



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

17  
ZED

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y  
BIOFERTILIZACION (Bradyrhizobium-Glomus) EN EL  
CONTENIDO DE PROTEINAS, ACEITE Y FOSFORO  
EN SOYA (Glycine max (L.) Merrill) variedad BM<sub>2</sub>.



FACULTAD DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :**

**MIGUEL HERRERA MARTINEZ**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

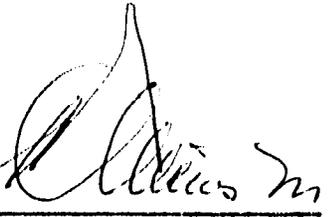
Jurado asignado:

**Presidente:** Profra. Biserka Sveshtarova Pekarkova.  
**Vocal:** Prof. Sergio Palacios Mayorga.  
**Secretario:** Profra. Josefina Viades Trejo.  
**Primer Suplente:** Prof. Adolfo Galnares Campos.  
**Segundo Suplente:** Profra. Lucía Cornejo Barrera.

Lugar donde se realizó la tesis:

**Departamento de Edafología del Instituto de Geología y  
Facultad de Química de la U.N.A.M.**

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Sergio Palacios Mayorga.

Asesor técnico:

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Lucía Cornejo Barrera.

Sustentante:

  
\_\_\_\_\_  
Miguel Herrera Martínez.

**A JESUCRISTO REY DEL UNIVERSO**

**A MI MADRE Y HERMANOS**

**Y A TODOS LOS QUE HAN APORTADO SU VIDA PARA**

**" CAMBIAR A MEXICO, SIN ODIO Y SIN VIOLENCIA"**

**ESPECIALMENTE A**

**S.S. JUAN PABLO II**

**EXMO. SR. JUAN JESUS POSADAS OCAMPO**

**ING. MANUEL DE JESUS CLOUTHIER DEL RINCON**

## AGRADECIMIENTOS

Hago patente mi más profundo agradecimiento:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Química.

A todos mis maestros por sus conocimientos, tiempo y paciencia.

Al personal académico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología y en particular:

Al M. en C. Sergio Palacios Mayorga, Jefe del Departamento de Edafología, por su invaluable dirección y apoyo.

A la M.en C. Kumiko Shimada Miyasaka, del Laboratorio de Biología de Suelos, por su supervisión técnica y gran ayuda.

Asimismo a los Maestros: Silvia Sánchez Beltrán y Teodoro Mendez García de los Laboratorios de Física y Química de Suelos, respectivamente, por su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Dra. María Luisa Ortega Delgado, jefa del Departamento de Bioquímica y a la Q.F.B. Evangelina Sevilla Paniagua, jefa del Laboratorio de Oleaginosas del INIFAP.

A mi madre la Q. F. B. Felicitas Martínez Alemán, quien con su experiencia profesional brindó todo su apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A los miembro del H. Jurado:

M. en C. Biserka Sveshtarova Pekarkova.

M. en C. Sergio Palacios Mayorga.

M. en C. Josefina Viades Trejo.

M. en C. Adolfo Galnares Campos.

M. en C. Lucía Cornejo Barrera.

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>9</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
<b>I. Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<b>A. Aspectos generales de la soya</b> .....	<b>17</b>
1. Composición química de la soya .	20
<b>B. Efecto de la fertilización química</b> <b>en la composición química de la soya</b> .	<b>26</b>
<b>C. Efecto de la biofertilización en la</b> <b>composición química de la soya</b> .....	<b>31</b>
1. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y la fijación biológica del nitrógeno .	35
2. Micorriza vesículo-arbuscular .	39
<b>D. Métodos Analíticos</b> .....	<b>42</b>
1. Métodos para el análisis de proteínas	42
2. Métodos para el análisis de aceite ..	46
3. Métodos para el análisis de fósforo ..	51

<b>II Materiales y Métodos</b> .....	<b>52</b>
<b>A. Material biológico</b> .....	<b>52</b>
1. Variedad BM <sub>2</sub> .....	<b>52</b>
2. Cepas bacterianas .....	<b>52</b>
3. Aislados fúngicos .....	<b>52</b>
4. Fertilizantes químicos .....	<b>53</b>
5. Tratamientos .....	<b>53</b>
<b>B. Análisis de proteínas</b> .....	<b>54</b>
1. Espectroscopía de infrarrojo cercano .....	<b>54</b>
2. Método de macrokjeldahl .....	<b>55</b>
<b>C. Análisis de aceite</b> .....	<b>58</b>
1. Espectroscopía de infrarrojo cercano .....	<b>58</b>
2. Resonancia magnética nuclear .....	<b>58</b>
3. Cromatografía de gases .....	<b>59</b>
<b>D. Análisis de fósforo</b> .....	<b>61</b>
1. Método de Vanado-Molibdato .....	<b>61</b>
a. Vía seca .....	<b>61</b>
b. Vía húmeda .....	<b>62</b>
<b>E. Análisis estadístico</b> .....	<b>65</b>
<b>III Resultado y Discusión</b> .....	<b>67</b>
<b>A. Efecto de la fertilización química</b> .....	<b>67</b>
1. Contenido de proteína .....	<b>67</b>
2. Contenido de aceite .....	<b>68</b>
3. Contenido de ácidos grasos .....	<b>68</b>
4. Contenido de fósforo en la semilla ..	<b>68</b>
5. Contenido de humedad .....	<b>69</b>
6. Peso de las semillas .....	<b>70</b>

<b>II Materiales y Métodos</b> .....	<b>52</b>
<b>A. Material biológico</b> .....	<b>52</b>
1. Variedad BM <sub>2</sub> .....	<b>52</b>
2. Cepas bacterianas .....	<b>52</b>
3. Aislados fúngicos .....	<b>52</b>
4. Fertilizantes químicos .....	<b>53</b>
5. Tratamientos .....	<b>53</b>
<b>B. Análisis de proteínas</b> .....	<b>54</b>
1. Espectroscopía de infrarrojo cercano	<b>54</b>
2. Método de macrokjeldahl .....	<b>55</b>
<b>C. Análisis de aceite</b> .....	<b>58</b>
1. Espectroscopía de infrarrojo cercano	<b>58</b>
2. Resonancia magnética nuclear	<b>58</b>
3. Cromatografía de gases .....	<b>59</b>
<b>D. Análisis de fósforo</b> .....	<b>61</b>
1. Método de Vanado-Molibdato	<b>61</b>
a. Vía seca .....	<b>61</b>
b. Vía húmeda .....	<b>62</b>
<b>E. Análisis estadístico</b> .....	<b>65</b>
<b>III Resultado y Discusión</b> .....	<b>67</b>
<b>A. Efecto de la fertilización química</b> .....	<b>67</b>
1. Contenido de proteína .....	<b>67</b>
2. Contenido de aceite .....	<b>68</b>
3. Contenido de ácidos grasos .....	<b>68</b>
4. Contenido de fósforo en la semilla ..	<b>68</b>
5. Contenido de humedad .....	<b>69</b>
6. Peso de las semillas .....	<b>70</b>

<b>B. Efecto de la biofertilización con</b>	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	71
1. Contenido de proteína .....	71
2. Contenido de aceite .....	71
3. Contenido de ácidos grasos .....	72
4. Contenido de fósforo en la semilla ..	72
5. Contenido de humedad .....	73
6. Peso de las semillas .....	73
<b>C. Efecto de la biofertilización con</b>	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> y la	
fertilización química .....	74
1. Contenido de proteína .....	74
2. Contenido de aceite .....	75
3. Contenido de ácidos grasos .....	75
4. Contenido de fósforo en la semilla ..	76
5. Contenido de humedad .....	77
6. Peso de las semillas .....	77
<b>D. Efecto de la biofertilización con</b>	
<i>Bradyrhizobium - Glomus fasciculatum</i> .	79
1. Contenido de proteína .....	79
2. Contenido de aceite .....	80
3. Contenido de ácidos grasos .....	81
4. Contenido de fósforo en la semilla ..	82
5. Contenido de humedad .....	82
6. Peso de las semillas .....	83
<b>E. Efecto de la doble inoculación</b>	
<i>Bradyrhizobium - Glomus</i> y la	
fertilización química .....	85
1. Contenido de proteína .....	85

2. Contenido de aceite .....	86
3. Contenido de ácidos grasos .....	88
4. Contenido de fósforo en la semilla ..	89
5. Contenido de humedad .....	90
6. Peso de las semillas .....	91
F. Cuadros .....	92
G. Gráficas .....	95
H. Figuras .....	100
IV Conclusiones .....	101
Bibliografía .....	104
Apéndice .....	113

## RESUMEN

El presente trabajo, pretende evaluar el efecto de la fertilización química y de la biofertilización por *Bradyrhizobium* y *Glomus*, en el contenido de proteínas, aceite, ácidos grasos y fósforo en la semilla, así como en el peso de la misma, aspectos que determinan la calidad de la soya (*Glycine max (L.) Merrill*).

Este trabajo constituye una etapa más de un proyecto de investigación con biomejoradores del suelo que se lleva a cabo en el Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM. El material biológico empleado en el presente trabajo se obtuvo como resultado de un trabajo experimental realizado, a nivel de campo, en el que se evaluó el efecto de la doble inoculación (*Bradyrhizobium-Glomus*) en la producción de semilla de soya. (Gómez-Hernández, R. y Rodríguez-Guerrero, R, 1992).

Para lograr los objetivos antes mencionados se utilizaron métodos oficiales para el análisis de la semilla de esta oleaginosa. El estudio consistió en el análisis del contenido de proteína por el método de espectroscopía de infrarrojo cercano, comparando con el análisis por macrokjeldahl. Asimismo, el aceite se determinó por el método de espectroscopía de infrarrojo cercano y por el método de resonancia magnética nuclear. La separación y cuantificación de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases. El contenido de fósforo, por el método tradicional del vanado-molibdato, variando únicamente la vía de oxidación que, en un primer término, se realizó por vía seca hasta obtención de cenizas y, el segundo, por oxidación húmeda con el ataque de la muestra por una mezcla ternaria de los ácidos: HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HClO<sub>4</sub>. El análisis de humedad se realizó por espectroscopía de infrarrojo cercano y, por último, se pesaron 1000 semillas de soya en balanza analítica digital.

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico de varianza y prueba de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos y poder observar, de una manera más clara y con un sustento estadístico, los efectos de la fertilización química y biofertilización en los diferentes elementos analizados en todos los tratamientos.

Los resultados mostraron que la fertilización química probada en los tratamientos: 2 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 3 (80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) no provocó una variación significativa en el contenido de proteína, aceite, ácidos grasos y peso de las semillas, sin embargo, se observó un aumento altamente significativo ( $P=0.01$ ) en el contenido de fósforo por hectárea en el tratamiento 4.

La aplicación simple del biofertilizante *Bradyrhizobium japonicum*, propició un aumento altamente significativo en el contenido de proteínas, así como una disminución, igualmente significativa, en el contenido de aceite, mientras que las demás variables analizadas no se vieron influenciadas.

Con los tratamientos: 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), se observó un aumento significativo en el contenido de proteína, así como una disminución, significativa en el contenido de aceite. Los tratamientos 7 y 8 muestran una disminución significativa ( $P=0.05$ ), respecto al testigo, en el contenido de ácido linolénico. El análisis estadístico no mostró variaciones significativas en los análisis de fósforo y humedad, pero se observó un aumento altamente significativo en el peso de las semillas, esto último se debió principalmente, al aumento en el contenido de proteínas en estos mismos ensayos.

La doble inoculación (*Bradyrhizobium* - *Glomus*), propició un aumento altamente significativo, en el contenido de proteína y peso de las semillas, así como un decremento significativo en el contenido de aceite. En cuanto al contenido de ácidos grasos, humedad y fósforo en la semilla, no se observaron diferencias

estadísticamente significativas.

En los tratamientos: 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) se observó un aumento significativo en el contenido de proteína, y un decremento también significativo en el contenido de aceite en la semilla, verificándose la relación inversa entre estas dos variables, señalada por Markley (1959). Entre otros autores, Vejsadová *et. al.* (1993a) observó que el aumento en el peso de la semilla se debe, entre otras causas, al aumento en el contenido de proteínas. En el presente ensayo, se observó un aumento significativo en el contenido de proteínas y el consiguiente aumento en el peso de la semilla. El tratamiento 11 presentó una disminución significativa en la concentración de ácido linolénico. La doble biofertilización combinada con fertilizantes químicos nitrogenados y fosfatados propiciaron un aumento estadísticamente significativo, en los contenidos de humedad y fósforo.

Las conclusiones del presente trabajo fueron:

1. La biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum*, mostró un aumento significativo ( $P=0.05$ ) en rendimientos de proteína y peso de las semillas, superando los efectos propiciados por la fertilización química. Sin embargo, sucede lo contrario en cuanto al rendimiento de aceite; manteniéndose estadísticamente inalterable, la calidad del aceite.

2. La inoculación simple (*Bradyrhizobium japonicum*) puede igualar los rendimientos obtenidos con la doble inoculación (*Bradyrhizobium-Glomus*), en el contenido de proteína, aceite, fósforo y peso de las semillas, conservando la calidad del aceite estadísticamente inalterable.

3. En relación a la interacción de los fertilizantes químicos con los tratamientos inoculados, se observó que, en la mayoría de los casos, el rendimiento en proteína fue inferior a la fertilización química únicamente, sin la utilización de los

estadísticamente significativas.

En los tratamientos: 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) se observó un aumento significativo en el contenido de proteína, y un decremento también significativo en el contenido de aceite en la semilla, verificándose la relación inversa entre estas dos variables, señalada por Markley (1959). Entre otros autores, Vejsadová *et. al.* (1993a) observó que el aumento en el peso de la semilla se debe, entre otras causas, al aumento en el contenido de proteínas. En el presente ensayo, se observó un aumento significativo en el contenido de proteínas y el consiguiente aumento en el peso de la semilla. El tratamiento 11 presentó una disminución significativa en la concentración de ácido linolénico. La doble biofertilización combinada con fertilizantes químicos nitrogenados y fosfatados propiciaron un aumento estadísticamente significativo, en los contenidos de humedad y fósforo.

Las conclusiones del presente trabajo fueron:

1. La biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum*, mostró un aumento significativo ( $P=0.05$ ) en rendimientos de proteína y peso de las semillas, superando los efectos propiciados por la fertilización química. Sin embargo, sucede lo contrario en cuanto al rendimiento de aceite; manteniéndose estadísticamente inalterable, la calidad del aceite.

2. La inoculación simple (*Bradyrhizobium japonicum*) puede igualar los rendimientos obtenidos con la doble inoculación (*Bradyrhizobium-Glomus*), en el contenido de proteína, aceite, fósforo y peso de las semillas, conservando la calidad del aceite estadísticamente inalterable.

3. En relación a la interacción de los fertilizantes químicos con los tratamientos inoculados, se observó que, en la mayoría de los casos, el rendimiento en proteína fue inferior a la fertilización química únicamente, sin la utilización de los

biofertilizantes. El contenido de aceite, por lo tanto, fue mayor en los tratamientos fertilizados en comparación con los tratamientos inocuados.

4. La utilización del *Bradyrhizobium japonicum* más la aplicación de sulfato de amonio, propició un incremento de 22.5 % en el contenido de proteínas respecto al testigo, así como una disminución significativa (14.4%) en la concentración de ácido linolénico, siendo este ácido la principal causa de la baja calidad sensorial de la soya.

5. Los tratamientos químicamente fertilizados (sulfato de amonio y superfosfato de calcio simple) o combinados con la doble inoculación (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum*) propiciaron un aumento significativo en el contenido de fósforo en la semilla.

## INTRODUCCION

La soya (*Glycine max (L.) Merrill*) es considerada a nivel mundial, como una fuente de proteínas y aceites de buena calidad y bajo costo. La demanda mundial de soya ha ido en aumento debido, principalmente, a su importancia industrial como oleaginosa y como materia prima en la producción de proteína vegetal hidrolizada, texturizados, aglutinantes de grasa y agua, emulsificantes y alimentos balanceados para animales, entre otros usos.

Actualmente, se han manifestado en la sociedad diversas corrientes ecológicas que postulan la agricultura orgánica, es decir, aquella que propicia el incremento en el rendimiento y calidad de las cosechas con la aplicación de recursos orgánicos y microbiológicos, para estimular el desarrollo de las plantas. Un ejemplo de ello lo constituye la inoculación de las leguminosa con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno que, al establecerse en las raíces de estas plantas, les proporcionan el nitrógeno necesario.

Por otra parte, debido a que la fijación biológica del nitrógeno es un fenómeno en el que el consumo de energía en forma de ATP, es elevado, la inoculación con hongos endomicorrízicos VA puede constituir un mecanismo que ayude a la planta en la absorción de fósforo y otros nutrimentos, que el hongo toma del suelo.

Esta doble inoculación constituye una opción biotecnológica para estimular el crecimiento y rendimiento de leguminosas, abatiendo los costos económicos y ecológicos que implica el uso exhaustivo de fertilizantes químicos.

Al respecto, diversos autores han comprobado un aumento en la producción de semilla de soya, por hectárea, al utilizar esta biotecnología. Sin embargo, no ha sido suficientemente valorado el contenido de proteínas, aceite y fósforo en la semilla, como resultado de la utilización de la biofertilización, en comparación con la fertilización química. Se espera que la fertilización biológica incremente el contenido de proteína en la semilla de soya, en igual o superior magnitud que con la aplicación de fertilizantes químicos.

Este trabajo es la continuación de otro trabajo previo en el cual se experimentó, a nivel de campo, el efecto de la doble inoculación en la producción de semilla (Gómez y Rodríguez 1992; y Palacios *et. al.*, 1994). Los excelentes resultados de esa investigación, constituyeron la principal motivación para la realización de este trabajo en el cual se evaluará el aporte de nitrógeno y fósforo, a través del contenido de proteína, aceite, ácidos grasos, fósforo en la semilla por hectárea y peso de las semillas, como respuesta de la planta a la simbiosis (*Bradyrhizobium - Glomus*).

## Hipótesis

**Se espera que la fertilización biológica incremente el contenido proteínico de la soya, en igual o superior magnitud que con la aplicación de fertilizantes químicos. Este incremento deberá, a su vez, repercutir en el contenido total de aceite y de ácidos grasos.**

### 1. Objetivo general

**Evaluar el efecto de la biofertilización por *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*, en comparación con la fertilización química, a través del contenido total de proteínas, aceite, ácidos grasos y fósforo en la semilla de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) variedad BM<sub>2</sub>, comparando diferentes métodos analíticos.**

## 2. Objetivos particulares

- A) Determinación del contenido total de proteínas por espectroscopía de infrarrojo cercano y macrokjeldahl.**
- B) Determinar el contenido total de aceite por espectroscopía en el infrarrojo cercano y resonancia magnética nuclear.**
- C) Determinar el porcentaje de ácidos grasos por cromatografía de gases.**
- D) Determinar el contenido de fósforo por el método de Vanado-Molibdato, utilizando dos diferentes procedimientos de digestión de la muestra: a) oxidación por vía húmeda; y b) oxidación por vía seca.**
- E) Realizar el análisis estadístico que permita encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados bajo diferentes métodos analíticos.**

## I. Antecedentes

### A. Aspectos Generales

La soya o soja es originaria del oriente asiático. La palabra soya proviene del chino "chiang-yiu", y al pasar a Japón, se pronunció "show-yu". Con el paso del tiempo, la palabra se contrajo, hasta ser actualmente "so-ya" o "soya". La soya, también, se conoce como, frijol de soya, frijol Chino o frijol de Manchuria (Markley, 1950).

En el año 2838 A.C., bajo el mandato del Emperador Sheng-Nung, se escribieron los libros, Pen Ts'ao Kong Mu, en los que se encuentra el primer registro de la soya. El libro religioso "Wu-Ku", consigna a la soya como uno de los cinco granos sagrados, junto con el arroz, trigo, cebada y mijo. Se le consideraba, en esa época, como la leguminosa cultivada más importante e indispensable para la existencia de la civilización China (Markley, *op cit.*, Caldwell, 1973).

Engelbert Kaempfer, botánico alemán, dio a conocer la soya en Europa, en el año 1712. En Estados Unidos, Mease dio a conocer la soya en el año 1804. Pero fue hasta 1854, cuando se empezó a cultivar a partir de 2 variedades importadas de Japón (Markey, *op. cit.*, Caldwell, *op. cit.*).

En México, las primeras noticias sobre el cultivo de la soya datan de 1911, año en que la Secretaría de Agricultura y Fomento la introdujo en forma experimental. "En el año 1928, en la Escuela Nacional de Agricultura de Chapingo, se logró la adaptación de cuatro variedades" (Crispin, 1970). Sin embargo, no fue sino hasta 1958 cuando se logró introducirla, en forma comercial, en el estado de Sonora y, posteriormente, difundirla con bastante éxito en otras regiones de la República.

Durante el verano de 1975, en el Instituto Superior Agropecuario del estado de Guerrero, en Iguala, Gro. México, el Dr. Nuren Banafunzi liberó la variedad BM<sub>2</sub>, como resultado de un programa de fitomejoramiento. "Esta variedad se originó de la cruce de la variedad Kahala del grupo V con la variedad Lee 68 del grupo IV... La variedad BM<sub>2</sub> alcanza mayores rendimientos por hectárea que sus antecesoras" (Banafunzi, 1981).

Por su importancia nutricional, ... se ha propuesto utilizar la soya para enriquecer la dieta de pueblos cuya alimentación se basa en el maíz, que es deficiente en triptofano y en lisina. En el siguiente cuadro se observa el aumento de la relación de eficiencia proteínica que experimenta este cereal, al añadirle diferentes cantidades de la oleaginosa; es evidente la complementación que existe ya que, con sólo añadir a la masa 8% de proteína de soya aislada o 10% de harina, el valor de la relación de eficiencia de proteína (REP) de la tortilla aumenta de 1.8 a 2.5.

*Valor nutritivo de la tortilla elaborada con mezclas de soya y maíz. (DelValle, 1974)*

Enriquecimiento (% de soya)	REP	% REP de la caseína	% UNP de la caseína
0	1.8	59	46
8	2.5	84	65
16	2.6	86	70
Caseína	3.0	100	100

Nota: REP = Relación de eficiencia de proteína, UNP = Utilización neta de proteína.

En general, la proteína de soya presenta una deficiencia de aminoácidos azufrados que se acentúa más en los aislados proteínicos, ya que la concentración de metionina y cistina se reducen durante el proceso de manufactura de estos productos. Sin embargo, el porcentaje de lisina es elevado lo que hace que la soya sea muy adecuada para complementar las proteínas de los cereales. Además, su patrón de aminoácidos es, en ciertos aspectos, comparable al de la FAO (Baduí, 1990).

Los estudios sobre la composición y valor nutricional de la vaina de esta variedad, indican que la concentración de proteína, aceite, fibra cruda y azúcares totales aumenta al madurar el ejote de soya. Las vainas son una buena fuente de tiamina y riboflavina pero, sorpresivamente, se encontró que es una fuente pobre en ácido ascórbico.

Se encontró que los niveles de inhibidores de tripsina están por encima de los límites aceptables, por lo que interfieren con la digestibilidad de las proteínas. Por esta razón, se requiere de una inactivación térmica para hacer su consumo inocuo.

Los resultados de las pruebas REP y UNP, realizadas con soya sometida a un tratamiento térmico previo, para eliminar los inhibidores de tripsina, mostrados en la siguiente tabla, revelan que la vaina de soya de la variedad BM<sub>2</sub> es una buena fuente de proteína de alta calidad, aceite, tiamina y riboflavina. Sin embargo, para su consumo es necesario someter los ejotes a un cocimiento para reducir los inhibidores de tripsina a menos de 20,000 UTI/g (Bourges, 1981).

*Tabla de REP y UNP de vaina de soya variedad BM<sub>2</sub>, en diferentes etapas de madurez.*

Fuente de proteína	REP	REP como % de caseína	UNP	UNP como % de caseína
Caseína	2.5 ± 0.43	-----	60.0 ± 8.6	-----
* 65 días	1.73 ± 0.21	69.2	56.83 ± 7.5	94.7
* 75 días	1.73 ± 0.21	69.2	57.31 ± 8.2	95.5
* 85 días	2.35 ± 0.48	94.0	56.9 ± 7.7	94.8

\*Vaina de 65, 75 y 85 días después de la floración.

Actualmente, la producción mundial de soya se estima en 60 millones de toneladas de semilla. Los principales países productores son Estados Unidos, China, Brasil, Rusia, Indonesia, Corea, Canadá, Rumania, México y Colombia (Sánchez, 1982).

## 1. Composición química de la soya

La soya (*Glycine max (L.) Merrill*) pertenece a las leguminosas y, por su elevado contenido de aceite se incluye, junto con el cártamo, el girasol, la aceituna y el cacahuete, en las oleaginosas.

La soya tiene un contenido de proteína que fluctúa en un intervalo entre 30 y 42% y de aceite entre 18 y 25% (Badui, *op. cit.*, Raboy, 1984, Markley, *op. cit.*).

Badui Dergal (1990) comenta, a propósito de la composición química de la soya que:

Como sucede con la mayoría de los alimentos provenientes del campo, su composición química depende de muchos factores, tales como el tipo de suelo, irrigación, fertilización, temperatura ambiental, etc. Se conocen algunas variedades cuyo contenido de proteína es mayor, pero a expensas de la grasa y de los hidratos de carbono, así como del rendimiento por hectárea.

*Composición de la soya y de sus partes (%)*

	<i>Proteína (N*6.25)</i>	<i>Grasa</i>	<i>Hidratos de carbono</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Constituyentes de la semilla</i>
Soya total	40	21	34	4.9	-----
Cotiledón	43	23	29	5.0	90
Cascarilla	9	1	86	4.4	8
Hipocotilo	41	11	43	4.3	2

En forma general, la semilla de soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, que representa 8% del peso total de la semilla, el hipocotilo (2%) y el cotiledón (90%); en este último, se localiza el aceite en unos pequeños compartimientos, llamados esferomas, de 0.2 a 0.3  $\mu$  y que, a su vez, están dispersos entre los cuerpos proteínicos (denominados aleuronas) de mayor tamaño (2 a 20 $\mu$ )

## 1. Composición química de la soya

La soya (*Glycine max (L.) Merrill*) pertenece a las leguminosas y, por su elevado contenido de aceite se incluye, junto con el cártamo, el girasol, la aceituna y el cacahuete, en las oleaginosas.

La soya tiene un contenido de proteína que fluctúa en un intervalo entre 30 y 42% y de aceite entre 18 y 25% (Badui, *op. cit.*, Raboy, 1984, Markley, *op. cit.*).

Badui Dergal (1990) comenta, a propósito de la composición química de la soya que:

Como sucede con la mayoría de los alimentos provenientes del campo, su composición química depende de muchos factores, tales como el tipo de suelo, irrigación, fertilización, temperatura ambiental, etc. Se conocen algunas variedades cuyo contenido de proteína es mayor, pero a expensas de la grasa y de los hidratos de carbono, así como del rendimiento por hectárea.

*Composición de la soya y de sus partes (%)*

	<i>Proteína (N*6.25)</i>	<i>Grasa</i>	<i>Hidratos de carbono</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Constituyentes de la semilla</i>
Soya total	40	21	34	4.9	-----
Cotiledón	43	23	29	5.0	90
Cascarilla	9	1	86	4.4	8
Hipocotilo	41	11	43	4.3	2

En forma general, la semilla de soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, que representa 8% del peso total de la semilla, el hipocotilo (2%) y el cotiledón (90%); en este último, se localiza el aceite en unos pequeños compartimientos, llamados esferomas, de 0.2 a 0.3  $\mu$  y que, a su vez, están dispersos entre los cuerpos proteínicos (denominados aleuronas) de mayor tamaño (2 a 20 $\mu$ )

integrados por, aproximadamente, 98% de proteínas y algo de lípidos y de ácido fítico (Wolf, 1979). Por esta razón, en las alueronas se encuentra casi toda la proteína, (Tombs, 1967) cuya función básica es constituir una fuente de reserva que le sirva a la planta en la germinación y el crecimiento.

Las proteínas de la soya y de otras oleagionosas son una mezcla heterogénea de globulinas (60-75% del total) y de albúminas con pesos moleculares muy variados, solubles en soluciones salinas y en agua; precipitan en su punto isoeléctrico, generalmente en el intervalo de 4.2 a 4.8. Su aminograma difiere del de los cereales en que las cantidades de metionina, ácido glutámico, arginina, leucina, isoleucina y valina son menores pero, en cambio, es más rico en lisina.

La fracción lipídica está integrada por triacilglicéridos que contienen el 14% de ácidos grasos saturados, el 22% de ácido oleico, el 55% de ácido linoleico y el 8% de ácido linolénico, con un punto de solidificación aproximado de  $-16^{\circ}\text{C}$  y un índice de yodo de 130. También, se encuentran fosfolípidos, esteroides y tocoferoles; cabe indicar que de la refinación del aceite se obtiene lecitina, ampliamente utilizada por sus propiedades funcionales. La acumulación de lípidos en las oleagionosas va acompañada de un decremento de los hidratos de carbono, lo que significa que es muy probable que éstos sean los precursores en la síntesis de grasas (Badui, *op. cit.*).

El color del aceite de soya dependerá de la variedad, estado de madurez y condiciones de crecimiento y maduración. Sin embargo, generalmente se puede concluir que está comprendido entre el amarillo 70, con 10 unidades de rojo (70Y-10R), al amarillo 70, con 30 unidades de rojo (70Y-30R), en la escala N de colores (Markley, 1950).

La densidad se encuentra entre 0.922 a 0.934 a  $15^{\circ}\text{C}$  y 0.920 a  $25^{\circ}\text{C}$ . El índice de refracción está en el intervalo de 1.47084 a 1.47243 unidades. El punto de humo (smoke point) de un aceite de buena calidad, se tiene a los  $385^{\circ}\text{F}$  ( $358.33^{\circ}\text{C}$ ) y el punto de ignición (fire point) a  $677^{\circ}\text{F}$  ( $367.22^{\circ}\text{C}$ ) (Markley, *op. cit.*).

La temperatura es la variable ambiental que incide de manera más directa en la composición química de la soya. Viljoen (1937) citado por Markley, *op. cit.*, calculó el coeficiente de regresión para el contenido de aceite y proteína, y encontró que por cada grado de incremento en la escala de temperatura se tiene un 0.44% de variación en el contenido de aceite y, en proteínas, una variación de 0.39%.

El contenido de proteínas se aumenta con las temperaturas elevadas. Valuta (1938) citado por Markley *op. cit.*, observó que la soya sembrada en zonas cálidas de Rumania presentaba un incremento en el contenido de proteína en un 6 a 7%, con respecto a la cultivada en lugares fríos en Alemania. El contenido de aceite se aumenta por el efecto de la alta temperatura en 8.1%.

El contenido de ácidos grasos se ve afectado por la temperatura de cultivo, esto ha sido demostrado por diversos autores (Howell, 1957, Rennie, 1989, Cherry, 1985). Howell (1957) encontró que el contenido de ácido linolénico fluctúa del 5 a 8.5% y el ácido linoleico del 46 a 54%, en soya de una misma variedad; en su estudio, este autor establece que ambos ácidos grasos se correlacionan de manera inversa con la temperatura.

Otros autores concluyen que, al aumentar la temperatura, disminuye la concentración de ácido linolénico y aumenta el ácido linoleico, influyendo esta condición en el aumento del contenido del ácido oleico y ácido palmítico (Carver, 1986, Dombos, 1989 y 1992). "Esto se debe, principalmente, a que el ácido linoleico y el ácido linolénico son sintetizados por la desaturación consecutiva del ácido oleico, durante el desarrollo de las semillas, la actividad de la enzima desaturasa oleica puede ser inhibida por la temperatura alta durante el llenado de la semilla" (Harris, 1969 y Wilson, 1980). El coeficiente de correlación de -0.59, -0.83 y 0.66 entre el ácido linolénico y ácido esteárico, oleico, y linoleico, respectivamente, concuerda con la actividad de la enzima desaturasa oleica.

Al respecto, Cherry *et al.* (1985) demostraron que el contenido de ácido oleico presente, en una misma variedad, aumenta con la temperatura.

Hawkins (1983), en su estudio del contenido de ácidos grasos insaturados en diversas líneas de soya, ubica el porcentaje de ácido palmítico en un intervalo que va de 10.2 a 11.9; de 2.9 a 4.2% para ácido esteárico; de 18.6 a 27.9% para el ácido oleico; 50.0 a 58.6% para el ácido linoleico y 6.8 a 9.3% para el ácido linolénico.

En cuanto al tipo de variedad, se han establecido intervalos máximos y mínimos para el contenido de humedad (5.02-9.42%), cenizas (3.30-6.35%), aceite crudo (14.95-22.95%), fibra cruda (4.34-7.60%) y proteínas cruda (36.62-53.19%), de las 10 variedades de soya más comunes en los Estados Unidos (Markley, *op. cit.*). Por otra parte, Raboy (1984), estableció, al analizar 163 líneas de soya, un intervalo para el contenido total de fósforo (5.8-9.1 g/kg); ácido fitico (13.9-23.0 g/kg); zinc (38-67 mg/kg); calcio (1.8-3.2 g/kg); magnesio (2.2-3.4 g/kg) y proteína (364-496 g/kg) en la semilla de esta leguminosa. Por otra parte, Lolas (1976), realizó un análisis de 15 variedades de soya y determinó, como resultado de su estudio, un coeficiente de correlación entre el contenido total de fósforo y el ácido fitico igual a 0.9852.

El genotipo es un factor de suma importancia en la calidad del aceite y contenido de ácidos grasos en la semilla de soya. La investigación genética en soya, durante la pasada década, se orientó a reducir los porcentajes de ácido linolénico en forma significativa, por ser el causante del mal sabor y olor, así como de la baja estabilidad del aceite. También, se buscó el aumento en el contenido de ácido oleico, esteárico y palmítico, ya que al presentarse en elevadas concentraciones se reduce la necesidad de realizar modificaciones químicas al aceite durante su procesamiento, con el fin de mejorar sus cualidades sensoriales (Bubeck, 1989). Entre otras variedades que se siembran en México, la Júpiter tiene 11.5 % de ácido palmítico, 3.0 % de ácido esteárico, 21.0 % de ácido oleico, 58.5 % de ácido linoleico y 6.0 % de ácido linolénico; o variedades como la Tapachula con 10.3 % de ácido palmítico, 3.7 % de ácido esteárico, 21.7 % de ácido oleico, 57.5 % de ácido linoleico y 6.8 % de ácido linolénico. Sin embargo, países con un nivel tecnológico importante en la producción de soya como Estados Unidos, han logrado obtener genotipos con 4 % de ácido linolénico, con el objetivo de lograr una mayor estabilidad y mejorar el sabor y olor del aceite de soya. Algunas industrias buscan

que la semilla de soya tenga un elevado porcentaje de ácido palmítico ya que este ácido es de gran utilidad para las industrias productoras de margarinas (Fehr, 1991).

Autores como Erickson (1988) y Rennie (1988) proporcionan, información esencial para desarrollar estrategias eficientes de cruza con el propósito de liberar variedades que contengan entre 2 y 4 % de ácido linolénico. Se han desarrollado variedades con bajo contenido de ácido linoleico, como la PI361088B, Sin embargo, se observó que las condiciones ambientales, como son las bajas temperaturas, influían contrariamente en la obtención de los resultados esperados. Actualmente, se sigue investigando sobre la variabilidad atribuida a las interacciones genotipo-condiciones ambientales, así como en el desarrollo de variedades más estables a interacciones ocasionadas por el lugar y año de siembra (Carver, 1986).

El grado de madurez es otro factor determinante en la composición química de la semilla de la soya. Conforme aumenta la madurez, disminuye el contenido de humedad y aumenta el contenido de proteína, aceite, fibra cruda y cenizas (Bourges, *op. cit.*, Chavez, 1983 y Markley, *op. cit.*). De la misma manera, conforme la soya madura, los gránulos de almidón desaparecen y cuando casi no hay evidencia de ellos, la soya ha llegado a su grado máximo de madurez. Roehm y Privett (1967) citados por Caldwell (1973), mencionan que los mayores cambios en la concentración de ácidos grasos se tienen durante los primeros 52 días después de la floración. El ácido palmítico decrece en su concentración de 13.9 a 10.6%; el ácido esteárico permanece constante en 3.8 %; el ácido oleico se incrementa de 11.4 a 25.5%; el ácido linoleico también se incrementa de 37.7 a 52.4% y, por último, la concentración de ácido linolénico pasa de 34.2 a 7.6% (Caldwell, 1973).

Es bien sabido que la sequía es un factor que influye en la germinación, rendimiento y tamaño de la semilla de soya, por lo que es de esperar que la composición química también se vea afectada por este factor. Al respecto, se ha observado que la soya sometida a sequía severa contiene un 4.4 % más de proteína, mientras que el aceite decrece en 2.9 % con respecto al testigo. Conforme el estrés por sequía se incrementa, el contenido de proteína aumenta en forma lineal, y el

contenido de aceite decrece en la misma forma. Además, las plantas expuestas a 35 °C durante el período de engrosamiento o llenado de la semillas dentro de la vaina, presentaron un 4.0% más de proteínas y un 2.6% menos de aceite, que aquellas sometidas a 29 °C. La sequía afecta ligeramente la composición de los ácidos grasos del aceite, pero las altas temperaturas reducen la proporción de los ácidos grasos poliinsaturados (Durnbos, 1992).

Por último, es necesario comentar acerca de los factores antifisiológicos que produce la soya. Estos son metabolitos que, en ocasiones, pueden ser muy dañinos para el hombre.

Se ha observado que al alimentar a ciertos animales de laboratorio con soya cruda, con o sin grasa, éstos presentan problemas de inhibición de crecimiento, reducción de la digestibilidad de la proteína y de la disponibilidad de los aminoácidos, vitaminas y minerales, además de una hipertrofia pancreática.

Entre los factores antifisiológicos presentes en la soya están: los promotores de flatulencia, inhibidores de proteasas (inhibidores de tripsina y quimotripsina), fitohemaglutininas (hemaglutininas o lectinas), saponinas, bociogénicos, compuestos fenólicos estrogénicos y el ácido fitico. Sin embargo, algunos de estos factores antifisiológicos se eliminan mediante tratamientos térmicos (Badui, 1990 y Valle, 1991).

## B. Efecto de la fertilización química en la composición química de la soya

El fertilizante es toda aquella sustancia que contiene uno o más de los elementos químicos aplicados a los vegetales, en forma tal, que puedan ser absorbidos por la planta y que favorezcan el desarrollo de las mismas (Mercado, 1985).

La fertilización química influye, de una forma más evidente en el rendimiento, que en la composición química de la semilla de soya.

Gómez y Rodríguez (1992) demostraron en su trabajo de investigación, que el rendimiento de semillas de soya por hectárea, en "los tratamientos fertilizados químicamente con fósforo y nitrógeno más fósforo, resultaron ser estadísticamente iguales, pero superiores a los tratamientos testigo, sin fertilización química y con nitrógeno únicamente" (Gómez y Rodríguez, *op. cit.*).

En ensayos con varias cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y la aplicación de la fórmula química (00-40-20), bajo condiciones de temporal en campo, alcanzó un rendimiento máximo de 2,450 kg/ha (Delgado, 1990). Asimismo, se ha observado un incremento en el rendimiento de semilla por hectárea al inocular la soya y adicionar una fórmula química (15-60-00) (Jimenez, 1991).

La soya es una leguminosa que, al presentar una buena nodulación, raramente necesita adicionársele fertilizante nitrogenado inorgánico para obtener buenos rendimientos. Weber (1966) citado por Caldwell (1973) comparó las respuesta de líneas de soya inoculada y no inoculada, a la fertilización nitrogenada encontrando que, mientras la soya no nodulada respondió ampliamente a la fertilización nitrogenada al presentar un aumento en el rendimiento, las líneas de soya nodulada presentaron una respuesta muy pequeña a la fertilización y un rendimiento igual o superior a las líneas no noduladas y fertilizadas (Caldwell, 1973).

Al respecto, se ha demostrado que la soya inoculada con *Bradyrhizobium* y abonada con estiércol, produce un aumento en el rendimiento de la semilla. La adición de fertilizante químico nitrogenado y estiércol a la semilla inoculada, ha dado como resultado un aumento en el rendimiento pero no estadísticamente significativo al 5 % de probabilidad (Sekhon, 1984).

El fósforo es el segundo elemento más importante en la nutrición vegetal, de aquí que su carencia sea doblemente importante, puesto que las plantas sin él, no aprovechan otros nutrimentos y, por consiguiente, se afecta el crecimiento vegetativo normal (Chavez-Paredes, 1983). Es sabido que la deficiencia de fósforo trae como resultado una alteración en la asimilación del nitrógeno. El fósforo es, probablemente, el nutrimento más importante en el crecimiento y nodulación de las leguminosas.

Pongsakul y Jensen (1991) encontraron, en su trabajo sobre fijación biológica del nitrógeno, que la fertilización química con fósforo aumenta la capacidad de la simbiosis *Glycine max-Bradyrhizobium japonicum*.

La falta de fósforo repercute en un menor contenido de semillas por vaina y, por lo tanto, en un menor rendimiento de la cosecha. Grabau (1986) apoyado en las observaciones de otros autores, comenta que una falta de potasio hace que el proceso de envejecimiento de la planta sea prematuro. Un retraso en el envejecimiento origina mayor tiempo de translocación de nitrógeno a la semilla y, por consiguiente, un aumento en el contenido de proteínas. De esta manera, una suplementación adecuada de fósforo retrasará el envejecimiento, lo que favorecerá el aumento del contenido de proteínas, tamaño y peso de las semillas de soya.

Fredeen, *et. al.* (1989) al estudiar la influencia de dos diferentes concentraciones de fósforo (alta y baja) sobre el crecimiento de soya, concluyeron que las plantas sembradas y fertilizadas con bajas concentraciones de fósforo redujeron, en 7 días, el crecimiento del primer retoño, "los resultados sugieren que bajas concentraciones de fósforo provocan la reducción del crecimiento primario de la soya, e incrementan las concentraciones de almidón y sacarosa en las hojas maduras, presentando una

reducción del 85 % en el área total de las hojas, así como una reducción del 78 % en el peso seco de los retoños."

"La aplicación de fósforo y nitrógeno combinados incrementa, de manera significativa, el contenido de proteína en la semilla, comparada con la aplicación de fósforo y potasio o simplemente fósforo" (Markley, *op. cit.*). La utilización de fósforo para la asimilación del nitrógeno por las leguminosas es universalmente reconocido (Chavez-Paredes, 1983).

Por otra parte, se ha observado que "las aplicaciones de P incrementan el rendimiento, número de vainas y cantidad el nitrógeno total absorbido en el grano" (Bueno, 1981).

Pal (1989) observó que, "en general, las plantas sin fertilización química fosfatada fueron más pequeñas, con un crecimiento deprimido, comparadas con aquellas que sí fueron fertilizadas con fósforo." Este autor observó, también, un incremento significativo en el rendimiento de semilla de soya, del 45 al 102 % sobre el control, al aplicar 13.2 kg P / ha. Finalmente, la aplicación de fósforo tuvo como resultado un incremento en la concentración de fósforo en las hojas de 27.5 a 33.0 %.

Sin embargo, se ha observado que la aplicación del fertilizante fosfatado o fósforo en combinación con potasio, incrementa significativamente el contenido de aceite en la semilla, en comparación con la aplicación de fósforo y nitrógeno (Markley, *op. cit.*).

Estudios sobre niveles de fertilización en tres variedades de soya han permitido concluir que el contenido de proteína y aceite está determinado tanto por el genotipo específico como por la dosis de fertilización nitrogenada; dosis altas aumentan el contenido de proteínas pero disminuyen el de aceite en la semilla. Por otra parte, dosis bajas disminuyen las proteínas pero aumentan el contenido de aceite, independientemente de la variedad de soya (Mercado, *op. cit.*).

Niveles bajos de fertilización fosfatada han significado rendimientos menores en vainas y semilla, en comparación con niveles de fertilización más altos. Los resultados muestran que el tamaño de la semilla no depende del fósforo presente en el suelo o aplicado. La concentración de fósforo en la semilla dependerá del nivel de fertilización (Crafts-Brander, 1992). Estos resultados concuerdan con los de Garner, *et. al.* (1914) citados por Markley, *op. cit.* Además, estos autores encontraron que la aplicación de fósforo aumenta el contenido de aceite, y este aumento no se ve afectado por la aplicación simultánea de potasio.

Alten y Gottwick (1939) citados por Markley, *op. cit.*, encontraron que la semilla de soya, cosechada de plantas que recibieron una fertilización completa, presenta menor contenido de aceite y mayor proteína cruda que aquellas que recibieron una fertilización con nitrógeno y fósforo únicamente. La fertilización con potasio no afectó el contenido de potasio y fósforo en la semilla.

En experimentos sobre la fertilización química en plantas noduladas y no noduladas, se ha encontrado que la utilización de fertilizantes químicos con N, P y K aumentan el contenido de estos nutrimentos en la planta y que, aproximadamente, el 50 % de los nutrimentos (N, P y K), requeridos por la semilla para su formación y desarrollo, son traslocados de las hojas y tallos, mientras que el otro 50 % son obtenidos del suelo por las raíces durante el período de su desarrollo (Hanway y Weber, 1971).

Asimismo, se ha observado que la fertilización completa incrementa el contenido de minerales en las semillas, detectable al analizar las cenizas, mientras que la aplicación de un solo tipo de fertilización, nitrogenada o fosfatada, no se traduce en aumento del contenido de estos minerales (Mecek, 1941, citado por Markley, *op. cit.*).

Por lo que respecta al efecto de la dosificación de nitrógeno se aprecian diferencias significativas en el peso de la semilla, mientras que para los niveles de fósforo y variedades de soya no existen diferencias significativas ( $P=0.05$ ) (Mercado, *op. cit.*).

Parece ser que el efecto de la fertilización química en la composición química de la semilla de soya, se debe a la influencia de la fertilidad, condiciones edáficas del suelo, clima y del balance en la elaboración de los intermediarios bioquímicos en la planta durante todo el período vegetativo, su translocación a la semilla, y la conversión en aceite y proteína.

En relación a la influencia que tienen diferentes niveles de fertilización química fosfatada en la triple simbiosis *Glycine-Glomus-Rhizobium*, Asimi *et al.*, (1980) demostraron que la fertilización fosfatada incrementa la actividad total de la nitrogenasa, por lo que la fijación biológica del nitrógeno se ve también estimulada. El rendimiento de semilla y el porcentaje de fósforo en la semilla se aumenta, no así el contenido de nitrógeno. Por otra parte, la aplicación de 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por Kg de suelo elimina el efecto de la micorriza, y la actividad de la nitrogenasa en el nódulo se elimina al adicionar 1.0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por kg de suelo.

### C. Efecto de la biofertilización en la composición química de la soya

Ha sido ampliamente demostrado que la doble inoculación de la soya con la micorriza vesículo-arbuscular (MVA) y *Bradyrhizobium* contribuye a la obtención de mayores rendimientos en semilla; aumento en la cantidad y número de vainas; aumento en el peso de la semilla, así como al enriquecimiento del suelo con nitrógeno y otros nutrimentos, tanto en condiciones de invernadero como en campo. Asimismo, se ha demostrado que la doble inoculación produce efectos mucho más grandes que la inoculación simple, en la planta. Por lo tanto, estos hallazgos demuestran que al establecerse una relación sinérgica entre estos dos microorganismos y la planta, se favorece ampliamente la simbiosis (Asimi, 1980; Bagyaraj, 1979; Bueno-Jaquez, 1981; Chavez-Paredes, 1983; Palacios-Mayorga *et al.* 1994; Gómez y Rodríguez, 1992; Hoque, 1993; Kawai, 1986; Lynch, 1993; Pacovsky, 1988; Pongsaku, 1991; Sekhon, 1984; Vejsadová *et al.* 1989; Vejsadová *et al.* 1992; Vejsadová *et al.* 1993; Wiersma, 1992). Sin embargo, sólo algunos autores han verificado el aporte de esta biofertilización a la calidad de semilla.

Diversos autores han demostrado que los hongos endomicorrízicos vesículo-arbusculares favorecen la nodulación de la soya por la bacteria *Bradyrhizobium*. El fenómeno de la fijación biológica del nitrógeno (Smith, 1994) así como las concentraciones de N, P, K y Mg en las plantas, también, se ven favorecidos por estos hongos (Vejsadová *et al.* 1993).

Bagyaraj *et al.* (1979) en su estudio sobre la interacción entre la micorriza VA y la bacteria *Rhizobium*, así como los efectos de éstos en la soya en condiciones de campo, concluyeron que, en la plantas inoculadas únicamente con *Rhizobium*, se incrementó el contenido de nitrógeno en la planta y en la semilla. Las plantas inoculadas únicamente con *G. fasciculatum* registraron aumento en el contenido de fósforo, peso seco y rendimiento de grano frente a las no inoculadas. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P=0.05$ ). La doble inoculación, MVA-*Rhizobium* incrementó, el peso seco y el contenido de nitrógeno

de las raíces, en comparación con las plantas inoculadas con uno sólo de los simbiontes, *Glomus* o *Rhizobium*. El peso de 100 semillas de soya fue significativamente mayor ( $P=0.05$ ) en plantas inoculadas con *Rhizobium* sólo o combinado con *Glomus*. Estos resultados sugieren que la MVA colabora grandemente en la nodulación y fijación biológica del nitrógeno de las plantas inoculadas con *Rhizobium*.

En experimentos con doble inoculación MVA y MVA-*Bradyrhizobium* se ha observado que la masa de las semillas aumenta 17 y 28 %, respectivamente, frente a los testigos. La inoculación con MVA resulta en un aumento del número de semillas y vainas. Sin embargo, al analizar las semillas, no se encontró un aumento significativo en la concentración de nitrógeno en las mismas. Asimismo, no se observaron diferencias en la composición de los aminoácidos de la semilla de plantas inoculadas con *Rhizobium* al compararse con las semillas de plantas inoculadas con MVA-*Rhizobium* (Vejsadova *et. al.*, *op. cit.*).

Vejsadová *et. al.* en otro estudio realizado en 1992, determinó que "la doble inoculación, también, produce un aumento de la biomasa hasta en un 25 % con respecto al testigo". Encontró, además, que la planta aumenta su capacidad para utilizar elementos como P, Zn y Cu, en suelos deficientes en P y N, bajo condiciones de campo.

En cuanto al efecto de la biofertilización en el contenido de fósforo en la planta, Pacovsky *et al.* (1986) relizaron estudios sobre los efectos de la inoculación de soya con MVA (*Glomus fasciculatum*), *Rhizobium japonicum* y los dos endófitos juntos, bajo condiciones de invernadero. La soya fue sembrada en arena deficiente en nitrógeno y fósforo. Todas los grupos recibieron solución nutritiva, N y P. Al finalizar el experimento se encontró que las plantas noduladas alcanzaron de 4 a 5 veces más fitomasa que las plantas control, no inoculadas. Las plantas colonizadas por los dos endófitos, MVA y *Rhizobium*, obtuvieron 18 % más peso seco que las plantas noduladas únicamente con *Rhizobium*. La fijación biológica del nitrógeno fue 80 % mayor en la simbiosis tripartita, debido a que estas plantas presentaron 20 % más masa en los nódulos y un incremento en la actividad específica de los

mismos. La colonización por MVA y el desarrollo de las vesículas incrementaron significativamente la nodulación.

Este mismo autor observó que la concentración de fósforo en las hojas y flores fue significativamente más alta en plantas colonizadas únicamente con MVA ( $P=0.05$ ). Las plantas noduladas presentaron la concentración más baja de fósforo en hojas y flores, y la concentración de fósforo en los nódulos fue tres veces mayor que la de las hojas. El contenido total de fósforo fue significativamente mayor para las plantas colonizadas por MVA e inoculadas con *Rhizobium*. Esto demuestra que el fósforo adicional que provee la micorriza fue utilizado por la planta para incrementar la biomasa.

Una baja disponibilidad de fósforo trae como consecuencia un bajo nivel de nodulación y fijación biológica del nitrógeno en las leguminosas. "Una vez más quedó de manifiesto que la nodulación y la fijación del nitrógeno depende de la disponibilidad del fósforo para la simbiosis, y que la presencia de MVA incrementa esa disponibilidad" (Mullen, 1988, Pacovsky, *op. cit.*). Las interacciones sinérgicas entre los microsimbiontes sugiere que la respuesta del huésped a la doble colonización dependerá del equilibrio entre las tres partes de la simbiosis (Pacovsky, 1989).

Sobre el efecto que tiene la aplicación de biofertilizantes en el contenido de nitrógeno y fósforo en la semilla, Emiliano Bueno en 1981, realizó estudios en los que evaluó la eficiencia de tres simbiontes para fijar el nitrógeno. En estos estudios, realizados en Chapingo, Edo de México, con soya *Glycine max* y *Bradyrhizobium japonicum*, bajo condiciones de invernadero, se concluye que, "En relación a la inoculación con las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y mezclas de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, se obtuvo mayor rendimiento de grano, mayor número de vainas, mayor cantidad de nitrógeno total y fósforo absorbido en el grano en comparación con el tratamiento sin inoculación. Las aplicaciones de fósforo químico incrementaron el rendimiento, número de vainas y cantidad de nitrógeno total absorbido en el grano".

Bajo condiciones de campo, Flores-Román y Palacios-Mayorga en 1987, al evaluar el efecto de la fertilización e inoculación de soya, variedad BM<sub>2</sub>, con *Rhizobium*, en el rendimiento y calidad de la semilla de soya, en condiciones de riego y temporal, concluyeron que los rendimientos promedio más altos en grano obtenidos con los tratamientos inoculados, utilizando las cepas de *Rhizobium* 145 y 147, fueron del orden de 1,921 y 1,839 kg/ha, respectivamente, al compararlos con los tratamientos fertilizados (00-40-00), (40-60-00) y (40-00-00), los cuales solamente alcanzaron rendimientos de 1,311, 1412 y 1363 kg/ha, respectivamente. Además encontraron que los tratamientos inoculados alcanzaron los valores más altos, en relación a los fertilizados, en todas las variables de estudio: de 1.723 a 1.921 t/ha de semilla, con incremento de rendimiento promedio de 34 %; y de 35.5 a 37.3% de proteína cruda en semilla, con un incremento de 15 %; de 12.9 a 13.3 vainas por planta, con un incremento de 18 %; y de 14.3 a 15.3 g por 100 semillas, con incremento de 10 %.

Otros investigadores, al experimentar la fertilización nitrogenada e inoculación de soya, con seis diferentes cepas de *Rhizobium*, encontraron que, "en todos los ensayos y condiciones ambientales, las plantas respondieron a la inoculación con *Rhizobium*. La inoculación aumentó el rendimiento del grano entre 1.7 % y 41.0% y el peso de la semilla entre 1.8 y 18.0 %. La adición de fertilizante nitrogenado (168 kg/ha), aumentó significativamente ( $P=0.05$ ) el peso de la semilla y la concentración de nitrógeno en el grano con respecto a la inoculación simple (Wiersma, 1992).

Sobre el contenido de minerales y lípidos en la simbiosis *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium*; Pacovsky *et al.* (1986a) sembraron un grupo de soya (*Glycine max* var. Amsoy 71), inoculada con MVA (*Glomus fasciculatum*); solamente con *Bradyrhizobium japonicum* y otro con los dos simbioses juntos, además de los respectivos grupos control. El grupo de plantas no inoculadas fue fertilizado con P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) químico para compensar las aportaciones por *Glomus* y *Bradyrhizobium*. Este autor encontró que: (a) las diferencias en la asimilación de N y P, durante el crecimiento, por la plantas noduladas o micorrizadas, indicó que *Glomus* es mucho más eficiente durante la parte más

temprana del crecimiento de la planta de soya (Pacovsky, 86a), y *Bradyrhizobium* es más activo hasta la etapa en que la vaina empieza su llenado; (b) en forma general, la soya colonizada por *Glomus* contiene más Cu, pero menos Mn y P que las correspondientes plantas fertilizadas con fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); (c) las plantas de soya noduladas con *Bradyrhizobium japonicum* contienen más ácidos grasos totales en vaina y semilla que las plantas fertilizadas con nitrógeno químico ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); (d) las plantas de soya noduladas contienen niveles más altos de ácido palmitoleico (16:0) en vainas, en comparación con las no noduladas; (e) las plantas noduladas presentaron un contenido, en semilla, más alto del ácido graso palmitoleico (16:0) y esteárico (18:0) que las no noduladas; (f) las plantas noduladas presentaron en la semilla más ácido oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3), que las plantas fertilizadas químicamente con nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); (g) las plantas micorrizadas contienen menos ácido linoleico (18:3) y araquidónico (20:0) pero, comparativamente, más behénico (22:0) que las plantas fertilizadas químicamente con fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Los resultados de este experimento sugieren que la calidad de la semilla puede ser alterada debido a los cambios fisiológicos resultantes de la colonización por bacterias fijadoras de nitrógeno y/o por los hongos endomicorrizicos VA (Pacovsky, 1988).

### 1. *Bradyrhizobium japonicum* y la fijación biológica del nitrógeno

*Bradyrhizobium japonicum* es un microorganismo fijador de nitrógeno capaz de establecer simbiosis específicamente en soya (*Glycine max* (L) Merrill). Es una bacteria gram negativa, de forma bacilar y de dimensiones medias (0.5-0.9 \* 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ ). Móvil por la presencia de flagelos peritricos o polares. Carece totalmente de formas especiales de resistencia, como esporas o quistes, aunque se ha citado la posibilidad de formar cápsulas (Walker, 1975).

En los medios de cultivo, los rizobios, producen un polisacárido extracelular que da un aspecto mucilaginoso a sus colonias y que parece tener importancia en el proceso de colonización de la leguminosa huésped.

Su metabolismo es heterótrofo, al menos en las condiciones normales de vida, y aerobio. El pH óptimo de crecimiento se encuentra próximo a la neutralidad (6.8 - 7.0), y la temperatura óptima de crecimiento fluctúa entre 30 y 35 °C.

La simbiosis que establece *Bradyrhizobium japonicum* con la planta es a través de la formación de nódulos en la corteza radical de la misma, los cuales se forman por un proceso de colonización de la raíz de la planta por la bacteria que, normalmente existe en el suelo, o bien, se aplica a manera de inóculo en la semilla, al momento de la siembra.

Los nódulos son las estructuras donde se lleva a cabo el fenómeno de la fijación biológica del nitrógeno.

La reacción química total de la fijación biológica del nitrógeno involucra el rompimiento del triple enlace de la molécula de nitrógeno ( $N_2$ ) y la subsecuente unión de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno. Estos átomos de hidrógeno se obtienen de las bacterias fijadoras a través del metabolismo de los carbohidratos de la planta. El medio acuoso de las células aporta los protones o iones hidronio que se combinan con los electrones que son transportados activamente y, de esta manera, la glucosa es oxidada y el nitrógeno es reducido.

La clave molecular en la fijación biológica del nitrógeno es la enzima microbiana nitrogenasa, "se trata de una enzima compleja, formada por dos tipos de subunidades, incapaces de actuar por si solas, requiriéndose ambas para que tenga lugar el proceso" (Postgate, 1981).

La primera subunidad está constituida, a su vez, por cuatro componentes, y la segunda por dos componentes proteicos.

Una peculiaridad del sistema de la nitrogenasa es que las dos subunidades proteicas de la enzima son desnaturalizadas por el contacto con el oxígeno. La simbiosis Leguminosa - *Bradyrhizobium* sintetiza, en el nódulo, una sustancia llamada leghemoglobina, la cual regula la tensión del oxígeno y protege a la nitrogenasa de un posible daño. La nitrogenasa necesita, además, la presencia del  $Mg^{2+}$  para su adecuado funcionamiento (Orive, 1983).

La energía utilizada en este proceso, generalmente, procede de la luz solar y del proceso de fotosíntesis de la planta. La conversión de una molécula de nitrógeno en dos moléculas de amoníaco requiere de 12 a 24 moléculas de ATP (Postgate, 1981).

Bethlenfalvay comenta que la relación existente entre la fijación del nitrógeno en el nódulo y la actividad fotosintética que la fijación del nitrógeno en el nódulo guarda una estrecha relación con la actividad fotosintética de la planta, ya que se necesita de los fotosintatos para el mantenimiento y desarrollo del nódulo, y para la fijación y evacuación del amoníaco fijado, en forma de aminoácidos. Una disminución de la fotosíntesis se traduce, generalmente, en una menor fijación (Bethlenfalvay, 1977).

La nodulación es un fenómeno sumamente complejo y se ve influido por un gran número de factores, tanto ambientales como genéticos. La existencia de nodulación, la abundancia o escasez de nódulos, su tamaño y el momento de aparición, entre otras características, dependen de la planta huésped, o de las características genéticas de la bacteria. De una adecuada selección de las cepas de *Bradyrhizobium*, dependerá la máxima fijación de nitrógeno por la planta y los máximos rendimientos en la cosecha (Brill, 1978; Champion, 1992; Hume, 1990; Lynch *et al.*, 1993; Ravuri, 1992; Vasilas, 1993).

Lynch *et al.* (1993), en su estudio sobre la actividad simbiótica entre diferentes cepas de *Bradyrhizobium*, demuestran que la inoculación con dos cepas de alta capacidad simbiótica pueden mejorar los rendimientos de semilla y fijación biológica de nitrógeno, con respecto a la inoculación simple, en condiciones climatológicas adversas.

Entre los factores ambientales que afectan a la nodulación, cabe destacar la temperatura, el pH, la humedad, la presencia de nitrógeno combinado y los microorganismos del suelo, especialmente hongos y actinomicetos (Orive, *op. cit.*).

La concentración de la bacterias de *Bradyrhizobium* utilizada en la inoculación, es otro factor determinante en el rendimiento y calidad de la cosecha. Se ha determinado que, incrementando la concentración de bacterias de  $10^5$  a  $10^6$ , en inoculantes comerciales, se aumenta el rendimiento en la cosecha en un 24 % (Hume, 1990).

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico llevada a cabo por la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, contribuyen con un considerable ahorro en cuanto a la utilización de fertilizantes nitrogenados, ya que el costo de éstos ha aumentado considerablemente en los últimos años incidiendo, a su vez, en un mayor costo de la producción. Otra ventaja de la inoculación es la disminución de la demanda de nitrógeno en el suelo, pues parece ser que las leguminosas utilizan de una manera más efectiva el nitrógeno fijado, que el aplicado directamente del suelo como fertilizante (Hernández, 1987).

## 2. Micorrizas vesículo-arbusculares

Actualmente, se han encontrado diversos problemas en la agricultura tradicional, tales como los altos costos de producción y la contaminación causada por la utilización indiscriminada de agroquímicos. La agricultura orgánica se presenta como una opción para preservar al medio ambiente. En este tipo de tecnología, los microorganismos presentes en el suelo juegan un papel determinante. Entre los microorganismos más importantes utilizados en este tipo de agricultura están los hongos micorrízicos. Estos hongos establecen una simbiosis mutualista con la raíz de las plantas superiores. En esta simbiosis, el hongo coloniza, de forma biotrófica, la corteza de la raíz. La planta le suministra sustratos carbonados procedentes de la fotosíntesis, mientras que el micosimbionte heterótrofo ayuda al vegetal a captar nutrientes minerales del suelo (Olivares, 1991; Bolan, 1991).

Existen varios tipos de micorrizas, pero la más extendida es la denominada vesículo-arbuscular (MVA), en virtud de las estructuras típicas que el hongo desarrolla en la corteza de la raíz (Olivares, *op. cit.*). Sin embargo, en algunos trabajos muy recientes sobre su caracterización, se propone la denominación de micorrizas arbusculares, considerando éste el carácter más estable (Rosendahl, 1994). Estas micorrizas se establecen en más del 90 % de las especies vegetales.

Las MVA constituyen, en la práctica, raíces fisiológicamente modificadas por la presencia del hongo. El hongo solamente coloniza la epidermis y el parénquima cortical de la raíz.

En una micorriza bien establecida se distinguen dos fases claramente diferenciadas, la intraradical y la extraradical. La primera está compuesta por las hifas del hongo que colonizan la raíz, y crecen por entre los espacios intercelulares pero que, cuando alcanzan la zona más interna de la corteza, emiten frecuentes proyecciones laterales que penetran las células y, mediante ramificaciones dicotómicas repetidas, dan lugar a los arbusculos... "En estas estructuras tienen lugar, preferentemente, el intercambio de nutrientes entre los dos simbiosis"

(Cooper, 1984). "Con posterioridad a la formación de los arbusculos, y por un engrosamiento de las hifas, se originan las vesículas, inter o intracelulares, que tienen función de almacenamiento de reservas, de tipo lipídico" (Cooper, 1978). La fase extrarradical, o micelio externo, está constituido por un conjunto de hifas que se desarrollan en el suelo, y son las encargadas de la captación de nutrimentos y agua. "Las hifas del micelio externo constituyen una superficie adicional para la captación de nutrimentos, y son capaces de explorar microhábitats del suelo inasequibles a la raíz propiamente dicha" (Abbott, 1984). "Los nutrimentos captados por el hongo son trasladados hacia el micelio interno y, una vez en los arbusculos, son transferidos mediante mecanismos activos..."

Las esporas producidas por el hongo *Glomus*, para su propagación, se denominan clamidosporas y son esporas de resistencia, de paredes gruesas, originadas, asexualmente, en los extremos de hifas vegetativas, que se distribuye entre las partículas del suelo (Walker, 1987; Olivares, *op. cit.*).

El nutrimento más importante que el hongo trasloca del suelo a la planta es el fósforo; de manera secundaria el azufre, cobre, estroncio, potasio y zinc (Asimi *et al.*, 1980; Bolan, 1991; Marschener, 1994; Pacovsky *et al.*, 1986(a,d); Vejsadová *et al.*, 1993; Wellings, 1991).

Mosse explica, como resultados de sus investigaciones, que el crecimiento de las plantas se debe, principalmente, al incremento de la absorción de fósforo. La concentración de fósforo es más grande en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas, y que la micorrización y la adición de fertilizantes fosfatados tienen efectos similares sobre el crecimiento de la planta (Mosse, 1981).

Nava, (1983) concluye, en su trabajo, que "la inoculación de maíz con *Glomus fasciculatum*, incrementó el contenido de fósforo en follaje en una escala que va de 36 a 65% con respecto a las plantas no micorrizadas. Se demostró, además, que con la inoculación se pueden igualar e incluso superar, los efectos de la aplicación de fertilizantes fosfatados".

Se ha demostrado que la micorriza incrementa la capacidad de fijación del nitrógeno en la leguminosa por la acción simbiótica con *Bradyrhizobium japonicum* (Bagyaraj *et al.*, 1979; Balbuena, 1980; Vejsadová *et al.*, 1989).

La experimentación con plantas de soya inoculadas con micorrizas VA; se ha traducido en una gran estimulación de la actividad de la nitrogenasa...

...de las plantas de soya noduladas con *Rhizobium spp.*, (140 - 170 %) por lo tanto, ésto indica una gran fijación de nitrógeno. Se ha observado en el análisis estadístico de la actividad total de la nitrogenasa, que las plantas micorrizadas presentaron una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) frente a las no micorrizadas. El aumento en la actividad de la nitrogenasa fue acompañado por una estimulación en el crecimiento de la planta. Después de 58 días, la diferencia entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas era evidente. Al momento de la cosecha, el rendimiento en grano y peso de las raíces, follaje y nódulos fue significativamente mayor en las plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas (Asimi *et al.*, 1980).

En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que la MVA mejora las relaciones hídricas de las plantas, incrementado la resistencia al estrés hídrico y aumentando la conductividad hidráulica (Barea *op. cit.*, Azcón, *op. cit.*, Cooper, *op. cit.*). Las hifas externas del hongo, tienen la capacidad de captar agua (debido a su longitud) de lugares más lejanos de la zona de deficiencia de agua, que normalmente rodea la raíz. De esta forma, la hifa sobrepasa la zona de sequía y conecta la planta con el suelo menos deficitario en agua y, la MVA contribuye a que la planta resista más la sequía.

La respuesta favorable de soya a la inoculación con hongos endomicorrízicos VA, también fue demostrada por Shenck (1973) al encontrar un mayor peso seco en las semillas de soya, con mayor contenido de aceite y proteínas, que los tratamientos testigos sin inocular.

## D. Métodos Analíticos

### 1. Métodos para análisis de proteínas

Existen diversos métodos para la cuantificación de las proteínas, todos ellos basados en algunas de sus propiedades típicas, como pueden ser: los patrones de absorción de las radiaciones electromagnéticas de los grupos aromáticos, la reactividad del enlace peptídico, su contenido de nitrógeno, etc.

Los métodos más comunes para la determinación de proteínas están basados en la determinación de un elemento como el nitrógeno, o grupo específico como la hemoglobina en la proteína. Posteriormente, se calcula la cantidad de proteína que rodea a ese elemento o grupo, mediante un factor de proporcionalidad.

La determinación de nitrógeno en una muestra de proteína, es el método más común. Se ha determinado que una mezcla pura de proteínas contiene 16 % de nitrógeno. De esto se desprende que el contenido de proteína en una muestra se obtiene al multiplicar la determinación de nitrógeno por un factor igual a  $6.25=(100/16)$ . Se han determinado factores más aproximados como son: 5.70 para trigo, 6.38 para leche y 5.55 para gelatina.

A continuación se presenta un resumen de los métodos más conocidos.

**MacroKjeldahl.** En el año de 1883, el Danés Kjeldahl trabajó en un método para la determinación del nitrógeno en las proteínas para la industria cervecera. El método ha sufrido varias modificaciones desde la primera vez que se publicó. Básicamente, con este método se determina el nitrógeno total, tanto proteico como no proteico. El método consiste en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico. Las proteínas y demás materia orgánica son oxidadas por el ácido sulfúrico; el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte, como hidróxido de sodio, se desprende amoniaco que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido

clorhídrico valorado. Por la titulación del ácido no neutralizado, se calcula la cantidad de amoníaco desprendido y, asimismo la cantidad de nitrógeno de la muestra. El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 nos da el porcentaje de proteína.

El método de Kjeldahl es el más común y, por lo tanto, permite comparar fácilmente resultados con otros laboratorios. Una de sus principales limitaciones es que puede haber pérdidas de nitrógeno debido a la temperatura de digestión y al catalizador. El contenido de nitrógeno en la proteína puede variar considerablemente y, por lo tanto, el factor usado para convertir nitrógeno a proteína. También, el nitrógeno no proteico se debe tomar en cuenta, ya que éste se mide junto con el proteico. Se usan reactivos y condiciones un tanto peligrosas. El proceso es largo.

**Dumas.** En el método clásico de Dumas (1831), el nitrógeno es liberado por pirólisis de la muestra (700-900°C). La medición de nitrógeno elemental desprendido se hace volumétricamente en un nitrómetro. Actualmente, los mayores adelantos en la tecnología garantizan una mayor precisión en la pirólisis y en la determinación de nitrógeno en materiales orgánicos.

Se puede hacer un análisis hasta en 10 minutos, con los equipos automatizados existentes en el mercado. Existen aparatos que incluyen para la determinación, cromatógrafos de gases, con lo que reducen el tiempo de análisis hasta dos minutos.

Este análisis ofrece dos limitaciones: una que los equipos son muy costosos, y la otra que la presencia de nitrógeno no proteico interfiere en las determinaciones.

Los siguientes métodos se basan en el desarrollo de color para, posteriormente, relacionar el contenido de proteína mediante una curva patrón.

**Método espectrofotométrico.** Absorción en el ultravioleta (280 nm). La mayoría de las proteínas absorben en el UV a 280 nm debido, básicamente, a grupos cromóforos de tirosina y triptofano. Si se considera que la cantidad de estos

dos aminoácidos es siempre constante, la absorbancia debe ser proporcional a la concentración de proteína. Sólo los aminoácidos aromáticos: tirosina, triptofano y fenilalanina, contienen dobles ligaduras que absorben energía radiante del ultravioleta, en forma máxima a 274.5, 278 y 260 nm, respectivamente. Al hacer esta determinación hay que recordar que todos los aminoácidos, por su estructura química, absorben a 210 nm.

Este método es muy rápido, requiere de muy poca cantidad de proteína y es un método que no destruye la muestra, por lo que ésta puede ser utilizada en otros análisis. Las determinaciones se pueden hacer bajo condiciones en las que otros métodos fallarían, como puede ser la presencia de iones amonio y algunas sales. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados con cuidado.

**Método de Biuret.** El método de Biuret fue propuesto por Riegler en 1914. Las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo púrpura-violeta con sales de cobre en soluciones alcalinas. Es posible que el color se desarrolle por la formación de un ión coordinado tetracúprico con dos grupos -CO-NH- adyacentes. La intensidad del color es determinada espectrofotométricamente a 540 nm con una curva patrón.

Este método es el más simple para medir proteína total. En este método, existen muy pocas interferencias de otros compuestos en el desarrollo de color. Sin embargo, los lípidos e hidratos de carbono por formación de complejos con el ión coordinado, causan interferencias. La presencia de  $\text{NH}_4^+$  interfiere con la reacción. Una limitación más es que se necesitan entre 20 y 40 mg de proteína. Otra desventaja es que se necesita más material de laboratorio que en otros métodos. Pinckney, en 1949, realizó algunas modificaciones al método original para determinar proteína en cereales. En el método modificado, el color se evalúa después de un período de reacción y se utiliza hidróxido de potasio, tartrato de sodio y sulfato cúprico aplicado directamente para obtener simultáneamente la extracción y reacción colorida. Los resultados correlacionan bien con la determinación de proteína por el método de Kjeldahl.

**Método Lowry.** Es el método más sensible, 100 veces más sensible que el Biuret. Relativamente rápido, ya que se hacen los análisis en una hora. Se basa en el desarrollo de un color azul, debido a: (1) reacción de Biuret, y (2) reducción del reactivo de fosfomolibdeno-volframato por aminoácidos, como tirosina y triptofano, presentes en las proteínas. La absorbancia se mide a 750 nm (alta sensibilidad) para proteínas concentradas. Se requiere de una curva patrón, que es recomendable hacer con la misma proteína. La sensibilidad va desde 0.2 a 300 microgramos.

Los inconvenientes de este método son: (1) que se requiere de mucho cuidado en la estandarización; (2) la intensidad de color varía entre proteínas; (3) el color no es siempre proporcional a la concentración. Este método presenta, además, interferencia de sacarosa, lípidos, amortiguadores de pH, monosacáridos y hexosaminas, ya que reaccionan con los reactivos de Lowry. El sulfato de amonio, los sulfhidrilos y los fosfatos, también, interfieren en la determinación (Badui, 1990).

## 2. Métodos para análisis de aceite

Los métodos para la determinación de aceite se dividen, generalmente, en dos grupos: aquellos para determinar el contenido y la composición de los lípidos en el alimento, y los relativos al análisis de las propiedades físicas y químicas de los aceites extraídos.

El propósito de este estudio fue hacer un análisis del contenido de aceite en la semilla de la soya. Para lograr este fin, la bibliografía refiere muchos métodos para la determinación no instrumental del contenido de aceite en la harina de soya. Por tal motivo, solamente se hará referencia a los más comunes.

**Soxhlet.** Método gravimétrico en el que se usa un extractor de Soxhlet que consta de tres partes: un extractor, un matraz y un refrigerante unidos por juntas esmeriladas. La muestra previamente molida y homogeneizada se pesa en un cartucho especial de celulosa. Se conecta el matraz al extractor y éste al

refrigerante. A continuación, se agrega eter etílico por el refrigerante, y se procede a calentar el matraz en parrilla eléctrica. Después de cuatro horas, se saca el cartucho con la muestra desengrasada y se sigue calentando hasta la casi total eliminación del éter, recuperando el cartucho antes de que descargue. Se quita el matraz y se calienta bajo la campana hasta la total evaporación del éter. Secar el extracto a 100 °C por 30 min., enfriar en un desecador y pesar (Pomeranz, 1982).

**Goldfisch.** Este también es un método gravimétrico que consiste en pesar en un cartucho de celulosa, 4 a 5 g de muestra previamente molida y homogenizada; tapar con algodón y colocar en un sostenedor o recipiente con el fondo perforado. El sostenedor se coloca en el aparato de Goldfisch. Por otro lado, en el vaso ya pesado se ponen aproximadamente 40 ml de éter dietílico y se coloca en el aparato de Goldfisch mediante un anillo de fierro con empaque de hule. Se sube la parrilla. Calentar durante 4 horas comprobando que la extracción haya sido completa. Al finalizar se cambia el sostenedor con el cartucho por otro recipiente cerrado sin perforación y se vuelve a calentar para recuperar el éter del vaso, éste se quita del aparato y se mete 30 min. a la estufa. Se enfría en el desecador y se pesa (Aragón y Villa, 1994; Pomeranz y Meloan, *op. cit.*).

Básicamente, los dos métodos antes mencionados son similares. Ambos, se basan en la extracción del aceite de la muestra por un solvente, aprovechando la propiedad de ser "una sustancia insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos, tales como cloroformo, hexano y éter etílico" (Badui, 1990).

Estos métodos tienen la desventaja de que son destructivos, ya que requieren moler la muestra y extraer el aceite para determinar su contenido. Además de ser métodos que consumen mucho tiempo. Sin embargo, son métodos muy comunes y, por lo tanto, permiten comparar fácilmente resultados con otros laboratorios (Pomeranz y Meloan, 1982).

Además, existen otros métodos como el de Werner-Schmid y el de Røese-Gottlieb (Pomeranz y Meloan, 1982).

**Cromatografía de gases.** "La base común para todas las técnicas cromatográficas es la migración diferencial de un soluto, debida a una fase estacionaria que propicia una atracción con una fase en movimiento" (Hamilton, 1981). Aunque existe esta base en común, hay muchas diferencias entre los diversos métodos cromatográficos.

La separación se realiza utilizando las diferentes polaridades de los lípidos y ácidos grasos. Al inyectarse una muestra de material en la corriente de un gas inerte (gas acarreador); este gas pasa a una columna que contiene un medio apropiado para que se efectúe la separación, retardando el flujo de los componentes de la muestra. Los compuestos separados emergen a diferentes intervalos, pasan a través de un detector, y se registran en un papel, obteniéndose así el cromatograma.

La cantidad de soluto es directamente proporcional al pico que se registra en el cromatograma. Para obtener un resultado más exacto, se mide el área del pico. Existen diferentes métodos para medir el área: (a) planímetro, (b) triangulación, (c) corte y peso de papel y (d) con la ayuda de un integrado digital electrónico.

Existen otros métodos instrumentales para la determinación indirecta del aceite, como es la resonancia magnética nuclear, que es un método no destructivo y altamente eficiente.

**Resonancia magnética nuclear (RMN).** La aplicación reciente de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, para el análisis del aceite en semillas, ha abierto nuevas oportunidades para los genetistas y los productores de semillas mejoradas (Collins, 1967; Pomeranz y Meloan, 1982). El método no es destructivo, y la semilla mantiene la capacidad de germinar, por lo que es una herramienta que colabora en el desarrollo de nuevas variedades de semillas (Collins, *op. cit.*). Es un método rápido, y puede ser usado para determinar el contenido de aceite en una semilla o en un lote de semillas. La humedad superior al 4 % interfiere con la determinación.

Básicamente, el método se basa en "la absorción de energía en la zona de la radiofrecuencia por parte de los núcleos de algunos átomos, cuando se colocan éstos en un campo magnético interno de alta homogeneidad" (Watty, 1982). Los elementos que se determinan, generalmente, por RMN son  $^1\text{H}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ .

El espectrómetro de RMN está compuesto de las siguientes unidades básicas: magneto, oscilador de radio frecuencia y un detector de radio frecuencia.

Este método, también, se utiliza para la determinación de las propiedades físicas y químicas de los aceites. Por este método se puede determinar la proporción de los ácidos grasos presentes en el aceite.

La espectroscopía de RMN es el método analítico rival de la espectroscopía de infrarrojo cercano (IRC) para el análisis de alimentos. El método de RMN permite realizar análisis proximales de los alimentos, de manera confiable. Este método requiere de una mínima preparación de la muestra, obteniéndose resultados rápidos y con un alto grado de precisión (Osborne, 1987).

**Espectroscopía de infrarrojo (IR).** Actualmente, las técnicas de infrarrojo están ampliamente reconocidas en diferentes sectores de la industria de los alimentos debido, principalmente, a la rapidez en los análisis proximales. Particularmente, en la industria de las semillas, la espectroscopía en el infrarrojo cercano (IRC) es aceptada como un método para el análisis de proteína y aceite. La razón principal, por la cual el método de análisis por infrarrojo es poco utilizado, es porque presenta algunas limitaciones dentro de los análisis cuantitativos de los alimentos.

A partir de 1973, la utilización de la espectroscopía de infrarrojo en el análisis de alimentos aumentó, en forma sorprendente, con la aplicación de una modalidad más moderna de la espectroscopía de infrarrojo cercano. Karl H. Norris logró obtener, de cereales y semillas, espectros en infrarrojo cercano, los cuales fueron interpretados, dando un nuevo impulso a esta tecnología. Actualmente, la técnica de Norris es la que se utiliza en la fabricación y diseño de los analizadores de

infrarrojo cercano (Osborne,*op. cit.*).

Miller en 1979, demostró las ventajas que presenta la utilización de la espectroscopía en el infrarrojo cercano en el análisis proximal de cereales. Sus principales ventajas son rapidez y precisión.

Otra ventaja de este método es que se pueden hacer determinaciones sin tener que preparar la muestra. Es un método no destructivo. Los analizadores IRC permiten que las muestras sean rápidamente analizadas. Los resultados obtenidos proporcionan información para la toma de decisiones en cuanto a calidad y precio que debe ser pagado por cada lote. Además de proporcionar criterios para el almacenamiento de las semillas. La desventaja principal es que es un método empírico, ya que no usa ninguna ley matemática que describa las interacciones fielmente. Es preciso utilizar patrones conocidos al calibrar los instrumentos lectores de los analizadores de infrarrojo cercano. Sin embargo, en los analizadores modernos, el proceso de calibración es muy rápido gracias a la existencia de programas computarizados o software que facilitan esta tarea.

El método Kjeldahl, para la determinación de proteínas, es el método frente al cual se verifican y calibran las lecturas del IRC, sin embargo, el IRC es un método mucho más rápido que el Kjeldahl.

El método IRC se utiliza para la determinación de humedad, proteína, aceite, carbohidratos, fibra dietética, ácidos orgánicos, alcoholes, constituyentes inorgánicos, daño mecánico en almidón, pureza de harinas y dureza del trigo, etc. (Osborne. *op. cit.*).

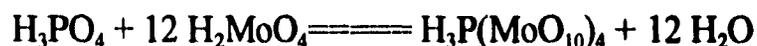
**Espectrofotometría en ultravioleta.** Este método permite la detección de los ácidos grasos más comunes. Para su determinación es preciso que los ácidos grasos polinsaturados, sean convertidos en isómeros conjugados por la acción del calor en presencia de álcalis. El método es empírico y presenta limitaciones en los procedimientos analíticos no estequiométricos (Pomeranz y Meloan, 1982).

El desarrollo de equipos ópticos y métodos basados en las diferencias de las presiones de vapor, coeficientes de partición, adsorción, y patrones de fragmentación por métodos degradantes y resonancia de electrones, son herramientas muy poderosas que proporcionan información específica muy valiosa sobre los contenidos de aceite y ácidos grasos.

### 3. Métodos para análisis de fósforo

**Método del Vanado-Molibdato:** El método del Vanado-Molibdato es el método sugerido por el A.O.A.C. para la determinación de fósforo en harina de soya. Este método es el más confiable y utilizado por la gran mayoría de los laboratorios de análisis de alimentos.

El método colorimétrico para la determinación de fósforo se basa en la formación de heteropolicomplejos, mediante la coordinación de grupos molibdato, actuando el fósforo como átomo central del complejo, remplazando los grupos molibdato a los átomos de oxígeno del grupo  $\text{PO}_4$ :



Los heteropolicompuestos, antes de su reducción, imparten a las disoluciones acuosas que los contienen, tonalidades amarillas. El color amarillo del compuesto vanadomolibdofosfórico se intensifica considerablemente por la presencia del vanadio.

La naturaleza del compuesto cromógeno amarillo del sistema vanadomolibdofosfórico se atribuye a la sustitución de los átomos de O del radical  $\text{PO}_4^-$  por radicales oxivanadio y oximolibdeno, para dar un heteropolicompuesto que es cromógeno. Las ventajas del método son su extrema simplicidad y una sensibilidad de 1 a 20 ppm de P. Otra ventaja es que el color amarillo es estable con el paso del tiempo, así como la independencia de interferencias por parte de un gran número de especies iónicas, hasta concentraciones de 1000 ppm y la

adaptabilidad a medios acidificados con  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HClO}_4$ . Los iones que no interfieren en concentraciones de hasta 1000 ppm son: Mg, Ca, Ba, Al, K, Na, Mn, Cu, Zr, cianuro, sulfato, sulfito, citrato, oxalato y benzoato.

Básicamente, existen dos vías para realizar el análisis de fósforo. Estas dos son oxidación de la muestra por vía seca ó húmeda. En el apartado referente al análisis de fósforo del Capítulo 2, Materiales y Métodos, se explicarán con detalle estos dos métodos (AOAC, 1980).

**Espectroscopía de absorción atómica.** En un análisis de absorción atómica, la muestra que contiene el fósforo se vaporiza y reduce a su estado atómico. Un rayo luminoso de una longitud de onda característica, producido por una lámpara especial, se dirige a través del eje longitudinal de una flama, hacia un espectrofotómetro. Al mismo tiempo, la solución de la muestra, previamente dispersada en forma de niebla, pasa por una flama, donde se evapora secando la sal, y el vapor de ésta se disocia en los átomos del elemento en estudio, los cuales absorben parte de la luz emitida por la lámpara. Dicha absorción se mide y se relaciona con la concentración. Cada elemento emite o absorbe luz a longitudes de onda características, que se pueden utilizar para su identificación y cuantificación.

La técnica se ha aplicado en el análisis de bebidas y alimento. Sus ventajas son: (1) una muy alta sensibilidad, (2) un límite de detección muy bajo. Además, se pueden analizar y obtener resultados, con precisión en concentraciones del orden de ppm, ppb o picogramos. Es fácil de operar, y los análisis son muy rápidos. Como desventaja principal, se tiene el que sea un método destructivo. Se necesitan estándares para comparar el problema y, solamente, se puede determinar un elemento a la vez (Watty, 1982; Hamilton *et al.*, 1981).

**Espectroscopía en el infrarrojo cercano:** Este método instrumental permite el análisis de los constituyentes inorgánicos de los alimentos. Por este método es posible la detección de contenido de fósforo en la semilla de soya. El ser un método no destructivo es una gran ventaja sobre otros métodos. Otra ventaja es su rapidez y sensibilidad (Osborne, 1987).

## II Materiales y Métodos

### A. Material biológico

#### 1. Variedad BM<sub>2</sub>

Se analizó soya *Glycine max (L.) Merrill* variedad BM<sub>2</sub>. Esta soya se obtuvo como resultado de un trabajo experimental previo titulado "Efecto de la inoculación de la soya (*Glycine max (L.) Merrill*) variedad BM<sub>2</sub>, con *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*, en comparación con la fertilización química, en suelo calcimórfico del estado de Morelos, bajo condiciones de temporal" (Gómez y Rodríguez, 1992).

Este trabajo de campo, dirigido por el M. en C. Sergio Palacios Mayorga, en el "Municipio de Miacatlán, Morelos, se ubicó geográficamente a los 18°46' de latitud norte y 99°21' de longitud oeste del meridiano de Greenwich, con una elevación promedio de 1,100 m.s.n.m., en un suelo de naturaleza calcimagnésica muy pobre en fósforo disponible" (Gómez y Rodríguez, 1992).

#### 2. Cepas bacterianas

Para la inoculación se utilizó un cultivo líquido de *Bradyrhizobium japonicum*, con una población de 10<sup>9</sup> células/ml. Se utilizó la cepa RCR 3407 de la colección de cepas del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

#### 3. Aislados fúngicos

El inoculante de *Glomus fasciculatum*, estuvo compuesto por 8.5 g de una mezcla de suelo con raíces de maíz (2.5 g) cortadas en segmentos de 0.5-0.8 cm de largo, con un promedio de infección del 70 % y 50 esporas, en promedio, por gramo de inoculante, base húmeda por tratamiento. Se utilizó la cepa E3 de la colección de cepas del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

#### 4. Fertilización química

"Como fuente de nitrógeno se aplicó sulfato de amonio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 20.5%, y como fuente de fósforo se utilizó superfosfato de calcio simple,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  al 20 %" (Gómez y Rodríguez, 1992).

#### 5. Tratamientos

El experimento desarrollado por Gómez y Rodríguez, "se estableció en una superficie de 496.8 m<sup>2</sup>, con base en un diseño experimental de bloques al azar, considerando 12 tratamientos y 4 repeticiones" (Gómez y Rodríguez, 1992).

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. 00-00-00 (Testigo absoluto).
2. Fertilizado con 40-00-00 (N,P,K).
3. Fertilizado con 00-80-00 (N,P,K).
4. Fertilizado con 40-80-00 (N,P,K).
5. Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum*.
6. Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* + 00-80-00 (N,P,K).
7. Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* + 40-00-00 (N,P,K).
8. Inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* + 40-80-00 (N,P,K).
9. Inoculado con *B. japonicum* + *Glomus fasciculatum*.
10. Inoculado con *B. japonicum* + *G. fasciculatum* + 40-00-00 (N,P,K).
11. Inoculado con *B. japonicum* + *G. fasciculatum* + 00-80-00 (N,P,K).
12. Inoculado con *B. japonicum* + *G. fasciculatum* + 40-80-00 (N,P,K).

## B. Análisis de proteína.

El análisis del contenido de proteínas en la semilla de soya se hizo por espectroscopía de infrarrojo cercano y por el método de Kjeldahl. La finalidad de realizar el análisis por estos dos métodos fue el verificar la exactitud de los datos obtenidos.

A continuación se describe el procedimiento de acuerdo a los métodos utilizados:

### 1. Espectroscopía de infrarrojo cercano

Los análisis de proteína, aceite y humedad por el método de infrarrojo cercano se realizaron con el analizador INFRATEC, modelo 1255 "Food and Feed Analyzer" (Figura 1, al final del capítulo de resultados). Este analizador se basa en la espectroscopía por transmitancia en el infrarrojo cercano. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Oleaginosas, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), en Chapingo, Estado de México.

Fundamento. La región del espectro de infrarrojo cercano comprende el intervalo de los 700 a 3000 nm. La incidencia de un haz de energía infrarroja radiante atraviesa la muestra provocando un cambio en los movimientos rotacionales y vibratorios de la moléculas de la muestra, presentándose por lo tanto un cambio de momento dipolar en las moléculas. Al absorber la energía las moléculas cambian la amplitud y frecuencia de su vibración. La medición de los diferentes tipos de vibraciones, debido al tipo de enlace característico de la molécula será el objetivo del análisis de infrarrojo cercano. Estas mediciones de las señales eléctricas o bandas son los elementos que caracterizarán los grupos funcionales y estructuras químicas que componen la molécula, por lo que es factible identificar un elemento en base a la posición que ocupa la banda dentro del

espectro. Este método instrumental de análisis es aplicado exitosamente en las determinaciones cualitativas y su aplicación se ha extendido a determinaciones cuantitativas con la utilización de métodos computarizados de calibración, reduciendo al mínimo los errores que se producían debido a que, frecuentemente, el método de infrarrojo no cumple con la ley de Beer (Osborne, 1987; Skoog, 1992).

**Procedimiento.** Mediante un programa computarizado especial, se calibra el analizador para trabajar con semilla de soya. Una vez calibrado, se seleccionan las celdas según se indica en el manual de operación del autoanalizador. Estas celdas se colocan en el compartimento destinado para la muestra. Se distribuyen las semillas de soya dentro de la serie de 5 celdas; cada anillo o celda tiene una capacidad de muestra entre 6 y 8 g. Una vez rasadas las celdas a su capacidad se cierra el compartimento dispuesto para la muestra y, automáticamente, se inicia el análisis. Después de 1 minuto, se obtienen los resultados.

## 2. Método de Macrokjeldahl

Los análisis por el método de Kjeldahl se realizaron en el Laboratorio de Biología de Suelos del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

**Fundamento.** Las proteínas y demás materia orgánica son oxidadas por el ácido sulfúrico durante el proceso de digestión; el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio. Durante el proceso de destilación se hace reaccionar esta sal con una base fuerte, se desprende amoniaco que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido valorado. Por titulación del ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoniaco desprendido y así, la cantidad de nitrógeno de la muestra. (Aragón y Villa-Novoa, 1994).

**Procedimiento.** Se pesa en balanza analítica 1 g de harina de soya homogeneizada, dentro de un papel blanco, y se introduce en un matraz de Kjeldahl de 800 ml; se agregan 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 15 ml de ácido sulfúrico concentrado; y pedazos de plato

poroso, ó perlas de vidrio, para regular la ebullición en la destilación. Lo anterior se hace con el fin de oxidar las proteínas y la demás materia orgánica. Se coloca el matraz en el digestor del aparato de Kjeldahl y se inicia la digestión a una temperatura constante, hasta la total destrucción de la materia orgánica; la solución debe quedar completamente cristalina. Este proceso se lleva a cabo en una o dos horas. Enfriar y diluir con 350 ml de agua destilada; enfriar sobre hielo. Durante la digestión, el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica y se fija como sulfato de amonio. Se requiere hacer un blanco con todos los reactivos para utilizarlo en la corrección de los cálculos.

Añadir 40 ml de una solución concentrada de hidróxido de sodio 1:1 (100 g de NaOH en 100 ml de agua) que, también, ha sido enfriada sobre hielo, haciéndola resbalar lentamente por la pared del matraz, de manera que se estratifiquen las dos soluciones, evitando agitación para no propiciar el desprendimiento prematuro de amoníaco. Se adiciona granalla de zinc ó 0.2 g de zinc en polvo y se conecta inmediatamente el matraz a la trampa de Kjeldahl, unida al refrigerante que, a su vez, está conectado a una alargadera que va sumergida en 50 ml de HCl 0,1 N (medidos con pipeta volumétrica), contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, adicionados en 5 gotas de indicador rojo de metilo 0.1 % en alcohol. Al hacer reaccionar el sulfato de amonio, con una base fuerte, se desprende amoníaco que se destila y se recibe en un volúmen conocido de ácido valorado. Las conexiones deben ser de un ajuste perfecto para evitar las fugas.

Una vez conectado el matraz, agitar vigorosamente para mezclar las dos capas e, inmediatamente, colocar en la parrilla (ya caliente) del destilador, regulando la ebullición. Se destila, aproximadamente, hasta un volúmen de 250 ml. Suspender la destilación, retirando primero el matraz con el destilado de manera que la alargadera quede por encima del nivel y, antes de apagar la parrilla, dejar destilar unos minutos con el objeto de lavar la alargadera por dentro y después lavarla por fuera recogiendo el líquido de los lavados en el mismo matraz.

Titular el exceso de ácido con solución valorada de NaOH 0.1N, hasta que vire al amarillo del indicador. La titulación del ácido no neutralizado permite conocer la cantidad de amoníaco desprendido y, así, la cantidad de nitrógeno de la muestra (AOAC, 1980, Aragón y Villa-Novoa, 1994).

El porcentaje de proteína cruda se calcula como sigue:

$\% \text{ Nitrógeno} = [(\text{mlblanco} - \text{mlproblema}) * \text{N}(\text{NaOH}) * 0.014 * 100] / \text{peso de la muestra en gramos.}$

$\text{meq Nitrógeno} = 0.014$

El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 dá el porcentaje de proteína cruda (Aragón y Villa-Novoa, 1994).

Titular el exceso de ácido con solución valorada de NaOH 0.1N, hasta que vire al amarillo del indicador. La titulación del ácido no neutralizado permite conocer la cantidad de amoníaco desprendido y, así, la cantidad de nitrógeno de la muestra (AOAC, 1980, Aragón y Villa-Novoa, 1994).

El porcentaje de proteína cruda se calcula como sigue:

$\% \text{ Nitrógeno} = [(\text{mlblanco} - \text{mlproblema}) * \text{N}(\text{NaOH}) * 0.014 * 100] / \text{peso de la muestra en gramos.}$

$\text{meq Nitrógeno} = 0.014$

El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 dá el porcentaje de proteína cruda (Aragón y Villa-Novoa, 1994).

## **C. Análisis de aceite**

### **1. Espectroscopía de infrarrojo cercano:**

La técnica y el fundamento de la espectroscopía de infrarrojo cercano fueron descritos en el apartado correspondiente al análisis de proteína.

### **2. Resonancia magnética nuclear:**

El análisis del contenido de aceite en la semilla de soya se realizó en el laboratorio de oleaginosas del INIFAP. Se utilizó un analizador de resonancia magnética nuclear (R.M.N.) de banda ancha, NEWPORT ANALYSER, modelo MK-III (Figura 2, al final del capítulo de resultados).

**Fundamento.** Es un método espectrofotométrico de análisis no destructivo, el cual está basado en la absorción de energía en la zona de radiofrecuencia de los núcleos de algunos átomos, cuando se colocan éstos en un campo magnético interno de alta homogeneidad. El espectro obtenido es un gráfico que ofrece la intensidad de la absorción de la energía en función de la intensidad del campo magnético (Hart, 1991).

**Procedimiento.** El método para el análisis del contenido de aceite en la semilla se realizó por el método de R.M.N. El análisis se inicia con el secado de la muestra en estufa a 100 °C, con el fin de retirar la mayor cantidad de humedad posible de la semilla, ya que las moléculas de agua interfieren con el análisis.

Se pesa una muestra, aproximadamente, de 27 g dentro de una celda. Se registra el peso y se introduce dentro del aparato de resonancia magnética nuclear, se obtiene una lectura y se calcula el porcentaje de aceite en la muestra según el procedimiento indicado en el siguiente apartado.

### Cálculos:

$$\text{Factor para aceite de soya puro (F)} = (\text{Peso de la muestra} / \text{Lectura por RMN}) * 100$$

El factor utilizado es la lectura que se obtiene del aparato de RMN para una muestra patrón del aceite de soya puro. El factor utilizado fue  $29.68 = (24.9596 / 84.1) * 100$

$$\% \text{ de aceite en la muestra} = [(\text{Lectura de la muestra por RMN} * F) / \text{Peso de la muestra}]$$

### 3. Cromatografía de gases

El análisis del contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla de soya se realizó en el Laboratorio de oleaginosas del INIFAP, en Chapingo, Estado de México.

El método utilizado para la separación y cuantificación de ácido grasos fue el de cromatografía de gases utilizando metilato de sodio, para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos. La separación se efectuó mediante columna de acero inoxidable de dos metros de largo empacada con Dietilen glicol succinato (DEGS) al 15% en Chromosorb W.A.W. con malla 80/100.

El detector para este caso fue ionización de flama, el equipo de cromatografía es marca VARIAN, modelo 3700.

Fundamento. La cromatografía de gases es un proceso en el cual la mezcla problema se separa en sus partes constituyentes, por una fase gaseosa móvil que pasa sobre un adsorbente sólido fijo. La muestra es inyectada y vaporizada rápidamente por efecto de una alta temperatura, la cual una vez mezclada con un gas acarreador pasa por la columna. Un detector cuantifica el paso de la sustancias eluyentes en el gas acarreador, a medida que salen de la columna. Todos los detectores están diseñados para producir una señal eléctrica, como resultado de un efecto físico causado por la sustancia eluyente. Se amplifica la señal y se aplica a un registrador que hace una trazo referente a la sustancias que se eluyen, o se aplica

a un integrador electrónico y a un equipo de procesamiento de datos. Para el análisis de alimentos, el detector más utilizado es el de ionización de flama, el cual es muy sensible y tiene unos límites de respuesta lineal muy amplios (Gordon, 1990, Egan *et al.*, 1987).

**Procedimiento.** Se molió la semilla de soya, en un molino de aspas por 30 segundos. Se tomó una muestra de 0.5 g y se colocó en un tubo de ensayo. Se la agregaron 2 ml de hexano y se agitó por 30 segundos. Se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 15,000 rpm, en una centrífuga IEC, modelo K, serie 71651846. Después, se tomó una alícuota, se pasó a un tubo de ensayo con rosca y se añadieron 2 gotas de metilato de sodio, para obtener los ésteres metílicos. Se agitó y se dejó reposar por unos minutos.

Se agitó y se tomaron de 1 a 2 microlitros de muestra con una jeringa, para inyectarlos en el cromatógrafo. La temperatura de la columna fué de 180° C. El receptáculo donde se inyectó se encontraba a 220° C y el detector a 230° C. Por último, al cabo de unos minutos, se obtuvieron los resultados en un graficador VARIAN, modelo 9176 (Gráfica 16).

**Cálculos.** La concentración de los ácidos grasos se obtuvo por el método de normalización de áreas con la ayuda del método de triangulación.

## D. Análisis de fósforo

Los análisis de fósforo se realizaron en el Laboratorio de biología de suelos, del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

El fósforo presente en la semilla se determinó por el método oficial y tradicional del Vanado-Molibdato, vía seca, propuesto por el AOAC (1980), y se verificaron los datos por el método del Vanado-Molibdato, vía húmeda.

Fundamento. El método del Vanado - Molibdato para el análisis de fósforo se basa en la reacción de Misson. La solución ácida que contiene ortofosfato se trata con un reactivo que contiene ácido molíbdico y ácido vanádico, para formar un complejo estable de color amarillo naranja del ácido vanadomolibdofosfórico ( $H_3PO_4$ ,  $VO_3M$ ,  $11 MoO_3$ ,  $nH_2O$ ). La absorción máxima es a 330 nm, sin embargo, se han publicado trabajos en los que se han obtenido resultados satisfactorios en el intervalo de 420-480 nm, si se tiene el cuidado de que la luz sea monocromática. A continuación, se describen los métodos empleados (Ayres, 1970, Egan, *et al.*, 1987).

### 1. Método del Vanado-Molibdato, vía seca

Material y Equipo. Matraces volumétricos de 100 ml, pipetas volumétricas de 1 y 10 ml, probeta de 50 ml y espectrofotómetro.

Reactivo compuesto de vanado-molibdato. Disolver 20 g de molibdato de amonio en 400 ml de agua desionizada caliente (50° C) y enfriar. Disolver en un matraz aforado de 1 litro, 1 g de vanadato de amonio en 300 ml de agua hirviendo; enfriar y adicionar 140 ml de ácido nítrico concentrado; agitar, en seguida se agrega la solución de molibdato a la solución de vanadato, poco a poco agitando, para luego; aforar a 1 litro, con agua destilada.

Solución tipo de fosfato. Preparar una la solución que contenga 3.3834 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por litro. Tomar 25 ml de ésta solución y llevarlos a 250 ml de agua destilada.  $1\text{ml} = 0.2\text{ mg de P}_2\text{O}_5$ .

Preparación de la curva patrón. A una serie de matraces volumétricos de 100 ml, añadir las siguientes alícuotas de la solución diluída de fosfato, 0, 2.5, 5, 10, 20 y 30 ml. Agregar de 50 a 60 ml de agua destilada en cada matraz. Añadir unas gotas de la solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a cada matraz y acidificar con  $\text{HNO}_3$  (1:2). Posteriormente, agregar 25 ml del reactivo de vanado-molibdato, diluyendo al aforo y homogeneizar. Dejar reposar 10 minutos, y leer en el espectrofotómetro a 470 nm.

Procedimiento. Colocar 1 g de la muestra en un crisol de porcelana; añadir 3 ml de una solución saturada de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , mezclar bien con una agitador de vidrio. Limpiar el agitador con un pedazo pequeño de papel filtro y dejar ese pedazo de papel en el crisol. Secar la muestra en estufa por dos horas, a  $100^\circ\text{C}$ . Transferir el crisol a una mufla y calcinar a  $550^\circ\text{C}$  por 6 a 8 hr., hasta obtener cenizas blancas. Si las cenizas no son blancas, después de este tiempo, dejar enfriar el crisol y, posteriormente, humedecer las cenizas con unas gotas de ácido nítrico (1+2). Secar en la estufa a  $100^\circ\text{C}$ , y volver a calcinar a  $550^\circ\text{C}$  hasta obtener cenizas blancas. Enfriar el crisol y cubrirlo con un vidrio de reloj. Hervir las cenizas con 10 ml de  $\text{HCl}$  (1+4), para disolverlas. Añadir 5 ml más de ácido clorhídrico. Transferir cuantitativamente la solución sobre un matraz volumétrico de 100 ml, lavando con agua destilada. Filtrar, si fuera necesario. Neutralizar con  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta pH 7-7.2 (el volumen de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , en este paso, deberá ser entre 50 y 60 ml), y luego, acidificar con  $\text{HNO}_3$  (1:2). Tomar una alícuota de 10 ml y agregar 25 ml del reactivo de vanado-molibdato, aforando después al volumen del matraz (AOAC, 1980, Aragón y Villa-Novoa, *op. cit.*). Tomar 10 ml, colocarlos en un celda del espectrofotómetro y medir la densidad óptica a 470 nm, después de dejar reposar 10 minutos. Se utilizó un espectrofotómetro marca SPECTRONIC, modelo 20, serie 563245.

**Cálculos:**

Obtener la concentración en mg del pentóxido de fósforo interpolando de la curva patrón.

$$\frac{(\text{Conc. en mg de P}_2\text{O}_5 \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 100)}{\text{Peso de la muestra}} = \text{mg de P}_2\text{O}_5 / 100 \text{ mg de muestra}$$

**1. Método del Vanado-Molibdato, vía húmeda**

**Material y Equipo.** Matraces Erlenmeyer de 500 ml para realizar las digestiones, placa eléctrica con termostato, buretas, matraces aforados de 50 ml, y un espectrofotómetro.

**Reactivos.** Disolución ternaria de los ácidos: HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HClO<sub>4</sub>. Se prepara mezclando 100 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado, 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 40 ml de HClO<sub>4</sub> al 60 % (cualquier cantidad en la proporción en volumen 10:1:4), dejando que se enfríe antes de utilizarla.

**Procedimiento:**

**Precauciones.** La digestión previa de la harina con HNO<sub>3</sub>, antes de la adición de HClO<sub>4</sub>, es muy importante para eliminar el peligro de explosiones e incendios. Si el ácido perclórico es de concentración superior al 60 % nunca deberá ser añadido directamente sobre la harina.

**Predigestión.** Se coloca la muestra de harina en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y 5 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado por cada gramo de harina. Se imprime al frasco un movimiento giratorio con el fin de humedecer toda la muestra, se coloca el matraz sobre una placa eléctrica a una temperatura de 180 a 200° C. El frasco se conecta al sistema de aspirado con el fin de eliminar los óxidos de nitrógeno y condensar los vapores ácidos que no hayan reaccionado. Se hierve la suspensión hasta que se reduzca casi a sequedad. Esta predigestión requiere unos 45 minutos.

**Digestión.** Una vez frío el matraz, después de la predigestión, se añaden 5 ml de la mezcla ternaria ( $\text{HNO}_3$  -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  -  $\text{HClO}_4$ ) por cada gramo de harina. La digestión se prolonga a temperatura de 180 a 200 °C hasta que aparezcan los humos blancos de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HClO}_4$ . El proceso de digestión se continúa hasta que quede una disolución clara después de la volatilización de los ácidos, y se haya evaporado en su mayor parte.

**Determinación:** una vez digerida la muestra, se añaden 30 ml de ácido clorhídrico que no exceda la normalidad de 0.8. Posteriormente, se añaden 10 ml del reactivo de vanadomolibdato y se diluye la disolución hasta 50 ml con agua destilada, mezclando bien. El color se desarrolla rápidamente pero, usualmente, se lee una vez transcurridos 10 minutos, con el fin de asegurar que se alcance la intensidad máxima. El color se mide en el colorímetro en un intervalo de absorbancia de 400 a 490 nm. Generalmente, se utiliza un filtro de 470 nm (AOAC, 1980, Aragón y Villa-Novoa, *op. cit.*). Se usó un espectrofotómetro marca SPECTRONIC, model 20, serie 563245.

**Cálculos.** Obtener la concentración en mg del pentóxido de fósforo interpolando de la curva patrón.

$$\frac{(\text{Conc. en mg de } \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 100)}{\text{Peso de la muestra}} = \text{mg de } \text{P}_2\text{O}_5 / 100 \text{ mg de muestra}$$

## E. Análisis estadístico

Desde el punto de vista del planteamiento estadístico se proponen dos hipótesis estadísticas.

$H_0$ : No existe diferencia significativa ( $P=0.01$ ) entre los tratamientos experimentados, en cuanto al contenido de humedad, peso de 1000 semillas, contenido de proteína y aceite en semilla, concentración de ácidos grasos, fósforo total en semilla.

$H_1$ : Sí existe diferencia significativa entre los tratamientos experimentados, en cuanto a estas mismas variables.

En cuanto a la normalidad de los datos experimentales, obtenidos para cada uno de los análisis de cada tratamiento, se supone que cumplen con una distribución normal o del tipo gaussiana; llamada así en honor de Karl F. Gauss, quien dedujo una ecuación para la descripción de este tipo de distribuciones..

Para el análisis de los datos, y con base en la normalidad de los mismos, se utilizó una prueba de hipótesis paramétrica. Esta prueba de hipótesis es el análisis de varianza. El análisis de varianza es, además, una técnica por la cual la variación total es dividida en componentes en algún sentido, es decir, establece grupos de tratamientos con medias comprendidas dentro de un intervalo de variabilidad.

Por último se utilizó la prueba de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre cada grupo.

El nivel de significancia se define como la probabilidad de cometer un error de tipo I, es decir, la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es verdadera. En otras palabras, el nivel de significancia es el parámetro máximo que se puede permitir para equivocarse o cometer un error en la toma de decisiones con

respecto a la hipótesis nula. Para el análisis, se estableció un nivel de significancia de 0.05. Una de las razones principales por las que se eligió este nivel de significancia es porque durante la experimentación en campo, existió una gran cantidad de variables difíciles de controlar, como pueden ser una posible mutación de los microorganismos utilizados en la biofertilización; la pureza de los fertilizantes químicos; y la respuesta de la planta a las condiciones de cultivo. Sin embargo, para fines de investigación, y con la intención de mostrar un estudio estadístico más completo y de utilidad, se presentan los resultados a un nivel de confiabilidad del 1 % (Galdeano B., Federico, comunicación personal, 1994, y Walpole, 1989).

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa estadístico para computadora STATGRAPHICS 5.0, en el Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

### III. Resultados y Discusión

#### A. Efecto de la fertilización química

Los tratamientos fertilizados con agroquímicos fueron: el 2 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 3 (80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Los resultados de los análisis se muestran en el apartado de los cuadros de resultados, al final del capítulo.

##### 1. Contenido de proteína

El análisis de varianza y prueba de Tukey, muestran que al comparar los tratamientos fertilizados con agroquímicos, T2, T3 y T4, frente al testigo absoluto; no existen diferencias significativas en el contenido de proteína ( $P=0.05$  y  $P=0.01$ ) (Tabla 1 y 2 del apéndice). Los resultados de este experimento muestran que la fertilización química, por sí sola, no provocó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de proteína en la semilla (Gráfica 2 al finalizar el presente capítulo). Sin embargo, en el análisis por IRC, se puede observar que, numéricamente, el tratamiento 4 presentó un contenido mayor de proteínas (36.2%), que el T3 (35.5%); y éste, a su vez, mayor que el T2 correspondiente a 35.4% (Gráficas 4 y 7). Las observaciones de Markley (1957) y Chávez (1983), concuerdan con estos resultados, demostrando que la fertilización química completa provoca un aumento en el contenido de proteína, en mayor proporción que la fertilización parcial, con nitrógeno ó fósforo (Cuadro 1 al finalizar el presente capítulo).

El análisis de proteínas se realizó, también, por el método de macrokjeldahl. Este análisis muestra una diferencia numérica entre los tratamientos 4 y 1, sin embargo, no se observa, en el análisis estadístico, una diferencia significativa ( $P=0.05$  y  $0.01$ ) entre el tratamiento 4 y el testigo absoluto (Cuadro 1 y Tablas 3 y 4 del apéndice).

## 2. Contenido de aceite

Sobre el contenido de aceite, no se detectaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ), al comparar los tratamientos 2 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); 3 (80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), frente al testigo; tanto en los análisis realizados por R.M.N. como por IRC (Cuadro 2 y Tablas 5 y 8 del apéndice). Es importante hacer notar que el testigo absoluto presentó, numéricamente, un contenido mayor de aceite en comparación con los tratamientos fertilizados con agroquímicos. De esta manera se observa que, de los tratamientos fertilizados con agroquímicos, el tratamiento 4 presentó el menor contenido de aceite (Cuadro 2). Los resultados de este experimento indican que la fertilización química completa aplicada en el T4, se relaciona con un contenido menor de aceite en comparación con los tratamientos 2 (únicamente con nitrógeno) y 3 (únicamente con fósforo).

Markley (1992) y Crafts-Brandner (1992), observaron que la aplicación de fertilizante fosfatado incrementa el contenido de aceite en la semilla, en comparación con la aplicación de fósforo y nitrógeno combinados. Estas observaciones son similares a los resultados en este experimento, ya que al comparar los resultados de los tratamientos 2 y 4 se puede observar, que el contenido de aceite aumentó en forma numérica, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo.

## 3. Contenido de ácidos grasos

En cuanto al contenido de ácidos grasos, la fertilización química, en este experimento, no influyó de manera significativa en el contenido de los ácidos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, ya que en el análisis de varianza y prueba de Tukey, los resultados de los tratamientos 2, 3 y 4, frente al testigo absoluto, no mostraron diferencias significativas ( $P=0.05$  y  $P=0.01$ ) (Cuadro 3 y Tablas de la 9 a 14 del apéndice). Se ha observado que la variación en la calidad del aceite, en cuanto al contenido de ácidos grasos se da, principalmente, en función de la temperatura de cultivo y del genotipo (Cherry *et al.*, 1985; Dombos *et al.*, 1992;

Howell y Collins, 1957; Hawkins *et al.*, 1983; Rennie *et al.*, 1988 y Wilson *et al.*, 1980).

#### 4. Contenido de fósforo en la semilla

Por lo que respecta al contenido de fósforo en la semilla por hectárea, el análisis de la semilla, fertilizada con agroquímicos, mostró que los tratamientos 2 (40 kg/ha de N) y 3 (80 kg/ha de P), no presentaron diferencias significativas frente al testigo, en el contenido de fósforo. Sin embargo, se observa que la utilización de fertilizante fosfatado, únicamente, provoca un aumento de 23.86 % frente al testigo (Cuadro 4). Pal *et al.* (1989), observó un aumento de 27.5 a 33.0 % en el contenido de fósforo en las hojas bajo las mismas condiciones de fertilización.

La evaluación del contenido de fósforo en el tratamiento 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , mostró un aumento altamente significativo ( $P=0.01$ ), al compararse frente al testigo absoluto (Gráfica 12 y Tabla 16 del apéndice). Asimismo, el T4 mostró el contenido de fósforo en la semilla por hectárea, más alto de todos los tratamientos químicamente fertilizados (46.0 %) (Cuadro 4). De esta manera, se puede observar por los resultados obtenidos en este experimento, que la fertilización completa aumenta significativamente, el contenido de fósforo en la semilla por hectárea (Gráfica 7). Es importante hacer notar que la aplicación de la fertilización química completa (T4), incrementó, de manera altamente significativa ( $P=0.01$ ), el contenido de fósforo en la semilla por hectárea, comparada con la aplicación del fertilizantes fosfatado, únicamente, probada en el tratamiento 2.

#### 5. Contenido de humedad

En la evaluación del contenido de humedad en la semilla de soya, no se observaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ), al comparar los tratamientos, 2, 3 y 4, frente al T1 (Cuadro 5 y Tabla 19 del apéndice). Esto se debió, probablemente, al tipo y condiciones de almacenaje, ya que permanecieron en un ambiente seco por un tiempo prolongado, desde la cosecha hasta el análisis cuantitativo.

## 6. Peso de las semillas

Los resultados del peso de 1000 semillas no mostraron diferencia significativa ( $P=0.05$  y  $P=0.01$ ), los tratamientos 2 (40 kg/ha de N), 3 (80 kg/ha de P) y 4 (40 kg/ha de N + 80 kg/ha de P) al compararlos con el T1 (Tablas 21 y 22 del apéndice).

Las diferencias sólo fueron numéricas, alcanzando el mayor peso las semillas del tratamiento 4 con fertilización química (138.23g), siguiendo el tratamiento 3 con fertilización fosfatada (135.7g) y, por último, el tratamiento 2 (128.3g) con fertilización nitrogenada, únicamente (Cuadro 5). Tanto en el presente ensayo, como en el trabajo de Grabau, (*op. cit.*) se pudo observar que la aplicación de fósforo, favoreció el aumento en el peso de 1000 semillas. Cabe hacer notar que en el tratamiento 2 se encontró el menor peso, aún menor que en el testigo, con un peso de 128.86 g.

Se observó, que con la aplicación de la fertilización química completa, experimentada en el tratamiento 4, se favorece el aumento en el contenido de proteína, disminuyendo el contenido de aceite (Gráfica 7). En los tratamiento, 2 y 3, con fertilización individual, nitrogenada y fosfatada, respectivamente, se observa una disminución en el contenido de proteína y un aumento en el contenido de aceite. Por último, se puede ver que el T1 presenta la mayor concentración de aceite y la menor concentración de proteína respectivamente (Gráfica 1). Es importante hacer notar que, tanto en los trabajos de Mercado-Pineda, 1985 como en el presente ensayo, se observó una relación inversa entre el contenido de proteína y el de aceite.

## B. Efecto de la biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum*

La biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum*, únicamente, se probó en el tratamiento 5.

### 1. Contenido de proteína

Se puede observar que la aplicación de *Bradyrhizobium japonicum* tuvo un efecto altamente significativo ( $P=0.01$ ) en el contenido de proteínas en la semilla, al comparar el tratamiento 5 (41.4%) con al testigo absoluto (33.8%) (Cuadro 1 y Tablas 1 y 2 del apéndice). Este tratamiento junto con los tratamientos 7 y 9 (*Bradyrhizobium - Glomus*), presentaron la concentración máxima de proteínas en semilla. El porcentaje de incremento del T5 frente al testigo (T1) absoluto es de 22.5 % (Gráfica 7).

Entre otros autores que coinciden con los resultados de este ensayo, está Bueno (1981), quien experimentó bajo condiciones de invernadero, y Flores-Román y Palacios-Mayorga (1987), bajo condiciones de campo. Estos autores encontraron que el *Bradyrhizobium japonicum* tiene un efecto positivo en el contenido de proteínas aumentándolo, de manera significativa, y alcanzando aún valores iguales o más altos que los tratamientos fertilizados con agroquímicos.

Los porcentajes de incremento de los tratamientos 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), frente al testigo, es de 8.9 % y 22.5 %, respectivamente. Esta diferencia muestra que, en este experimento, la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, además de tener un efecto altamente significativo ( $P=0.01$ ), supera 3.3 veces a la fertilización química, en la obtención de proteínas (Gráficas 3 y 7).

## 2. Contenido de aceite

En cuanto al contenido de aceite, los resultados del análisis de varianza y prueba de Tukey muestran que existe una diferencia significativa ( $P=0.05$ ), al comparar el T5 con el testigo absoluto (T1), tanto para el aceite determinado por RMN, (21.0%) como por IRC (20.9%) (Tabla 5 y 7 del apéndice). El tratamiento 5 contiene menor cantidad de aceite que el testigo absoluto (23.9% por R.M.N. y 23.7% por IRC) (Cuadro 2). El porcentaje de decremento del tratamiento 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente) es de 12.1 % por lo que, en este experimento, se observa que la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, tiene como efecto el decremento en el contenido de aceite, (Gráfica 7) pero a su vez, provoca un aumento de proteína; de esta manera se mantiene la relación inversa señalada por Markley, 1950 (Gráfica 1).

## 3. Contenido de ácidos grasos

Los resultados del análisis de varianza relativos al contenido de ácidos grasos, no presentan diferencias significativas, al comparar el tratamiento 5 con el testigo absoluto (Cuadro 3). Por lo tanto, el contenido de ácidos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, no muestran una variación significativa. De esta manera se puede observar que, en este experimento, la utilización de *Bradyrhizobium japonicum* no influyó en la calidad del aceite (Gráfica 8).

Sin embargo, tanto los hallazgos de Pacovsky (1988), como los del presente trabajo muestran que las plantas del T5, noduladas con *Bradyrhizobium japonicum*, presentaron un mayor porcentaje de ácido oleico, en la semilla, al compararse con las plantas del T2, fertilizadas con nitrógeno químico, sin embargo, este aumento no pudo ser comprobado en el caso de los ácidos linoleico y linolénico (Cuadro 3 y Gráficas 8 y 9).

## 4. Contenido de fósforo en la semilla

Algunos autores como Bueno, *op. cit.*, indica que la inoculación con

*Bradyrhizobium japonicum*, aumenta la absorción de fósforo en la semilla. Sin embargo, en el presente ensayo, el aumento en el contenido de fósforo en semilla por hectárea, por el efecto de la inoculación de *B. japonicum* no fue estadísticamente significativo ( $P=0.05$ ), ya que únicamente se observaron diferencias aritméticas principalmente entre los tratamientos 1 y 5, con 27.8 y 33.94 kg/ha respectivamente. (Gráfica 12, Cuadro 4 y Tablas 15 y 16 del apéndice).

#### 5. Contenido de humedad

En el contenido de humedad en la semilla, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.05$ ), al comparar el tratamientos 5 con el T1 (Cuadro 5). Esto se debió principalmente, al tipo y condiciones de almacenaje, ya que se almacenaron en un ambiente seco por un tiempo prolongado, desde la cosecha hasta el momento del análisis cuantitativo.

#### 6. Peso de las semillas

Al comparar el efecto de la biofertilización simple con *Bradyrhizobium japonicum*, con el testigo absoluto, no se observó diferencia significativa ( $P=0.05$ ) en el peso de 1000 semillas, sin embargo, sí se pudo observar un aumento numérico, que va de 128.86 g en el T1; a 145.3 g en el T5, lo que representa un incremento del 12.7% (Gráfica 14 y Tabla 21 del apéndice). Flores y Palacios-Mayorga, (1987) en su experimento bajo condiciones de campo, indican que la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* propicia un aumento en el peso de 100 semillas en un 10 %; en el presente ensayo, el aumento registrado fue numéricamente mayor.

El porcentaje de incremento del tratamiento 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), frente al testigo absoluto, es de 7.3 % y 12.8 %, esto muestra que la utilización del *Bradyrhizobium japonicum* provocó, en este experimento, un aumento del peso en 1.7 veces más que la fertilización química (Gráfica 7).

### C. Efecto de la biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* y fertilización química

El efecto de la biofertilización *Bradyrhizobium japonicum* y fertilización química, se experimentó en los tratamientos 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

#### 1. Contenido de proteína

El máximo contenido de proteínas, en el presente ensayo, se obtuvo con el tratamiento 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), con 41.5 % (Cuadro 1). Este tratamiento presentó la concentración numéricamente más alta. Asimismo, el porcentaje de incremento fue de 22.5 %, 14.7%, 0.14%, 1.8%, 0.14% y 1.7 %, con respecto a los tratamientos 1, 4, 5, 8, 9 y 12, respectivamente (Gráfica 7). No obstante, este tratamiento, fue estadísticamente similar a los tratamientos 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 9 (doble inoculación *Bradyrhizobium* - *Glomus*, únicamente), 10 (*Bradyrhizobium* - *Glomus* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium* - *Glomus* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium* - *Glomus* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y, a su vez, significativamente diferentes frente al testigo absoluto (Cuadro 1 y Tablas 1 y 2 del apéndice).

Al comparar, el tratamiento 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), con el tratamiento 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), se puede observar, en el análisis de varianza, que no existió diferencia significativa en cuanto al contenido de proteínas ( $P=0.05$ ) (Gráfica 3 y Tabla 1 del apéndice). Sin embargo, la aplicación del *Bradyrhizobium japonicum*, propició un aumento de 12.6 %, en el contenido de proteínas, y un decremento de aceite del 10.5 %, (Gráfica 7); esta observación ya había sido descrita por Markley (1950) y Rivas (1989).

## 2. Contenido de aceite

El análisis de varianza y prueba de Tukey de los resultados de los análisis realizados por IRC del contenido de aceite, de los tratamiento 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), muestran diferencias significativas ( $P=0.05$ ), con respecto al testigo absoluto (Tabla 5 de apéndice). Asimismo, los análisis realizados por RMN, de los mismos tratamientos, muestran una diferencia significativa a  $P=0.05$  (Cuadro 2 y Tabla 7 del apéndice).

Por otra parte, en los tratamiento 6, 7 y 8, se observaron decrementos del 15.0 %, 15.3 % y 13.4 %, respectivamente, a través del análisis por IRC, y respecto al testigo absoluto, lo que indica que la utilización de fertilizantes químicos y el *Bradyrhizobium japonicum*, trae como consecuencia un decremento en el contenido de aceite. Esta apreciación se tiene más claramente, al comparar el tratamiento 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), con el tratamiento 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), donde se observó un decremento de 10.5 % (Gráficas 6 y 7).

## 3. Contenido de ácidos grasos

En cuanto al contenido de ácidos grasos: palmítico, esteárico, oleico y linoleico, no se observaron, en general, diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo. Sin embargo, al comparar el tratamiento 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), con el testigo absoluto, se presentó una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) en el contenido de ácido linolénico. De la misma manera, el tratamiento 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), presentó una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ) en el contenido del mismo ácido graso (Cuadro 3 y Tabla 14 del apéndice).

Por otro lado, los datos de este experimento muestran que la aplicación del *Bradyrhizobium japonicum* más 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , en el tratamiento 7, ó la fertilización completa experimentada en el tratamiento 8, (*Bradyrhizobium*

*japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , favorecen el descenso del ácido linolénico en el aceite, en un 14.4 % y 20.9 %, respectivamente (Gráficas 8 y 9). Por último, se observa que la aplicación de 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , produjo disminución en un 8.2 % del ácido linolénico, según comparación del rendimiento del tratamiento 7 con el del 8. Es importante hacer notar que en el desarrollo de variedades nuevas de soya, se tiene como objetivo disminuir el contenido de ácido linolénico, ya que este ácido es el responsable del mal olor y sabor del aceite de soya, así como de la inestabilidad del mismo.

El tratamiento 6 dio, numéricamente, el contenido más alto de ácido palmítico y ácido esteárico, con 12.6 % y 3.9 %, respectivamente, así como el valor más bajo de ácido oleico, con 23.54 %, de todos los tratamientos del presente ensayo. Aunque existen diferencias porcentuales, estadísticamente no se observaron diferencias significativas a ninguno de los niveles probados (Gráfica 10 y Tablas 9, 10 y 11 del apéndice).

Los 3 valores más altos de ácido linoleico en el ensayo, se presentaron en los tratamientos 8 (53.2%), 7 (53.1%) y 6 (53.1%), sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo (Cuadro 3 y Tabla 12 del apéndice). Se observó en general, que la aplicación de 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en forma individual o combinada con 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , a la soya inoculada con *Bradyrhizobium japonicum*, favorece la síntesis de los ácidos palmítico, esteárico y linoleico, disminuyendo considerablemente la síntesis de los ácidos oleico y linolénico (Gráficas 8, 9 y 10).

#### 4. Contenido de fósforo en la semilla

En el contenido de fósforo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, al comparar los resultados de los tratamientos 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

Los porcentajes de incremento de los tratamientos 6, 7 y 8, con respecto al testigo, fueron de 15.8 %, 19.8 % y 16.9 %, respectivamente (Gráficas 4 y 7). Al obtener los porcentajes de incremento de los tratamientos 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), se puede observar que la aplicación de fertilización completa tuvo, como consecuencia, un aumento en 4.5 % de fósforo en la semilla por hectárea. De la misma manera, al comparar el tratamiento 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), frente al tratamiento 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), el porcentaje de incremento fue de 24.9 %. Es importante hacer notar que, a pesar de estos incrementos, las diferencias, en ambos casos, no fueron estadísticamente significativas, según se puede observar en la prueba de Tukey (Cuadro 4 y Tablas 15 y 16 del apéndice).

#### 5. Contenido de humedad

En los tratamientos 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), no se observaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ) frente al testigo (Cuadro 5 y Tablas 19 y 20 del apéndice). Tampoco se observaron diferencias significativas entre estos mismos tratamientos.

Los porcentajes de incremento de los tratamiento 6, 7 y 8, son 0.4 %, 1.2 % y 2.4 %, respectivamente. Como se puede observar, en este experimento, ninguno de los factores de fertilización influyó en el contenido de humedad de manera significativa.

#### 6. Peso de las semillas

La aplicación de fertilizantes químicos, en los tratamientos 6 (*Bradyrhizobium japonicum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 7 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha

de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , mostró, en todos los casos, un efecto altamente significativo ( $P=0.01$ ), al compararse con el testigo absoluto (Tablas 21 y 22 del apéndice).

Los porcentajes de incremento, son los siguientes, para los tratamientos 6 7 y 8, 19.8 %, 21.1 % y 28.2 %, respectivamente.

Es importante hacer notar que al comparar el tratamiento 4 ( 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), con el tratamiento 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), se observa, también, una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ) (Tabla 22). Por lo tanto, en este experimento, los resultados indican, que la aplicación del *Bradyrhizobium japonicum* favorece el aumento significativo ( $P=0.01$ ) del peso de la semillas de soya (Gáfica 15). Por otro lado, al comparar el tratamiento, 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente) frente al tratamiento 8 (*Bradyrhizobium japonicum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), se observa una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ), por lo que la aplicación del fertilizante químico (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) tuvo un incremento del 13.7 %, en el peso de 1000 semillas de soya (Cuadro 5 y Tabla 22 del apéndice).

## D. Efecto de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum*

El efecto de la doble inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y el hongo endomicorrízico vesículo arbuscular, *Glomus fasciculatum* se probó en el tratamiento 9.

### 1. Contenido de proteína

El contenido de proteína en el tratamiento 9 fue significativamente mayor que en el testigo absoluto. Esto demuestra que la doble inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum* tiene como efecto una elevación en el contenido de proteína en la semilla (Gráfica 2 y Tabla 1 del apéndice). Vejsadová (1992), entre otros autores, ha demostrado que la MVA tiene como función principal la traslocación de fósforo del suelo a la planta. Se ha demostrado que el aporte de fósforo por la MVA favorece, de manera positiva, la fijación biológica del nitrógeno, aumentando la cantidad de nódulos en la raíz. En este mismo sentido, Pacovsky, *et. al.* (1986d), han demostrado que la utilización de la MVA, favorece la simbiosis *Glycine* - *Bradyrhizobium japonicum*, por lo que el contenido de nitrógeno en la semilla aumenta entre 5 y 7 veces. Los resultados de Pacovsky *et al.* (1986d), son similares a los obtenidos en este experimento ya que el contenido de proteína en la semilla del T9, analizado por IRC, aumentó en 22.4 %, comparando con el T1 (Gráfica 7).

Tanto el análisis por IRC, como el análisis por macrokjeldahl, mostraron una diferencia altamente significativa, en el contenido de proteína ( $P=0.01$ ), al compararse el tratamiento 9 con el testigo absoluto (Cuadro 1 y Tabla 3 del apéndice).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los tratamientos 5 (*Bradyrhizobium* únicamente), 7 (*Bradyrhizobium* + (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y 9 (*Bradyrhizobium*- *Glomus*, únicamente) produjeron los máximos rendimientos de proteína en la semilla, con un 41.4, 41.5 y 41.4 %, respectivamente, ésto representa un 22.4, 22.6 y 22.4 % de incremento, respectivamente, con respecto al T1. De la misma manera, al someterse los resultados obtenidos por macrokjeldahl a un análisis de varianza y prueba de Tukey, por separado, se observaron diferencias altamente significativas ( $P=0.01$ ) en comparación al testigo, este hecho corrobora, las determinaciones realizadas por el método de IRC (Cuadro 1 Tablas 2 y 4 del apéndice).

Al compararse el tratamiento 4 con el 9, no se observaron diferencias estadísticas en los resultados obtenidos por IRC, pero se observó que el análisis estadístico de los resultados obtenidos por la metodología de macrokjeldahl muestra una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) (Cuadro 1 y Tablas 1 y 3 del apéndice). El método de macrokjeldahl, es un análisis que determina todo el nitrógeno existente en el material analizado, tanto el nitrógeno proteico como el no proteico, mientras que el método basado en la espectroscopía IRC, determina solamente el nitrógeno proteico, esta puede ser la causa principal por la que un método difiera en contenido de nitrógeno y arroje un resultado estadístico diferente. Sin embargo, se puede observar que la doble inoculación puede igualar o superar a los rendimientos de proteína obtenidos con la fertilización química (Gráfica 2 y Cuadro 1).

Al comparar el tratamiento 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), con el tratamiento 9, doblemente inoculado (*Bradyrhizobium* - *Glomus*), no se observaron diferencias significativas entre estos dos tratamientos y numéricamente el contenido de proteína es el mismo, por esto se deduce que la MVA, en este ensayo, no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de proteína en la semilla. Vejsadová, *et al.* (*op. cit.*, c) indican que la aplicación de MVA y *Bradyrhizobium japonicum*, mejora el crecimiento y rendimiento de la soya, por el efecto que tiene la MVA sobre la simbiosis tripartita, sin embargo, no se pudo observar este efecto en cuanto al contenido de proteínas.

## 2. Contenido de aceite

En relación al contenido de aceite, se observó en el análisis de varianza y prueba de Tukey, una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ), al comparar los resultados del tratamiento 9 con el testigo absoluto, tanto en el análisis por RMN como el realizado por IRC (Cuadro 2 y Tablas 5 y 7 del apéndice). El T1 presentó mayor contenido de aceite que el T9 (Gráfica 5). El porcentaje de decremento del tratamiento 9 (*Bradyrhizobium - Glomus*) con respecto al testigo absoluto, es de 15.5 % (Gráfica 7). En este ensayo, se muestra que la aplicación de la doble inoculación, causa un decremento en el contenido de aceite, quedando de manifiesto, nuevamente, la relación inversa entre el contenido de aceite y de proteína (Gráfica 1).

Al compararse el tratamiento 4 con el 9, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.05$ ) en los resultados obtenidos por IRC (Tabla 5 del apéndice). Estos resultados muestran un decremento en el contenido de aceite al compararse con el testigo. El tratamiento 5 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), no presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento 9, doblemente inoculado (*Bradyrhizobium - Glomus*), por lo que la micorriza VA, en este experimento, no propició un efecto sobre el contenido de aceite (Gráfica 5). El porcentaje de decremento de los tratamientos, 4, 5 y 9 con respecto al testigo, son 3.2 %, 12.1 % y 15.5%, respectivamente, esto demuestra que la doble inoculación repercutió en una disminución del contenido de aceite, seguido por el tratamiento 5 en el que se aplicó *Bradyrhizobium japonicum* únicamente y, por último, la fertilización química completa con 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Gráfica 7).

## 3. Contenido de ácidos grasos

Por lo que respecta al resultado del análisis de varianza del contenido de ácidos grasos, no se observaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ), al comparar, el tratamiento 9 con el testigo absoluto. Por lo tanto, el contenido de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico, no muestran una

variación significativa (Cuadro 3 y Tablas 9, 10, 11, 12 y 13 del apéndice). De esta manera se puede observar que, en este experimento, la doble inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum*, no influyó en la calidad del aceite. Lo mismo sucede al comparar el tratamiento 9 con el 4, por lo que la utilización de los dos microorganismos y la fertilización química completa no influyen en la calidad del aceite (Gráfica 8).

Pacovsky (1986 e), demostró que las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*, contienen más ácidos grasos totales en la semilla que las plantas fertilizadas con nitrógeno químico. En el presente ensayo, se observó que el tratamiento 9 (inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*), contiene una mayor concentración en ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico que el tratamiento 2, (fertilizado únicamente con 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Sin embargo, la concentración de los ácidos palmítico y esteárico, es menor. También, Pacovsky (*op. cit.*, e) observó que las plantas inoculadas con MVA y *Bradyrhizobium*, contienen menor cantidad de ácido linoleico que las plantas fertilizadas con fósforo químico, esta observación pudo ser corroborada durante este ensayo, ya que el tratamiento 9 con 51.79 %, presentó menor cantidad de ácido linoleico que el T3 (80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), con 51.64 %, fertilizado con fósforo químico (Gráfica 11 y Cuadro 3). Es preciso hacer notar que las diferencias, en todos los casos, son numéricas y no estadísticamente significativas.

#### 4. Contenido de fósforo en la semilla

En el contenido de fósforo en la semilla por hectárea no se observó una diferencia significativa, al comparar el tratamiento 9 (*Bradyrhizobium* - *Glomus*), con el testigo absoluto (Cuadro 4 y Tabla 15 del apéndice).

Pacovsky (1986) en sus estudios sobre la triple simbiosis *Glycine* - *Glomus* - *Bradyrhizobium*, menciona que las plantas doblemente inoculadas, presentan un contenido similar de fósforo en las hojas, al de las plantas inoculadas y fertilizadas con fósforo químico. También, observó que estas plantas produjeron una mayor cantidad de fitomasa.

Los resultados anteriores concuerdan con los resultados obtenidos por Gómez y Rodríguez (1992), que muestran que el tratamiento 9 (*Bradyrhizbium* - *Glomus*) presentó un aumento del peso seco del follaje en un 60.48 %, respecto al testigo absoluto. Como se puede observar, existió un aumento en el peso seco del follaje en el T9. Tomando en cuenta las consideraciones de Pacovsky, se puede concluir que el fósforo adicional, aportado por la MVA, posiblemente, fue utilizado en la formación de fitomasa y no acumulado en la semilla. Es muy probable que por esta razón, no se obtuvieran diferencias estadísticamente significativas en el contenido de fósforo en la semilla por hectárea (Gráfica 12 y Tabla 15 del apéndice).

### 5. Contenido de humedad

En la evaluación del contenido de humedad en la semilla, no se observaron diferencias significativas ( $P=0.05$  y  $P=0.01$ ), al comparar el tratamientos 9 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum*), con al testigo absoluto (Tabla 19 del apéndice).

### 6. Peso de las semillas

El peso de 1000 semillas mostró una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ), al comparar el tratamiento doblemente inoculado (T9, con 160.83g) con el testigo absoluto (T1, con 128.86g) (Gráfica 14 y Tabla 22 del apéndice). La respuesta favorable de la soya a la inoculación con MVA ha sido demostrada. Shenck y Hinson (1973), quienes encontraron que la MVA propicia un aumento en el peso de la semilla. Asimismo, Wiersama y Orf (1992), encontraron que la inoculación con *Bradyrhizobim japonicum* aumentó el rendimiento entre un 1.7 y 41.0 %, y el peso de la semilla entre 1.8 y 18.0 %.

Bagyaraj, *et. al.* (1979) entre otros autores, han demostrados que la MVA propicia un aumento en el peso de las semillas. De la misma manera, Vejsadová *et. al.* (1993) demostró, en su trabajo, que la doble inoculación (*Bradyrhizobium* - *Glomus*) propicia un aumento del 28 % en el peso de seco de la semilla. Como se

puede observar, en los resultados del presente ensayo, la doble inoculación tuvo un efecto altamente significativo ( $P=0.01$ ), en el peso de 1000 semillas, aumentando el peso de la semilla en 24.8 %, comparando con el testigo absoluto (Gráfica 7, Cuadro 5 y Tabla 22 del apéndice).

El tratamiento 9, comparado con el 4, mostró una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) en el peso de 1000 semillas. Este resultado demuestra que la doble inoculación supera el peso obtenido con la fertilización química completa (Gráfica 14 y Tabla 22 del apéndice).

puede observar, en los resultados del presente ensayo, la doble inoculación tuvo un efecto altamente significativo ( $P=0.01$ ), en el peso de 1000 semillas, aumentando el peso de la semilla en 24.8 %, comparando con el testigo absoluto (Gráfica 7, Cuadro 5 y Tabla 22 del apéndice).

El tratamiento 9, comparado con el 4, mostró una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) en el peso de 1000 semillas. Este resultado demuestra que la doble inoculación supera el peso obtenido con la fertilización química completa (Gráfica 14 y Tabla 22 del apéndice).

## E. Efecto de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum* y fertilización química

El efecto de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum* y fertilización química, fue probada en los tratamientos 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

### 1. Contenido de proteína

En los tratamientos 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), el análisis de varianza y prueba de Tukey indican diferencias altamente significativas, tanto al 1% como al 5%, al compararse con el testigo absoluto (Cuadro 1 y Tablas 1 y 2 del apéndice). Los porcentajes de incremento de los tratamiento 10, 11 y 12 fueron de 21, 3 %, 22.1 % y 20.5 %, respectivamente, (Gráficas 4 y 7). Como se puede observar en los resultados del experimento, la doble inoculación y la aplicación de fertilizantes químicos tuvo un efecto positivo y altamente significativo ( $P=0.01$ ) en el rendimiento de proteína en la semilla (Gráficas 4 y 7 y Tablas 1 y 2 del apéndice).

Para observar el efecto que tiene la micorriza en el contenido de proteína, bajo condiciones de fertilización química, se contrastaron los tratamientos 12 con 8, 11 con 6, y 10 con 7. El resultado del análisis de varianza y prueba de Tukey muestran que no existen diferencias significativas al 5 % de probabilidad, por lo que la MVA no propició un aumento en el contenido de proteínas. Esta observación, también, fue hecha por Vejsadová, *et al.* (*op. cit.*, c) quien afirma que la MVA influyó positivamente en el número de vainas y semillas en cada vaina, pero no en la concentración de nitrógeno en las semillas.

## E. Efecto de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum* y fertilización química

El efecto de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum* y fertilización química, fue probada en los tratamientos 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

### 1. Contenido de proteína

En los tratamientos 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), el análisis de varianza y prueba de Tukey indican diferencias altamente significativas, tanto al 1% como al 5%, al compararse con el testigo absoluto (Cuadro 1 y Tablas 1 y 2 del apéndice). Los porcentajes de incremento de los tratamiento 10, 11 y 12 fueron de 21, 3 %, 22.1 % y 20.5 %, respectivamente, (Gráficas 4 y 7). Como se puede observar en los resultados del experimento, la doble inoculación y la aplicación de fertilizantes químicos tuvo un efecto positivo y altamente significativo ( $P=0.01$ ) en el rendimiento de proteína en la semilla (Gráficas 4 y 7 y Tablas 1 y 2 del apéndice).

Para observar el efecto que tiene la micorriza en el contenido de proteína, bajo condiciones de fertilización química, se contrastaron los tratamientos 12 con 8, 11 con 6, y 10 con 7. El resultado del análisis de varianza y prueba de Tukey muestran que no existen diferencias significativas al 5 % de probabilidad, por lo que la MVA no propició un aumento en el contenido de proteínas. Esta observación, también, fue hecha por Vejsadová, *et al.* (*op. cit.*, c) quien afirma que la MVA influyó positivamente en el número de vainas y semillas en cada vaina, pero no en la concentración de nitrógeno en las semillas.

La comparación del tratamiento 12 con el 9 (*Bradyrhizobium japonicum*, únicamente), permitió apreciar el efecto de la fertilización química sobre la simbiosis y en el contenido de proteínas en la semilla. El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas, por lo que la fertilización química, en este experimento, no influyó en el contenido de proteínas (Tablas 1 y 2 del apéndice).

Vejsadová, (*op. cit.*, c) demostró que la aplicación de *Bradyrhizobium* - *Glomus* tiene un efecto mayor en el crecimiento de la planta y rendimiento de la semilla, que la aplicación de los microorganismos por separado. En el presente ensayo, se compararon los tratamiento 10 con el 2 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 con el 3 (80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 con el 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), para observar la influencia de *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum* en el contenido de proteína. Se pudo observar en el análisis de varianza, que existe una diferencia significativa ( $P=0.05$ ), al comparar el tratamiento 10, con el 2 y 11 con el 3. El porcentaje de incremento fue 16.0 y 16.3 %, respectivamente (Gráfica 4 y Tabla 1 del apéndice). Sin embargo, al contrastar, el tratamiento 12 con el 4 no se observó una diferencia significativa, siendo el porcentaje de incremento de 12.7 %; comparativamente inferior al de los tratamientos antes contrastados (Gráfica 3). Los resultados anteriores, demuestran parcialmente, que el *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*, tuvieron un efecto positivo en el contenido de proteína en la semilla.

## 2. Contenido de aceite

En cuanto al contenido de aceite, se observaron diferencias significativas similares a las encontradas para proteínas, pero de manera inversa. Es decir que, en los tratamientos donde se aumenta el contenido de proteínas disminuye el contenido de aceite (Gráfica 1).

Los tratamiento 10, 11 y 12, presentaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ) en el contenido de aceite, al compararse con el testigo absoluto (Gráfica 6 y Tabla 5 del apéndice) . Los porcentajes de decremento son 14.7 % para el tratamiento 10, 15.8 % para el tratamiento 11 y 12.2 % para el tratamiento 12 (Gráficas 4 y 7).

Al contrastar el tratamiento 12 con el 9, para observar el efecto de la fertilización química completa, el análisis de varianza no muestra una diferencia significativa a ningún nivel, en los dos métodos analíticos, IRC y RMN (Cuadro 2 y Tablas 5, 6, 7 y 8 del apéndice).

Tampoco se observó que la MVA, por sí sola, tuviera un efecto significativo sobre el contenido de aceite, ya que al comparar el tratamientos 10 con el 7; el 11 con el 6, y el 12 con el 8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.05$ ) (Tablas 5, 6, 7 y 8 del apéndice).

Por último, al comparar el tratamiento 10 con el 2 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); el 11 con el 3 (80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y el 12 con el 4 (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), para observar, la influencia de *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*, en el contenido de aceite, nuevamente, se observó en el análisis de varianza, que existe una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) (Tablas 5 y 7 del apéndice). De la misma forma que para el contenido de proteína no se observó una diferencia significativa (al 5 % de probabilidad) al contrastar, el tratamiento 12 con el 4 (Gráfica 6 y Tablas 1 y 5 del apéndice). Los resultados de este ensayo muestran: (1) que la relación inversa entre contenido de proteína y contenido de aceite no se altera con la aplicación de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum* (Gráfica 1); (2) los dos microorganismos simbióticos ejercen un efecto sobre el contenido de proteína y, por lo tanto, este efecto repercute en una baja en el contenido de aceite; (3) en el presente ensayo, la soya fue sembrada en un suelo del tipo calcimórfico, que se caracteriza por tener una alta capacidad para retener el fósforo y dificultar la biodisponibilidad de este elemento para las plantas. Esta característica dificulta y, en algunos casos, impide la respuesta de las leguminosas a la fertilización fosfatada (Gómez y Rodríguez, 1992). Por otra parte, la aplicación de dosis bajas y medias de fertilizantes nitrogenado y fosfatado, respectivamente, no aumentó la biodisponibilidad de estos agroquímicos. Estos dos factores pudieron influir para que la doble inoculación y la fertilización química, no hayan propiciado los efectos esperados (Gráfica 7 y Cuadro 2).

### 3. Contenido de ácidos grasos

El análisis de varianza y prueba de Tukey, de los resultados correspondientes al análisis de ácidos grasos, indica que no se observaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ), en el contenido de los ácidos: palmítico, esteárico, oleico y linoleico, en los tratamientos 10 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), y 12 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), al compararlos con el testigo absoluto (Cuadro 3 y Tablas 9, 10, 11 y 12). Se observa, además, una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ) en el contenido de ácido linolénico, en el tratamiento 11, al ser comparado con el testigo (Tabla 14). El porcentaje de decremento en este tratamiento es de 25.4 %, también, comparado con el testigo (Gráfica 10). Es necesario hacer notar que los tratamientos 11 y 12, presentaron el menor contenido de ácido linolénico y palmítico de todos los tratamientos (Gráfica 8).

Además, se hace notar que los tratamientos 2, 3, 4, 5, y 9 presentaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ) al compararse con al tratamiento 11. El porcentaje de decremento de estos tratamientos es de: 29.7, 27.5, 30.1, 25.5 y 31.3 %, respectivamente. Como se puede observar, el ácido linolénico, disminuyó de manera significativa al contrastar el tratamiento 11 con el 3, lo que puede hacer pensar que el factor causante de esta diferencia es la interacción simbiótica de los microorganismos *Bradyrhizobium* - *Glomus*, sin embargo, comparando el tratamiento 10 con el 2 y 12 con el 4 no presentaron esta diferencia significativa por lo que es necesario hacer más estudios para demostrar la hipótesis de la posible influencia de los simbioses en el contenido de ácido linoleico en el aceite.

Al realizar la comparación de los tratamientos 12 con el 9 mediante la prueba de Tukey, no se observó una diferencia significativa por lo que es difícil probar que la fertilización química repercutió en la concentración de los diferentes ácidos grasos (Gráfica 8 y Tablas 9, 10, 11, 12 y 13).

En el tratamiento 12, al ser comparado con el tratamiento 8, se observaron diferencias estadísticamente significativas, lo que hace pensar que la MVA es un factor que tiende a disminuir la cantidad de ácido linolénico. Sin embargo, al comparar los tratamientos, 11 con el 6 y 10 con el 7 no se observaron estas diferencias en el análisis estadístico, por lo que esta hipótesis no pudo ser comprobada de manera concluyente.

Diferentes autores han observado que el grado de madurez, el genotipo y la temperatura, entre otros factores modifican la calidad del aceite y contenido de ácidos grasos en la semilla (Bourges *et al.*, 1981; Markley, 1950 y Dornbos y Muller, 1992). Los resultados del presente ensayo, indican que la biofertilización, también, puede ser un factor que influye en la concentración de los ácidos grasos, sin embargo los resultados son limitados. Por este motivo, es necesario mantener los esfuerzos de la investigación en este problema, para la obtención de resultados más concluyentes.

#### 4. Contenido de fósforo en la semilla

El análisis de varianza, al 5 % y 1 % de significancia, para la variable contenido de fósforo por hectárea, indica una diferencia altamente significativa en el tratamiento 12, al ser comparado con al tratamiento 1 (Gráfica 13). La aplicación de la doble inoculación *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus fasciculatum*, más la fertilización completa (40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), propicia un aumento altamente significativo con respecto al testigo (Gráfica 7 y Tabla 16). Además, es importante comentar que, numéricamente, el tratamiento 12 presentó el valor más alto de todos los tratamientos en cuanto al contenido de fósforo por hectárea en la semilla (Cuadro 4).

Con el objetivo de ver cual ha sido el aporte de la fertilización química 40 kg/ha de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , se comparó el tratamiento 12 con el 9, determinándose una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ) y un porcentaje de incremento del 34.0 % (Gráfica 7 y Tabla 16).

La experimentación con MVA, ha demostrado que la principal función de estos hongos es la de traslocar el fósforo del suelo a la planta. Con el objetivo de observar el efecto de la micorriza sobre el contenido de fósforo en la semilla, se compararon los tratamientos, 12 con el 8, 11 con el 6, y 10 con el 7. Solamente al comparar el caso del tratamiento 12 con el 8 se observó una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) en el contenido de fósforo, mientras que en las otras dos comparaciones no se observó esta diferencia. Sin embargo, en las otras dos comparaciones no se observaron diferencias significativas. Los datos de este experimento muestran que no hubo consistencia en los tratamientos y, por lo tanto, pudieron existir múltiples factores que alteraron el resultado previsto.

El efecto de la doble inoculación *Bradyrhizobium* - *Glomus* sobre el contenido de fósforo en semilla, no fue estadísticamente significativo. Esto se observó al comparar los tratamientos 12 con el 2, 11 con el 3 y 12 con el 4 (Gráficas 4 y 7). Al igual que en las comparaciones de los tratamientos, para observar el efecto de la micorriza sobre el contenido de fósforo en la semilla por hectárea, en este caso, los factores que pudieron intervenir en la obtención de un resultado diferente al esperado pudieron ser muy diversos, como pudo ser la biodisponibilidad del fósforo debido al tipo del suelo, o la posibilidad de la utilización del fósforo traslocado por la MVA en otra parte de la planta o de la simbiosis.

### 5. Contenido de humedad

En esta variable no se encontró una diferencia significativa ( $P=0.05$ ) en los tratamientos 10 y 11. Sin embargo, el contenido de humedad en el tratamiento 12 fue, numéricamente, el más alto de todos los tratamientos del presente ensayo, además de presentar una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ), al compararse con el testigo absoluto (Cuadro 5 y Tablas 19 y 20).

En diversos estudios, se ha puesto de manifiesto que la MVA mejora las condiciones hídricas de las plantas, incrementado la resistencia al estrés hídrico y aumentando la humedad en los tejidos (Barea, *op. cit.*; Azcón, *op. cit.*, Cooper, *op. cit.* y Gianiazzi, *op. cit.*). Al comparar el tratamiento 12 con el 8, se observó que

existe una diferencia significativa ( $P=0.05$ ). El porcentaje de incremento es de 5.5 %. Aparentemente, la MVA tuvo un efecto positivo en el contenido de humedad de la semilla, por lo que estos resultados son similares a los encontrados en la bibliografía. No obstante, es importante hacer notar que el tipo de almacenaje, también pudo influir en la variación del contenido de humedad del tratamiento 12.

### 6. Peso de las semillas

Los tratamientos 10, 11 y 12, estuvieron dentro de los cuatro tratamientos que alcanzaron los mayores pesos en 1000 semillas. Estos tratamientos presentaron diferencias significativas tanto al 1% como al 5 %, al compararse con el testigo absoluto (Cuadro 5 y Tablas 21 y 22 del apéndice). Los porcentajes de los incrementos de estos tratamientos, referidos al testigo, son 24.8, 29.1 y 29.0 %, respectivamente (Gráficas 4 y 7).

Bagyaraj, *et. al.*, 1979 entre otros autores, han demostrado que la micorriza propicia un aumento en el peso de las semillas. De la misma manera, Vejsadová *et. al.* (1993) indican que la inoculación con MVA, produce un 17 % de incremento en el peso de la semilla y que la doble inoculación (*Bradyrhizobium - Glomus*) aumenta el peso en un 28 %. En el presente ensayo, se compararon los tratamientos 10 con el 2, 11 con el 3 y 12 con el 4, de tal manera que al estar la fertilización química como una constante, se pudiera observar el efecto de la doble inoculación. Por lo tanto, los resultados de estas observaciones son similares al los del autor anteriormente citado, ya que se encontró una diferencia altamente significativa ( $P=0.01$ ), en el peso de 1000 semillas, lo que indica, que la doble inoculación tiene un efecto positivo en el peso de la semilla (Cuadro 5, Gráficas 4 y 7, y Tablas 21 y 22 del apéndice).

## F. CUADROS

### CUADRO 1. ANALISIS DE PROTEINA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO Y MACROKJELDAHL

TRATAMIENTOS	PROTEINA POR IRC %	PROTEINA POR MACROKJELDAHL %
T1 Testigo absoluto	33.8	34.0
T2 40-00-00 (N,P,K)	35.4	
T3 00-80-00 (N,P,K)	35.5	
T4 40-80-00 (N,P,K)	36.2	36.9
T5 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	41.4**	
T6 <i>B. japonicum</i> 00-80-00 (N,P,K)	41.0**	
T7 <i>B. japonicum</i> 40-00-00 (N,P,K)	41.5**	
T8 <i>B. japonicum</i> 40-80-00 (N,P,K)	40.7**	
T9 <i>B. japonicum</i> + <i>G. fasciculatum</i>	41.4**	43.3**#
T10 <i>B. j.</i> + <i>G. f.</i> + 40-00-00 (N,P,K).	41.0**	
T11 <i>B. j.</i> + <i>G. f.</i> + 00-80-00 (N,P,K).	41.3**	
T12 <i>B. j.</i> + <i>G. f.</i> + 40-80-00 (N,P,K).	40.8**	

\*\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.01).

# = Diferencia significativa frente al T4 (P=0.05).

### CUADRO 2. ANALISIS DE ACEITE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO Y RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

TRATAMIENTOS	ACEITE POR IRC %	ACEITE POR R. M. N. %
T1	23.7	23.9
T2	23.3	23.5
T3	23.1	23.4
T4	22.9	23.1
T5	20.9*	21.0**
T6	20.2**#	20.5**#
T7	20.1**#	20.6**#
T8	20.6**	21.0*
T9	20.1**	21.6
T10	20.2**	21.4*
T11	20.0**	21.3*
T12	20.8*	20.9**

\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.05).

\*\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.01).

# = Diferencia significativa frente al T4 (P=0.05).

**CUADRO 3. ANALISIS DE ACIDOS GRASOS EN EL ACEITE, POR CROMATOGRAFIA DE GASES.**

<b>% DE ACIDOS GRASOS</b>					
<b>TRATAM.</b>	<b>PALMITICO</b>	<b>ESTEARICO</b>	<b>OLEICO</b>	<b>LINOLEICO</b>	<b>LINOLENICO</b>
T1	12.4	3.8	23.9	52.1	7.8
T2	12.3	3.6	23.9	52.6	7.6
T3	12.3	3.9	24.8	52.6	7.4
T4	11.9	3.6	24.4	52.5	7.6
T5	12.1	3.9	24.8	51.9	7.3
T6	12.6	4.0	23.6	53.1	6.8
T7	12.5	3.8	23.8	53.1	6.7*
T8	12.2	3.6	24.9	53.2	6.1***
T9	11.9	3.4	25.3	51.8	7.6
T10	11.8	3.8	25.6	52.2	6.8
T11	12.4	3.8	25.6	52.5	5.8***
T12	11.6	3.7	24.8	52.5	7.5

\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.05).

\*\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.01).

## = Diferencia significativa frente al T4 (P=0.01).

CUADRO 4. ANALISIS DE FOSFORO POR EL METODO DE VANADO-MOLIBDATO, POR OXIDACION VIA SECA Y HUMEDA, EXPRESADOS EN KG POR HECTAREA.

TRATAMIENTOS	FOSFORO VIA SECA (Kg/Ha)	FOSFORO VIA HUMEDA (Kg/Ha)
T1 Testigo absoluto	27.8	32.8
T2 40-00-00 (N,P,K)	25.2##	25.2##
T3 00-80-00 (N,P,K)	34.4	31.4
T4 40-80-00 (N,P,K)	40.6**	40.5
T5 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	33.9	33.7
T6 <i>B. japonicum</i> 00-80-00 (N,P,K)	33.0	
T7 <i>B. japonicum</i> 40-00-00 (N,P,K)	33.0	
T8 <i>B. japonicum</i> 40-80-00 (N,P,K)	32.5	
T9 <i>B. japonicum</i> + <i>Gl. fasciculatum</i>	34.4	
T10 <i>B. j.</i> + <i>G. f.</i> + 40-00-00 (N,P,K)	30.1##	
T11 <i>B. j.</i> + <i>G. f.</i> + 00-80-00 (N,P,K)	34.5	
T12 <i>B. j.</i> + <i>G. f.</i> + 40-80-00 (N,P,K)	46.2**	

\*\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.01).

## = Diferencia significativa frente al T4 (P=0.01).

CUADRO 5. ANALISIS DE HUMEDAD Y PESO DE LAS SEMILLAS.

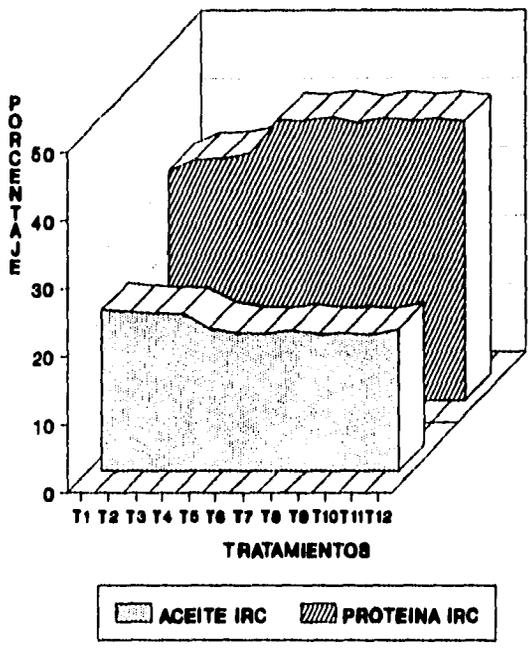
TRATAMIENTOS	HUMEDAD %	PESO DE LAS SEMILLAS (g)	RENDIMIENTO Kg/ha (GR)
T1	8.2	128.9	2126.79
T2	8.5	128.3	2176.86
T3	8.5	135.7	2294.71
T4	8.5	138.2	2335.64
T5	8.4	145.3	2797.63
T6	8.2	154.4**	2765.13
T7	8.3	156.0**	3053.74
T8	8.4	165.2***##	3016.80
T9	8.4	160.8**	3259.55
T10	8.1	160.8**	2833.32
T11	8.1	166.4**	2957.49
T12	8.9**	166.3**	3220.13

\*\* = Diferencia significativa frente al T1 (P=0.01).

## = Diferencia significativa frente al T4 (P=0.01).

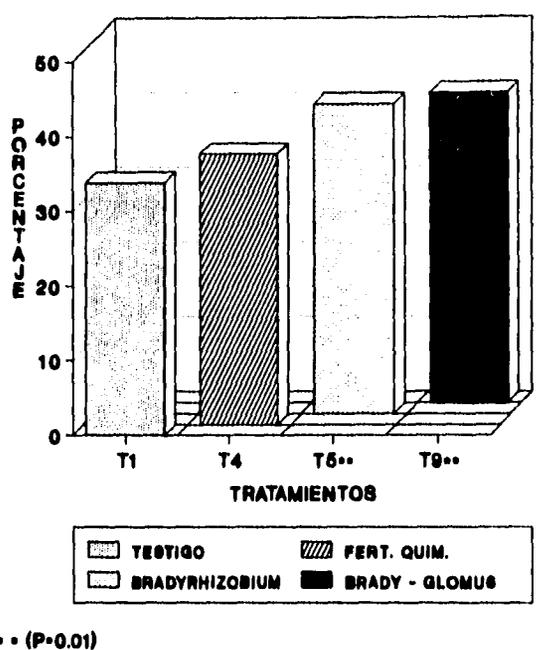
GR = (Gómez y Rodríguez, 1992).

**ANALISIS DE PROTEINA Y ACEITE POR IRC**



GRAFICA 1

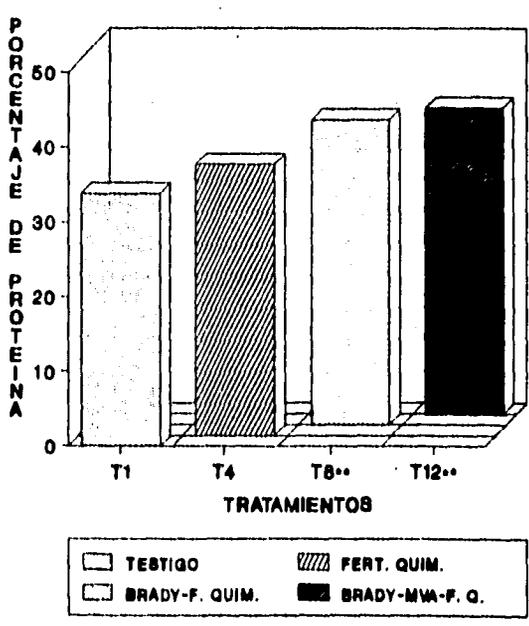
**EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y LA BIOFERTILIZACION EN EL CONTENIDO DE PROTEINA**



\*\*\* (P<0.01)

GRAFICA 2

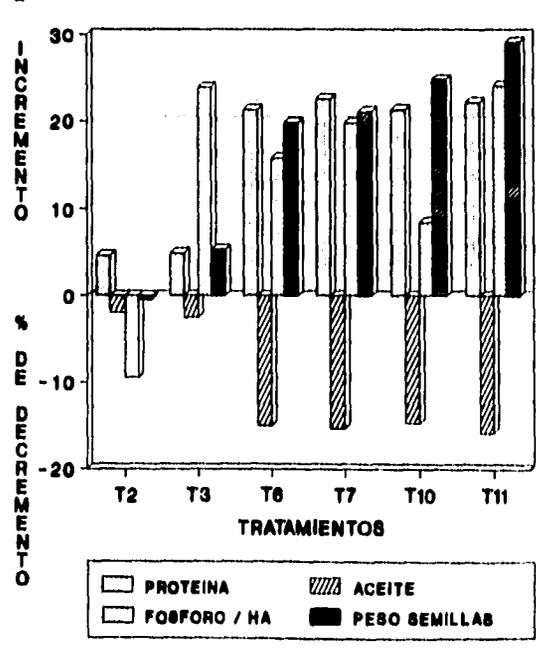
**EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y LA BIOFERTILIZACION EN EL CONTENIDO DE PROTEINA**



\*\*\* (P<0.01)

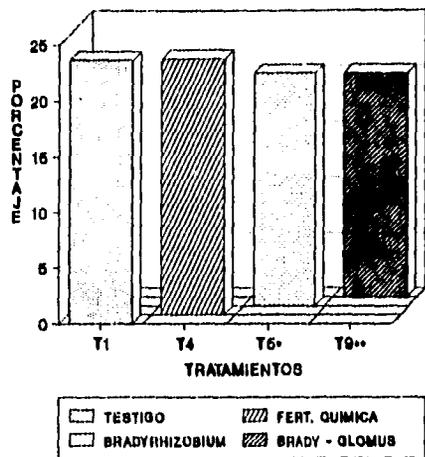
GRAFICA 3

**EFFECTO DE LA FERTILIZACION NITROGENADA Y FOSFATADA, EN LOS COMPONENTES QUIMICOS ANALIZADOS EN LA SEMILLA DE SOYA**



GRAFICA 4

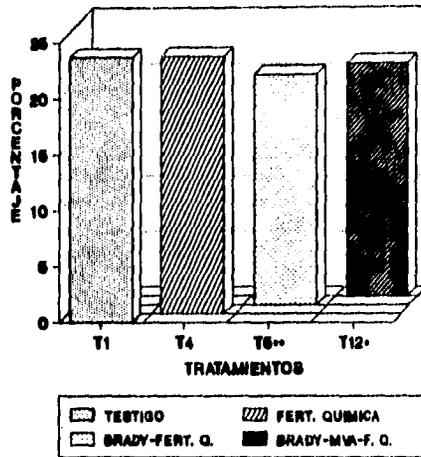
EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN EL CONTENIDO DE ACEITE



.. (P=0.05)  
 \*\* (P=0.01)

GRAFICA 5

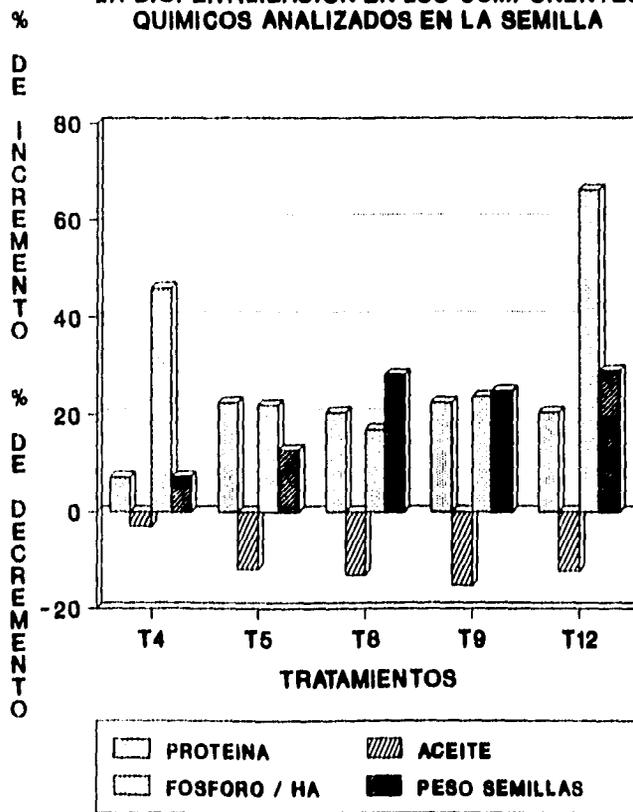
EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN EL CONTENIDO DE ACEITE



.. (P=0.05)  
 \*\*\* (P=0.01)

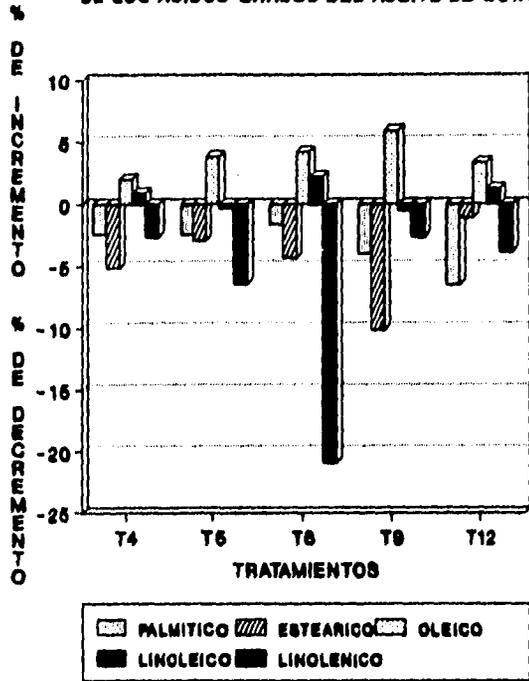
GRAFICA 6

EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN LOS COMPONENTES QUIMICOS ANALIZADOS EN LA SEMILLA



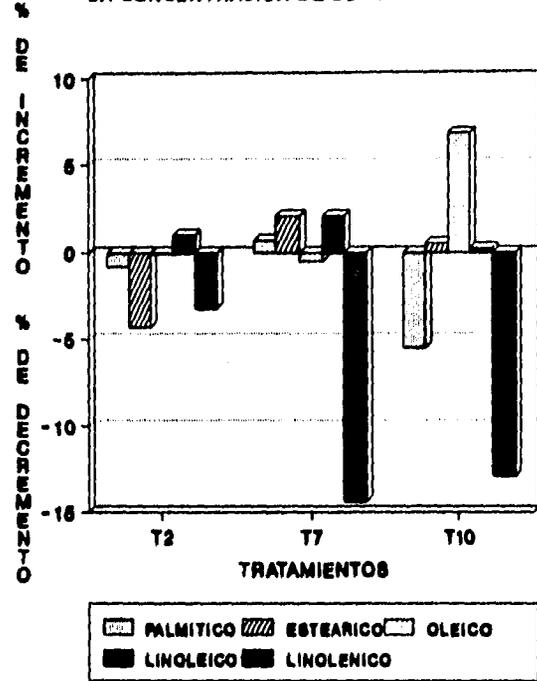
GRAFICA 7

EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN LA CONCENTRACION DE LOS ACIDOS GRASOS DEL ACEITE DE SOYA



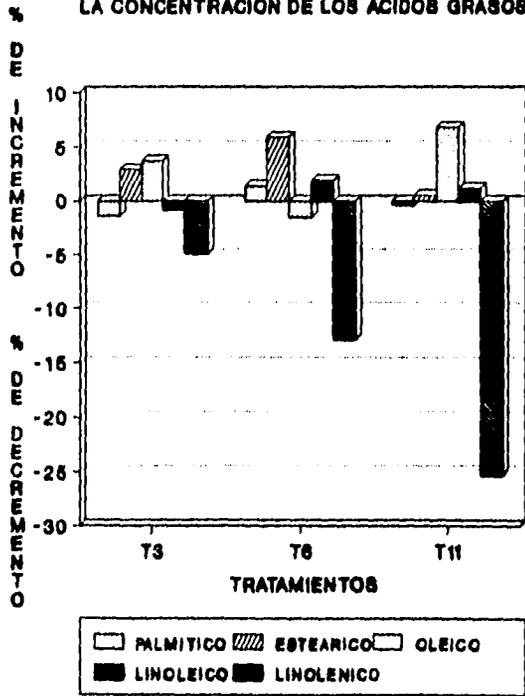
GRAFICA 8

EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA NITROGENADA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN LA CONCENTRACION DE LOS ACIDOS GRASOS



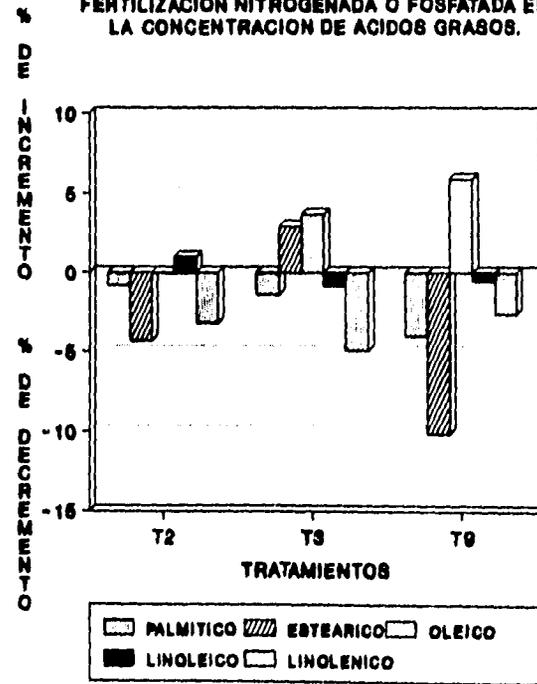
GRAFICA 9

EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA FOSFATADA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN LA CONCENTRACION DE LOS ACIDOS GRASOS



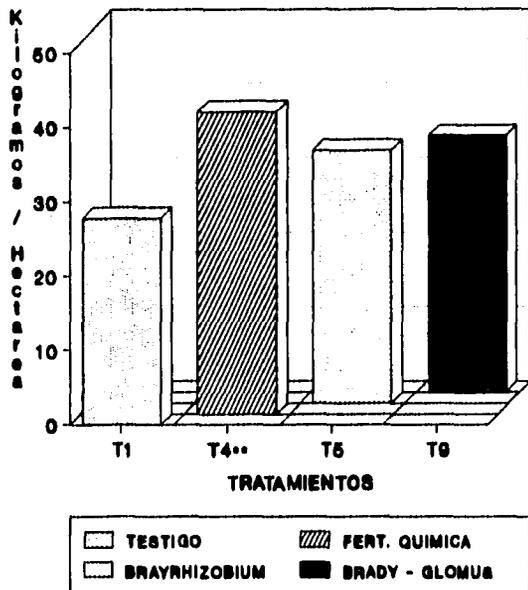
GRAFICA 10

EFFECTO DE LA DOBLE BIOFERTILIZACION Y FERTILIZACION NITROGENADA O FOSFATADA EN LA CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS.



GRAFICA 11

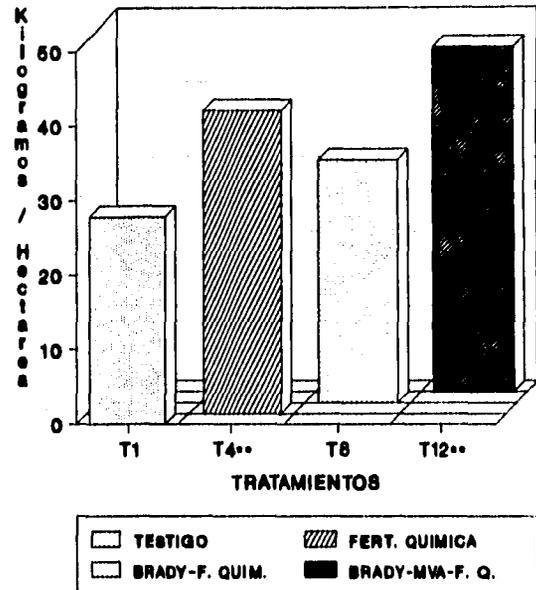
EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN EL CONTENIDO DE FOSFORO EN LA SEMILLA POR HECTAREA



.. (P=0.01)

GRAFICA 12

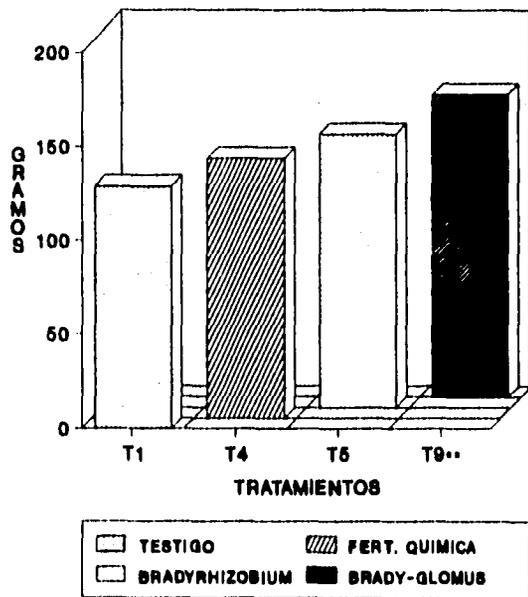
EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN EL CONTENIDO DE FOSFORO EN LA SEMILLA POR HECTAREA



.. (P=0.01)

GRAFICA 13

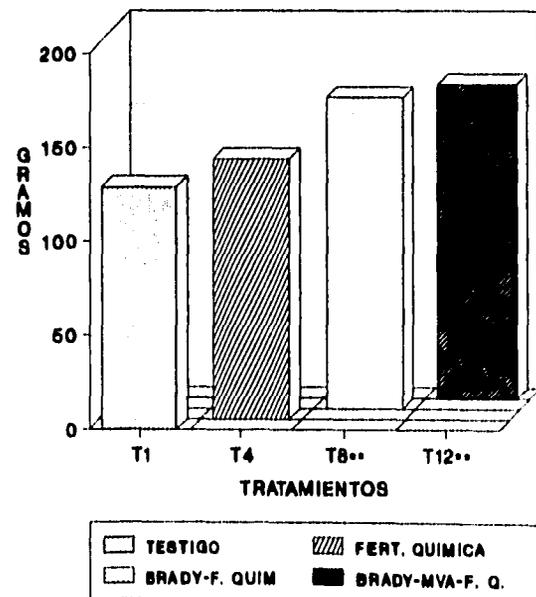
EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN EL PESO DE LAS SEMILLAS DE SOYA



.. (P=0.01)

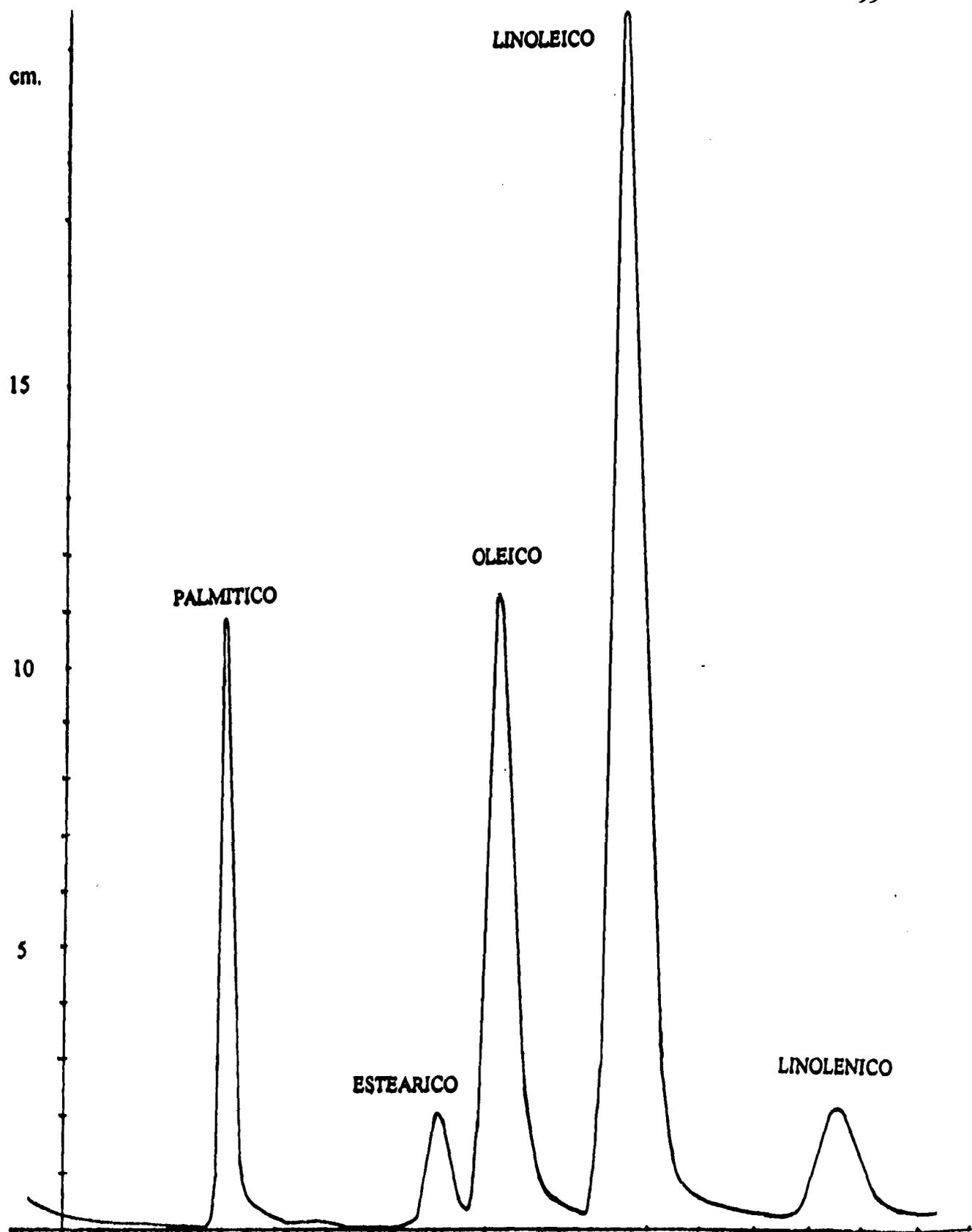
GRAFICA 14

EFFECTO DE LA FERTILIZACION QUIMICA Y DE LA BIOFERTILIZACION EN EL PESO DE LAS SEMILLAS DE SOYA



.. (P=0.01)

GRAFICA 15



Gráfica 16. Gráfica del cromatógrafo de gases (Varian, modelo 3700) que expresa las diferentes concentraciones de ácidos grasos en semilla de soya, correspondiente al tratamiento 11 (*Bradyrhizobium japonicum* + *Glomus fasciculatum* + 80 kg/ha de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), en el que se muestra el mínimo contenido de ácido linolénico, responsable de la baja calidad sensorial del aceite, y uno de los valores más altos de linoleico, ácido graso esencial en la nutrición humana.



FIGURA 1. Espectrofotómetro de infrarrojo cercano. Infratec, modelo 1255 "Food and Feed Analyser".

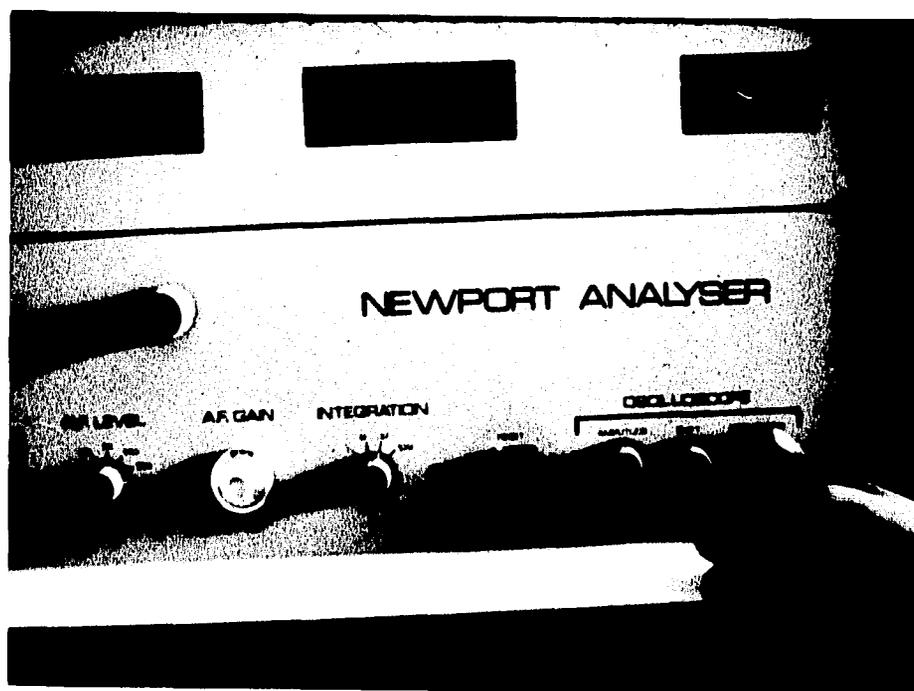


FIGURA 2. Analizador de resonancia magnética nuclear de banda ancha. Newport Analyser, modelo MK-III.

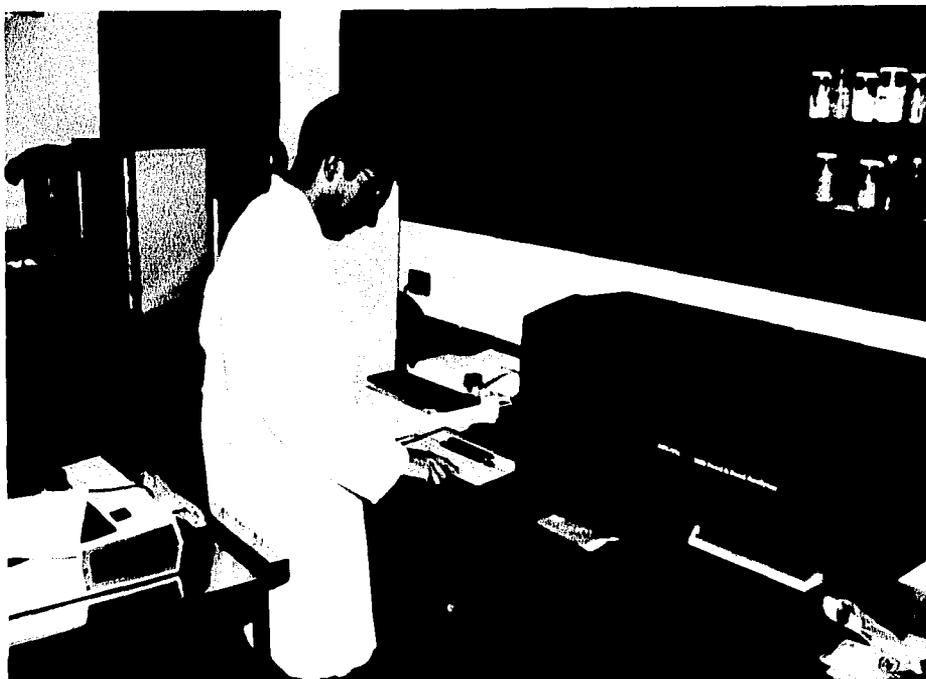


FIGURA 1. Espectrofotómetro de infrarrojo cercano. Infratec, modelo 1255 "Food and Feed Analyser".

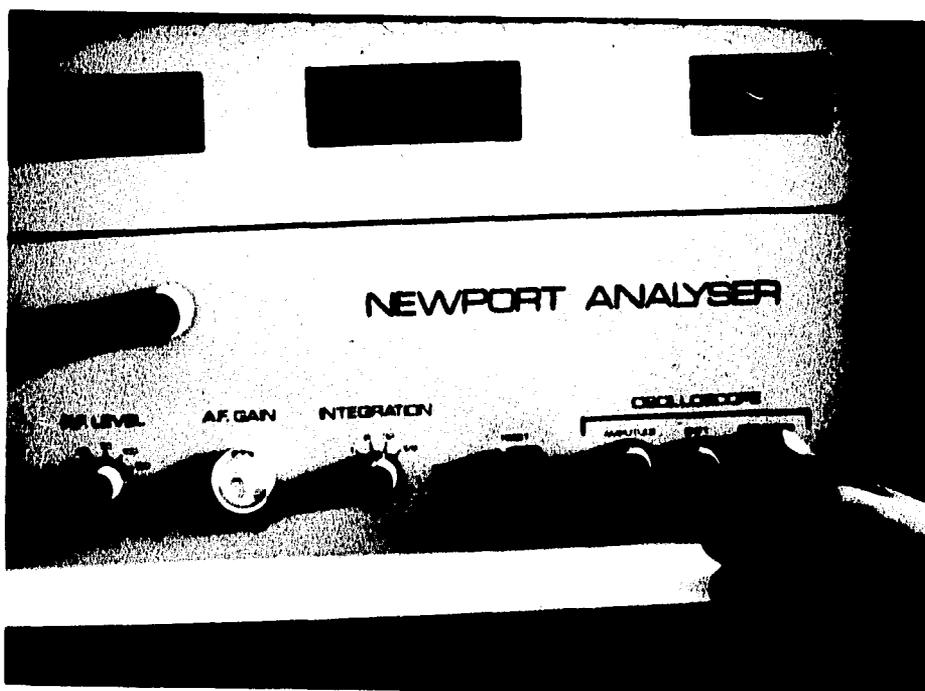


FIGURA 2. Analizador de resonancia magnética nuclear de banda ancha. Newport Analyser, modelo MK-III.

## IV Conclusiones

1. La aplicación de la doble biofertilización (*Bradyrhizobium* - *Glomus*), propició un aumento altamente significativo en el contenido de proteínas y peso de la semilla igualando, estadísticamente, a las inoculadas únicamente con *Bradyrhizobium japonicum*. De la misma manera, la utilización de este biofertilizante más el fertilizante nitrogenado, propició la más alta concentración de proteínas de todo el ensayo. Los resultados de este experimento demuestran que la biofertilización puede superar los rendimientos de proteína obtenidos con la fertilización química individual o en forma completa (sulfato de amonio y/o superfosfato de calcio simple).

2.. Se observó que la biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* únicamente, propició un aumento del contenido de proteínas 3.3 veces más que la fertilización química completa. De la misma manera, la inoculación simple puede igualar el contenido de aceite, fósforo y peso en la semilla, conservando la calidad del aceite estadísticamente inalterable. Por lo tanto, se observó que la inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* puede superar los efectos de la fertilización química.

3. El presente ensayo mostró que la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, más la aplicación del fertilizante químico nitrogenado y fosfatado (ambos en dosis de bajas a moderadas, en forma individual o combinada), favorece la síntesis de proteínas y el aumento en el peso de la semilla pero, en algunos casos, disminuye significativamente el contenido total de aceite. Por otra parte, se observó que la biofertilización simple más la fertilización química completa, o la doble biofertilización combinada con el fertilizante fosfatado disminuyó, de manera altamente significativa ( $P=0.01$ ) el contenido de ácido linolénico de la semilla. Y que la aplicación del *Bradyrhizobium japonicum* más la fertilización química completa o la combinación de la biofertilización simple más la fertilización nitrogenada favorece, de manera significativa ( $P=0.05$ ), la disminución del contenido de este mismo ácido.

4. Para fines de nutrición humana, el efecto benéfico de la biofertilización, combinada con dosis de bajas a moderadas de nitrógeno y fósforo, significó un aumento en el contenido de proteínas y una disminución del contenido de ácido linolénico, responsable del mal sabor, olor e inestabilidad del aceite, sin que se afecte el contenido alto de ácido linoleico, que representa una cualidad nutricional importante en la soya.

5. La doble biofertilización con *Bradyrhizobium* - *Glomus* más la aplicación del superfosfato de calcio, propició una disminución estadísticamente significativa en el contenido del ácido linolénico resultando, este tratamiento, estadísticamente igual en este efecto a la aplicación de *Bradyrhizobium japonicum* más sulfato de amonio.

6. La fertilización química permitió observar que la aplicación por separado de sulfato de amonio y superfosfato de calcio no incrementó, significativamente, el contenido de proteínas en la semilla. Sin embargo, la fertilización completa (N+P) incrementó, aritméticamente, el rendimiento de semillas y cantidad de proteína en la semilla con respecto al testigo.

7. En cuanto al contenido de fósforo en la semilla por hectárea, el mayor rendimiento se produjo con la doble biofertilización (*Bradyrhizobium* - *Glomus*) más la aplicación combinada de los fertilizantes químicos (sulfato de amonio y superfosfato de calcio), seguida por la aplicación de los fertilizantes químicos, únicamente. En ambos casos, el aumento en el contenido de fósforo en la semilla, respecto al testigo, fue altamente significativo ( $P=0.01$ ).

8. Se observó que la soya cultivada bajo condiciones de estrés nutricional, es decir, sin biofertilización ni fertilización química, en un suelo muy pobre en N y P, significó rendimientos bajos en semillas y contenido de proteínas. Sin embargo se observaron contenidos muy altos en aceite y ácido linolénico.

Sobre la hipótesis planteada en el presente trabajo, los resultados obtenidos, corroboran lo propuesto en relación a que la biofertilización (*Bradyrhizobium* y *Bradyrhizobium - Glomus*) incrementó significativamente el contenido de proteínas en la semilla, superando el efecto de la fertilización química. Por otra parte, se encontró que el incremento en proteínas guarda una relación inversamente proporcional al contenido de aceite. Finalmente, se observó que la biofertilización, combinada con la fertilización química disminuyó significativamente el contenido de ácido linolénico. Lo anterior nos permite considerar que los resultados obtenidos confirman la hipótesis inicialmente planteada.

## Bibliografía

- Abbott, L.K. y Robson, A.D. 1984. The effect of mycorrhizas on plant growth. *In*: VA micorrizae. Powell, C.L. Bagyaraj, D.J., CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 113-130.
- Aragón, M. E. y Villa-Novoa, I. 1994. Prácticas de laboratorio de análisis de alimentos. Departamento de alimentos y biotecnología. Facultad de Química. UNAM.
- Asimi, S., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. *Can. J. Bot.* 58:2200-2205.
- Ayres, G. H. 1970. Análisis químico cuantitativo. 2a. edición. Ed. Harla. México. ISBN: 006-3100-50-9.
- Azcón-G de Aguilar, C. y Barea, J.M. 1980. Micorriza. *Rev. Investigación y Ciencia.* N47:8-16.
- Azcón-G de Aguilar, C., García-García F. y Barea, J.M. 1991. Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. En Olivares, J. y Barea, J.M. Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol. II Fijación de N y micorrizas. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid.
- Badui, S. 1990. Química de los alimentos. 2ª ed., Alhambra. México. ISBN: 968-444-095-2.
- Bagyaraj, D.J., Manjunath, A. y Fatil, R.B. 1979. Interaction between a Vesicular-Arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* and Their effects on soybean in the field. *New Phytol.* 82:141-145.
- Balbuena-Robles, D.G. y De la Torre-Sanchez, A. 1980. Importancia de la inoculación simultánea de endomicorrizas y *Rhizobium*. Tesis profesional. UNAM. México.
- Banafunzi, N.M.S. Mena, B., Rangel, D., Mastache, A., Molina, M., Gantes V.M.H. y Marquez, B. 1981. A new soybean for human consumption in the tropics. *J. Am. Oil Chem. Soc.* N3:143-147.
- Bethlenfalvay, G.J. y Phillips, D.A. 1977. Autogenic interactions between

- photosynthesis and simbiotic nitrogen fixation in legumes. *Plant Physiol.* 60:419-421.
- Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134:189-207.
- Bourges, H., Camacho, J.L. y Banafunzi, N. 1981. Composition and nutritive value of green soybeans of the BM<sub>2</sub> variety. *J. Am.Oil Chem. Soc.* March:371-372.
- Brill, W.J. y Maier, R.J. 1978. Mutant strains of *Rhizobium japonicum* with increased ability to fix nitrogen for soybean. *Science* 201:448-449.
- Brown, M.S. y Bethlenfalvay, G. J. 1987. *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. VI. Photosynthesis in nodulated, mycorrhizal, or N- and P-fertilized soybean. *Plant Physiol.* 85:120-123.
- Brown, M.S. y Bethlenfalvay, G. J. 1988. *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. VII. Photosynthetic nutrient-use efficiency in nodulated, mycorrhizal soybeans. *Plant Physiol.* 86:1292-1297.
- Bubeck, D. M., Fehr, W.R. y Hammond, E.G. 1989. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. *Crop Sci.* 29:652-656.
- Bueno-Jaquez, J.E. 1981. Efecto de tres inoculantes y sus interacciones con niveles de nitrógeno y fósforo sobre el rendimiento y contenido de proteína en soya (*Glycine max (L.) Merr.*) var. tropicana. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Caldwell, B. E., 1973. Soybeans: Improvement, production and uses. American Society of Agronomy, Inc., Publisher. Wisconsin, U.S.A. LCC: 78-86619. pp. 217-220
- Carver, B.F., Burton, J.W., Carter, T.E. y Wilson, R.F. 1986. Response to environmental variation of soybean lines selected for altered unsaturated fatty acid composition. *Crop Sci.* 26:1176-1180.
- Champion, R.A., Mathis, J.N., Israel, D.W. y Hunt, P.G. 1992. Response of soybean to inoculation with efficient and inefficient *Bradyrhizobium japonicum* variants. *Crop Sci.* 32:457-463.
- Chavez-Paredes, A. 1983. Efectos de fertilización e inoculantes en rendimientos y calidad de soya. Tesis profesional. UNAM. México.
- Cherry, J.H., Bishop, L., Hasegawa, P.M. y Leffler, H.R. 1985. Differences in the

- fatty acid composition of soybean seed produced in northern and southern areas of the U.S.A. *Phytochemistry*, 24(2):237-241.
- Collins, F.I., Alexander, D. E., Rodgers, R.C. y Solvela, L. 1967. Analysis of Oil Content of Soybeans by Wide-Line NMR. *J. Am.Oil Chem. Soc.* 44(Dec):708-710.
- Cooper, K. M. y Losel, D.M. 1978. Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipid in roots of onion, clover, and ryegrass infected with *Glomus mosseae*. *New Phytol.*, 80:143-151.
- Cooper, K. M. 1984. Physiology of VA mycorrhizal associations. In: *Mycorrhiza*. Powell, C.L. y Bagyaraj, D.J., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 155-203.
- Crafts-Brandner, S. J. 1992. Significance of leaf phosphorus remobilization in yield production in soybean. *Crop Sci.* 32:420-424.
- Crispín, G. y Barriga, S.C. 1970. El cultivo de la soya en México. INIA. Folleto N38. México.
- Cubero, J. J. y Moreno, M. T. 1983. *Leguminosas de grano*. Ed. Mundi-prensa. Madrid.
- Delgado, Q.E. 1990. Selección de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* para soya (*Glycine max (L.) Merrill*) variedad BM<sub>2</sub>, en suelos calcimórficos de Miacatlán, Morelos, bajo condiciones de temporal. Tesis profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No.9. Miacatlán, Morelos.
- Del Valle, F. R. y Perez Villaseñor, J. 1974. Enrichment of tortilla with proteins by lime cooking of whole raw corn-soybean mixtures. *J.Food Sci.* 39:244-249.
- Dombos, D.L.Jr., Mullen, R.E. y Hammond, E.G. 1989. Phospholipids of environmentally stressed soybean seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(9):1371-1373.
- Dombos, D.L.Jr. y Mullen, R.E. 1992. Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69(3):228-231.
- Egan, H., Kirk, R. S. y Sawyer, R. 1987. *Análisis químico de alimentos de Pearson*. Compañía editorial continental. México. ISBN: 968-26-0734-5.
- Erickson, E.A., Wilcox, J.R. y Cavins, J.F. 1988. Fatty acid composition of the oil

- in reciprocal crosses among soybean mutants. *Crop Sci.* 28:644-646.
- Fehr, W.R., Welke, E.G., Hammond, D.N. y Cianzio, S.R. 1991. Inheritance of elevated palitic acid content in soybean seed oil. *Crop Sci.* 31:1552-1524.
- Flores-Román, D., Palacios-Mayorga, S. y Vallejo-Gómez, E. 1987. Efecto de la fertilización e inoculación de soya var. BM<sub>2</sub> con *Rhizobium* en el rendimiento y calidad de semilla, en condiciones de campo, riego y temporal, bajo el sistema de tres cosechas al año. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29:311-320.
- Fredeen, A. L., Madhusudana Rao, I. y Terry, N. 1989. Influence of phosphorous nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiol.* 89:225-230.
- Gómez, R. y Rodríguez, R. 1991. Efecto de la inoculación de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) variedad BM<sub>2</sub>, con *Bradyrhizobium japonicum* y *Glomus fasciculatum*, en comparación con la fertilización química, en un suelo calcimórfico del estado de Morelos, bajo condiciones de temporal. Tesis profesional. Instituto tecnológico agropecuario No. 9. Miacatlán, Morelos.
- Gordon, M. H. 1990. Principles and applications of gas chromatography in food analysis. Ellis Harwood. Londres. ISBN: 0-7476-0053-8.
- Grabau, L.J., Blevins, D.G. y Minor, H.C. 1986. P Nutrition during seed development. *Plant Physiol.* 82:1008-1012.
- Hamilton, L.F., Simpson, S.G. y Ellis, D.W. 1981. Cálculos de química analítica. Séptima Edición. McGraw-Hill. México. ISBN: 968-451-120-5
- Hanway, J.J. y Weber, C.R. 1971. Accumulation of N, P and K by soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants. *Agrn. J.* 63:406-408.
- Harris, P. y James, A.T. 1969. The effect of low temperatures on fatty acid biosynthesis in plants. *Biochem. J.* 112:325-330.
- Hart, F.L. y Fisher, H. J. 1991. Análisis moderno de los alimentos. Ed. Acribia. España. ISBN: 84-200-0297-6.
- Hawkins, S.E., Fehr, W.R. y Hammond, E.G. 1983. Resource allocation in breeding for fatty acid composition of soybean oil. *Crop Sci.* 23:900-904.
- Hernández-Salgado, G. y Meza-Fraga, M.G. 1987. Inoculación de *Rhizobium japonicum* en diferentes variedades de soya (nivel invernadero). Tesis

- profesional. UNAM. México.
- Hoque, M.S. 1993. Bradyrhizobium technology: a promising substitute for chemical nitrogen fertilizer in Bangladesh agriculture. *Plant and Soil*. 155/156:337-340.
- Howell, R.W. y Collins, F.I. 1957. Factors affecting linolenic and linoleic acid contents of soybean oil. *Agrn. J.* 49:593-597.
- Hume, D. J. y Shelp, B. J. 1990. Superior performance of the HUP-*Bradyrhizobium japonicum* strain 532C in Ontario soybean field trails. *Can. J. Plant Sci.* 70:661-666.
- Hume, D. J. y Blair, D. H. 1992. Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. *Can. J. Microbiol.* 38:588-593.
- Jacobs, M.B. 1973. The chemical analysis of food and food products. Third edition. Krieger publishing. EEUU. ISBN 0-88275-131-X.
- Jimenez, J.A., Olalde, P.V. y Peña, C. 1991. Evaluación en campo de *Bradyrhizobium japonicum* en dos variedades de soya (*Glycine max (L.) Merrill*). *Terra* 9(1):79-86.
- Kawai, Y. y Yamamoto, Y. 1986. Increase in the formation and nitrogen fixation of soybean nodules by vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Plant Cell Physiol.* 27(3):399-405.
- Lolas, G.M., Palamidis, N. y Markakis, P. 1976. The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chem.* 53(6):867-871.
- Lynch, D.H. y Smith, D.L. 1993. Early seedling and seasonal N<sub>2</sub>-fixing symbiotic activity of two soybean (*Glycine max (L.) Merr.*) cultivars inoculated with *Bradyrhizobium* strains of diverse origin. *Plant and Soil* 157:289-303.
- Mann, C. K., Vickers, T. J. y Gulick, W. M. 1974. Instrumental analysis. Harper & Row, Publ. Nueva York. ISBN 006-042535-0.
- Markley, K.S. 1950. Soybeans and soybean productos. Vol. I, Interscience Publishers, Inc. Nueva York.
- Marschner, D. y Dell, D. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159:89-102.
- Mercado-Pineda, J.J.J. 1985. Niveles de fertilización en tres variedades de soya

- (*Glycine max (L.) Merrill*) en el ejido Venta de Palula, Guerrero. Temporal 1982. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. pp.26-30.
- Mosse, B. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture. College of tropical agriculture. Univ. de Hawaii. Misc. Publ.
- Miller, B.S. 1979. A feasibility study on the use of near infrared techniques. Cereal Foods World. 24(3):88-9
- Mullen, M.D., Israel, D.W. y Wollum, A.G. 1988. Effects of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean (*Glycine max (L.) Merr.*) phosphorus nutrition on nodulation and dinitrogen fixation. Appl. Environ. Microbiol. 54(10):2387-2392.
- Nava-Salazar, J.R. 1983. Interacción de los hongos endomicorrícicos nativos (V.A.) en ensayos de inoculación de maíz con *Glomus fasciculatum* en Suelos muy deficientes en fósforo. Tesis profesional. UNAM. México.
- Norris, J. R., Read, D. J. y Varma, A. K. 1992. Methods in microbiology. Vol 24. Techniques for the study of mycorrhiza. Academic Press.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (AOAC). 1980. Thirteenth Edition. Washington, D.C. ISBN: 0-935584-14-5.
- Olivares, J. y Barea, J. M. 1991. Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol. II. Fijación de N y micorrizas. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid.
- Orive, R. y Temprano, F. 1983. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. En: Cubero, J.I. y Moreno, M.T. Leguminosas de grano. Ediciones Mundi-prensa. Madrid.
- Orozco, F. D. 1970. Análisis químico cuantitativo. 17 edición. Ed. Porrúa. México. ISBN: 968-432-004-3.
- Osborne, B. G. y Fream, T. 1987. Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis. Logman Scientific & Technical. New York. U.S.A.
- Pacovsky, S. R. 1986. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. Plant and Soil. 95:379-388.
- Pacovsky, S. R., Bethlenfalvay, G. J. y Paul, E. A. 1986. Response of mycorrhizal and P-fertilized soybeans to nodulation by *Bradyrhizobium* or

- ammonium nitrate. *Crop Science*. 26:145-150.
- Pacovsky, S. R., Bethlenfalvay, G. J. y Paul, E. A. 1986. Comparisons between P-fertilized and mycorrhizal plants. *Crop Science*. 26:151-156.
- Pacovsky, S.R., Fuller, G., Stafford, A.E. y Paul, E. A. 1986. Nutrient and growth interactions in soybeans colonized with *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil* 92:37-45.
- Pacovsky, S.R. y Fuller, G. 1988. Mineral and lipid composition of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* simbioses. *Physiol. Plant*, 72:733-746.
- Pal. U.R., Olufajo, O.O., Nnadi, L.A. y Singh, L. 1989. Response of soya bean (*Glycine max (L.) Merr.*) to phosphorus, potassium and molybdenum applications. *J.Agric. Sci.*, 112:131-136.
- Pongsakul, P. y Jensen E.S. 1991. Dinitrogen fixation and soil N uptake by soybean as affected by phosphorus availability. *J. Plant Nut.*, 14(8),809-823.
- Pomeranz, Y. y Meloan, C. E. 1982. *Food Analysis: Theory and Practice*. Avi Publishing Company, INC. Westport, Connecticut. ISBN: 0-87055-238-4
- Postgate, J. 1981. Fijación del nitrógeno. Ed. Omega. Barcelona. ISBN: 84-282-0618-X.
- Raboy, V., Dickison, D.B. y Below, F.E. 1984. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *G. soja*. *Crop Sci*. 24(3):431-434.
- Ravuri, V. y Hume, D.J. 1992. Performance of a superior *Bradyrhizobium japonicum* and a selected *Sinorhizobium fredii* strain with soybean cultivars. *Agron. J.* 84:1051-1056.
- Rennie, B.D., Zilka, J., Crammer, M.M. y Beversdorf, W.D. 1988. Genetic analysis of low linolenic acid levels in the soybean line PI 361088B. *Crop Sci*. 28:655-657.
- Rennie, B.D. y Tanner, J.W. 1989. Fatty acid composition of oil from soybean seed grown at extreme temperatures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(11):1622-1624.
- Rivas-Jacobo, I. C. 1989. El cultivo de la soya (*Glycine max (L) Merril*) variedad BM<sub>2</sub> como alternativa de rotación con el sorgo (*Sorghum bicolor (L) Moench*) en el oriente bajo del estado de Morelos. Tesis Profesional. UACH. México.

- Rosendahl, S., Dodd, J.C. y Walker, C. 1994. Taxonomy and phylogeny of the *Glomales*. Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Ed. Birkhäuser Verlag. ISBN 0-8176-5000-8.
- Ryan, M.H., Chilvers, G.A. y Dumaresq, D.C. 1994. Colonization of wheat by VA-mycorrhizal fungi was found to be higher on a farm managed in an organic manner than on a conventional neighbour. *Plant and Soil*. 160:33-40.
- Sánchez, A. 1982. Cultivo de oleaginosas. Ed. Trillas. México. ISBN: 968-24-1117-3.
- Sekhon, H.S., Kaul, J.N. y Dhingra, K.K. 1984. Effect of *Rhizobium* inoculation, mulch and nitrogen and phosphorus fertilizer on soya bean (*Glycine max (L.) Merrill*). *J. Agric. Sci. Camb.* 102:475-478.
- Shenck, N.C. y Hinson, K. 1973. Response of nodulating and non-nodulating soybeans to a species of endogene mycorrhiza. *Agron. J.* 65:849-850.
- Skoog, D. A. y Leary, J. J. 1992. 4a. edición. Ed. Internacional. México. ISBN: 0-03-075398-8.
- Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V., Koide, R. y Cairney, W.G., 1994. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil*. 159:103-113.
- Tomb, M.P. 1967. Protein bodies of the soybean. *Plant Physiol.* 42:797-813.
- Valle Vega, P. 1991. Toxicología de Alimentos. Ed. Centro panamericano de ecología humana y salud. México. ISBN: 92-75-37004-4
- Vasilas, B.L. y Fuhrmann, J.J. 1993. Field response of soybean to nodulation by Rhizobitoxine producing strain of *Bradyrhizobium*. *Agron. J.* 85:302-305.
- Vejsadová, H., Hrselová, H., Prikryl, Z. y Vancura, V. 1989. Effect of different phosphorus and nitrogen levels on development of VA mycorrhiza, rhizobial activity and soybean growth. *Agric. Ecosystems Environ.* 29:429-434.
- Vejsadová, H., Sibliková, D., Hrselová, y Vancura, V. 1992. Effect of the VAM fungus *Glomus sp.* on the growth and yield of soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, 140:121-125.
- Vejsadová, H., Siblikova, D., Gryndler, M. y Simon, T. 1993. Influence of inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Glomus claroideum* on

- seed yield of soybean under greenhouse and field conditions. *J. Plant Nut.* 16(4):619-629.
- Vejsadová, H., Catská, H., Hrselová, H. y Gryndler, M. 1993. Influence of bacteria on growth and phosphorus nutrition of mycorrhizal corn. *J. Plant Nut.* 16(9):1857-1866.
- Vincent, J.M. 1975. *Manual práctico de rizobiología*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Walker, N. 1975. *Soil Microbiology*. Halsted Press. Nueva York. ISBN: 0-470-91812-8.
- Walker, C. 1987 Identifying the endomycorrhizal endogonaceae, II Reuniao Brasileria sobre micorrizas, Sao Paulo, pp. 83-97.
- Walpole, R. E. y Myers, R. H. 1989. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. Tercera edición. Ed. McGraw-Hill. México. pp. 462-485. ISBN 968-422-679-9.
- Watty, M.B. 1982. *Química Analítica*. Ed. Alhambra Universidad. México. ISBN: 968-444-019-7.
- Wellings, N.P., Wearing, A.H. y Thompson J.P. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) improve phosphorus and zinc nutrition and growth of pigeonpea in a vertisol. *Aust. J. Agric. Res.* 42:835-845.
- Wiersma, J.V. y Orf, J.H. 1992. Early maturing soybean nodulation and performance with selected *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Agron. J.* 84(3):449-458.
- Wilson, R. F., Weissinger, H. H. y Buck, J. A. 1980. Involvement of phospholipids in polyunsaturated fatty acid syntesis in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 66:545-549.
- Wolf, K.M. 1979. *Soybean as a food source*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Winton, A. L. y Winton, K. B. 1944. *Analisis de alimentos*. Editorial Hispanoamericana. México.
- Zavala-Ruiz, R. 1994. *El libro y sus orillas*. UNAM. México. ISBN: 968-36-2217-8.

APENDICE

One-Way Analysis of Variance

Data: PROTEINA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Level codes: BIOFERT.TRATAMIEN

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 95 Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	291.38667	11	26.489697	7.811	.0000
Within groups	81.39333	24	3.391389		
Total (corrected)	372.78000	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:26:38 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	33.833333	.9134793	1.0632323	31.638407	36.028260
2	3	35.366667	2.0102515	1.0632323	33.171740	37.561593
3	3	35.500000	1.9295941	1.0632323	33.305074	37.694926
4	3	36.166667	1.9547663	1.0632323	33.971740	38.361593
5	3	41.400000	.6027714	1.0632323	39.205074	43.594926
6	3	41.033333	.6333333	1.0632323	38.838407	43.228260
7	3	41.466667	.2403701	1.0632323	39.271740	43.661593
8	3	40.733333	.2333333	1.0632323	38.538407	42.928260
9	3	41.400000	.2081666	1.0632323	39.205074	43.594926
10	3	41.033333	.3179797	1.0632323	38.838407	43.228260
11	3	41.300000	.2309401	1.0632323	39.105074	43.494926
12	3	40.766667	.2666667	1.0632323	38.571740	42.961593
Total	36	39.166667	.3069287	.3069287	38.533046	39.800287

Sun Nov 20 1994 03:27:21 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	3	33.833333	X
2	3	35.366667	XX
3	3	35.500000	XX
4	3	36.166667	XXX
8	3	40.733333	XX
12	3	40.766667	XX
6	3	41.033333	X
10	3	41.033333	X
11	3	41.300000	X
9	3	41.400000	X
5	3	41.400000	X
7	3	41.466667	X

One-Way Analysis of Variance

Data: PROTEINA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 99      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	291.38667	11	26.489697	7.811	.0000
Within groups	81.39333	24	3.391389		
Total (corrected)	372.78000	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:35:50 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	33.833333	.9134793	1.0632323	30.858998	36.807669
2	3	35.366667	2.0102515	1.0632323	32.392331	38.341002
3	3	35.500000	1.9295941	1.0632323	32.525665	38.474335
4	3	36.166667	1.9547663	1.0632323	33.192331	39.141002
5	3	41.400000	.6027714	1.0632323	38.425665	44.374335
6	3	41.033333	.6333333	1.0632323	38.058998	44.007669
7	3	41.466667	.2403701	1.0632323	38.492331	44.441002
8	3	40.733333	.2333333	1.0632323	37.758998	43.707669
9	3	41.400000	.2081666	1.0632323	38.425665	44.374335
10	3	41.033333	.3179797	1.0632323	38.058998	44.007669
11	3	41.300000	.2309401	1.0632323	38.325665	44.274335
12	3	40.766667	.2666667	1.0632323	37.792331	43.741002
Total	36	39.166667	.3069287	.3069287	38.308050	40.025283

Sun Nov 20 1994 03:34:09 PM

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	3	33.833333	X
2	3	35.366667	XX
3	3	35.500000	XX
4	3	36.166667	XX
8	3	40.733333	X
12	3	40.766667	X
6	3	41.033333	X
10	3	41.033333	X
11	3	41.300000	X
9	3	41.400000	X
5	3	41.400000	X
7	3	41.466667	X

One-Way Analysis of Variance

Data: PROTEINA POR MACROKJELDAHL

Level codes: BIOFERT2.TRATAMIEN2

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 95      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	135.86000	2	67.930000	10.974	.0099
Within groups	37.14000	6	6.190000		
Total (corrected)	173.00000	8			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:47:19 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	34.033333	1.0170764	1.4364308	30.517448	37.549218
4	3	36.933333	2.2696059	1.4364308	33.417448	40.449218
9	3	43.333333	.0666667	1.4364308	39.817448	46.849218
Total	9	38.100000	.8293237	.8293237	36.070103	40.129897

Sun Nov 20 1994 03:48:23 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	3	34.033333	X
4	3	36.933333	X
9	3	43.333333	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 4	-2.90000		6.23300
1 - 9	-9.30000		6.23300 *
4 - 9	-6.40000		6.23300 *

\* denotes a statistically significant difference.

One-Way Analysis of Variance

Data: PROTEINA POR MACROKJELDAHL

Level codes: BIOFERT2.TRATAMIEN2

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 99      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	135.86000	2	67.930000	10.974	.0099
Within groups	37.14000	6	6.190000		
Total (corrected)	173.00000	8			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:52:27 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	34.033333	1.0170764	1.4364308	28.706442	39.360225
4	3	36.933333	2.2696059	1.4364308	31.606442	42.260225
9	3	43.333333	.0666667	1.4364308	38.006442	48.660225
Total	9	38.100000	.8293237	.8293237	35.024518	41.175482

Sun Nov 20 1994 03:53:05 PM

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level      Count      Average      Homogeneous Groups

1	3	34.033333	X
4	3	36.933333	XX
9	3	43.333333	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 4	-2.90000		9.08899
1 - 9	-9.30000		9.08899 *
4 - 9	-6.40000		9.08899

\* denotes a statistically significant difference.

One-Way Analysis of Variance

Data: ACEITE POR INFRARROJO CERCANO

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 95      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	72.074167	11	6.5521970	8.549	.0000
Within groups	18.393333	24	.7663889		
Total (corrected)	90.467500	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 02:53:46 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	23.733333	.4841946	.5054334	22.689921	24.776745
2	3	23.266667	.8819171	.5054334	22.223255	24.310079
3	3	23.133333	1.1215069	.5054334	22.089921	24.176745
4	3	22.966667	.6984109	.5054334	21.923255	24.010079
5	3	20.866667	.4666667	.5054334	19.823255	21.910079
6	3	20.166667	.1666667	.5054334	19.123255	21.210079
7	3	20.100000	.0000000	.5054334	19.056588	21.143412
8	3	20.566667	.0666667	.5054334	19.523255	21.610079
9	3	20.066667	.0881917	.5054334	19.023255	21.110079
10	3	20.233333	.1452966	.5054334	19.189921	21.276745
11	3	19.966667	.0881917	.5054334	18.923255	21.010079
12	3	20.833333	.1452966	.5054334	19.789921	21.876745
Total	36	21.325000	.1459061	.1459061	21.023793	21.626207

Sun Nov 20 1994 02:52:08 PM

Multiple range analysis

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
11	3	19.966667	X
9	3	20.066667	X
7	3	20.100000	X
6	3	20.166667	X
10	3	20.233333	X
8	3	20.566667	XX
12	3	20.833333	XXX
5	3	20.866667	XXX
4	3	22.966667	XXX
3	3	23.133333	XXX
2	3	23.266667	XX
1	3	23.733333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACEITE POR INFRARROJO CERCAÑO

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 99      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	72.074167	11	6.5521970	8.549	.0000
Within groups	18.393333	24	.7663889		
Total (corrected)	90.467500	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:02:21 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	23.733333	.4841946	.5054334	22.319410	25.147256
2	3	23.266667	.8819171	.5054334	21.852744	24.680590
3	3	23.133333	1.1215069	.5054334	21.719410	24.547256
4	3	22.966667	.6984109	.5054334	21.552744	24.380590
5	3	20.866667	.4666667	.5054334	19.452744	22.280590
6	3	20.166667	.1666667	.5054334	18.752744	21.580590
7	3	20.100000	.0000000	.5054334	18.686077	21.513923
8	3	20.566667	.0666667	.5054334	19.152744	21.980590
9	3	20.066667	.0881917	.5054334	18.652744	21.480590
10	3	20.233333	.1452966	.5054334	18.819410	21.647256
11	3	19.966667	.0881917	.5054334	18.552744	21.380590
12	3	20.833333	.1452966	.5054334	19.419410	22.247256
Total	36	21.325000	.1459061	.1459061	20.916836	21.733164

Sun Nbv 20 1994 03:04:04 PM

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
11	3	19.966667	X
9	3	20.066667	XX
7	3	20.100000	XX
6	3	20.166667	XX
10	3	20.233333	XXX
8	3	20.566667	XXX
12	3	20.833333	XXXX
5	3	20.866667	XXXX
4	3	22.966667	XXXX
3	3	23.133333	XXX
2	3	23.266667	XX
1	3	23.733333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACEITE POR RESONANCIA MAGENTICA NUCLEAR

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 95      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	51.289722	11	4.6627020	6.857	.0000
Within groups	16.320000	24	.6800000		
Total (corrected)	67.609722	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 02:24:21 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	23.933333	.3844188	.4760952	22.950487	24.916180
2	3	23.500000	.9018500	.4760952	22.517154	24.482846
3	3	23.366667	.7512952	.4760952	22.383820	24.349513
4	3	23.066667	.8333333	.4760952	22.083820	24.049513
5	3	21.000000	.3055050	.4760952	20.017154	21.982846
6	3	20.466667	.1201850	.4760952	19.483820	21.449513
7	3	20.633333	.1855921	.4760952	19.650487	21.616180
8	3	21.033333	.2027588	.4760952	20.050487	22.016180
9	3	21.600000	.4582576	.4760952	20.617154	22.582846
10	3	21.433333	.0666667	.4760952	20.450487	22.416180
11	3	21.333333	.2666667	.4760952	20.350487	22.316180
12	3	20.866667	.1763834	.4760952	19.883820	21.849513
Total	36	21.852778	.1374369	.1374369	21.569054	22.136501

Sun Nov 20 1994 02:41:32 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	3	20.466667	X
7	3	20.633333	X
12	3	20.866667	XX
5	3	21.000000	XXX
8	3	21.033333	XXX
11	3	21.333333	XXXX
10	3	21.433333	XXXX
9	3	21.600000	XXXXX
4	3	23.066667	XXXX
3	3	23.366667	XXX
2	3	23.500000	XX
1	3	23.933333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACEITE POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 99

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	51.289722	11	4.6627020	6.857	.0000
Within groups	16.320000	24	.6800000		
Total (corrected)	67.609722	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Fri Nov 25 1994 02:41:12 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	23.933333	.3844188	.4760952	22.478672 25.387995
2	3	23.500000	.9018500	.4760952	22.045338 24.954662
3	3	23.366667	.7512952	.4760952	21.912005 24.821328
4	3	23.066667	.8333333	.4760952	21.612005 24.521328
5	3	21.000000	.3055050	.4760952	19.545338 22.454662
6	3	20.466667	.1201850	.4760952	19.012005 21.921328
7	3	20.633333	.1855921	.4760952	19.178672 22.087995
8	3	21.033333	.2027588	.4760952	19.578672 22.487995
9	3	21.600000	.4582576	.4760952	20.145338 23.054662
10	3	21.433333	.0666667	.4760952	19.978672 22.887995
11	3	21.333333	.2666667	.4760952	19.878672 22.787995
12	3	20.866667	.1763834	.4760952	19.412005 22.321328
Total	36	21.852778	.1374369	.1374369	21.432853 22.272702

Multiple range analysis

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	3	20.466667	X
7	3	20.633333	XX
12	3	20.866667	XX
5	3	21.000000	XX
8	3	21.033333	XXX
11	3	21.333333	XXX
10	3	21.433333	XXX
9	3	21.600000	XXX
4	3	23.066667	XXX
3	3	23.366667	XXX
2	3	23.500000	XX
1	3	23.933333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACGRASOS.palmitico

Level codes: ACGRASOS.tratamient

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	3.5715639	11	.3246876	2.764	.0181
Within groups	2.8190667	24	.1174611		
Total (corrected)	6.3906306	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sat Oct 29 1994 06:39:29 PM

Table of means

Level	Count	Average	Stnd. Error (internal)	Stnd. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean	
1	3	12.443333	.2107394	.1978729	11.938746	12.947920
2	3	12.343333	.1637410	.1978729	11.838746	12.847920
3	3	12.260000	.1212436	.1978729	11.755413	12.764587
4	3	11.930000	.2858904	.1978729	11.425413	12.434587
5	3	12.123333	.3138117	.1978729	11.618746	12.627920
6	3	12.606667	.1975123	.1978729	12.102080	13.111254
7	3	12.533333	.2240784	.1978729	12.028746	13.037920
8	3	12.153333	.0366667	.1978729	11.648746	12.657920
9	3	11.876667	.1901169	.1978729	11.372080	12.381254
10	3	11.746667	.0566667	.1978729	11.242080	12.251254
11	3	12.393333	.0554777	.1978729	11.888746	12.897920
12	3	11.553333	.2659156	.1978729	11.048746	12.057920
Total	36	12.163611	.0571210	.0571210	12.017949	12.309273

Sat Oct 29 1994 06:38:02 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
12	3	11.553333	X
10	3	11.746667	XX
9	3	11.876667	XX
4	3	11.930000	XX
5	3	12.123333	XX
8	3	12.153333	XX
3	3	12.260000	XX
2	3	12.343333	XX
11	3	12.393333	XX
1	3	12.443333	XX
7	3	12.533333	XX
6	3	12.606667	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACGRASOS.estearico

Level codes: ACGRASOS.tratamient

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.9120889	11	.0829172	1.094	.4060
Within groups	1.8182667	24	.0757611		
Total (corrected)	2.7303556	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	3.7600000	.1563117	.1589141	3.3547602 4.1652398
2	3	3.6033333	.0868588	.1589141	3.1980936 4.0085731
3	3	3.8700000	.0585947	.1589141	3.4647602 4.2752398
4	3	3.5666667	.1920359	.1589141	3.1614269 3.9719064
5	3	3.8700000	.1951922	.1589141	3.4647602 4.2752398
6	3	3.9833333	.1472338	.1589141	3.5780936 4.3885731
7	3	3.8366667	.2658529	.1589141	3.4314269 4.2419064
8	3	3.6033333	.1703265	.1589141	3.1980936 4.0085731
9	3	3.3766667	.1223837	.1589141	2.9714269 3.7819064
10	3	3.7800000	.0611010	.1589141	3.3747602 4.1852398
11	3	3.7766667	.2136456	.1589141	3.3714269 4.1819064
12	3	3.7200000	.0832666	.1589141	3.3147602 4.1252398
Total	36	3.7288889	.0458746	.0458746	3.6119062 3.8458715

Sat Oct 29 1994 06:49:39 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
9	3	3.3766667	X
4	3	3.5666667	X
2	3	3.6033333	X
8	3	3.6033333	X
12	3	3.7200000	X
1	3	3.7600000	X
11	3	3.7766667	X
10	3	3.7800000	X
7	3	3.8366667	X
3	3	3.8700000	X
5	3	3.8700000	X
6	3	3.9833333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACGRASOS.oleico

Level codes: ACGRASOS.tratamient

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	15.577275	11	1.4161159	3.697	.0036
Within groups	9.193200	24	.3830500		
Total (corrected)	24.770475	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sat Oct 29 1994 06:52:19 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean	
1	3	23.920000	.4121893	.3573280	23.008794	24.831206
2	3	23.906667	.2425100	.3573280	22.995461	24.817873
3	3	24.813333	.2490203	.3573280	23.902127	25.724539
4	3	24.416667	.1970054	.3573280	23.505461	25.327873
5	3	24.780000	.6610850	.3573280	23.868794	25.691206
6	3	23.546667	.2387700	.3573280	22.635461	24.457873
7	3	23.803333	.4816753	.3573280	22.892127	24.714539
8	3	24.870000	.5139066	.3573280	23.958794	25.781206
9	3	25.320000	.2345918	.3573280	24.408794	26.231206
10	3	25.543333	.0785988	.3573280	24.632127	26.454539
11	3	25.540000	.2981610	.3573280	24.628794	26.451206
12	3	24.770000	.2497999	.3573280	23.858794	25.681206
Total	36	24.602500	.1031517	.1031517	24.339457	24.865543

Sat Oct 29 1994 06:53:01 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	3	23.546667	X
7	3	23.803333	XX
2	3	23.906667	XX
1	3	23.920000	XX
4	3	24.416667	XX
12	3	24.770000	XX
5	3	24.780000	XX
3	3	24.813333	XX
8	3	24.870000	XX
9	3	25.320000	XX
11	3	25.540000	X
10	3	25.543333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACGRASOS.linoleico

Level codes: ACGRASOS.tratamient

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	9.3498222	11	.8499838	2.422	.0339
Within groups	8.4222000	24	.3509250		
Total (corrected)	17.772022	35			

0 missing value(s) have been excluded.  
Sat Oct 29 1994 06:57:13 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean	
1	3	52.070000	.6278004	.3420161	51.197840	52.942160
2	3	52.610000	.2055075	.3420161	51.737840	53.482160
3	3	51.640000	.1724336	.3420161	50.767840	52.512160
4	3	52.516667	.3002962	.3420161	51.644507	53.388826
5	3	51.920000	.2211334	.3420161	51.047840	52.792160
6	3	53.063333	.1809543	.3420161	52.191174	53.935493
7	3	53.143333	.3919325	.3420161	52.271174	54.015493
8	3	53.196667	.5206833	.3420161	52.324507	54.068826
9	3	51.786667	.4532230	.3420161	50.914507	52.658826
10	3	52.150000	.2557994	.3420161	51.277840	53.022160
11	3	52.456667	.1738134	.3420161	51.584507	53.328826
12	3	52.700000	.2000000	.3420161	51.827840	53.572160
Total	36	52.437778	.0987315	.0987315	52.186007	52.689549

Sat Oct 29 1994 06:57:45 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	51.640000	X
9	3	51.786667	X
5	3	51.920000	X
1	3	52.070000	X
10	3	52.150000	X
11	3	52.456667	X
4	3	52.516667	X
2	3	52.610000	X
12	3	52.700000	X
6	3	53.063333	X
7	3	53.143333	X
8	3	53.196667	Y

One-Way Analysis of Variance

Data: ACGRASOS.linolenico

Level codes: ACGRASOS.tratamient

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	12.993256	11	1.1812051	8.686	.0000
Within groups	3.263867	24	.1359944		
Total (corrected)	16.257122	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sat Oct 29 1994 07:02:43 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	7.8033333	.1770436	.2129119	7.2603963 8.3462704
2	3	7.5500000	.2025669	.2129119	7.0070630 8.0929370
3	3	7.4200000	.1106044	.2129119	6.8770630 7.9629370
4	3	7.5766667	.0545690	.2129119	7.0337296 8.1196037
5	3	7.2966667	.2041514	.2129119	6.7537296 7.8396037
6	3	6.8000000	.1101514	.2129119	6.2570630 7.3429370
7	3	6.6833333	.1855023	.2129119	6.1403963 7.2262704
8	3	6.1766667	.2356080	.2129119	5.6337296 6.7196037
9	3	7.6400000	.1001665	.2129119	7.0970630 8.1829370
10	3	6.7933333	.2089923	.2129119	6.2503963 7.3362704
11	3	5.8266667	.4656298	.2129119	5.2837296 6.3696037
12	3	7.4800000	.2052641	.2129119	6.9370630 8.0229370
Total	36	7.0872222	.0614624	.0614624	6.9304898 7.2439546

Sat Oct 29 1994 07:03:24 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
11	3	5.8266667	X
8	3	6.1766667	X
7	3	6.6833333	XX
10	3	6.7933333	XXX
6	3	6.8000000	XXX
5	3	7.2966667	XX
3	3	7.4200000	XX
12	3	7.4800000	XX
2	3	7.5500000	XX
4	3	7.5766667	XX
9	3	7.6400000	XX
1	3	7.8033333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: ACGRASOS.linolenico

Level codes: ACGRASOS.tratamient

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 99

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	12.993256	11	1.1812051	8.686	.0000
Within groups	3.263867	24	.1359944		
Total (corrected)	16.257122	35			

0 missing value(s) have been excluded.  
Sat Oct 29 1994 07:07:05 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	7.8033333	.1770436	.2129119	7.1528021 8.4538646
2	3	7.5500000	.2025669	.2129119	6.8994688 8.2005312
3	3	7.4200000	.1106044	.2129119	6.7694688 8.0705312
4	3	7.5766667	.0545690	.2129119	6.9261354 8.2271979
5	3	7.2966667	.2041514	.2129119	6.6461354 7.9471979
6	3	6.8000000	.1101514	.2129119	6.1494688 7.4505312
7	3	6.6833333	.1855023	.2129119	6.0328021 7.3338646
8	3	6.1766667	.2356080	.2129119	5.5261354 6.8271979
9	3	7.6400000	.1001665	.2129119	6.9894688 8.2905312
10	3	6.7933333	.2089923	.2129119	6.1428021 7.4438646
11	3	5.8266667	.4656298	.2129119	5.1761354 6.4771979
12	3	7.4800000	.2052641	.2129119	6.8294688 8.1305312
Total	36	7.0872222	.0614624	.0614624	6.8994300 7.2750144

Sat Oct 29 1994 07:06:01 PM

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
11	3	5.8266667	X
8	3	6.1766667	XX
7	3	6.6833333	XXX
10	3	6.7933333	XXX
6	3	6.8000000	XXX
5	3	7.2966667	XX
3	3	7.4200000	XX
12	3	7.4800000	X
2	3	7.5500000	X
4	3	7.5766667	X
9	3	7.6400000	X
1	3	7.8033333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: FOSFORO POR HECTAREA

Level codes: FOSFORO VIA SECA

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	978.91680	11	88.992436	11.191	.0000
Within groups	190.84860	24	7.952025		
Total (corrected)	1169.7654	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Thr Nov 3 1994 07:28:40 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	27.790000	.1852026	1.6280894	23.638283 31.941717
2	3	25.176667	1.0072625	1.6280894	21.024950 29.328384
3	3	34.420000	.0000000	1.6280894	30.268283 38.571717
4	3	40.563333	1.2967181	1.6280894	36.411616 44.715050
5	3	33.943333	3.2101783	1.6280894	29.791616 38.095050
6	3	32.996667	1.3574650	1.6280894	28.844950 37.148384
7	3	33.286667	2.6102128	1.6280894	29.134950 37.438384
8	3	32.480000	.4358899	1.6280894	28.328283 36.631717
9	3	34.443333	.5757700	1.6280894	30.291616 38.595050
10	3	30.123333	2.1328333	1.6280894	25.971616 34.275050
11	3	34.503333	1.9733333	1.6280894	30.351616 38.655050
12	3	46.153333	1.0733333	1.6280894	42.001616 50.305050
Total	36	33.823333	.4699889	.4699889	32.624836 35.021831

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	25.176667	X
1	3	27.790000	XX
10	3	30.123333	XX
8	3	32.480000	XXX
6	3	32.996667	XXX
7	3	33.286667	XXX
5	3	33.943333	XX
3	3	34.420000	XX
9	3	34.443333	XX
11	3	34.503333	XX
4	3	40.563333	XX
12	3	46.153333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: FOSFORO POR HECTAREA

Level codes: FOSFORO VIA SECA

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 99

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	978.91680	11	88.992436	11.191	.0000
Within groups	190.84860	24	7.952025		
Total (corrected)	1169.7654	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Thr Nov 3 1994 07:34:57 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	27.790000	.1852026	1.6280894	22.815534 32.764466
2	3	25.176667	1.0072625	1.6280894	20.202201 30.151132
3	3	34.420000	.0000000	1.6280894	29.445534 39.394466
4	3	40.563333	1.2967181	1.6280894	35.588868 45.537799
5	3	33.943333	3.2101783	1.6280894	28.968868 38.917799
6	3	32.996667	1.3574650	1.6280894	28.022201 37.971132
7	3	33.286667	2.6102128	1.6280894	28.312201 38.261132
8	3	32.480000	.4358899	1.6280894	27.505534 37.454466
9	3	34.443333	.5757700	1.6280894	29.468868 39.417799
10	3	30.123333	2.1328333	1.6280894	25.148868 35.097799
11	3	34.503333	1.9733333	1.6280894	29.528868 39.477799
12	3	46.153333	1.0733333	1.6280894	41.178868 51.127799
Total	36	33.823333	.4699889	.4699889	32.387329 35.259338

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD	Level	Count	Average	Homogeneous Groups
	2	3	25.176667	X
	1	3	27.790000	X
	10	3	30.123333	X
	8	3	32.480000	XX
	6	3	32.996667	XX
	7	3	33.286667	XX
	5	3	33.943333	XX
	3	3	34.420000	XX
	9	3	34.443333	XX
	11	3	34.503333	XX
	4	3	40.563333	XX
	12	3	46.153333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: FOSFORO POR HECTAREA

Level codes: POSVHUMD VIA HUMEDA

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 95

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	359.69863	4	89.924657	7.037	.0058
Within groups	127.78387	10	12.778387		
Total (corrected)	487.48249	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Fri Nov 25 1994 06:04:45 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	32.753333	3.6371249	2.0638465	27.945876 37.560790
2	3	25.180000	2.1253078	2.0638465	20.372543 29.987457
3	3	31.363333	.7666667	2.0638465	26.555876 36.170790
4	3	40.486667	.7766667	2.0638465	35.679210 45.294124
5	3	33.663333	1.5364606	2.0638465	28.855876 38.470790
Total	15	32.689333	.9229802	.9229802	30.539373 34.839293

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	25.180000	X
3	3	31.363333	XX
1	3	32.753333	XX
5	3	33.663333	XX
4	3	40.486667	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	7.57333		9.61491
1 - 3	1.39000		9.61491
1 - 4	-7.73333		9.61491
1 - 5	-0.91000		9.61491
2 - 3	-6.18333		9.61491
2 - 4	-15.3067		9.61491 *
2 - 5	-8.48333		9.61491
3 - 4	-9.12333		9.61491
3 - 5	-2.30000		9.61491
4 - 5	6.82333		9.61491

\* denotes a statistically significant difference.

One-Way Analysis of Variance

Data: FOSFORO POR HECTAREA

Level codes: POSVHUMD VIA HUMEDA

Labels:

Means plot: Tukey

Confidence level: 99

Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	359.69863	4	89.924657	7.037	.0058
Within groups	127.78387	10	12.778387		
Total (corrected)	487.48249	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Fri Nov 25 1994 06:08:41 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Tukey HSD intervals for mean
1	3	32.753333	3.6371249	2.0638465	26.398545 39.108122
2	3	25.180000	2.1253078	2.0638465	18.825211 31.534789
3	3	31.363333	.7666667	2.0638465	25.008545 37.718122
4	3	40.486667	.7766667	2.0638465	34.131878 46.841455
5	3	33.663333	1.5364606	2.0638465	27.308545 40.018122
Total	15	32.689333	.9229802	.9229802	29.847385 35.531281

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	25.180000	X
3	3	31.363333	XX
1	3	32.753333	XX
5	3	33.663333	XX
4	3	40.486667	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	7.57333		12.7096
1 - 3	1.39000		12.7096
1 - 4	-7.73333		12.7096
1 - 5	-0.91000		12.7096
2 - 3	-6.18333		12.7096
2 - 4	-15.3067		12.7096 *
2 - 5	-8.48333		12.7096
3 - 4	-9.12333		12.7096
3 - 5	-2.30000		12.7096
4 - 5	6.82333		12.7096

\* denotes a statistically significant difference.

One-Way Analysis of Variance

Data: BIOFERT.HUMEDAD

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 95      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	1.4288889	11	.1298990	6.073	.0001
Within groups	.5133333	24	.0213889		
Total (corrected)	1.9422222	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:11:45 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	8.2000000	.0577350	.0844371	8.0256888	8.3743112
2	3	8.5000000	.0000000	.0844371	8.3256888	8.6743112
3	3	8.5000000	.0577350	.0844371	8.3256888	8.6743112
4	3	8.4666667	.0333333	.0844371	8.2923555	8.6409779
5	3	8.4000000	.0577350	.0844371	8.2256888	8.5743112
6	3	8.2333333	.1201850	.0844371	8.0590221	8.4076445
7	3	8.3000000	.1527525	.0844371	8.1256888	8.4743112
8	3	8.4000000	.1154701	.0844371	8.2256888	8.5743112
9	3	8.4333333	.0881917	.0844371	8.2590221	8.6076445
10	3	8.1333333	.0881917	.0844371	7.9590221	8.3076445
11	3	8.1000000	.0000000	.0844371	7.9256888	8.2743112
12	3	8.8666667	.0881917	.0844371	8.6923555	9.0409779
Total	36	8.3777778	.0243749	.0243749	8.3274585	8.4280971

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
11	3	8.1000000	X
10	3	8.1333333	X
1	3	8.2000000	X
6	3	8.2333333	X
7	3	8.3000000	X
5	3	8.4000000	X
8	3	8.4000000	X
9	3	8.4333333	X
4	3	8.4666667	XX
2	3	8.5000000	XX
3	3	8.5000000	XX
12	3	8.8666667	X

One-Way Analysis of Variance

Data: BIOFERT.HUMEDAD

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 99      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	1.4288889	11	.1298990	6.073	.0001
Within groups	.5133333	24	.0213889		
Total (corrected)	1.9422222	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 03:20:21 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	8.2000000	.0577350	.0844371	7.9637917	8.4362083
2	3	8.5000000	.0000000	.0844371	8.2637917	8.7362083
3	3	8.5000000	.0577350	.0844371	8.2637917	8.7362083
4	3	8.4666667	.0333333	.0844371	8.2304583	8.7028750
5	3	8.4000000	.0577350	.0844371	8.1637917	8.6362083
6	3	8.2333333	.1201850	.0844371	7.9971250	8.4695417
7	3	8.3000000	.1527525	.0844371	8.0637917	8.5362083
8	3	8.4000000	.1154701	.0844371	8.1637917	8.6362083
9	3	8.4333333	.0881917	.0844371	8.1971250	8.6695417
10	3	8.1333333	.0881917	.0844371	7.8971250	8.3695417
11	3	8.1000000	.0000000	.0844371	7.8637917	8.3362083
12	3	8.8666667	.0881917	.0844371	8.6304583	9.1028750
Total	36	8.3777778	.0243749	.0243749	8.3095903	8.4459653

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
11	3	8.1000000	X
10	3	8.1333333	X
1	3	8.2000000	X
6	3	8.2333333	X
7	3	8.3000000	X
5	3	8.4000000	XX
8	3	8.4000000	XX
9	3	8.4333333	XX
4	3	8.4666667	XX
2	3	8.5000000	XX
3	3	8.5000000	XX
12	3	8.8666667	X

One-Way Analysis of Variance

Data: PESO DE 1000 GRANOS

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 95      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	7002.7733	11	636.61576	15.022	.0000
Within groups	1017.1067	24	42.37944		
Total (corrected)	8019.8800	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 04:13:52 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	128.86667	.9837570	3.7585212	121.10761	136.62572
2	3	128.33333	2.1372360	3.7585212	120.57428	136.09239
3	3	135.70000	6.4236542	3.7585212	127.94095	143.45905
4	3	138.23333	5.6572471	3.7585212	130.47428	145.99239
5	3	145.30000	3.8000000	3.7585212	137.54095	153.05905
6	3	154.36667	.4096069	3.7585212	146.60761	162.12572
7	3	156.00000	3.8188131	3.7585212	148.24095	163.75905
8	3	165.20000	4.6608297	3.7585212	157.44095	172.95905
9	3	160.83333	1.9359178	3.7585212	153.07428	168.59239
10	3	160.83333	2.2929845	3.7585212	153.07428	168.59239
11	3	166.43333	3.4901449	3.7585212	158.67428	174.19239
12	3	166.30000	4.3143172	3.7585212	158.54095	174.05905
Total	36	150.53333	1.0849916	1.0849916	148.29349	152.77318

Sun Nov 20 1994 04:14:38 PM

Multiple range analysis

Method: 95 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	128.33333	X
1	3	128.86667	X
3	3	135.70000	XX
4	3	138.23333	XXX
5	3	145.30000	XXXX
6	3	154.36667	XXXX
7	3	156.00000	XXX
9	3	160.83333	XX
10	3	160.83333	XX
8	3	165.20000	X
12	3	166.30000	X
11	3	166.43333	X

One-Way Analysis of Variance

Data: PESO DE 1000 GRANOS

Level codes: BIOFERT.TRATAMIENT

Labels:

Means plot: Conf. Int.      Confidence level: 99      Range test: Tukey

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	7002.7733	11	636.61576	15.022	.0000
Within groups	1017.1067	24	42.37944		
Total (corrected)	8019.8800	35			

0 missing value(s) have been excluded.

Sun Nov 20 1994 04:20:18 PM

Table of means

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	99 Percent Confidence intervals for mean	
1	3	128.86667	.9837570	3.7585212	118.35241	139.38093
2	3	128.33333	2.1372360	3.7585212	117.81907	138.84759
3	3	135.70000	6.4236542	3.7585212	125.18574	146.21426
4	3	138.23333	5.6572471	3.7585212	127.71907	148.74759
5	3	145.30000	3.8000000	3.7585212	134.78574	155.81426
6	3	154.36667	.4096069	3.7585212	143.85241	164.88093
7	3	156.00000	3.8188131	3.7585212	145.48574	166.51426
8	3	165.20000	4.6608297	3.7585212	154.68574	175.71426
9	3	160.83333	1.9359178	3.7585212	150.31907	171.34759
10	3	160.83333	2.2929845	3.7585212	150.31907	171.34759
11	3	166.43333	3.4901449	3.7585212	155.91907	176.94759
12	3	166.30000	4.3143172	3.7585212	155.78574	176.81426
Total	36	150.53333	1.0849916	1.0849916	147.49813	153.56854

Multiple range analysis

Method: 99 Percent Tukey HSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	128.33333	X
1	3	128.86667	X
3	3	135.70000	XX
4	3	138.23333	XXX
5	3	145.30000	XXXX
6	3	154.36667	XXX
7	3	156.00000	XXX
9	3	160.83333	XX
10	3	160.83333	XX
8	3	165.20000	X
12	3	166.30000	X
11	3	166.43333	X