidad de la materia seca (%DMS): Se calculó a partir de los resultados de %FDA obtenidos, aplicando la fórmula propuesta por Goering y Van Soest, (1982).

$$\% \text{ Digestibilidad} = 88,9 - (0,779 \times \text{FDA}).$$

Diseño experimental y análisis estadístico:

Se utilizó un DBCA con distribución factorial (cultivares x *Azospirillum* x fertilizante x momento) y tres repeticiones, con cultivar como parcela principal y tratamiento como sub parcela sembrados durante los años 2009 y 2011. Se realizaron análisis de la varianza ANOVA para detectar los efectos de los tratamientos aplicados considerándose tanto los efectos principales como sus

interacciones. Se aplicaron test de comparación de medias (DGC) a fin de discriminar los posibles efectos detectados por ANOVA. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Infostat 2018. Se consideró una probabilidad de $p < 0,05$ para todas las pruebas estadísticas consideradas.

RESULTADOS

El ensayo se repitió dos años (2009 y 2011). Ambos años tuvieron características ambientales diferentes. El ANOVA que se realizó con todos los datos mostró efecto significativo entre años ($p=0,0001$), por lo que se realizó un análisis por separado de los tratamientos dentro de cada año.

Se registraron diferencias significativas entre-momentos ($p=0,0001$), cultivares ($p=0,0001$) y Az - N ($p=0,0001$) e interacciones dobles y triples entre las cuatro fuentes de variación. Esto indicaría que la biofertilización con *Azospirillum brasilense*, la aplicación de nitrógeno de síntesis química (urea) y su aplicación conjunta no se comportan de la misma manera en ambos materiales genéticos (cultivares), en los dos momentos o estadios fenológicos a lo largo del período de producción (macollaje y pre-encañazón) y años.

Año 2009

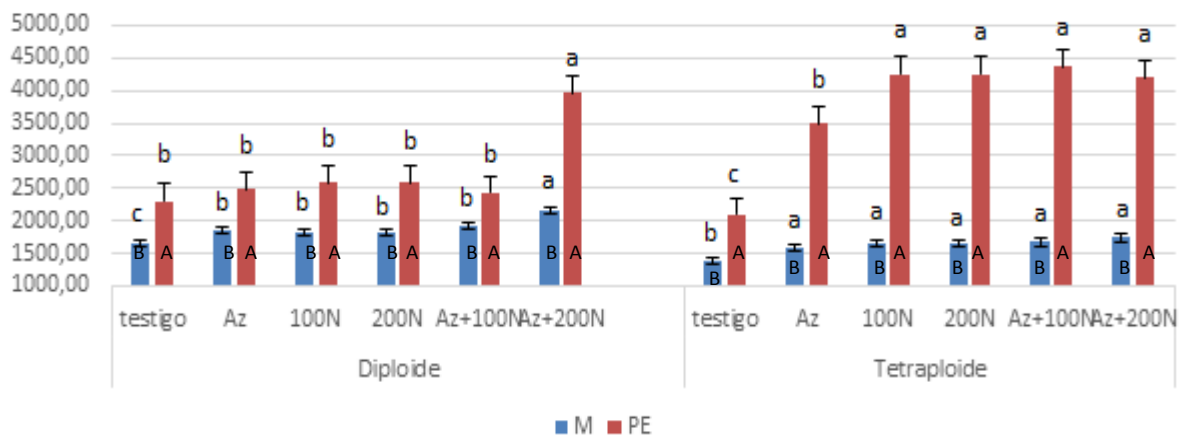
Los resultados del ANOVA muestran que existen diferencias significativas entre cultivares ($p=0,0001$), momentos ($p=0,0001$), Az ($p=0,0032$) y N ($p=0,0001$) e interacciones Az x N para la cantidad de materia seca producida (kg MS/ha) y porcentaje de digestibilidad de la materia seca (%DMS) ($p=0,0224$). Para el porcentaje de materia seca (%MS), el porcentaje de fibra detergente neutro (%FDN), el de fibra detergente ácido (%FDA) y el porcentaje de proteína bruta (%PB) no se encontraron diferencias significativas entre cultivares ($p=0,3005$, $0,1864$, $0,0715$ y $0,2633$, respectivamente).

Cantidad de materia seca (kg MS ha⁻¹)

Macollaje: El cultivar diploide presentó los mayores valores de materia seca con la combinación Az+200N. Este se diferenció estadísticamente de los demás tratamientos y el testigo. A su vez el testigo produjo el menor registro con respecto a los demás tratamientos. En el cultivar tetraploide todos los tratamientos, sin diferenciarse estadísticamente entre sí, mostraron mayores cantidades de materia seca que el testigo (Figura 3).

Pre-encañazón: El cultivar diploide con la aplicación de Az+200N respondió originando cantidades significativamente mayores de materia seca respecto a los demás tratamientos, los cuales a su vez no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo. Por otro lado, el cultivar tetraploide obtuvo los mayores rendimientos (sin diferenciarse entre sí) ante la aplicación de 100N, 200N, Az + 100N, Az + 200N. A su vez, la aplicación de Az produjo mayor cantidad de materia seca que el testigo, pero menor que los demás tratamientos (Figura 3).

En ambos cultivares, la cantidad de materia seca fue mayor en pre-encañazón con respecto a macollaje (Figura 3).



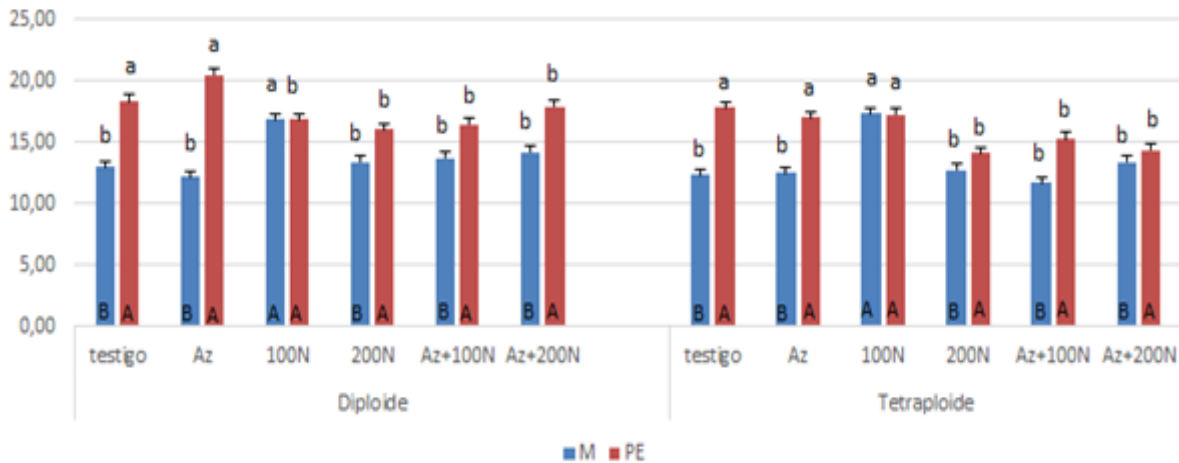
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 3. Cantidad de materia seca (Kg MS/Ha) producida por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

Porcentaje de Materia Seca (%MS)

Macollaje: La aplicación de 100N ha⁻¹ produjo los mayores valores de %MS diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos y testigo ya sea para el cultivar diploide como para el tetraploide. Entre los demás tratamientos, no existió diferencia significativa al igual que con el testigo (Figura 4).

Pre-encañazón: El testigo y Az mostraron los mayores valores para el cultivar diploide; mientras que por otro lado, para el cultivar tetraploide, el testigo, Az y 100N mostraron los mayores valores de %MS (Figura 4).

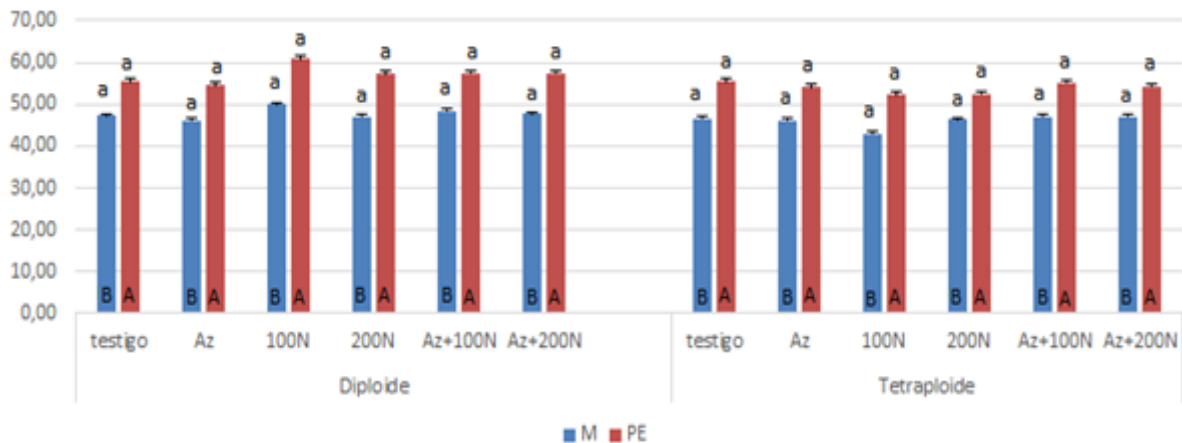


Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 4. Porcentaje de Materia Seca (% MS Kg⁻¹) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (%FDN)

En respuesta a los tratamientos aplicados, durante el estadio de macollaje y pre-encañazón no se presentaron diferencias estadísticamente significativas para el %FDN ($p=0,3339$) en ninguno de los materiales genéticos evaluados (Figura 5).

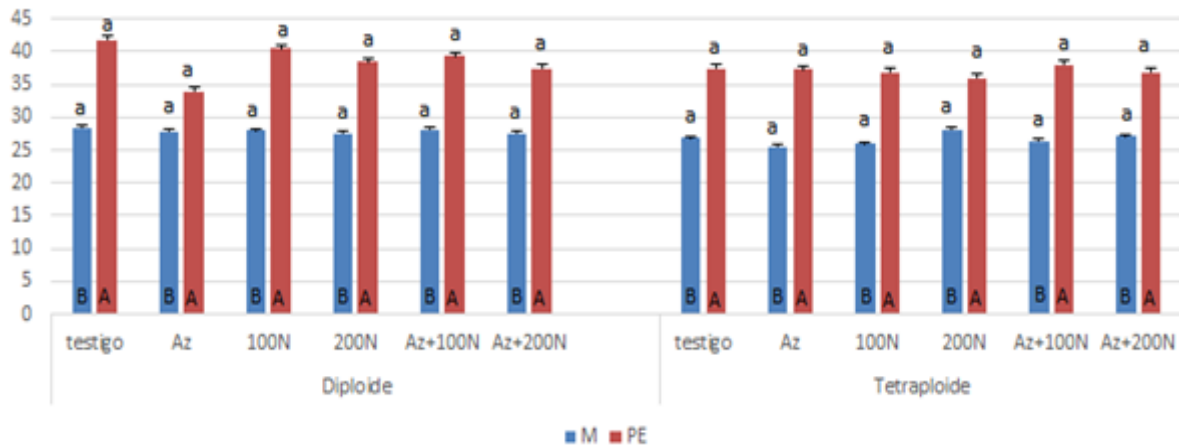


Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 5. Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (%FDN) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

Porcentaje de Fibra Detergente Acido (%FDA)

En respuesta a los tratamientos aplicados, durante el estadio de macollaje y pre encañazón no se presentaron diferencias estadísticamente significativas para el %FDA ($p=0,197$) para ambos materiales genéticos (Figura 6).

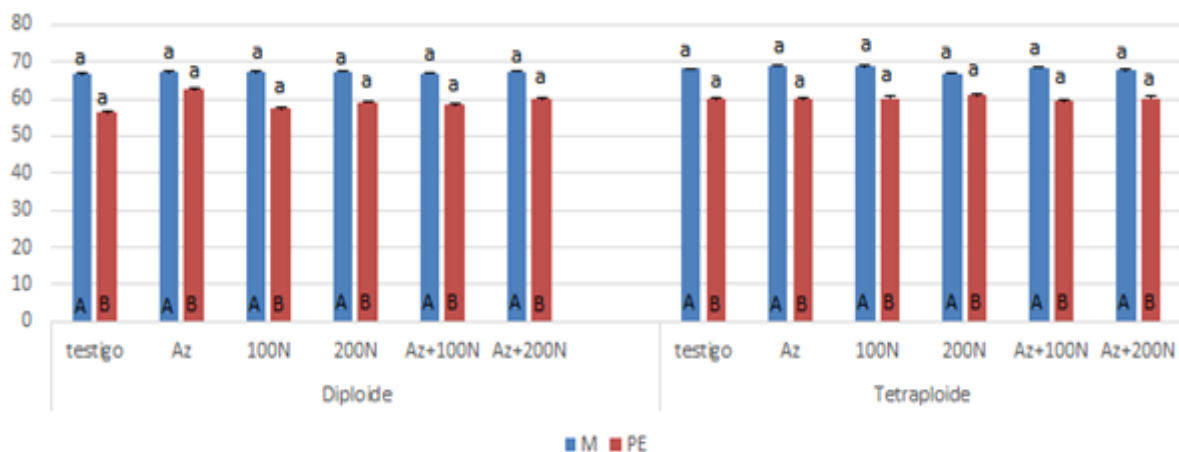


Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 6. Porcentaje de Fibra Detergente Acido (% FDA) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

Porcentaje de Digestibilidad de la materia seca (% DMS)

En respuesta a los tratamientos aplicados, durante el estadio de macollaje y pre-encañazón no se presentaron diferencias estadísticamente significativas para el DMS ($p=0,197$) para ambos materiales genéticos (Figura 7).



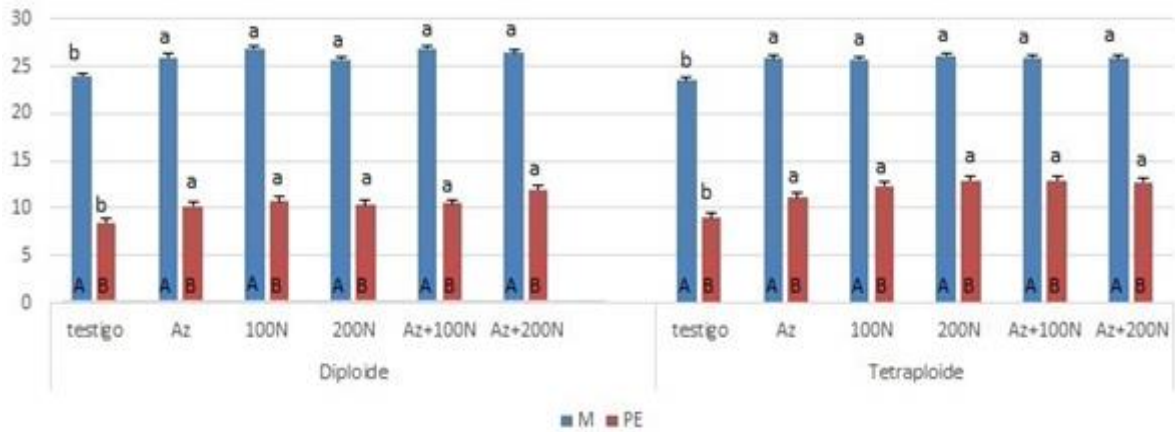
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 7. Porcentaje de Digestibilidad de la Materia Seca (%DMS) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

Porcentaje de Proteína Bruta (%PB)

En respuesta a los tratamientos aplicados, tanto durante el estadio de macollaje como en pre-encañazón se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0013$) para el %PB en ambos materiales genéticos. Todos los tratamientos presentaron mayores valores de %PB con respecto al testigo (Figura 8).

Entre momentos se encontraron diferencias significativas ($p=0,0001$) en ambos cultivares. Los %PB fueron superiores durante macollaje con respecto a encañazón (Figura 8).



Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 8. Porcentaje de Proteína Bruta (%PB) de un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2009.

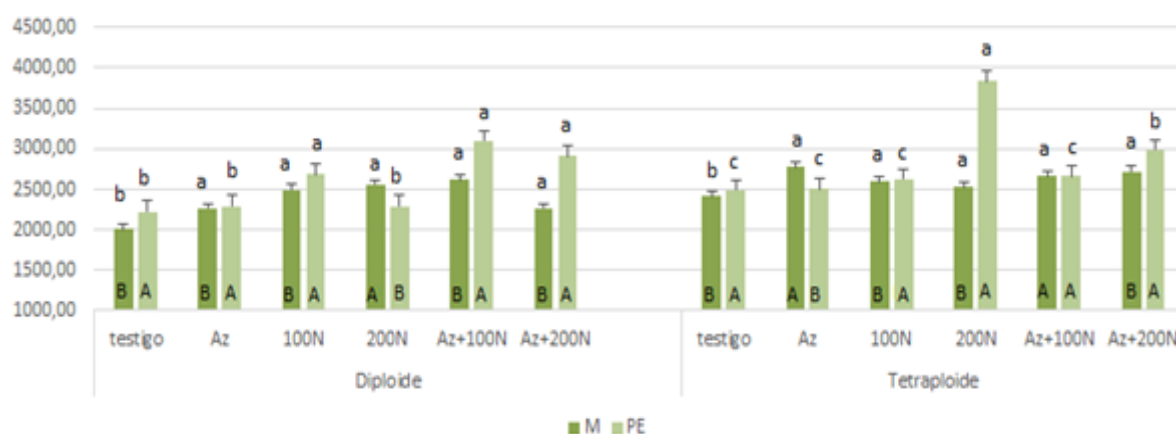
Año 2011

Los resultados del ANOVA muestran que existen diferencias significativas entre cultivares ($p=0,0003$), momentos ($p=0,0001$), Az ($p=0,0001$) y N ($p=0,0002$) e interacciones Az x N para la cantidad de materia seca producida (kg MS/ha) y porcentaje de digestibilidad de la materia seca (%DMS) ($p=0,0054$), porcentaje de materia seca (%MS) ($p=0,0030$) el porcentaje de fibra detergente neutro (%FDN) ($p=0,0023$), el de fibra detergente ácido (%FDA) ($p=0,0031$) y el porcentaje de proteína bruta (%PB) ($p=0,0001$)

Cantidad de materia seca (kg MS ha⁻¹)

Macollaje: tanto en el cultivar diploide como en el tetraploide, todos los tratamientos dieron una mayor cantidad de materia seca respecto al testigo sin presentar diferencias significativas entre los mismos (Figura 9).

Pre-encañazón: en el cultivar diploide, los mayores valores de producción se obtuvieron con los tratamientos 100N, Az+100N y Az+200N, siendo el testigo, Az y 200N los que menos produjeron. Por otro lado, en el cultivar tetraploide los mayores cantidades de materia seca los obtuvo con 200N, seguido por Az+200N y finalmente el resto de los tratamientos y testigo (Figura 9).



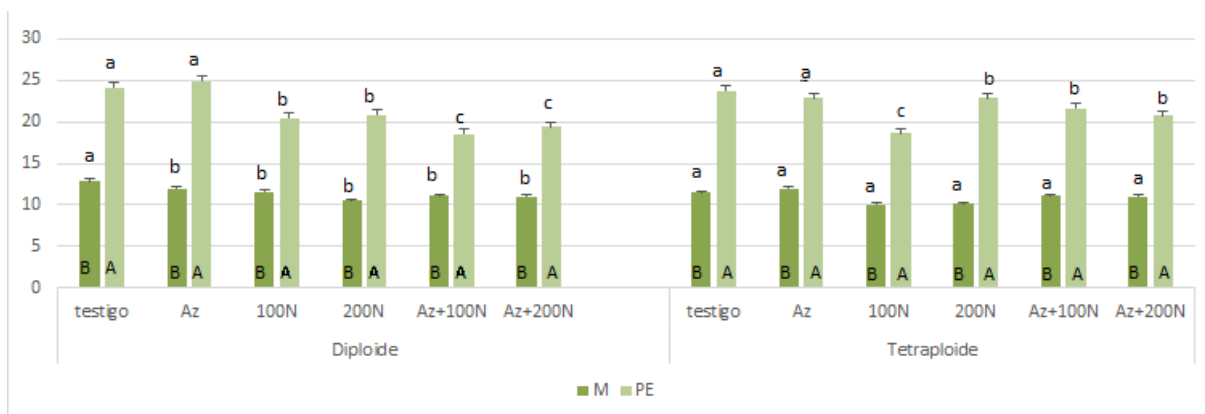
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 9. Cantidad de materia seca (Kg MS/Ha) producida por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

Porcentaje de Materia Seca (%MS)

Macollaje: en el cultivar diploide todos los tratamientos mostraron un menor valor de %MS en comparación con el testigo ($p= 0,0019$) mientras que para el cultivar tetraploide no existió diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0,27$) (Figura 10).

Pre-encañazón: en el cultivar diploide se obtuvieron los mayores %MS en el testigo y Az, seguidos por 100N y 200N, para finalmente obtener los menores resultados con Az+100N y Az+200N. Para el cultivar tetraploide el mayor valor lo obtuvo el testigo y Az, mientras que el menor valor lo obtuvo 100N, no existiendo diferencias significativas entre los demás tratamientos ($p=0,22$) (Figura 10).



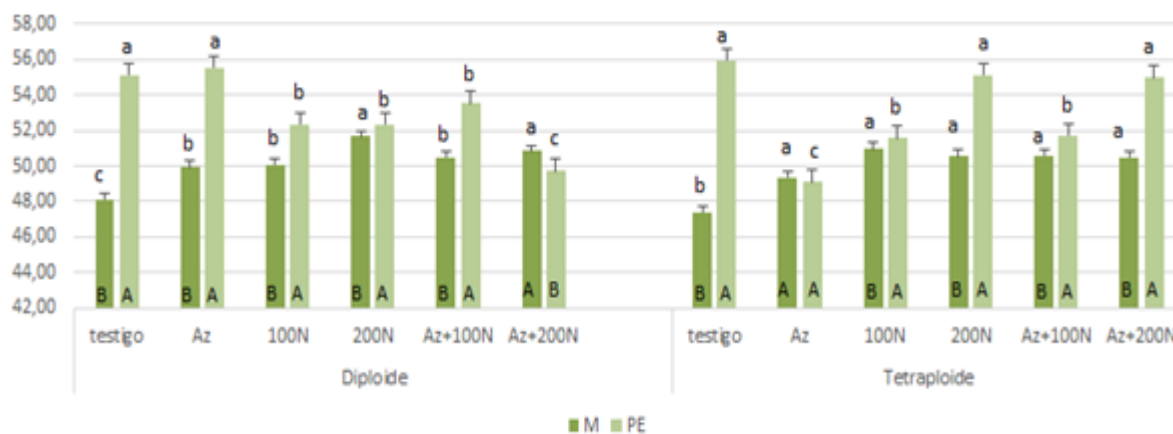
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 10. Porcentaje de Materia Seca (% MS Kg⁻¹) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (%FDN)

Macollaje: en el cultivar diploide los mayores valores fueron obtenidos con los tratamientos 200N y Az+200N, seguidos por Az, 100N y Az+100N y finalmente el menor valor para el testigo. Respecto al cultivar tetraploide, todos los tratamientos mostraron un comportamiento similar superando los valores del testigo. ($p=0,002$) (Figura 11).

Pre-encañazón: en el cultivar diploide tanto el testigo como Az dieron los mayores valores, seguidos por 100N, 200N y Az+100N; siendo Az+200N el menor valor. Para el cultivar tetraploide el testigo, 200N y Az+200N dieron los valores superiores, seguidos por 100N y Az+100N, y finalmente el valor inferior perteneciente a Az. (Figura 11).



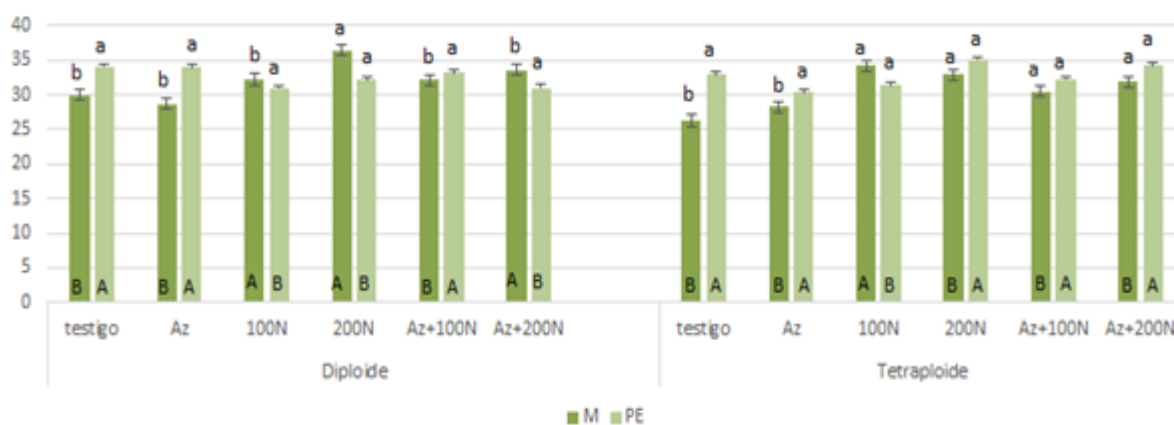
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 11. Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (% FDN) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

Porcentaje de Fibra Detergente Acido (%FDA)

Macollaje: en el cultivar diploide se obtuvieron los mayores valores de %FDA con el tratamiento 200N, no existiendo diferencia significativa para los demás tratamientos incluido el testigo. Para el cultivar tetraploide todos los tratamientos que incluyeron fertilización con N dieron valores superiores respecto al testigo y AZ (Figura 12).

Pre-encañazón: no existieron diferencias significativas entre tratamientos para ambos cultivares evaluados. ($p=0,26$) (Figura 12).

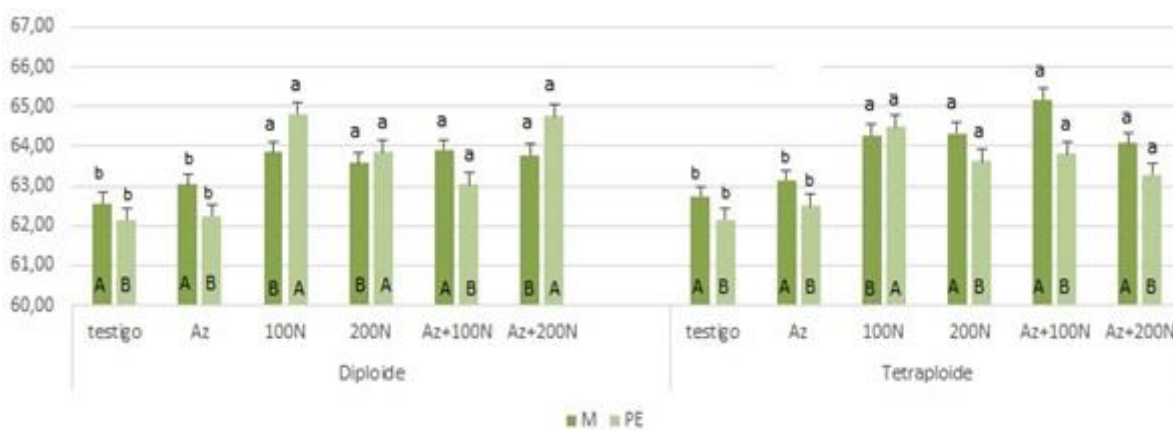


Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 12. Porcentaje de Fibra Detergente Acido (% FDA) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

Porcentaje de Digestibilidad de la materia seca (% DMS)

Durante el 2011, tanto para el cultivar diploide como para el tetraploide se encontraron diferencias significativas ($p= 0,0038$) entre tratamientos y el testigo junto con el Az para la variable %DMS en ambos estadios fenológicos (Figura 13).

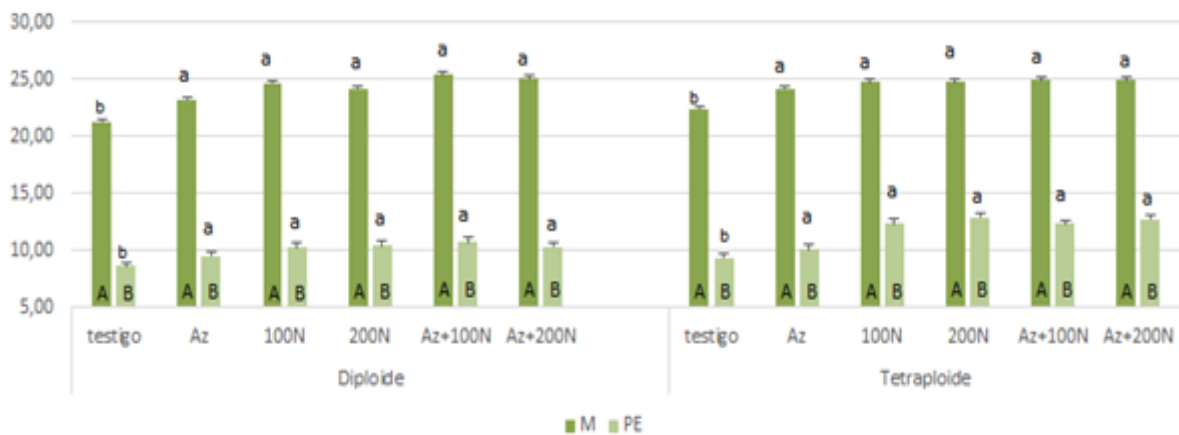


Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 13. Porcentaje de Digestibilidad de la Materia Seca (%DMS) producido por un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

Porcentaje de Proteína Bruta (%PB)

Tanto para el estadio macollaje, como en pre encañazón, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo para cada cultivar evaluado ($p=0,003$) para la variable %PB (Figura 14).



Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar y para cada estadio fenológico; y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre estadios fenológicos para cada tratamiento ($p < 0,05$) en cada cultivar.

Figura 14. Porcentaje de Proteína Bruta (%PB) de un cultivar diploide y un cultivar tetraploide de *Lolium multiflorum* Lam. sometidos a diferentes niveles y combinaciones de biofertilización (*Azospirillum*) y fertilización de síntesis química (Urea) durante macollaje (M) y pre-encañazón (PE). Año 2011.

DISCUSIÓN

La aplicación individual y en conjunto de *Azospirillum* y nitrógeno de síntesis química (urea) aumentaron la cantidad de materia seca (kg de MS/ha) con respecto al testigo en ambos cultivares durante macollaje (Fig. 3 y 9).

La dosis de fertilizante tuvo respuesta solo en el año 2009, donde la combinación Az+200N se destacó por encima de los demás tratamientos y el testigo. En el 2011 no se encontraron diferencias entre tratamientos, aunque si fueron superiores al testigo nuevamente. Estos resultados coinciden con numerosos autores entre ellos Remy (1982), Tucker y col. (1983), Vernengo y Piroddi (1996); Mazzanti y col. (1997); Fernandez Grecco (2001); Marino y col. (2003); Fernandez Grecco y Agnusdei (2003) quienes demostraron en diferentes especies el aumento del rendimiento al incrementarse la cantidad de fertilizante.

Según Mazzanti *et al.*, 1994, Mazzanti y col. (1997), Lattanzi y col. (1996) y Gastal y col. (1992) estos mayores rendimientos con niveles crecientes de fertilizante podrían atribuirse principalmente a una mayor densidad de macollos, mayor velocidad de aparición de hojas y mayor número de hojas vivas por macollo con respecto a dosis menores, además de hojas más largas.

Según Gastal y Lemaire (1988) y Mazzanti y col. (1997) el incremento de todas estas variables permitirían una mejora en la captación de la energía lumínica y por consiguiente un incremento en la acumulación de forraje. Con menores dosis de nitrógeno también se logró mejorar la cantidad de materia seca producida con respecto al testigo. Esta mayor producción de forraje, según lo postulado por Whitehead (1995); Díaz Zorita (1997); entre otros, e independientemente de la dosis

de nitrógeno aplicado, podría esperarse que ocasione una atenuación en el déficit forrajero en otoño invierno de las pasturas o pastizales naturales que integren una cadena forrajera. Además, al estimular el crecimiento hacia el final del invierno del forraje (pre-encañazón) se podría dar lo que se denomina “adelantar la primavera” que consiste en ni más ni menos que anticipar la producción de primavera.

La biofertilización con *Azospirillum* sola o en conjunto con urea surge como una valiosa herramienta para favorecer el crecimiento del forraje invierno primaveral del raygrass anual y así poder atenuar el déficit forrajero en esa etapa crítica en las cadenas forrajeras que según Viglizzo (1981), Melgar y Straziscar (2004) y Marino y col (2012) se dan en pasturas y pastizales de nuestra región.

Esta respuesta positiva se siguió registrando hacia el periodo reproductivo (pre-encañazón) independientemente del cultivar y el año. El aporte de nitrógeno desde la siembra hasta macollaje, más el aporte previo a producción de macollos durante macollaje, habría favorecido dicha respuesta mediante una mayor producción de macollos y mayor área foliar. Además, en este periodo algunos macollos, al pasar al periodo reproductivo podrían haber aumentado su peso y así colaborar con el aumento de rendimiento.

Es importante destacar que la sola inoculación realizada a las semillas momentos antes de la siembra con *Azospirillum* permite lograr mayores producciones de forraje sin los inconvenientes que acarrea el uso de altas dosis de fertilizantes nitrogenados de síntesis química como la urea.

Coincidiendo con Kapulnik (1981) la asociación con *Azospirillum* podría haber favorecido el crecimiento de la gramínea lo cual repercutió en un aumento en la producción. En este sentido, Naiman (2009), Lestingi y col (2007) y Cardenas Caró (2009) también encuentran aumentos de la cantidad de materia seca aérea en trigo, triticale y pasto guinea, respectivamente, biofertilizados con *Azospirillum* respecto a los testigos, en cambio García y col. (2007) no encuentran diferencias en maíz con el testigo al biofertilizar con *Azospirillum*.

Por un lado, el aumento de la producción podría estar relacionado por efecto directo de la fijación de N₂ como lo reportado por Díaz Zorita y Fernández Canigia, (2009); Naiman y col., (2009), García de Salamone y Döbereiner (1996); Caballero-Mellado (2004), Ruiz, y col. (2011), y Reis-Junior y col., (2004) quienes atribuyen el aumento del rendimiento de la materia seca a la promoción de la acumulación de materia seca en las partes vegetativas mediante el aumento de la disponibilidad de nitrógeno en las mismas. Por otra parte, esta asociación bacteria-planta podría estar generando cambios en el contenido de fitohormonas de la planta. Según Dobbelaere y col. (1999); Dobbelaere y col. (2001) Flores y col. (2010) estos compuestos hormonales serían responsables de los cambios en el metabolismo y en la morfología de las plantas mejorando la captación de agua y nutrientes minerales, mediante el aumento de la cantidad y/o longitud de pelos radicales y raíces adventicias (Okon y Vanderleyden, 1997; Bashan y col., 2007).

También surge como una alternativa disminuir el uso de urea mediante la combinación Az+100N para mejorar el rendimiento de forraje. En este caso, si bien

se seguiría con el uso de fertilizantes de síntesis química, la dosis de Az+100N resulta en una producción equivalente a la obtenida con 200N o 100N con la posibilidad que si el año es muy seco y no puede ser utilizado eficientemente la urea estarían las bacterias disponibles para el aporte de nitrógeno. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ciolfi y col (2017) en cebada, Hungria y col (2016) en *brachiaria* y con Cardenas Caró (2009) en pasto guinea. Además estas bacterias podrían haber estimulado el crecimiento de las raíces permitiendo así mitigar los efectos adversos del estrés hídrico como ya lo demostraron Garcia y col (2015) y Leota y col (2012) permitiendo incrementar los rindes en especies como maíz.

Con respecto al efecto de los tratamientos sobre la calidad nutritiva del raygrass anual, se observó que, si bien Gastal y Lemaire (1988) y Mazzanti (1997) exponen que al incrementar la fertilización nitrogenada, aumenta el contenido de agua de la planta como consecuencia de una mayor actividad fisiológica por el incremento en el volumen de las células y el protoplasma, lo cual generaría menores valores de %MS, esto no coincide con los resultados encontrados. En este estudio no se vieron en general diferencias en el %MS con respecto a la biofertilización, fertilización con urea o la combinación de ambos. Durante el macollaje en el 2009, 100N produjo mayor %MS en ambos cultivares mientras que en el 2011 solo el testigo diploide produjo mayor %MS.

Esta indiferencia del %MS ante la fertilización sería beneficiosa en esta especie ya que su alto contenido de agua en los tejidos y el posible aumento del contenido de proteínas con la aplicación de nitrógeno o la biofertilización podrían generar incrementos en el desbalance nutricional que traiga aparejados problemas digestivos en los animales.

En pre-encañazón, debido al estadio fenológico, el %MS aumento. Sin embargo, estos valores disminuyeron con Az+100N, Az+200N, 100N y 200N lo cual sería una ventaja ya que mejoraría la calidad típica de este estadio fenológico. La disminución de la calidad nutritiva hacia el período reproductivo debido a la proporción de hoja/tallo no habría afectado la calidad en términos de fibras y por lo tanto no impactaría de modo negativo la performance animal.

Con respecto al contenido de fibras (%FDN y %FDA) en el año 2009 no se modificaron con la biofertilización ni con la fertilización con urea. Esto coincide con Lestingi y col (2007) quienes tampoco encontraron diferencias entre la biofertilización y la fertilización química para el FDN y FDA. Llamas y col. (2016) tampoco encontraron cambios en estas fracciones con el agregado de urea en *Setaria sphacelata* cv. Narok, Sin embargo, sí fueron afectados por el estado de madurez de la planta (diferencia encontrada entre ambos momentos en este trabajo).

Aunque numerosos autores entre ellos Herrera (1979); Xandé (1979); Lizárraga y Zambrano (1980) y Tucker y col. (1985), encuentran que al incrementar la fertilización nitrogenada, aumenta el contenido de agua de la planta como consecuencia de una mayor actividad fisiológica y al mismo tiempo que disminuye el contenido de fibra debido a un retardo de madurez fisiológica, esto no se encontró en ninguno de los dos años.

Por el contrario, en el año 2011 el contenido de FDN y FDA aumentó con el aporte de nitrógeno. Esto coincide con lo postulado por Mazzanti (1997), quien a través de diversos trabajos, registró incrementos el contenido de FDN con el aporte de nitrógeno en invierno. En un verdeo con bajos % MS es importante que la FDN

se mantenga alta. Sería importante que con la fertilización y la biofertilización el % de fibras se mantenga dentro de un rango óptimo en el cual no se produzca el efecto de llenado ruminal y disminuya el consumo voluntario por parte de los animales.

La fibra es fundamental para el correcto funcionamiento del rumen ya que no solo sirve para la obtención de energía mediante la fermentación bacteriana de la misma, sino que también cumple una importante función regulando el pH y la velocidad del tránsito ruminal. Altos contenido de fibras producen una disminución en la velocidad de digestión con lo cual el rumen permanece lleno más tiempo lo que limita el potencial de ingestión del animal; por otro lado, si el contenido de fibra es bajo, la digestión se vuelve más rápida y se incrementa la tasa de pasaje del rumen lo cual puede generar desbalances en el animal. En ambas situaciones se ve afectada la producción animal.

La digestibilidad tampoco sufrió variaciones con el aporte de nitrógeno durante el 2009 cuyos valores se ubicaron cercanos al 70% en macollaje y 57% y 60% en pre-encañazón. De todos modos, el agregado de nitrógeno puede afectar o no la digestibilidad (Whitehead, 1995, Wilson, 1982 y Van Soest, 1982).

Quizás la falta de respuesta a la aplicación de nitrógeno radica en el hecho de que ya los valores de la especie bajo esas condiciones ambientales de producción estarían llegando al techo de digestibilidad posible para la especie. Que no haya sobrepasado el 70% también sería beneficioso ya que valores más altos traerían problemas digestivos.

En el 2011, la aplicación de urea con o sin *Azospirillum* permitió un aumento de digestibilidad. Esto no coincide con lo expuesto por Smith *et al.* (2001) y Nair

(2004) quienes aseguran que la mayor proporción de contenido celular aumenta la concentración de carbohidratos solubles, proteínas y lípidos, mejoran la digestibilidad del forraje.

Los valores de digestibilidad en testigo y Az no superaron el 63% y los demás tratamientos entre 64% y 65%. Aunque las diferencias son significativas estadísticamente, en términos de esa diferencia entre tratamientos no afectaría el consumo animal. En este año, la mejora en la digestibilidad si fue importante y sobre todo que la misma fue similar entre macollaje y pre-encañazón con lo cual se mantuvo la calidad a lo largo de todo el periodo de producción.

La digestibilidad en 2009 disminuyó marcadamente en pre-encañazón llegando casi a valores límites que podrían acarrear disminuciones en el consumo animal y por lo tanto podría repercutir negativamente en la producción secundaria. Según Leng, (1990) los valores mínimos para que una especie forrajera sea considerada de calidad deberían encontrarse por encima de 55%. Esto coincide con lo expresado por Carámbula (2007) quien afirma que mientras las plantas se encuentran en estado vegetativo durante otoño e invierno la calidad del forraje ofrecido se mantiene constante, en el cual la digestibilidad de las hojas es similar a los tallos. Al iniciarse la etapa reproductiva la digestibilidad decae progresivamente. Siguiendo esta línea de pensamiento, esa caída en la digestibilidad al fertilizar o biofertilizar podría ser menos abrupta manteniendo así la calidad por más tiempo, independientemente del cultivar.

La fertilización con urea, *Azospirillum* o con la combinación de ambos aumenta el contenido de proteína bruta en el forraje en ambos años, momentos y cultivares.

En macollaje durante el 2009 los tratamientos superaron al testigo por 3% (27% vs 24%) y en el 2011 también superando al testigo en 3-4% (22 vs 25%) coincidiendo con Llamas y col., (2016) quienes reportaron incrementos en el %PB con el agregado de urea. También se manifestó, al igual que la digestibilidad, una disminución en los %PB al pasar de macollaje a pre-encañazón.

Estos aumentos en general del %PB con la aplicación de nitrógeno coinciden con Mazzanti y col., (1997) quien afirma que la fertilización con nitrógeno en invierno determina aumentos en el %PB en el forraje al igual que Llamas y col. (2016), Remy (1982) y Tucker y col. (1983). La biofertilización en conjunto con la fertilización nitrogenada con urea también resultaron ser eficientes en el aumento del %PB, resultados también encontrados por Ciolfi y col (2017), y Cardenas Caró (2009).

CONCLUSIONES

La aplicación conjunta de *Azospirillum brasilense* y distintas dosis de nitrógeno en forma de urea en cultivares diploides y tetraploides permite obtener una mayor producción de forraje, manteniendo el contenido de fibras, porcentajes de digestibilidad adecuados y contenidos de proteínas superiores compatibles con una alta producción animal.

Si bien no se encuentra un beneficio a nivel de calidad del forraje, se vislumbra-la posibilidad de disminuir las dosis de nitrógeno de síntesis química y con ello evitar riesgos de contaminación ambiental.

PUBLICACIONES DE ESTE TRABAJO

- Olivera, M.E; Salgado, M; Palladino, R.A; Postulka, E. y Ferrari, L. **Producción y calidad de dos cultivares de raygrass anual (*Lolium multiflorum* Lam.) con aplicación conjunta de *Azospirillum brasilense* y urea. 2014. 37° Congreso Argentino de Producción Animal – 2nt Joint Meeting ASAS-AAPA – XXXIX Congreso de la Sociedad Chilena – SOCHIPA. CABA, Argentina.**

- Salgado, M, Olivera, M.E, Palladino, A., Ferrari, L. y Postulka, E. **Interacción nitrógeno de síntesis química/biofertilización y su efecto sobre la producción y calidad de la materia seca de *Lolium multiflorum* Lam.** 2015. Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. FCA-UNLZ

BIBLIOGRAFÍA

- Aeron A, Kumar S, Pandey P y Maheshwari D.K. 2011. Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiología. En: Maheshwari DK (ed.), *Bacteria in Agrobiología: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin Heidelberg. Pp. 1-36.
- Altieri M.A, Nicholls C.I. 2000. Applying agroecological concepts to development of ecologically based pest management strategies. En: National Research Council (ed.), *Professional societies and ecologically based pest management: proceedings of a workshop*. National Academy Press, Washington DC, USA. 60 pp.
- AOAC. 2000. Official methods of Analysis, 4.6.01, 4:34. U.S.A.
- Barea J.M. 2004. Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 7-11.
- Bashan Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29:246-256.
- Bashan L.E de, Holguín G, Glick B.R y Bashan Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (eds.), *Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias, micro*

y macrofauna, control biológico y plantamicroorganismo. Editorial Trillas, México DF, México. Pp. 161-215.

Caballero-Mellado J. 2004. Uso de Azospirillum como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 45-49.

Carámbula M. (2007) Pasturas y forrajes. Tomos I, II y III. Ed. Hemisferio Sur, Uruguay.

Cardenas Caró. 2014. Inoculación con Azospirillum spp y Enterobacter aglomerans en Pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el Departamento de Cesar (Colombia) Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, vol. 67, núm. 2, 2014, pp. 7271-7280.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179931328003>

Castaño, J. 2005. Cap. 13: Raygrass anual. En: Maddaloni, J. & L. Ferrari (eds.), Forrajeras y pasturas del ecosistema Templado Húmedo de la Argentina. Editorial INTA-UNLZ, Argentina. Pp. 520.

Cid MS, Ferri CM, Brizuela MA, Sala O. 2008. Structural heterogeneity and productivity of a tall fescue pasture grazed rotationally by cattle at four stocking densities. Grassland Sci. 54: 9-16.

Ciolfi F, Contino J y Criado M.V. 2017. Impacto de la inoculación con Azospirillum brasilense sobre el flujo interno de N y C en plantas jóvenes de cebada.

Agrotecnia 25REBIOS 2017. XI Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos- Corrientes (Argentina)

Díaz Zorita M. 1997. Forrajeras. Pasturas mixtas templadas. En: Melgar R, Díaz Zorita M (eds). La fertilización de cultivos y pasturas. Ed. Hemisferio Sur. S.A. 259 p.

Díaz Zorita M y Fernández Canigia M.V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology* 45:3-11.

De Battista J. y Costa M. 2002. Respuesta del nitrógeno de verdeos invernales en vertisoles de Entre Ríos. EEA INTA Concepción del Uruguay.

Den Herder G, Van Isterdael G, Beeckman T y De Smet I. 2010. The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science* 15:600-607

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, VandeBroek A y Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212: 155-164.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-González C, Caballero-Mellado, J, Aguirre J, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S y Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:871–887.

Fernández Grecco R, Mazzanti A.E, y Echeverría H. 1995. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento de forraje de un pastizal natural de la

pampa deprimida bonaerense. p. 173-176. In Memorias XIV Reunión Latinoamericana de Producción Animal, 19º Congreso Argentino de Producción Animal, Mar del Plata, Argentina. 26 de noviembre al 1 de diciembre.

Fernandez Grecco R.C. 2001. Efecto de la fertilización nitrogenada invernal sobre la acumulación de forraje de un pastizal natural de la pampa deprimida, Argentina. Agric. Téc., vol.61, no.3, p.319-325.

Fernandez Grecco R.C. y Agnusdei M.G. 2003. Dinámica de la producción otoño-invernal de forraje de raigras anual: efecto de la fecha de siembra, la fertilización nitrogenada y el genotipo. Rev. Arg. Prod. Anim., vol. 23, supl. 1, 230-231.

Fertilizar - INTA Pergamino. Reacción de los fertilizantes en el suelo. Volatilización de amoníaco a partir de la urea. Disponible on line: <http://www.fertilizando.com/articulos/>

Flores P, Fenoll J, Hellin P y Aparicio P. 2010. Isotopic evidence of significant assimilation of atmospheric-derived nitrogen fixed by *Azospirillum brasilense* co-inoculated with phosphate-solubilising *Pantoea dispersa* in pepper seedling. Applied Soil Ecology 46(3): 335-340.

França, A.F.S., Borjas, A.L.R., Oliveira, E.R., Soares, T.V., Miyagi, E.S. e Sousa, V.R. 2007. Parâmetros nutricionais do capim-tanzânia sob doses crescentes de nitrogênio em diferentes idades de corte. Ciênc. Anim. Bras., 8: 695-703.

- Franco-Correa M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 239-242.
- Galián, L. R., Marrero, M. A., Postulka, E. B., Olivera, M. E., Ferrari, L., y Trejo, N.G. Diversidad morfológica de colonias de *Azospirillum brasilense* en distintos medios de cultivo. Pag. 90. *VII Reunión Científico-Técnica de Biología de Suelos y Fijación Biológica del Nitrógeno, REBIOS, Tucumán, Argentina. 2009.*
- García I y Dorronsoro C. 2007. Contaminación del suelo. Tema 14. Contaminación por fertilizantes. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Unidad docente e investigadora de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. España. Disponible on line: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema14/nitrog.htm>
- García de Salamone I.E, Döbereiner J, Urquiaga S y Boddey R.M. 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soils* 23:249–256.
- Gastal F y G. Lemaire. 1988. Study of tall fescue sward growth under nitrogen deficiency conditions. p. 323-327. In Proc. of the XII General Meeting of the European Grassland Federation, Dublin, Ireland.
- Gastal F, Belanger G y Lemaire G. 1992. A model of the leaf extension rate of tall fescue in response to nitrogen and temperature. *Annals of Botany* 70: 437-442.

- García J, Creus C, Suárez Rodríguez R, Ramírez-Trujillo JA, Peticari A, Groppa MD. 2015. Respuesta temprana al estrés hídrico de plantas de maíz inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum brasilense*. X Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología del Suelo y Fijación Biológica de Nitrógeno. II Congreso Nacional de Biología Molecular de Suelos, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.
- Gewin V. 2010. An underground revolution. *Nature* 466:552-553.
- Goering, H.K y Van Soest P.J. 1970. Forage fiber analysis. Agriculture Handbook N. 379. USDA.
- Hungria M, Nogueira M.A y Araujo R.S. 2016. Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 221, 125-131.
- InfoStat. 2018. InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat/FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Ed. Brujas, Cordoba, Argentina.
- Kapulnik Y, Kigel J, Okon Y y Henis Y. 1981. Effect of *Azospirillum* inoculum on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil* 61: 65-70.
- Lattanzi F, Marino, M.A y Mazzanti, A. 1996. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la morfogénesis de raigrás anual cv. Grasslands Tama. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 16. supl. 1., 240-241.

- Leng, R.A. 1990. Factor affecting the utilization of poor quality forages by ruminant animals particularly under tropical conditions. *Nutritional research. Reviews* 3:277-303.
- Leotta, E.D. García, J. Peticari, A. Bianchi. D.A. 2012. Tolerancia a condiciones de estrés hídrico en diferentes etapas de crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) inoculadas con dos cepas de *Azospirillum brasilense*. *Rev Fac Agronomía y Sc Agroalim UM.*, pp. 29-56
- Lestingi A, De Giorgio D, Montemurro F, Convertini G y Laudadio V. 2007. Effects of bio-activators on yield and quality composition of triticale forage as an animal food resource. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(1), 164.
- Lizarraga G y Zambrano R. 1980. Efecto de la dosis de nitrógeno sobre la producción forrajera y calidad del heno de Zacate bermuda cruzada-1. *Resúmenes de Avances de Investigación del Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora, A.C. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México.* p. 20
- Llamas J.O. 2016. Evaluación de la fertilización nitrogenada de *Setaria sphacelata*. *Agrotecnia* 24: 17-21
- Maddaloni J y Ferrari L. 2005. Cap. 9: Raygrass anual. En: *Forrajeras y pasturas del ecosistema Templado Húmedo de la Argentina. INTA-UNLZ.* 520 pag.
- Mahli S y Nyborg M. 1986. Increase in mineral N in soils during winter and loss of mineral N during early spring in north-central Alberta. *Canadian Journal of Soil Science* 66: 397-409.

- Marino M.A, Berardo A y Agnusdei M.G. 2003. Eficiencia de la fertilización nitrogenada invierno-primaveral en pasturas de cebadilla criolla y raigrás anual. *Revista Argentina de Producción Animal*. 23 Supl.1: 229-230
- Mazzanti A, Lemaire G y Gastal F. 1994. The effect of nitrogen fertilization upon the herbage production of tall fescue swards continuously grazed with sheep. 1. Herbage growth dynamics. *Grass Forage Sci*. 49: 111-120.
- Mazzanti A, Wade M.H y García S.C. 1997. Efecto de la fertilización nitrogenada de invierno sobre el crecimiento y composición química del forraje de raigrás anual. *Rev. Arg. Prod. Anim*. 17: 25-33.
- Mayz-Figueroa J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1): 1-20.
- Mazzanti, A, Marino M.A, Lattanzi F. Echeverria H.A y Andrade F. 1997. Fertilización nitrogenada en avena y raigrás anual. *Revista Fertilizar*, 7: 4-9.
- McIlroy R.J. 1967. Carbohidrates of grasslands herbage. *Herb. Abstr*. 37:79
- Melgar R. y Straziscar V. 2004. Uso de N en raygrass. *Revista Fertilizar*, 34: 13-15.
- Naiman A.D, Latrónico A.E y García de Salamone I.E. 2009. Inoculation of Wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology* 45:44-51.
- Olivera, M.E; Salgado, M; Palladino, R.A; Postulka, E. y Ferrari, L. Producción y calidad de dos cultivares de raygrass anual (*Lolium multiflorum* Lam.) con

aplicación conjunta de *Azospirillum brasilense* y urea. 2014. 37° Congreso Argentino de Producción Animal – 2nt Joint Meeting ASAS-AAPA – XXXIX Congreso de la Sociedad Chilena – SOCHIPA. CABA, Argentina.

Okon Y y Vanderleyden J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 63:366–370.

Postulka, E. B., Olivera, M. E., Ferrari, L., Galián, L. R., Marrero, M. A., Szemruch, C. y Esposito C. Efecto de la inoculación con tres marcas comerciales de *Azospirillum brasilense* en *Lolium multiflorum* Lam. (raigrass anual). Pag. 107. VII Reunión Científico-Técnica de Biología de Suelos y Fijación Biológica del Nitrógeno, REBIOS, Tucumán, Argentina. 2009.

Quintero C.E y Boschetti G.N. 2001. Eficiencia de uso del nitrógeno en trigo y maíz en la región pampeana Argentina. Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNER. Disponible on line: www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/riego/Congresos

Reis F.B.D, Silva M.F, Teixeira K.R.S, Urquiaga S y Reis V.M. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28:103-113.

Remy V.A. 1982. Comportamiento atronómico del pasto bermuda cruzada-1. Tesis presentada en opción al grado de C.Dr. en Ciencias. Escuela Superior de Agricultura de Praga. Checoslovaquia

- Rincón CA. 2012. Los minerales en el suelo. En: Rincón A, Baquero JE, Flórez H, Jaramillo CA, editores. Manejo de la nutrición mineral en sistemas ganaderos de los Llanos Orientales de Colombia. Villavicencio (CO): Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). p. 24-57.
- Robinson D, Melgar R y Scheneiter O. 1988. Sistemas forrajeros de corte. Fertilización y utilización de Nitrógeno. Revista fertilizar. Número especial Pasturas. Febrero 1998: pp 4-7.
- Robinson D, Scheneiter O., Melgar R y Fertilizar, INTA. 2005. Fertilización y utilización de nutrientes en campos forrajeros de corte. Colombia: INTA, Bogotá
- Rueda Puente E.O, Villegas J.A, Gerlach L.E, Tarazón M.A., Murillo B, Troya J.L y Preciado Rangel P. 2009. Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. Terra Latinoamericana, 27 (4): 345-354.
- Salgado, M, Olivera, M.E, Palladino, A., Ferrari, L. y Postulka, E. 2015. Interacción nitrógeno de síntesis química/biofertilización y su efecto sobre la producción y calidad de la materia seca de *Lolium multiflorum* Lam. Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. FCA-UNLZ
- Santos M.E.R, Fonseca D.M, Balbino E.M, Monnerat J.P.I, Silva S.P. 2009. Capim-braquiária diferido e adubado com nitrogênio: produção e características da forragem. Rev Bras Zootec. 38(4): 650-656.

- Scheneiter O y Bertin O. 1989. El fertilizante nitrogenado y la producción de forraje en pasturas de gramíneas y leguminosas. EERA INTA Pergamino, Información general N° 155.
- Schrauf G.E, Cornaglia P.S y Deregibus V. 1995. Adaptación a bajas temperatura en cultivares de *Festuca arundinacea* Schreb. Rev. Arg. Prod. Anim., Vol. 15 N 1 p 83-85.
- Tilman D. 1988. Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities. 360 p. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Tilman D, Cassman K.G, Matson P.A, Naylor R y Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature 418:671-677.
- Van Soest P.J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O and B books. Inc. Oregon, USA.
- Vernengo, E. y Piroddi, F. 1996. Fertilización nitrogenada sobre un tapiz natural de raigras anual (*Lolium multiflorum* Lam.) Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 16, supl. 1, 187-188.
- Vernengo E, Saharrea R. y Muñoz A. 1996. Efectos de la fertilización con nitrógeno y/o fósforo sobre un verdeo de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). Memorias XIV Reunión ALPA – 19° Congreso AAPA. 18-19.
- Vernengo E, Saharrea R y Muñoz A. 1995. “Efectos de la fertilización con nitrógeno y/o fósforo sobre un verdeo de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.)”. Revista Argentina de Producción Animal. Vol. 15. Memorias XIV Reunión

Latinoamericana de Producción Animal y 19º Congreso Argentino de Producción Animal. Vol 15. Nº 1: 18-19.

Viglizzo E. 1981. Dinámica de los sistemas pastoriles de producción de leche. Editorial Hemisferio Sur, pp. 125.

Whitehead D.C. 1995. Grassland nitrogen. CAB International. Wallingford, UK. 397 p.

Wilson, J.R. 1982. Environmental and nutritional factors affecting herbage quality. En: J.B. Hacker (ed) Nutritional limits to animal production from pastures Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K. pp. 111-131.

Xande A. 1979. Valeur alimentaire des fourrages tropicaux. Nouvelles agronomiques des Antilles et de la Guyane