

76150

BRUNO, CARLA VALERIA

Efecto del viento sobre la circulación atmosférica (prevención de la contaminación)

2017

76150



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA AGRÍCOLA

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**EFFECTOS DEL NITRATO SOBRE LA SIMBIOSIS *BRADYRHIZOBIUM*
JAPONICUM-SOJA: ROL DE LA NITRATO REDUCTASA EN LA
FIJACIÓN DE NITRÓGENO**

Ing. Agr. Carla Valeria Bruno

DIRECTOR: Dra. Stella Maris Castro

CODIRECTOR: Dra. Alicia María Thuar

50130

Río Cuarto, mayo 2017

70150

MFI
Clasif:
T-1106

COMISIÓN ASESORA

Dra. García de Salamone, Inés Eugenia

Universidad de Buenos Aires

Dra. Fernández, Elena Mercedes

Universidad Nacional de Río Cuarto

Dr. Balatti, Pedro Alberto

Universidad Nacional de La Plata

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha..... Río Cuarto, 05 de mayo de 2017
Calificación..... diez (10) sobresaliente

JURADO

Firma.....  Aclaración..... Inés E. GARCÍA DE SALAMONE
Firma.....  Aclaración..... Elena M. Fernández
Firma.....  Aclaración..... Miriam Esteban

A mi esposo Mauro y a mi hija Albertina

A mis padres, Mercedes y Alberto

Mis pilares en la vida

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por la educación pública y gratuita, que permitió mi formación de grado y posgrado.

A la Dra. Stella Castro, por dirigir mi trabajo, por su confianza, enseñanza y estímulo. Por su apoyo y la posibilidad de crecer profesionalmente más allá de la realización de la tesis doctoral.

A la Dra. Alicia Thuar, por co-dirigir mi trabajo, por la ayuda que me ha prestado en todo lo que he necesitado a lo largo de estos años.

A los miembros de la comisión asesora Dra. Inés García de Salamone, Dra. Elena Fernández y Dr. Pedro Balatti por sus valiosos aportes que han contribuido a mejorar significativamente este trabajo, por su dedicación y responsabilidad a la hora de corregir el trabajo de tesis.

Al Dr. Javier Andrés por compartir su conocimiento y disponibilidad para ayudarme.

A la Dra. Eliana Bianucci y a la Dra. Ana Furlan por abrirme las puertas cuando llegue y por haberme brindado el lugar y todo su equipamiento para desarrollar mi trabajo.

A la Lic. Ana Vianco por su colaboración y ayuda en el desarrollo de los análisis estadísticos.

Al MSc. Marcos Bongiovanni y a la Ing. Agr. Rosana Marzari por haberme ayudado a mi formación a nivel profesional como humano.

A las MSc. Mercedes Ibáñez y Leticia Borghi por guiarme en mis primeros pasos con los análisis estadísticos.

A todos los integrantes del Lab. de Microbiología Agrícola, a los que están y a los que se fueron, por compartir estos años de ensayos.

A Edgar Maseda por ayudarme en los ensayos experimentales.

A Mafa por su cariño, por su paciencia y por la ayuda en la crianza de mi hija.

A mi familia por su apoyo incondicional y acompañarme a pesar de las distancias.

A mi familia política, en especial a la Dra. Graciela Cufre y al Dr. Sergio Lenardón, por su ayuda académica y personal, y por alentarme siempre en mis estudios.

RESUMEN

En el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N) existen procesos claves en que los microorganismos permiten el reciclaje del N en la Tierra. Estos procesos son la fijación biológica del nitrógeno (FBN), que incorpora este elemento a la biósfera para su utilización por los organismos vivos, y la desnitrificación, que permite devolver el N a la atmósfera. En la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja, la FBN resulta ser una herramienta muy útil para mantener una agricultura sustentable, aunque se encuentra limitada por diferentes condiciones ambientales, entre ellas, altas concentraciones de nitrato del suelo. Una estrategia para contrarrestar el efecto negativo del nitrato en la FBN es seleccionar cepas desnitrificantes de bradyrizobios con una elevada actividad nitrato reductasa (NR) en simbiosis con la planta. Los estudios realizados en esta tesis doctoral se enfocaron a la optimización de la FBN en el cultivo de soja para una mayor producción y mantenimiento del recurso suelo. Para ello, se utilizaron cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12) como inoculantes del cultivo de soja creciendo en ausencia y presencia de 5 mM de nitrato en ensayos de invernáculo. Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento de las plantas no se encontró afectado por la presencia de nitrato, sin embargo, se observó una reducción en la nodulación sin alterar la FBN y el contenido de compuestos nitrogenados (nitrato, ureidos y aminoácidos). Es de destacar que la cepa Per 3.61 presentó la mayor actividad específica nitrato reductasa bacteroidal, en ambas condiciones de crecimiento, y se seleccionó junto con la cepa de referencia USDA110 para los ensayos a campo. En la campaña (2014-2015), el rendimiento de la soja inoculada con la cepa Per 3.61 fue superior a los tratamientos fertilizado e inoculado con USDA110 y presentó el mayor aporte de la FBN en el balance relativo de nitrógeno. En la campaña (2015-2016), el rendimiento de soja inoculada con la cepa Per 3.61 se mantuvo elevado aún cuando el cultivo de soja fue inoculado y fertilizado con urea. En ambos tratamientos (inoculado e inoculado y fertilizado) se observó significativos aportes de FBN en el balance relativo de nitrógeno. En conclusión, la cepa desnitrificante *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61, caracterizada por una elevada actividad nitrato reductasa, representa un aporte promisorio para su uso como inoculante para soja, mejorando la FBN y el rendimiento del cultivo en suelos con alto contenido de nitrato.

Palabras Clave: soja, *Bradyrhizobium japonicum*, nitrato, nitrato reductasa.

SUMMARY

The biogeochemical nitrogen (N) cycle includes two key processes by which microorganisms contribute to maintain soil fertility, biological nitrogen fixation (BNF) and denitrification. In the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiotic association, BNF is a highly recommendable environmental approach to keep sustainable agriculture, although it is limited by different environmental conditions, including high soil nitrate concentrations. A strategy to reduce the effect of nitrate on BNF might be to select denitrifying bradirhizobia strains with a high bacteroidal nitrate reductase (NR) activity in soybean symbiosis. Studies performed in this Doctoral Thesis focused on BNF optimization in soybean and emphasized in production improvement and soil resource maintenance. Denitrifying strains of *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, Per 3.64, Per 3.61 and Per 1.12) were used as inoculants for soybean in absence and presence of 5 mM nitrate in greenhouse trials. Results showed that plant growth was not affected by nitrate presence, however, a reduction in nodulation was observed without alterations in BNF and nitrogen compounds (nitrate, ureides and amino acids). Per 3.61 strain presented higher bacteroidal nitrate reductase specific activity and it was selected together with USDA110 reference strain for field trials. In the crop season (2014-2015) soybean yield inoculated with Per 3.61 strain was higher than the treatments (inoculated with USDA110 strain and fertilized with urea) showing the highest BNF contribution in relative nitrogen balance. In the crop season (2015-2016), soybean yield inoculated with the Per 3.61 strain remained high even when the soybean was inoculated and fertilized with urea showing a significant contribution of BNF in nitrogen relative balance in both treatments (inoculated/inoculated and fertilized). In conclusion, denitrifying strain of *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61, characterized by high nitrate reductase activity, represents a promising contribution for its used as inoculant for soybean, improving BNF and crop yield in soils with high nitrate content.

Keywords: soybean, *Bradyrhizobium japonicum*, nitrate, nitrate reductase.

Índice General

Comisión Asesora.....	i
Defensa Oral y Pública.....	i
Jurado	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen	iv
Summary.....	v
Índice General.....	vi
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras	x
CAPITULO 1: Introducción general	1
Importancia del nitrógeno para las plantas	2
Características de las plantas de soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill)	5
Características generales de los rizobios.....	9
Efecto del nitrato sobre la fijación biológica del nitrógeno.....	10
Hipótesis de trabajo	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO 2	15
Introducción.....	16
Microorganismos con actividad promotora del crecimiento vegetal.....	17
Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.....	18
Importancia de la fijación biológica del nitrógeno en la asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja	19
Mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el establecimiento de la asociación <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja	19
Características de las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> con capacidad desnitrificante	27
Influencia del nitrato sobre la asociación simbiótica rizobio-leguminosa	29
Objetivos específicos.....	32
Materiales y métodos.....	34
Cepas bacterianas	35
Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de las cepas bacterianas	35
Conservación de la cepa bacteriana.....	36

Ensayos de la actividad promotora del crecimiento vegetal.....	36
Cultivar de soja.....	37
Esterilización superficial de la semilla (Vincent, 1970).....	38
Germinación de las semillas.....	38
Asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja.....	38
Crecimiento de las plantas.....	39
Fijación simbiótica de nitrógeno.....	40
Análisis estadísticos.....	42
Resultados y discusión.....	43
Características del crecimiento y la viabilidad de las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	44
Actividad de promoción de crecimiento de las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	45
Efecto del nitrato sobre la asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja.....	46
Indicadores de la fijación de nitrógeno y de carbono en la asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja.....	51
CAPÍTULO 3	57
Introducción.....	58
Rol de los compuestos nitrogenados en la asociación simbiótica rizobio-leguminosa.....	59
Nitrato.....	60
Ureidos.....	62
Aminoácidos.....	65
Proceso de desnitrificación en el ciclo del nitrógeno.....	66
Enzimas involucradas en la desnitrificación.....	68
Rol de la desnitrificación en los nódulos de las leguminosas.....	69
Objetivos específicos.....	71
Materiales y métodos.....	73
Material Vegetal.....	74
Determinaciones Químicas.....	74
Determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa.....	75
Determinación de proteínas.....	76
Resultados y discusión.....	77
Efecto del nitrato sobre los compuestos nitrogenados de la planta de soja.....	78
Actividad nitrato reductasa bacteroidal.....	82
CAPÍTULO 4	85
Introducción.....	86

Fertilidad del suelo	87
Importancia del cultivo de soja en Argentina	88
Objetivos específicos	91
Materiales y métodos	93
Características del sitio experimental	94
Análisis de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo	94
Diseño experimental de los ensayos a campo	95
Estimación del balance de nitrógeno	97
Estimación de rendimiento del cultivo de soja	98
Análisis estadísticos	98
Resultados y discusión	100
Establecimiento de las condiciones edáficas y climáticas para el desarrollo del cultivo de soja	101
Interacción de la nodulación con las variables edáficas	106
Balance relativo de nitrógeno en el cultivo de soja	111
Rendimiento del cultivo de soja	113
CAPÍTULO 5: Conclusiones	119
Consideraciones Finales	122
Referencias Bibliográficas	123
Anexos	144

Índice de Tablas

Tabla 1. Estados fenológicos del cultivo de soja	7
Tabla 2. Características de las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	35
Tabla 3. Estimación del crecimiento aéreo y radical y del contenido de N en plantas de soja en asociación con <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	46
Tabla 4. Estimación de la nodulación de la asociación <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja..	47
Tabla 5. Estimación del N ₂ fijado y de la efectividad simbiótica en la asociación <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja	50
Tabla 6. Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera en plantas de sojas inoculadas con las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	52
Tabla 7. Actividad específica de la enzima nitrato reductasa en bacteroides de nódulos de soja	83
Tabla 8. Propiedades físico-químicos del suelo del área experimental campaña (2014-2015)	101
Tabla 9. Propiedades físico-químicos del suelo del área experimental campaña (2015-2016)	101
Tabla 36. Balance relativo de nitrógeno campaña (2014-2015).....	112
Tabla 37. Balance relativo de nitrógeno campaña (2015-2016).....	113
Tabla 38. Estimación del rendimiento del cultivo de soja cosechado en forma manual campaña (2014-2015).....	114
Tabla 39. Estimación del rendimiento del cultivo de soja cosechado en forma manual campaña (2015-2016).....	115
Tabla 40. Estimación del rendimiento del cultivo de soja cosechado en forma mecánica campaña (2015-2016).....	116

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno en la naturaleza. Fuente: Galloway <i>et al.</i> , 2004	3
Figura 2. Planta de soja (<i>Glycine max</i> L.)	6
Figura 3. Ciclo ontogénico de la leguminosa soja. Fuente: Modificado de Fulltec, 2012 ...	7
Figura 4. Infección de las raíces mediante la formación de hilo de infección. A) Los flavonoides liberados por las raíces actúan como quimioattractantes. B) Los rizobios se adhieren a pelos radicales de la zona susceptible de la raíz. El pelo radical se curva y engloba en su interior a las bacterias. Las células corticales retoman la división celular en respuesta a los factores Nod rizobianos y se forma el primordio nodular. C) La pared celular sufre una invaginación o degradación parcial seguida de una invaginación de la membrana plasmática vegetal para formar el hilo de infección. D) El hilo de infección crece y se ramifica a medida que se dirige al córtex radical. Posteriormente, las bacterias son captadas por las células del primordio por endocitosis y comienzan su diferenciación a bacteroides. Fuente: Ibáñez, 2009	22
Figura 5. Esquema de un nódulo indeterminado (izquierda) y determinado (derecha), mostrando sus diferentes zonas. Fuente: Modificado de Hadri <i>et al.</i> , 1998	23
Figura 6. Complejo enzimático nitrogenasa. La ferredoxina reduce la proteína Fe. Unión e hidrólisis de ATP a la proteína Fe provocando un cambio conformacional en dicha proteína que facilita las reacciones redox. La proteína Fe reduce la proteína MoFe y esta reduce el N ₂ . Fuente: Taiz y Zeiger, 2010	25
Figura 7. Célula infectada en un nódulo de leguminosa exportadora de amidas: rutas metabólicas que tienen lugar en el citosol, simbiosoma, mitocondrias y plastidios de una. SS: sacarosa sintasa, IA: invertasa alcalina, UDPGPP: UDP-glucosa pirofosforilasa, PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa, MDH: malato deshidrogenasa, Nasa: nitrogenasa, GS: glutamina sintetasa, GOGAT: glutamato sintasa, AAT: aspartato aminotrasferasa, ICDH: isocitrato deshidrogenasa. Fuente: González <i>et al.</i> , 2006	27
Figura 8. Viabilidad de las diferentes cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> en medio de cultivo YEM. Los datos representan la media ± error estándar (n=3)	44
Figura 9. δ ¹³ C en plantas de soja inoculadas con las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Los datos representan la media ± error estándar (n=3). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan (p<0,05)	54
Figura 10. Relación C:N en plantas de soja control e inoculadas con las cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> sin y con nitrato. Los datos representan la media ± error estándar (n=3). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan (p<0,05)	56
Figura 11. Biosíntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de leguminosas. Fuente: González <i>et al.</i> , 2006	60
Figura 12. Fórmula estructural de los principales ureidos transportados por el xilema.....	63
Figura 13. Composición de la fracción nitrogenada de la savia bruta en función de la fuente de nitrógeno usada por la leguminosa <i>Phaseolus vulgaris</i> . aa:	

aminoácidos; N: nitrato; U: ureidos. <i>Phaseolus vulgaris</i> . Fuente: Modificado de Quiles-Luque, 2012.....	64
Figura 14. Proceso completo de desnitrificación. Fuente: Bedmar <i>et al.</i> , 2014.....	67
Figura 15. Efecto del nitrato en la difusión de gases al nódulo. Fijación de nitrógeno y reducción del nitrato en bacteroide. 1: el nitrato directa o indirectamente causa un incremento en la resistencia de la barrera de difusión, 2: cuando hay nitrato disminuye la FBN, 3: en condiciones de baja tensión de oxígeno ocurre la reducción de nitrato, 4: la respiración aerobia en el bacteroide. Fuente: Lucinski <i>et al.</i> , 2002	70
Figura 16. Contenido de nitrato en la asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja. Los datos representan la media \pm error estándar (n=10). Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p<0,05$) según prueba Duncan.....	79
Figura 17. Contenido de ureidos en la asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja. Los datos representan la media \pm error estándar (n=10). Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p<0,05$) según prueba Duncan	80
Figura 18. Contenido de aminoácidos en la asociación simbiótica <i>Bradyrhizobium japonicum</i> -soja. Los datos representan la media \pm error estándar (n=10). Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p<0,05$) según prueba Duncan.....	82
Figura 19. Componentes del rendimiento del cultivo de soja	98
Figura 20. Precipitaciones, temperatura medias, máximas y mínimas diarias registradas en la campaña (2014-2015). Fuente: Servicios Agrometeorológicos, UNRC	103
Figura 21. Precipitaciones, temperatura medias, máximas y mínimas diarias registrada en la campaña (2015-2016). Fuente: Servicios Agrometeorológicos, UNRC	104
Figura 22. Evolución del agua en el suelo del cultivo de soja en la campaña (2014-2015). Fuente: Servicios Hidrología Agrícola, UNRC	105
Figura 23. Evolución del agua en el suelo del cultivo de soja en la campaña (2015-2016). Fuente: Servicios Hidrología Agrícola, UNRC	105
Figura 24. Agrupamiento de las observaciones en función de Peso Seco, Número de nódulos, Humedad, Nitrato y Nitrógeno de Nitrato	107
Figura 25. Agrupamiento de las observaciones en función de Peso Seco, Número de nódulos, Humedad, Nitrato y Nitrógeno de Nitrato, campaña (2014-2015)	108
Figura 26. Agrupamiento de las observaciones en función de Peso Seco, Número de nódulos, Humedad, Nitrato y Nitrógeno de Nitrato, campaña (2015-2016)	109

Capítulo 1: Introducción general

Importancia del nitrógeno para las plantas

El nitrógeno (N) es el nutriente más importante, esencial para todos los organismos. Es el constituyente esencial de los aminoácidos, nucleoproteínas y nucleótidos, esencial para la división y expansión celular y por lo tanto para el crecimiento de las plantas (Francis *et al.*, 2007). El amonio (NH_4^+) es oxidado principalmente a nitrato (NO_3^-), si bien ambos compuestos son asimilados por los organismos vivos. La forma oxidada del N, NO_3^- es la que incorporan las plantas (Li, 2013). Aún cuando la atmósfera contiene un 80 % de nitrógeno molecular (N_2), en este estado no puede ser aprovechado por la planta que se ven impulsadas a utilizar esas formas combinadas que se encuentran en el suelo, en cantidad insuficiente para suplir los requerimientos nutricionales de los cultivos siendo esto energéticamente más barato (Olivares-Pascual, 2008). Esta situación afecta la productividad primaria, en los ecosistemas naturales y también en la producción agrícola, dado el papel crítico que cumple el N en el crecimiento de dichos sistemas (Bedmar *et al.*, 2014).

Los compuestos biológicamente más importantes son nitrato, nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso y amonio. La concentración libre de cada uno de estos compuestos nitrogenados está determinada principalmente por las tasas de producción y consumo de los procesos metabólicos bacterianos (van Spanning, 2005). El crecimiento y el desarrollo de las plantas es dependiente del aporte de dicho nutriente; ésto indicaría la existencia de una estrecha relación entre el metabolismo del nitrógeno y el rendimiento del cultivo (Mattson *et al.*, 1991, Myrold, 2005), el tamaño de los granos, el contenido de proteínas y absorción de otros nutrientes como el fósforo y el potasio (Niklas, 2008).

En el mundo desarrollado, la agricultura intensiva que consiste en el laboreo intenso del suelo y el tratamiento con fertilizantes y agroquímicos para obtener y mantener altos rendimientos en las producciones agrícolas, no tiene en cuenta los daños que estos productos pueden ocasionar, ya sea afectando el ciclo global del nitrógeno, contaminando las aguas subterráneas y superficiales, incrementando los riesgos de intoxicaciones químicas y aumentando los niveles de óxido nitroso (N_2O) atmosférico, el cual es un potente gas invernadero (FAO, 2015).

En el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 1) existen procesos claves por los cuales, los microorganismos permiten el reciclaje del N en la Tierra. Uno de ellos es la fijación biológica del nitrógeno (FBN), en el que los microorganismos reducen el N_2 atmosférico a amonio favoreciendo así el aporte de nitrógeno a las plantas, y el otro

reducción de N_2 atmosférico realizada por las bacterias es el mayor aporte de N a la biosfera, y es un componente clave del ciclo global del nitrógeno. De los 175 millones de toneladas de nitrógeno que fijan las bacterias, 140 millones corresponden a la fijación simbiótica (de Felipe, 2006), es decir que, la principal fuente de FBN es la asociación simbiótica entre rizobios y plantas de la familia de las leguminosas. La interacción entre las bacterias y una planta huésped conduce a la formación de nódulos, estructuras que desarrollan frecuentemente en la raíz y solo en algunas pocas plantas en el tallo. Específicamente, la leguminosa soja se asocia simbióticamente con microorganismos que se agrupan en el orden Rhizobiales, incluyendo especies de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Azorhizobium*, *Allorhizobium* (Angelini *et al.*, 2011). Dentro de este grupo de organismos, existen tres especies de *Bradyrhizobium* que nodulan soja, de los cuales *B. japonicum* (Fred *et al.*, 1932) y *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) son de crecimiento lento, suministrando alrededor del 50-60% de los requerimientos del nitrógeno de la planta (Salvagiotti *et al.*, 2008) y *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) y *B. diazoefficiens* de crecimiento extra lento.

Sugiyama *et al.*, (2015) informaron cambios en las bacterias rizosférica especialmente en *Bradyrhizobium* durante el crecimiento de la planta de soja lo que sugiere que la relación soja-rizobio podría ser selectiva. Las leguminosas como la soja son capaces de adquirir la mayor parte del N esencial mediante el proceso de fijación y la parte restante estará disponible para la planta desde el suelo (Sinclair *et al.*, 2003). Los beneficios económicos del uso de inóculos de soja han sido muy trascendentales (Wagner, 2011).

La reducción anaeróbica de nitrato es un proceso crucial en el ciclo del N en la biosfera y su transformación en nitrógeno atmosférico mediante la desnitrificación permite la eliminación del exceso de nitrato que contamina los ecosistemas terrestres y acuáticos, principalmente como consecuencia del abuso de fertilizantes nitrogenados en la práctica agrícola. La desnitrificación tiene un gran impacto en la agricultura, el medioambiente y la salud humana (Delgado y Bedmar, 2006).

La desnitrificación es una forma alternativa de la respiración por lo que, en condiciones limitantes de oxígeno, los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus óxidos de nitrógeno derivados como aceptores de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de N_2 . La reducción de los óxidos de nitrógeno derivados está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a la célula crecer en ausencia de oxígeno. La capacidad de desnitrificar es de gran interés en las asociaciones simbióticas que se

establecen entre los rizobios y sus leguminosas específicas, ya que esta habilidad permite a los bacteroides sobrevivir durante períodos de anoxia (Sánchez, 2009).

Dado que los bacteroides poseen la maquinaria enzimática necesaria para desnitrificar, este proceso podría generar ATP en condiciones en las que el oxígeno disponible sea limitante. Tales condiciones podrían ocurrir como consecuencia de una disminución de la concentración de oxígeno en los bacteroides provocada por un estrés abiótico (altas concentraciones de NO_3^-), lo que daría lugar a la disminución de la difusión de oxígeno hacia el interior del nódulo y, de la capacidad de producción de ATP (Delgado *et al.*, 2007); o bien, remover los nitritos tóxicos que pueden producirse como intermediarios y dañan a la nitrogenasa (Lucinski *et al.*, 2002).

García-Plazaola *et al.*, (1993) han demostrado con 13 cepas de *Rhizobium meliloti* que la desnitrificación también puede desempeñar una función protectora para el sistema de fijación de nitrógeno. Serrano y Chamber (1990) indicaron que *Bradyrhizobium* sp. en simbiosis con *Lupinus* mostró una alta correlación positiva entre la presencia de actividad nitrato reductasa (NR), enzima encargada de la reducción del nitrato a nitrito, y la mayoría de las variables relacionadas con la fijación de nitrógeno, lo que sugiere que la actividad NR puede desempeñar funciones complementarias a las de la nitrogenasa. La actividad de la nitrogenasa en los nódulos de lupino amarillo cultivados en presencia de 3, 5 y 7 mM de NO_3^- durante 40 días fue mayor en un 246%, 159% y 133%, respectivamente, que en los nódulos cultivados en ausencia de NO_3^- (Lang *et al.*, 1993).

En esta Tesis Doctoral, el sistema experimental de trabajo consistió en la asociación simbiótica de cepas de Bradyrhizobium japonicum, con capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y desnitrificar, con plantas de soja en presencia de nitrato. A continuación, se describen las características más relevantes de ambos simbioses y el efecto del nitrato.

Características de las plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill)

La familia de las leguminosas es la tercera más numerosa luego de las compuestas y gramíneas con 750 géneros y 20.000 especies y son las segundas en importancia ecológica y económica luego de la familia Gramineae (Doyle, 2001). Las leguminosas cultivadas se utilizan principalmente como forrajeras o para la producción de grano y su importancia económica se basa en aspectos tales como la potencialidad en la producción de proteínas vegetales para el consumo humano, suplementación del ganado (Graham y Vance, 2003) y utilización como forraje para el consumo animal (Doyle y Luckow, 2003). También es un

complemento crítico en rotaciones y sistemas de cultivo como fuente de nitrógeno, constituyendo una alternativa a los fertilizantes químicos (Broughton *et al.*, 2003). La capacidad de colonizar ecosistemas naturales, participando en la recuperación de suelos marginales y mejorando la fertilidad del suelo al incorporar el nitrógeno fijado a la materia orgánica constituye otra ventaja por parte de dicha familia (Vance, 1998).

La soja, (orden Fabales, familia Fabaceas, sub-familia Papilonoideas, género *Glycine*) es una dicotiledónea originaria de Asia (Figura 2) siendo el norte y centro de China, el sitio en el que se originó y sufrió el proceso de domesticación. A partir de su sitio de origen, el cultivo de soja se dispersó por diversos sitios del planeta, cultivándose en los cinco continentes (López *et al.*, 2013). En la Argentina comienza su expansión y llega a una producción alrededor de 50 millones de toneladas debido al aumento de la superficie sembrada (18 millones de hectáreas) y del rendimiento ($28 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) en la campaña 2013-2014 (Gutiérrez-Boem y Salvagiotti, 2014).



Figura 2. Planta de soja (*Glycine max* L.).

Las características morfológicas principales son: es una planta herbácea de ciclo anual que se cultiva en el ciclo cálido, erecta, de hasta 1,5m de altura. Desde el punto de vista estructural, las dos primeras hojas (eófilos) son simples y las posteriores trifolioladas; foliolos oval-lanceolados, el terminal más grande. Posee flores de color blanco o violáceo, reunidas en racimos axilares. Su fruto es una legumbre, péndula, pluriseminada, hirsuta, agrupadas. Las semillas esféricas a ligeramente ovaladas, se desarrollan en vainas de 4 a 6

cm de longitud y cada vaina contiene entre 2 y 4 semillas en su interior, y pueden ser de diferentes colores según la variedad (amarillas, negras o verdes) (Bianco *et al.*, 2007). La germinación es epigea, comienza cuando la semilla absorbe agua del suelo hasta alcanzar aproximadamente un 50%. El primer signo externo de la germinación es la emergencia de la radícula (raíz primaria) que crece hacia abajo y ancla la planta al suelo. Luego, comienza el crecimiento del hipocótilo hacia arriba empujando los cotiledones (Melgar *et al.*, 2011). El ciclo del cultivo de soja posee dos estados de desarrollo: vegetativo y reproductivo de estas estructuras. Se mencionan los estados de acuerdo a la escala de Fehr y Caviness (1977) (Figura 3 y Tabla 1).

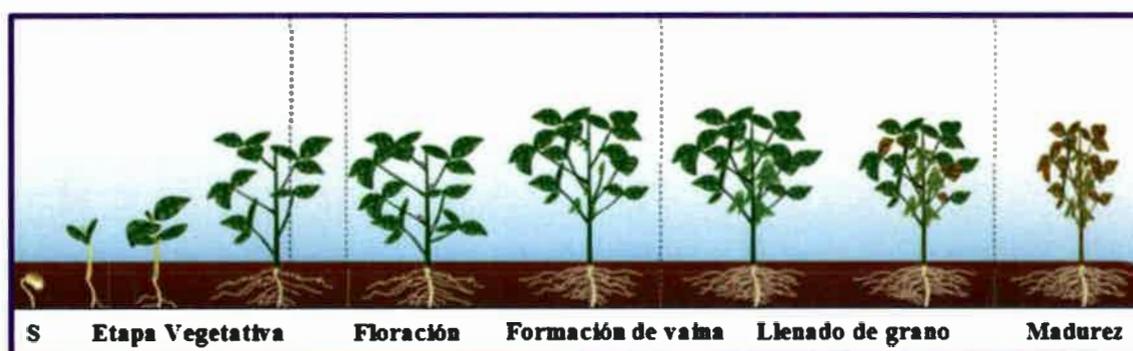


Figura 3. Ciclo ontogénico de la leguminosa soja. Fuente: Modificado de Fulltec, 2012.

Tabla 1. Estados fenológicos del cultivo de soja.

Estados Vegetativos	Estados Reproductivos
VE Emergencia	R1 Comienzo de floración
VC Cotiledonar	R2 Plena floración
V1 Un nudo	R3 Comienzo de fructificación
V2 Dos nudos	R4 Plena fructificación
V3 Tres nudos	R5 Comienzo de llenado de granos
	R6 Semilla completamente desarrollada
	R7 Comienzo de madurez
Vn n nudos	R8 Plena madurez

El cultivo de leguminosas, en asociación con bacterias fijadoras, mejoran la fertilidad del suelo lo que le confiere una gran eficacia a la hora de la fitorrecuperación de suelos forestales y revegetación, además de preparar los suelos agrícolas para ser utilizados con otros cultivos, por medio de la rotación de cultivos (Carpena *et al.*, 2006). Sin embargo, extraen grandes cantidades de fosfatos, potasio y calcio del suelo, de ahí que la

práctica habitual sea alternar cultivos de año en año siguiendo rotaciones en las que obligadamente interviene una leguminosa (Derka y Sánchez, 2006).

Dentro de los factores ambientales que regulan la dinámica del desarrollo y crecimiento del cultivo de soja se encuentra la temperatura y el fotoperíodo. Ambos factores actúan simultáneamente en las plantas que crecen en el campo y hay algunas evidencias de que existen interacciones entre ellos, los efectos de la temperatura varían según el fotoperíodo al que estén expuestas las plantas o viceversa (Sinclair *et al.*, 1991).

Temperatura: regula el desarrollo a lo largo de todo el ciclo, pero los requerimientos térmicos y las temperaturas cardinales que regulan la tasa de desarrollo difieren a lo largo de las fases, presentando una menor sensibilidad en estadios de crecimiento y desarrollo más avanzados. Para que se cumpla la fase germinación-emergencia se han calculado temperaturas bases (T_b) entre 6-9 °C, temperaturas óptimas entre 25-30 °C y una máxima de 40 °C. El tiempo térmico requerido para que se cumpla dicha fase se ha estimado entre 120-200 °C día ($T_b=6$ °C), con condiciones de buena-regular provisión hídrica (Andrade y Sadras, 2000).

Fotoperíodo: la soja es una especie con respuesta fotoperiódica cuantitativa, de días cortos. Presenta una corta fase juvenil, que dura en promedio 8 días desde emergencia (temperatura óptima), durante el cual el cultivo es insensible al fotoperíodo. A partir de V1, el fotoperíodo afecta todas las etapas del desarrollo del cultivo. Tanto el valor de fotoperíodo umbral como la sensibilidad fotoperiódica presentan una considerable variabilidad genotípica (Andrade y Sadras, 2000).

Por otra parte, el fotoperíodo y la temperatura también son dos factores importantes que influyen en el rendimiento del cultivo de soja (Kantolic *et al.*, 2003). En la actualidad, los rendimientos de la soja han aumentado de manera constante debido a una combinación de mejoras genéticas y de manejo, aunque este progreso se ve afectados por diferentes estreses ambientales como inundación, toxicidad de metales, contaminantes, radiación ultravioleta y factores bióticos (Hasanuzzaman *et al.*, 2016). Hay un creciente interés por valorar el impacto de la agricultura sobre la estructura del suelo, como así también por el conocimiento de la composición de las especies vegetales. Debido a la preponderancia del cultivo de soja, la investigación sobre los factores que controlan su producción, incidirá en la comprensión de los factores que la regulan. Así, uno de los factores a investigar es la relación simbiótica de la planta con los microorganismos del suelo (Pagano y Miransari, 2016).

Características generales de los rizobios

Los rizobios son bacilos Gram negativos de aproximadamente 0,5-0,9 μm de longitud, generalmente móviles cuando son jóvenes por flagelos peritricos, polares o subpolares, aerobios, quimiolitótrofos o quimioorganotrofos, no forman esporas, fáciles de cultivar; utilizan carbohidratos relativamente simples y amino-compuestos. Su crecimiento óptimo ocurre en un rango de temperaturas entre 25 °C y 30 °C y en un valor de pH entre 6 y 7 (Werner, 1992). En base a sus propiedades culturales se clasifican en rizobios de crecimiento rápido (RCR) con un tiempo de generación entre 3 y 4,5 horas, acidifican el medio y liberan abundantes polisacáridos y rizobios de crecimiento lento (RCL) con tiempos de generación que oscilan entre 6 y 8 horas, producen menos polisacáridos y alcalinizan el medio.

Los rizobios de crecimiento lento pertenecientes al género *Bradyrhizobium* presentan una velocidad de crecimiento lento en el medio extracto de levadura-manitol (YEM); producen colonias de morfología circular, opacas, blanquecinas y de textura granular luego de un período de incubación a 28 °C de 5 a 7 días en el medio YEM-Agar (Kerstens y Vancanneyt, 2005). Los miembros de este género no crecen en presencia de azúcares como la sacarosa y la ramnosa, sino que tienen la propiedad de crecer sobre ácidos orgánicos, y presentan ausencia de coloración de las colonias que crecen en un medio que contiene rojo congo. Además, son estimulados con biotina y requieren un alto contenido de calcio, hierro y cobalto para su crecimiento (Werner, 1992).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares de clasificación, se comenzó a utilizar el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr como uno de los principales criterios para la descripción de los géneros y las especies de rizobios (Menna *et al.*, 2009; Delamuta *et al.*, 2013). Actualmente, se asume que todos los rizobios, habitantes naturales en el suelo, pertenecen al Phylum Proteobacteria, ubicándose la mayor parte de ellos en el orden VI, Rhizobiales, de la clase I α -proteobacterias, familia Rhizobiaceae (Werner *et al.*, 2014). Con respecto a *Bradyrhizobium*, que constituye el grupo más importante en la interacción con soja, se considera que USDA110 y USDA76 son cepas representativas de *B. japonicum* y *B. elkanii* respectivamente, con lo cual suelen utilizarse como referencia para clasificar nuevos aislamientos (Balatti, 2007). Delamuta *et al.*, (2013) aportaron evidencias para considerar una reclasificación polifásica en una nueva especie de la cepa tipo USDA110, así como también la cepa SEMIA5080 comúnmente empleada en la formulación y diversidad simbiótica de *Bradyrhizobium* (López, 2015). En base a esta alta

diversidad en las propiedades genotípicas y fenotípicas, ha sido propuesta la reclasificación de la cepa *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, del grupo **Ia** en una nueva especie denominada *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov., por su mayor efectividad en la fijación de N, en altas tasas, especialmente en el cultivo de soja (Delamuta *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2014). La nueva especie *Bradyrhizobium diazoefficiens* debe su nombre a *diazo* referente a dinitrógeno y *efficiens* referente a eficiente, en conjunto remarcando una mayor eficiencia de fijación de nitrógeno mostrada por varias cepas de la especie *B. japonicum*. Esta nueva especie corresponde a bacterias Gram (-), aeróbicas como otras especies del género, pero sus colonias son de 1,2-1,5 mm de diámetro, circulares, convexas y opacas luego de 7 días de crecimiento a 28 °C en medio YEMA con rojo congo. Tienen un porcentaje de GC de 63,98% y son muy efectivas en la nodulación y fijación de nitrógeno en simbiosis con soja, aunque la especie también incluye simbiontes de otras leguminosas (López, 2015).

Efecto del nitrato sobre la fijación biológica del nitrógeno

El establecimiento de la asociación rizobio-leguminosa y la actividad fijadora de nitrógeno de los nódulos son procesos extremadamente sensibles a todo tipo de estreses, generalmente, la simbiosis en sí es mucho más sensible a los factores ambientales, que la planta o las bacterias en forma individual (Bedmar *et al.*, 2014). Los factores ambientales (temperatura, acidez, sequía, salinidad, metales pesados y alta concentración de nitrato del suelo, entre otros) pueden disminuir el número de rizobios naturalizados o introducidos en el inoculante. Asimismo, el estrés biótico (causado por patógenos o plagas) afecta la nodulación y condiciona la supervivencia de la planta (Camargo, 2012), por lo general, el microsimbionte es el más afectado (Hungria y Vargas, 2000).

El exceso de nitratos afecta no sólo a los ecosistemas terrestres y marinos, sino que también contribuye a la liberación a la atmósfera de especies reactivas de nitrógeno (óxido nitroso) los cuales deterioran la capa de ozono y contribuyen al incremento de los gases de efecto invernadero implicados en el cambio climático (Sutton *et al.*, 2011; Obando-Castellanos *et al.*, 2016). El empleo de fertilizantes ha provocado un considerable incremento en la producción de alimentos, también ha ocasionado contaminación del medioambiente. Gran parte del fertilizante que se aplica termina en ríos, lagos y mares, contribuyendo a su eutrofización en plataformas continentales marinas (Díaz y Rosenberg, 2008).

El uso de NO_3^- del suelo o del fertilizante y el nitrógeno atmosférico por asociación simbiótica con rizobios, de forma simultánea o complementaria por leguminosas noduladas, es una característica única de las plantas superiores (Delfini, 2010). La tasa media de fijación de N se situó en el rango de 0 a 337 kg ha^{-1} y la cantidad mínima se relacionó con aquellos campos que tenían una alta tasa de nitrato en la zona de raíces o donde existía algún tipo de estrés (Miransari, 2016). Kaschuk *et al.*, (2016) informaron que la aplicación de fertilizante nitrogenado afectó negativamente la nodulación ocasionando una disminución en el rendimiento del cultivo de soja. Resultados similares se observaron en cultivares de ambos hábitos de crecimiento (determinados e indeterminados), lo que indica que la fijación biológica de nitrógeno puede satisfacer las necesidades de N de nuevos genotipos de soja de ambos tipos de crecimiento.

Otro punto importante sobre el uso de fertilización nitrogenada es su interferencia con el proceso de fijación biológica de N por la soja y su simbiote. Si se usan cantidades adicionales de N químico, disminuye la actividad de *B. japonicum* y por tanto las cantidades de N fijadas por los rizobios simbióticos. En consecuencia, debe determinarse la tasa apropiada de fertilización química con N de manera que, en combinación con el proceso de fijación biológica de N, la planta pueda absorber su N esencial dando lugar a un crecimiento y a un rendimiento acorde a una óptima producción (Miransari, 2016).

Hipótesis y Objetivos

El manejo eficiente del N en sistemas agropecuarios a través de la Fijación Biológica del Nitrógeno resulta en una práctica económicamente viable para una agricultura sustentable. Sobre la base de estos antecedentes, la Fijación Biológica del Nitrógeno en el cultivo de soja resulta ser un proceso crucial, aunque se encuentra limitada por diferentes condiciones ambientales (entre ellas, altas concentraciones de nitrato). Una estrategia para solucionar esta limitación, sería utilizar bradirrizobios que presenten una elevada actividad nitrato reductasa en simbiosis con la planta.

Hipótesis de trabajo

-Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, caracterizadas por su actividad desnitrificante, presentan diferentes comportamiento agronómico y simbiótico en su asociación con la planta de soja en presencia de nitrato.

-La fijación biológica del nitrógeno en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja en suelo con alto nivel de nitrato depende de la presencia de una activa nitrato reductasa bacteroidal capaz de reducir el nitrato y suministrar la energía para la actividad nitrogenasa.

Objetivo general

- ✿ Contribuir a la optimización de la fijación de nitrógeno en el cultivo de soja para una mayor producción y mantenimiento del recurso suelo, en presencia de nitrato.

Objetivos específicos

- ✿ Determinar el crecimiento y la viabilidad de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, así como su actividad promotora del crecimiento vegetal (producción de ácido indolacético, sideróforos, cianidas y solubilización de fosfato).

- ✿ Evaluar el efecto del nitrato sobre el crecimiento de las plantas de soja inoculadas con cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, que presentan diferencias en su actividad desnitrificante en ensayos de invernáculo.
- ✿ Analizar el impacto del nitrato sobre la nodulación y estimar la eficiencia de la fijación de nitrógeno y carbono en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja.
- ✿ Determinar si el contenido de los compuestos nitrogenados (nitrato, ureidos y aminoácidos) se encuentra alterado en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja por la adición de nitrato.
- ✿ Caracterizar el rol de la enzima nitrato reductasa desnitrificante en los bacteroides obtenidos de los nódulos de soja en respuesta al nitrato.
- ✿ Analizar e interpretar las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo, así como las condiciones climáticas para el desarrollo del cultivo de soja inoculado con cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, que presentan una elevada actividad nitrato reductasa, en ensayos a campo.
- ✿ Estimar la contribución relativa del nitrógeno del suelo y el proveniente de la fijación biológica en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja.
- ✿ Evaluar el impacto de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* sobre el rendimiento del cultivo de soja durante dos campañas consecutivas.



Capítulo 2: Impacto del nitrato sobre el
crecimiento y la fijación biológica del
nitrógeno en la asociación simbiótica
Bradyrhizobium japonicum-soja.

Introducción

Microorganismos con actividad promotora del crecimiento vegetal

Diversos microorganismos del suelo tienen propiedades que lo hacen adecuados para ser utilizados como herramientas biotecnológicas (García de Salamone, 2013). Diferentes estudios tienden a la formulación de nuevos productos biológicos que permitan mejorar el rendimiento de los cultivos, resguardando su sanidad y minimizando el impacto ambiental que ocasiona el uso indiscriminado de agroquímicos y fertilizantes. Las interacciones plantas-microorganismos que ocurren en la rizósfera son las determinantes de la sanidad vegetal y de la fertilidad de los suelos. En ellas, los microorganismos juegan un rol fundamental en la transformación, movilización y solubilización de nutrientes en los suelos y su subsecuente incorporación para alcanzar su óptimo rendimiento de los cultivos (Jeffries *et al.*, 2003).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (del inglés, Plant Growth-Promoting Bacterium) se definen como aquellas bacterias de vida libre de suelo, rizósfera, rizoplasma, filósfera y simbióticas, que, bajo ciertas condiciones, son benéficas para las plantas (Bashan, 2005). Las PGPB pueden estimular el crecimiento y el desarrollo de los cultivos agrícolas cambiando el estado fisiológico y las características morfológicas de las raíces inoculadas, favoreciendo la captación de nutrientes en el reciclaje y tolerancia a la sequía (Glick, 2012).

Las rizobacterias simbióticas como aquellas pertenecientes al Orden Rizobiales y que incluyen individuos de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*, han sido extensamente estudiadas desde la perspectiva de su asociación con leguminosas, en términos del proceso de fijación biológica de nitrógeno (Lodwig y Poole, 2003). Sin embargo, nuevas evidencias sugieren que gran parte de los miembros de este género tendrían además potencialidad para ser considerados como rizobacterias promotoras del crecimiento. Podrían ser capaces de producir compuestos reguladores del crecimiento (ácido indolacético, ácido giberélico y citocininas) (Boiero *et al.*, 2007), la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999; Abbas-Zadeh *et al.*, 2010) y control biológico de patógenos (Hossain y Martensson, 2008, Bailly y Weisskopf, 2012). Así, Fernández *et al.*, (2005) estudiaron en aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. obtenidos de suelos donde se cultiva la soja, la habilidad fisiológica de solubilizar el fosfato inorgánico, encontrando que los mismos mostraron la capacidad de solubilización del fosfato.

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Estos microorganismos afectan positivamente el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos que pueden clasificarse en: a) directos tales como la solubilización de fosfatos u otros nutrientes, la producción de sideróforos, la producción de reguladores del crecimiento y la fijación de nitrógeno; b) indirectos como la biosíntesis de antibióticos y antifúngicos, la producción de sideróforos, la capacidad de competir en la rizósfera y la inducción de resistencia sistémica (Cattelan *et al.*, 1999; Nelson, 2004; Ahemad y Kibret, 2014). La promoción directa del crecimiento se produce cuando una PGPB proporciona los compuestos que influyen al metabolismo de la planta o cuando se facilita la adquisición de nutrientes no disponibles en el suelo. Los mecanismos directos más importantes que han sido propuestos, son:

- ∞ *Producción de reguladores de crecimiento*: muchas bacterias son capaces de producir fitohormonas, tales como ácido indolacético (AIA), ácido giberélico y citoquininas. Las moléculas promotoras del crecimiento producidas por los rizobios presentes en la rizósfera o en los tejidos de las plantas, estimulan el desarrollo de la raíz y favorecen la absorción de nutrientes en beneficio de las plantas (León-Barrios *et al.*, 2006).
- ∞ *Solubilización de fosfatos u otros nutrientes*: el fosfato, después del nitrógeno, es el elemento más requerido por las plantas y los microorganismos (Vance, 2001). Si bien es abundante en la materia orgánica, no está disponible. Dicho problema puede ser solucionado en cierta medida por la inoculación con microorganismos solubilizadores de P, que pueden convertir los compuestos de fósforo insolubles en formas accesibles para las plantas (Lavania y Nautiyal, 2013).
- ∞ *Producción y secreción de sideróforos*: los sideróforos microbianos juegan un rol importante en el biocontrol de enfermedades y en la nutrición del hierro de las plantas, ya que compiten con los fitopatógenos por el hierro disponible (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2006).
- ∞ *Fijación de nitrógeno*: la disponibilidad de nitrógeno atmosférico, en favor de la productividad y los ecosistemas, mediante la reducción del N₂ inerte a amonio es un proceso exclusivo de algunos procariotas que son capaces de romper el triple enlace de la molécula de N₂ con la participación de la nitrogenasa, y formar amonio que las bacterias ceden a las plantas (Lluch Plá, 2015).

Importancia de la fijación biológica del nitrógeno en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja

La importancia del proceso de FBN radica en que, las plantas superiores, los animales y la gran mayoría de los microorganismos dependen del nitrógeno combinado orgánico e inorgánico de la naturaleza para su nutrición y no pueden hacer uso del elevado volumen presente en la atmósfera (Balatti, 2007). La FBN es llevada a cabo por un escaso grupo de microorganismos procariotas llamados diazótrofos cuya característica principal es la de poseer el complejo nitrogenasa, encargado de transformar el nitrógeno atmosférico en amonio, forma asimilable por las plantas (Frioni, 2011).

La asociación simbiótica establecida entre las leguminosas se realiza con los microorganismos comúnmente conocidos con el nombre de rizobios, es el sistema simbiótico más eficiente. El proceso de FBN ocurre en la entrada a los ecosistemas terrestres de unas 250×10^6 toneladas de N anuales, aporte esencial para la alimentación humana y animal (Monza y Palacios, 2004; Salvagiotti *et al.*, 2008). Además, este tipo de asociación es altamente benéfica para ambos miembros del par simbiótico ya que la bacteria fija N_2 y cede gran parte a la planta permitiendo su crecimiento. La planta, fija carbono por medio de la fotosíntesis y aporta gran cantidad de compuestos carbonados a la bacteria. Este tipo de simbiosis no sólo favorece significativamente al ciclo global del nitrógeno, sino que además permite mantener la fertilidad de los suelos incrementando la productividad de las plantas (Mateo-Box, 2005).

Mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el establecimiento de la asociación *Bradyrhizobium japonicum*-soja

El establecimiento de la simbiosis es el resultado de una compleja secuencia de interacciones, entre los rizobios y las raíces de las leguminosas, que involucran cierto intercambio de señales moleculares entre ambos organismos (Spaink, 2000).

La rizósfera es la porción de suelo que está íntimamente relacionada con las raíces de las plantas en crecimiento con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo (Bazin *et al.*, 1990). Estas características están en gran medida influenciadas por una mezcla compleja de compuestos liberados de las raíces de las plantas, es decir, exudados de las raíces, que tienen un alto impacto sobre la dinámica de nutrientes y oligoelementos en la interfase suelo-raíz, así como sobre las actividades microbianas, hacen que dicha zona sea un lugar muy apropiado para el desarrollo de las

bacterias (Rugova *et al.*, 2017). Entre el 10% y 30% de los fotosintatos de la planta son excretados en los exudados radicales incluyendo carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos (Bowen y Rovira, 1999). Entre estos últimos encontramos a los flavonoides derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona que desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes. Los flavonoides varían en su composición dependiendo de la especie y son metabolizados por los rizobios. En concentración nanomolar provocan la quimiotaxis activa de los rizobios hacia la superficie radical, en cambio en concentración micromolar activan en los rizobios a los genes responsables de la nodulación, llamados genes *nod* (Redondo-Nieto *et al.*, 2003). En la asociación *Bradyrhizobium japonicum*-soja la molécula señal relacionada es la genisteína, la que también determina la especificidad de la simbiosis, es producida por la planta huésped lo que resulta en la activación de los genes bacterianos *nod* (Wang *et al.*, 2012).

Una proteína sensora/reguladora llamada NodD interacciona con los flavonoides producidos por la leguminosa compatible (su estructura molecular es reconocida por las leguminosas y determina en gran parte la compatibilidad entre una cepa de rizobio y la leguminosa correspondiente) y como consecuencia se modifica y activa la expresión de los genes *nod* que codifican un paquete de enzimas encargadas de producir los factores Nod; denominados lipo-quitina-oligosacárido (LQO) que son moléculas complejas con una estructura básica constituida por 3-6 residuos de N-acetil-glucosamina, unidos a un ácido graso y a otros sustituyentes (Perret *et al.*, 2000; Streng *et al.*, 2011). Los factores Nod son percibidos por los receptores a nivel de la célula del hospedante e inducen varias respuestas en la leguminosa huésped que se relacionan con el proceso de infección (Schultze y Kondorosi, 1998; Miransari, 2016), ya que determinan modificaciones en los pelos radicales, la formación del canal de infección y la división de células del córtex, que conducen a la formación del nódulo en cuyo interior se va a llevar a cabo la fijación del N₂.

La unión de la bacteria a la superficie del pelo radical es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. Fibrillas de celulosa producidas por la bacteria pueden ayudar a incluir al rizobio en la superficie mucilaginosa de la raíz, proceso reforzado por la presencia de proteínas dependientes de calcio, ricadhesinas, producidas por la bacteria (Jones *et al.*, 2007). Las lectinas (proteínas que contienen carbohidratos) también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de pelos radicales y en la superficie de las células del rizobio; es por esto que los polisacáridos y proteínas producidos por los rizobios juegan un papel muy importante en la interacción física entre la planta y la bacteria. La presencia de los

factores Nod a concentraciones nanomolar es suficiente para que la planta produzca la deformación de los pelos radicales, induzca la división celular en el parénquima de la raíz y con ello inicie la formación del nódulo (Tsvetkova *et al.*, 2006).

Los mecanismos de entrada de los rizobios a las leguminosas pueden ser de tres tipos: en alfalfa, soja y poroto la bacteria penetra por hilo de infección (Sprent, 2008); en leguminosas que no presentan pelos radicales la infección es directa vía células epidérmicas; en leguminosas tropicales y subtropicales (*Arachis*, *Sesbania*, *Neptunia*) por crack entry (Boogerd y Van Rossum, 1997). En el caso específico de la soja ocurre por formación del hilo de infección donde las bacterias se adhieren a los pelos radicales susceptibles y secretan factores Nod (Figura 4). El primer efecto observable es la inhibición del crecimiento apical del pelo radical, debido a una perturbación en la biosíntesis de la pared celular vegetal. Posteriormente, se reanuda el crecimiento del pelo radical, y el aporte continuo de factores Nod sintetizados por el rizobio causa la reorientación del eje de crecimiento hacia la célula bacteriana (Brewin, 2004). Así, los rizobios quedan atrapados por el curvado del pelo radical. La microcolonia bacteriana atrapada por el curvado del pelo radical, a través de la producción de los factores Nod actúa como un centro de señalización, induciendo el inicio de las divisiones de las células del córtex radical para formar los primordios nodulares. Luego, se produce la invaginación o degradación parcial de la pared celular del pelo radical seguida de una invaginación de la membrana plasmática que culmina con la formación de una estructura tubular denominada canal o hilo de infección, a través del cual los rizobios penetran a la raíz (Gage, 2004). Este hilo de infección comienza a crecer hacia la base del pelo y luego se ramifica a medida que se acerca a las células del córtex (Stougaard, 2000). Posteriormente, el hilo atraviesa las sucesivas capas corticales hasta alcanzar un primordio nodular; cuando esto ocurre la síntesis de nueva pared se detiene y el extremo del hilo queda rodeado por membrana plasmática. La membrana continúa su crecimiento debido al aporte de vesículas provenientes del aparato de Golgi (Xie *et al.*, 2012). Las bacterias en el interior del canal de infección son envueltas por la membrana vegetal y posteriormente esta estructura se independiza formando el simbiosoma en las células corticales (Verma y Hong, 1996). Finalmente, se produce la diferenciación de las bacterias en formas especializadas, los bacteriodes. Simultáneamente con la aparición de simbiosomas, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro (Maunoury *et al.*, 2008).

El proceso de simbiosis, entre el macrosimbionte (planta) y el microsimbionte (bacteria) es el resultado de tres eventos: infección intracelular de las células hospedadoras por el

microsimbionte; desarrollo y organogénesis del nódulo; y proceso de fijación de N₂. El primer y el segundo evento ocurren simultáneamente, mientras que la fijación ocurre una vez finalizada la organogénesis y sólo si la infección bacteriana fue la adecuada (Patriarca *et al.*, 2004).

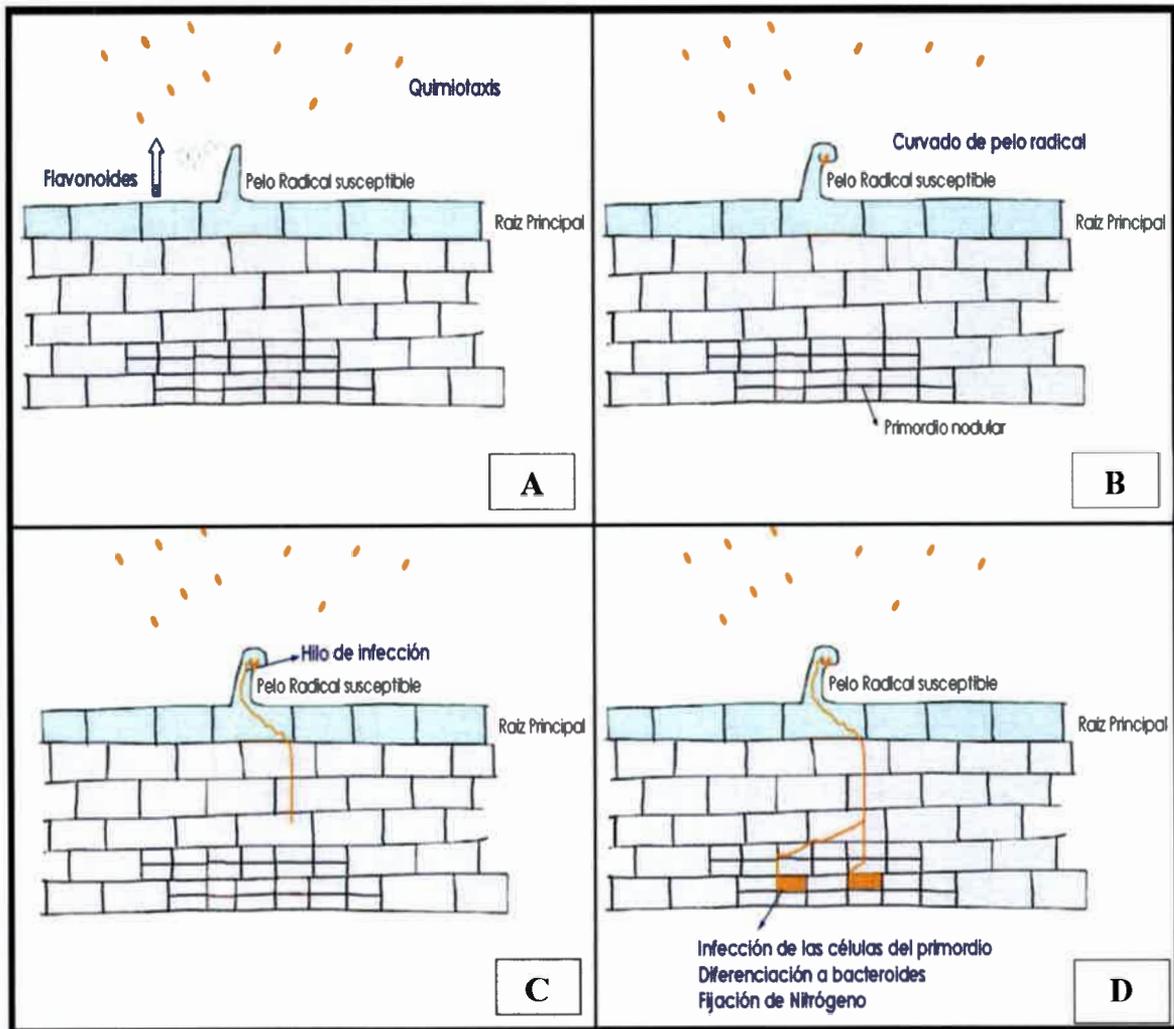


Figura 4. Infección de las raíces mediante la formación de hilo de infección. A) Los flavonoides liberados por las raíces actúan como quimioattractantes. B) Los rizobios se adhieren a pelos radicales de la zona susceptible de la raíz. El pelo radical se curva y engloba en su interior a las bacterias. Las células corticales retoman la división celular en respuesta a los factores Nod rizobianos y se forma el primordio nodular. C) La pared celular sufre una invaginación o degradación parcial seguida de una invaginación de la membrana plasmática vegetal para formar el hilo de infección. D) El hilo de infección crece y se ramifica a medida que se dirige al córtex radical. Posteriormente, las bacterias son captadas por las células del primordio por endocitosis y comienzan su diferenciación a bacteroides. Fuente: Ibáñez, 2009.

Generalmente, cada rizobio es capaz de formar nódulo en un número restringido de plantas leguminosas, y cada una de las mismas es nodulada por un pequeño número de rizobio (D'Antuono, 2006).

Dependiendo del sistema simbiótico y del lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz, se pueden encontrar dos tipos de nódulos: determinados o indeterminados (Doyle, 2011) (Figura 5). En líneas generales, los nódulos contienen dos zonas, una interna o zona de infección y otra externa o córtex. La zona de infección es muy diferente según de qué tipo de nódulos se trate. En leguminosas de climas tropicales y subtropicales, como es el caso de la soja la división de células del córtex externo da lugar a nódulos de forma esférica o nódulos determinados, ya que su crecimiento se basa en la expansión celular y no hay divisiones mitóticas transcurridos los 12-18 días desde la inoculación (Maunoury *et al.*, 2008; Popp y Ott, 2011). En leguminosas de climas templados, la división de las células del córtex interno da lugar a nódulos de forma alargada conocidos como nódulos indeterminados. Así como el genoma de la planta determina el mecanismo de entrada del microorganismo a las células, también determina el tipo de nódulo que se formará en las raíces de la leguminosa. Ambos tipos de nódulos, además de presentar una organización anatómica e histológica distinta, también difieren en la forma en que se comporta la bacteria dentro del nódulo en formación (Redondo-Nieto *et al.*, 2003) en lo que se refiere a la vía de asimilación del amonio y al tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprenst y James, 2007).

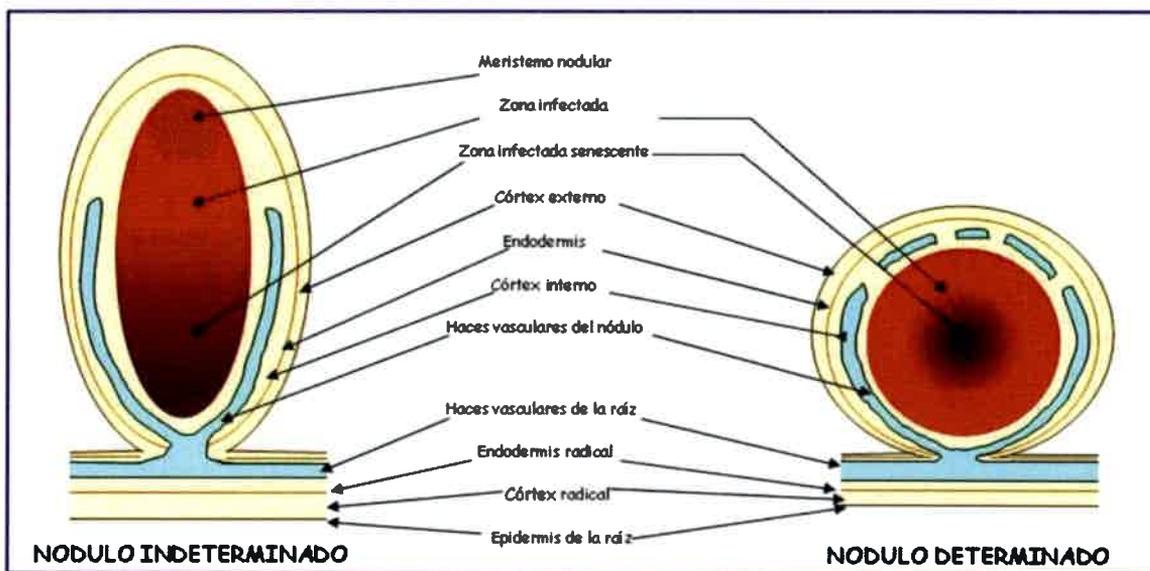


Figura 5. Esquema de un nódulo indeterminado (izquierda) y determinado (derecha), mostrando sus diferentes zonas. Fuente: Modificado de Hadri *et al.*, 1998.

El número y el tamaño de los nódulos están controlados por factores ambientales, como el N del suelo y el agua entre otros (Giller, 2001). En el córtex se pueden distinguir varias zonas, cuyo grado de diferenciación e incluso, su presencia, varía según la especie de leguminosa. Próximo a la zona de infección se encuentra el córtex interno, en el que se distingue una zona de células pequeñas, a veces, con grandes espacios intercelulares, y otra zona de células muy empaquetadas. El córtex medio contiene células grandes de pared gruesa pero no lignificada. Detrás de éste, en algunos casos, se distingue una capa de células con paredes engrosadas que constituyen la endodermis o esclerénquima. La última capa del nódulo, el córtex externo, contiene células grandes poco empaquetadas, y espacios intercelulares grandes. En algunos casos detrás de éste también se distingue una peridermis (Minchin *et al.*, 2008).

Dentro del nódulo, los bacteroides expresan el complejo enzimático nitrogenasa y determinados citocromos que no están presentes en las bacterias de vida libre. Este complejo es altamente sensible al oxígeno y consta de dos subunidades, una ferroproteína (Fe-proteína) o di-nitrogenasa reductasa, y una ferromolibdenoproteína (FeMo-proteína) o dinitrogenasa (Dixon y Kahn, 2004; Seefeldt *et al.*, 2004) (Figura 6). La reacción estequiométrica de la reducción de N₂, en condiciones óptimas, es la siguiente:



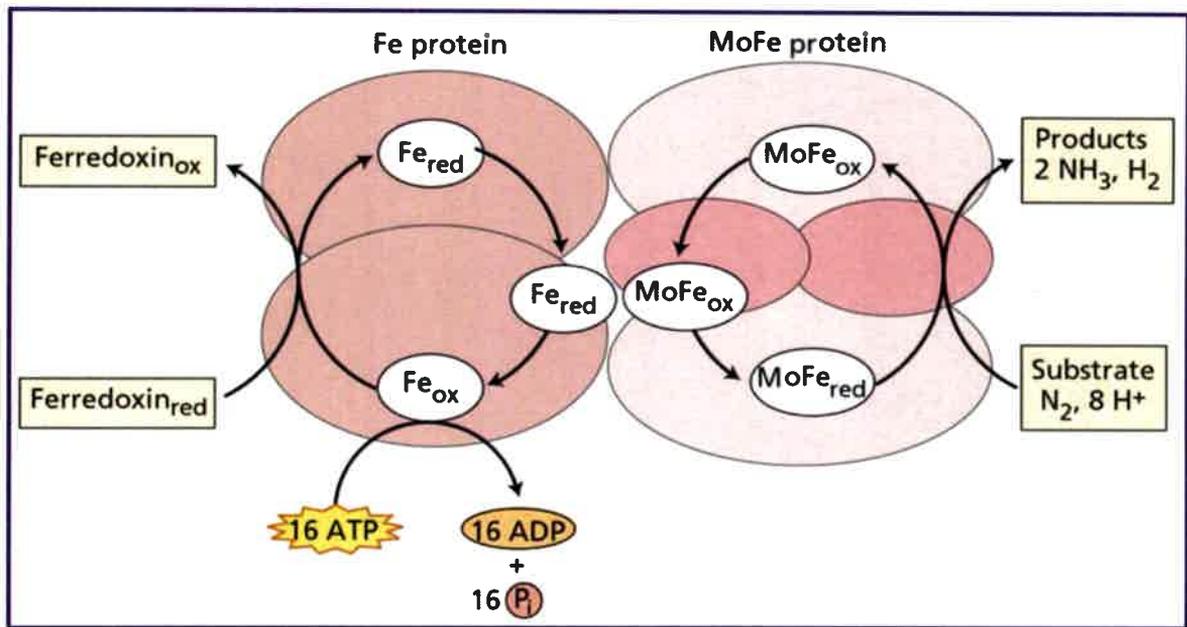


Figura 6. Complejo enzimático nitrogenasa. La ferredoxina reduce la proteína Fe. Unión e hidrólisis de ATP a la proteína Fe provocando un cambio conformacional en dicha proteína que facilita las reacciones redox. La proteína Fe reduce la proteína MoFe y esta reduce el N₂. Fuente: Taiz y Zeiger, 2010.

El donador de electrones de la nitrogenasa es la ferredoxina, proteína de potencial redox muy negativo. En la conversión del N₂ a NH₄⁺, la ruptura del triple enlace (N≡N) de la molécula de nitrógeno posee una elevada demanda de energía (≈ 960 kJ/mol de N₂ fijado). Es por ello, que la reacción está acompañada del hidrólisis de 16 moléculas de ATP por cada molécula de N₂ que se reduce (Taiz y Zeiger, 2010).

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de N₂. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos (succinato, malato y fumarato). Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, después de su conversión a piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N₂.

El equilibrio establecido en los nódulos entre el metabolismo del carbono y nitrógeno determina el funcionamiento de esta estructura y, por lo tanto, el necesario aporte de nitrógeno para el crecimiento de la planta (Figura 7). En los nódulos, la sacarosa, procedente de la parte aérea de la planta vía floema, es catabolizada por las actividades sacarosa sintasa (SS) e invertasa alcalina (IA). El amonio, formado por la nitrogenasa del bacteroide, es excretado al citosol del nódulo y asimilado en aminoácidos por las enzimas Glutamina sintetasa, (GS), Glutamato sintasa (GOGAT) y Glutamato deshidrogenasa

(GDH). Como resultado de la acción coordinada de las enzimas GS/GOGAT se forman dos moléculas de glutamato (Glu), una de ellas es utilizada por la aspartato aminotransferasa (AAT) para formar asparagina (Asn). Se ha propuesto recientemente que la planta suministra Glu a los bacteroides, además de dicarboxilatos; el Glu atravesaría la membrana por transporte pasivo y el bacteroide produciría Asp o posiblemente alanina (Ala). Así, los bacteroides exportarían estos dos aminoácidos (Asp y Ala) al citosol además de amonio (Lodwig *et al.*, 2003).

Los nódulos exportan el N asimilado en forma de amidas o ureidos a la parte aérea de la planta. Los ureidos (alantoína, ácido alantoico, citrulina) se sintetizan a partir de las amidas y precisan síntesis de *novο* de purinas que deben ser oxidadas. La glutamina y glutamato, son los compuestos primarios de asimilación del nitrógeno, los cuales son usados para sintetizar otros aminoácidos y compuestos nitrogenados por transaminación (Okumoto y Pilot, 2011). Particularmente, los nódulos determinados exportan ureidos, mientras que la asparagina o glutamina son las formas comunes con la que se transporta el N en nódulos indeterminados (Oldroyd *et al.*, 2011).

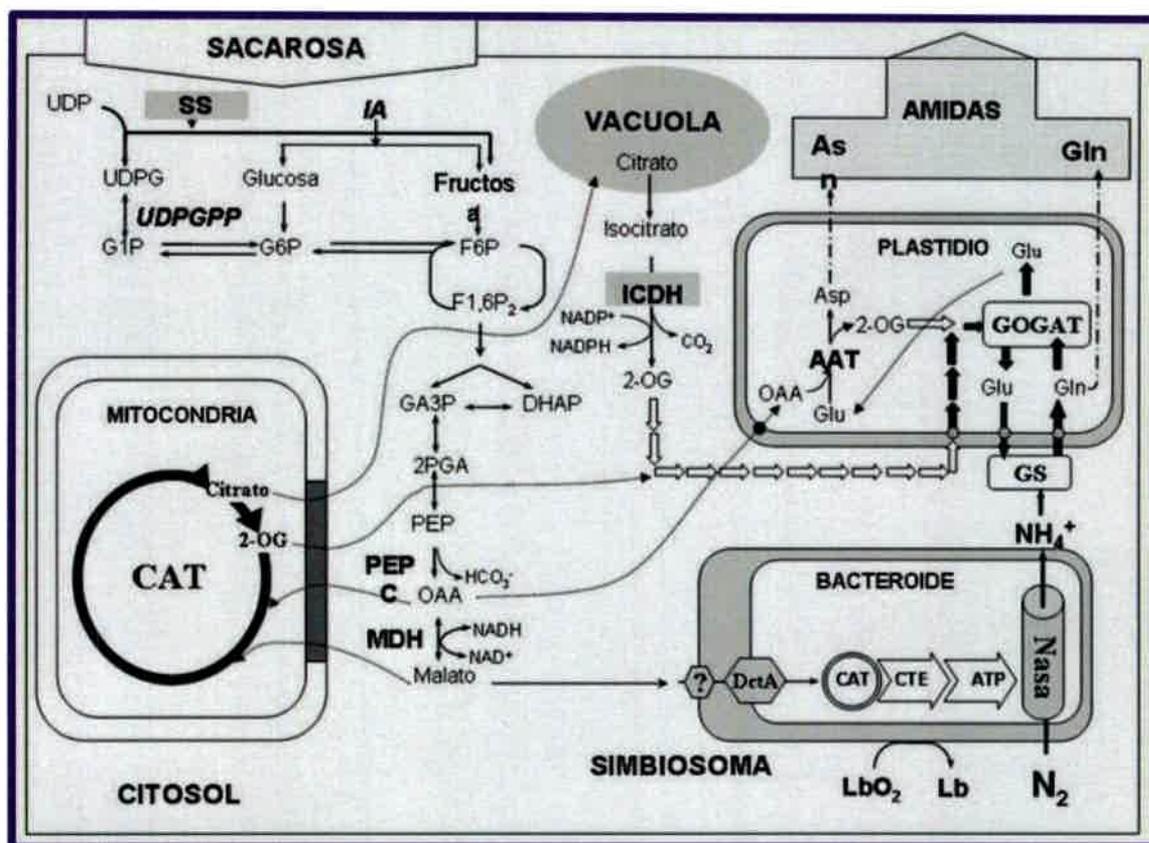


Figura 7. Célula infectada en un nódulo de leguminosa exportadora de amidas: rutas metabólicas que tienen lugar en el citosol, simbiosoma, mitocondrias y plastidios de una. SS: sacarosa sintasa, IA: invertasa alcalina, UDPGPP: UDP-glucosa pirofosforilasa, PEP C: fosfoenolpiruvato carboxilasa, MDH: malato deshidrogenasa, Nasa: nitrogenasa, GS: glutamina sintetasa, GOGAT: glutamato sintasa, AAT: aspartato aminotransferasa, ICDH: isocitrato deshidrogenasa. Fuente: González *et al.*, 2006.

Durante el establecimiento de la asociación simbiótica, la planta expresa proteínas específicas llamadas nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina la cual tiene como función aportar y controlar los niveles de O_2 en los bacteroides. Esta proteína se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por bacteroides y es la que da el típico color rosado de los nódulos funcionales (Becana y Klucas, 1992).

Características de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con capacidad desnitrificante

Los microorganismos capaces de llevar a cabo la desnitrificación (reducción de nitrato a N_2), son muy escasos ya que la mayoría de ellos sólo realizan una desnitrificación parcial o incompleta, lo que se debe a que no poseen o no expresan el equipo enzimático

necesario para llevar a cabo todos y cada uno de los procesos de reducción que conforman la desnitrificación.

Las bacterias desnitrificantes son microorganismos capaces de utilizar los óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones (proceso anóxico), en lugar del oxígeno. Desde el punto de vista bioquímico y taxonómico son muy diversas: algunas son heterotróficas, otras crecen de forma autotrófica en presencia de hidrógeno y CO₂, o con compuestos reducidos de azufre. La mayoría posee todas las enzimas necesarias para reducir el nitrato a N₂, pero algunas carecen de una o varias enzimas que participan en el proceso global, por lo que, solo pueden llevar a cabo la reducción del NO₂ o bien producir algunos productos intermedios (Seitzinger, 1992). Algunos de los géneros bacterianos que pueden llevar a cabo el proceso de desnitrificación son: *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes* y *Aquifex*. En el suelo, la mayoría de las bacterias desnitrificantes cultivables son anaerobios facultativos pertenecientes principalmente a los géneros, *Pseudomonas* y *Alcaligenes* y, en menor medida *Bacillus*, *Agrobacterium* y *Flavobacterium* (van Spanning, 2005).

Si bien la desnitrificación es propia de las bacterias anaerobias facultativas, y se considera que solo ocurre en ausencia de oxígeno, se han descrito algunas especies del género *Paracoccus* capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (Stouthamer *et al.*, 1997). También se ha demostrado la existencia de genes implicados en la desnitrificación en bacterias nitrificantes (Cebren y Garnier, 2005). También, tienen la capacidad de desnitrificar algunos hongos del género *Fusarium* (Takaya, 2002).

La capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios, ya que sólo *Bradyrhizobium japonicum* y *Azorhizobium caulinodans* son los únicos capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno con nitrato como aceptor final de electrones para la producción de ATP. Entre los rizobios, se han caracterizado genes que codifican enzimas de la desnitrificación en *R. sultae*, *R. etli*, *S. meliloti* y *B. japonicum* (Bedmar *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2007). *Bradyrhizobium japonicum* es el único rizobio donde se ha aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación, *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, implicados en la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente. Los genes *nos* de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 se identificaron mediante hibridación de su ADN genómico con el gen *nosZ* de *Pseudomonas stutzeri* (Robles *et al.*, 2006).

Fernández *et al.*, (2008) aislaron cepas desnitrificantes de los suelos donde se cultiva la soja en el país, en Pergamino (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba), las cuales han sido diferenciadas en tres categorías, de acuerdo a la producción de N₂O:

Grupo I: cepas de referencia *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y MSDG-G49 producen 7,06 y 7,30 nmol N₂O μg⁻¹ proteína, respectivamente.

Grupo II: cuatro aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. de suelos de Pergamino que producen entre 2 y 5 nmol N₂O μg⁻¹ proteína.

Grupo III: cuatro *Bradyrhizobium* sp. que producen < 1 nmol N₂O μg⁻¹ proteína.

Esta clasificación indica que hay una actividad desnitrificadora diferente en las cepas de *Bradyrhizobium* sp. indígena de los suelos cultivados con soja. El grupo I tiene la máxima actividad desnitrificadora. La habilidad del grupo II fue de cinco veces mayor que la del grupo III. El bajo nivel de actividad desnitrificante del grupo III sugirió que esos organismos pertenecen a los “desnitrificadores moderados” categoría descrita por Mahne y Tiedje (1995). Las características relevantes de los aislamientos y los genes descritos vinculados a la capacidad desnitrificadora de las cepas que se utilizaron son:

Per 3.64 grupo II; 3,26 nmol N₂O μg⁻¹ proteína; *napA*, *nirK*, *norC*, *nosZ*

Per 1.12 grupo II; 4,20 nmol N₂O μg⁻¹ proteína; *napA*, *nirK*, *norC*

Per 3. 61 grupo III; 1,03 nmol N₂O μg⁻¹ proteína; *napA*, *nirK*, *norC*, *nosZ*

Influencia del nitrato sobre la asociación simbiótica rizobio-leguminosa

Una exitosa asociación simbiótica bradirrizobio-soja requiere que no haya condicionantes por exceso o por déficit, para el desarrollo normal del cultivo. El nitrógeno combinado presente en el suelo inhibe el establecimiento de nódulos en las raíces de las leguminosas (Liu *et al.*, 2011). La abundancia de nitrógeno combinado en el suelo determina la represión de los genes *nod* así como disminución de la síntesis de lectinas, por lo que disminuye la capacidad de anclaje de la bacteria a la raíz. La presencia de nitrato también retrasa la formación de los nódulos y disminuye la masa nodular (Ralston y Ismande, 1983). Además, se produce aborto de los cordones de infección, se inhibe la transformación de bacterias a bacteroides, disminuye la actividad nitrogenasa, aumenta la síntesis de etileno por las raíces y la abscisión de nódulos (Ligero *et al.*, 1991).

Los niveles bajos de nitrógeno en los primeros estadios vegetativos en los que todavía los nódulos no son funcionales pueden ser beneficiosos. Pero, a medida que el nitrógeno proveniente del suelo o del fertilizante aumenta, el nitrógeno derivado de la

fijación biológica y la nodulación disminuyen (Fernández-Canigia, 2003). De esta forma, cuando hay suficiente disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la planta privilegia la incorporación del nitrógeno edáfico respecto al derivado de la atmósfera por razones de economía energética (Racca y Collino, 2006). Por otra parte, se demostró que el efecto inhibitorio producido por la presencia de nitrato depende fundamentalmente de la leguminosa y no del bradírizobio. La razón de esta inhibición no se conoce a nivel molecular, aunque parece ser un efecto que se ejerce a nivel local, no sistémico, según se desprende de experimentos realizados con sectores de sistemas radiculares expuestos por separado y simultáneamente a distintas concentraciones de nitrato (Monza y Márquez, 2004).

Las asociaciones simbióticas en la cual la función de la enzima nitrato reductasa es complementaria con la función de la nitrogenasa depende de los bacteroides capaces de reducir el nitrato por la vía desnitrificante. Es decir que además de fijar N_2 , algunas especies de rizobios, entre ellas *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, son también capaces de desnitrificar en simbiosis, siendo esto de gran interés ya que las cepas de rizobios caracterizadas por una elevada actividad nitrato reductasa son menos susceptibles a la inhibición por nitrato (Chamber-Pérez *et al.*, 1997). Los compuestos, que pueden producirse como intermediarios de la reducción de nitrato en los bacteroides, o por la planta como productos de la enzima nitrato reductasa o la enzima óxido nítrico sintasa, pueden afectar a la nitrogenasa o unirse a la leghemoglobina y formar complejos nitrosil-leghemoglobina afectando de esta manera a la fijación de nitrógeno (Meakin *et al.*, 2007).

Además, el óxido nitroso es un inhibidor competitivo de la nitrogenasa, ya que es sustrato de la misma, que puede reducirlo a N_2 . Así, el rol de la desnitrificación podría ser dual ya que podría remover los compuestos tóxicos o bien suministrar ATP a la nitrogenasa (García-Plazaola *et al.*, 1993). Por lo tanto, la fijación de nitrógeno y la desnitrificación, dos procesos que son antagonistas en el ciclo del nitrógeno, pueden actuar en forma complementaria y permitiría la sobrevivencia de la bacteria en el interior de los nódulos de las raíces (Lucinski *et al.*, 2002).

Cuando hay suficiente N disponible en el suelo, la planta, direcciona el metabolismo hacia un gasto menor de energía, privilegiando la incorporación del N edáfico por sobre el derivado de la atmósfera (Peticari *et al.*, 2007). De esta forma, el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere que exista una deficiencia de N en el suelo, al menos en el ambiente que circunda a la raíz, y que se produzca una serie de

eventos concatenados que consisten en la percepción de señales, su transducción y una respuesta determinada (Racca y Collino, 2006).

Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento y la viabilidad de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, así como su actividad promotora del crecimiento vegetal (producción de ácido indolacético, sideróforos, cianidas y solubilización de fosfato).

- Evaluar el efecto del nitrato sobre el crecimiento de las plantas de soja inoculadas con cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, que presentan diferencias en su actividad desnitrificante en ensayos de invernáculo.

- Analizar el impacto del nitrato sobre la nodulación y estimar la eficiencia de la fijación de nitrógeno y carbono en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* que se usaron en este trabajo de tesis doctoral se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*.

<i>Bradyrhizobium Japonicum</i>	Descripción	Referencia
USDA 110	Cepa de referencia	Belstville, USDA, Estados Unidos
USDA 110/CC41	Mutante defectiva en la enzima nitrato reductasa	Cedida por el Dr. Manuel Chamber-Pérez, CIFA, Sevilla-España
Per 1.12 Per 3.61 Per 3.64	Aislamientos nativos de suelos de Pergamino	Cedida por la Dra. Leticia Fernández, UNS-Bahía Blanca

Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de las cepas bacterianas

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo YEM (Vincent, 1970) a 28 °C en un agitador a 140 rev.min⁻¹. Para la cepa *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110/CC41 se adicionaron al medio YEM los antibióticos Estreptomicina (250 ppm) y Kanamicina (100 ppm), ésta última resistencia se la confiere el transposón Tn-5 que tiene insertado en su cromosoma. El crecimiento bacteriano se determinó por medición de la absorbancia a 620 nm. El número de células viables (UFC ml⁻¹) se determinó usando la técnica descrita por Somasegaran y Hoben (1994). Este método de recuento consiste en sembrar tres gotas (10 µl) por dilución en un cuarto de la placa de Petri conteniendo el medio sólido YEMA. Las mismas se incuban a 28 °C hasta obtener entre 3 y 30 colonias por dilución a simple vista o bajo lupa.

Composición del medio YEM

K ₂ HPO ₄	0,5 g l ⁻¹
MgSO ₄	0,2 g l ⁻¹
NaCl	0,1 g l ⁻¹
Extracto de levadura	1,0 g l ⁻¹
Manitol	10 g l ⁻¹
pH 6,8 – 7,0	

Para el mantenimiento de la cepa se utilizó el medio YEMA con el agregado de:

Agar 15 g l⁻¹

Rojo Congo 4 ml l⁻¹

El medio se esterilizó en autoclave a ¾ de atmósfera por 20 min.

Conservación de la cepa bacteriana

Las cepas se mantuvieron a 4 °C en placas de medio YEMA. Para el mantenimiento de las cepas a largo plazo, se tomaron alícuotas de cultivos en fase exponencial y se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo glicerol estéril a una concentración final 40% (v/v). Las suspensiones bacterianas se conservaron a -20 °C.

Ensayos de la actividad promotora del crecimiento vegetal

Producción de AIA (ácido indolacético): se realizó según modificación del método Bric *et al.*, (1991). En la superficie del Medio 79 modificado por Puente *et al.*, (2013) y suplementado con 5 mM de L-Triptofano, se colocaron pequeños discos de membrana de nitrocelulosa sobre el medio. Las cepas de *B. japonicum*, se sembraron por picadura, sobre los discos. Se incubó entre 5-7 días a 28 °C y luego las membranas se colocaron sobre un papel de filtro impregnado con reactivo de Salkowski. Los microorganismos productores de AIA o análogos producen una coloración rosa-rojo entre media a tres horas de agregado el reactivo mientras que la producción de otras índoles genera una coloración amarillo-marrón.

Composición del Medio 79

K ₂ HPO ₄	0,5 g l ⁻¹
MgSO ₄	0,2 g l ⁻¹
NaCl	0,1 g l ⁻¹
FeCl ₃ 1 M	50 µl l ⁻¹
Extracto de levadura	1,0 g l ⁻¹
Manitol	10 g l ⁻¹
pH 6,8 – 7,0	
Agar	15 g l ⁻¹

El medio se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ de atmósfera por 20 min.

Cianogénesis: se usó la técnica modificada de Bakker y Schippers (1987). Placas de Petri conteniendo Medio 79 suplementado con 4,4 g l⁻¹ de glicina y con una pieza de papel de filtro impregnada con ácido pícrico 0,5% y Na₂CO₃ 2% colocada sobre la parte interior de la tapa, se sembraron con ansa estéril por la técnica de estrías por agotamiento e incubadas a 28 °C entre 5-7 días. Un cambio de color de amarillo a naranja-marrón en el papel indica producción de cianidas.

Producción de sideróforos: la técnica utilizada fue la del Chromo Azurol S (CAS) (Alexander y Zubeber, 1991) modificada, la cual permite visualizar el halo de solubilización de hierro formado por microorganismos productores de sideróforos. El complejo ternario Azurol S/Fe³⁺/Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA-Fluka) sirve como indicador en este medio. Cuando un quelante fuerte remueve el hierro de éste, el color cambia de azul a anaranjado. Los halos de color naranja alrededor de las colonias, sobre el agar azul, indican la producción de sideróforos. Las bacterias se sembraron utilizando el método de picadura con palillos estériles y se incubaron en estufa a 28 °C durante 7 días.

Solubilización de fosfatos: se utilizó el medio modificado de Frioni (2011). La siembra de los microorganismos se efectuó con palillos estériles. Luego se incubó a 28 °C durante 7 días. Las colonias bacterianas que forman halos son consideradas solubilizadoras de fosfatos.

Medio solubilización de fosfatos

Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,0 g l ⁻¹
Glicerol	20 g l ⁻¹
Extracto de levadura	2,0 g l ⁻¹
pH 6,8 – 7,0	
Agar	15 g l ⁻¹

El medio se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ de atmósfera por 20 min.

Cultivar de soja

Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max* L. Merrill) variedad Don Mario 4210 RR (Grupo IVC) cuyas características principales son:

Posicionamiento	Zona núcleo sojera y ambientes de alta productividad del Centro de Córdoba y Santa Fe y Entre Ríos. Muy buen comportamiento en siembras de segunda
Ciclo / Hábito de crecimiento	IV corto / Indeterminado
Días desde emergencia a R8	135
Altura de planta para su ciclo (cm)	Alta (100)
Potencial de ramificación	Medio
Tipo de ramificación	Abierta
Susceptibilidad al vuelco (1 a 10)	3
Distancia entre surcos recomendada	Reducida (igual o menor a 35cm)
Peso promedio de 1000 semillas (g)	172
Color de pubescencia / Color de flor	Castaña clara / Violeta
Comportamiento frente al Cancro del Tallo	Resistente
Comportamiento frente a <i>Phytophthora</i>	Resistente (Rps 1K)

Esterilización superficial de la semilla (Vincent, 1970)

- 1) Tratamiento con etanol al 96% durante 30 segundos
- 2) Lavado con agua destilada estéril
- 3) Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 6% durante 3 min
- 4) Lavado 4-5 veces con agua destilada estéril 5-10 min cada lavado.

Germinación de las semillas

Las semillas de soja se colocaron en cápsulas de Petri estériles con algodón y papel de filtro humedecido con aproximadamente 10 ml de agua destilada. Se incubaron en estufa a 28 °C durante 48-72 horas hasta el desarrollo de raíces de 4-6 cm de longitud.

Asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja

Las semillas de soja esterilizadas y pregerminadas se transfirieron a macetas (20 cm de diámetro x 25 cm de alto) conteniendo una mezcla perlita: arena (1:2) estéril, soporte que no constituye ningún aporte al vegetal ni a los microorganismos. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado con concentraciones de KNO₃ (0 y 5 mM). La concentración de KNO₃ 5 mM es la recomendada como control de N en los ensayos de efectividad simbiótica (Vincent, 1970). Los tratamientos de las plantas fueron:

✓ **Control (sin inocular)**

✓ **Inoculada: con las diferentes cepas de bradirizobios (10^8 UFC/ml).**

En cada maceta se sembraron 3 semillas pregerminadas y a los 3 días se realizó un raleo al azar conservando una plántula por maceta. Luego se llevaron a invernáculo con fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), $220 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidad de luz, a una temperatura constante de 28°C y 50% de humedad relativa. El tratamiento de inoculación se realizó a la semana de la siembra colocando 5 ml del inoculante en la corona de la raíz de la planta. Las plantas se regaron con agua estéril o con la solución estéril de KNO_3 5 mM y cada 15 días con la solución nutritiva de Hoagland estéril (Hoagland y Arnon, 1950).

Solución nutritiva de Hoagland

CaCl_2 1M	1 ml l^{-1}
KCl 1M	1 ml l^{-1}
KH_2PO_4 1M	0,2 ml l^{-1}
MgSO_4 1M	0,4 ml l^{-1}
FeCl_3 (5mg/ml)	0,2 ml l^{-1}
Micronutrientes	0,2 ml l^{-1}
pH 6,8-7,0	

Solución de micronutrientes

H_3BO_3	2,83 g l^{-1}
MnCl_2	1,81 g l^{-1}
ZnCl_2	0,11 g l^{-1}
CuSO_4	0,05 g l^{-1}
NaMoO_4	0,025 g l^{-1}

Las plantas se cosecharon en la etapa fenológica R2 (plena floración) y se separaron los nódulos de las raíces y la parte aérea para determinar los siguientes parámetros:

Crecimiento de las plantas

1. **Peso seco de raíz (PSR) y de parte aérea (PSA):** las muestras se secaron en estufa a 70°C hasta peso constante.

2. **Contenido de nitrógeno:** se determinó en la parte aérea por el método de Kjeldahl modificado (Nelson y Sommers, 1973).

Fijación simbiótica de nitrógeno

1. **Número y peso seco de nódulos (PSN):** los nódulos se secaron en estufa a 70 °C hasta peso constante.

2. **Peso normalizado de nódulos (PNN):** se obtuvo a partir del peso seco de nódulos y el peso seco de la parte aérea, según la fórmula: **PNN= PSN/PSA**

-Con los datos del contenido de nitrógeno se estimó el N₂ fijado y la efectividad simbiótica, según ICARDA (1990), empleando las siguientes fórmulas:

$$\mathbf{N_2 \text{ fijado} = N \text{ total}_{Inoculado} - N \text{ total}_{control}}$$

$$\mathbf{Efectividad \text{ simbiótica (\%)} = N \text{ total}_{Inoculado} / N \text{ total}_{fertilizado) \times 100}$$

3. **Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%NDA):** para ello se determinó la discriminación de nitrógeno $\delta^{15}\text{N}$. Esta técnica se basa en el hecho de que el 99,6337% del N en el planeta es N¹⁴ y sólo 0,3663% es N¹⁵. En la atmósfera, la relación de N¹⁵/N¹⁴ como N₂, es una constante de 0,00367. El suelo tiene una relación N¹⁵/N¹⁴ más alta que la atmósfera, de manera que la relación N¹⁵/N¹⁴ de una muestra se puede calcular utilizando una planta de referencia que no fije N₂. Para este ensayo, las hojas de las plantas secadas en estufa, se molieron en un molinillo Wiley utilizando una malla de 0,5 mm (Arthur H Thomas, California, EE.UU.). Se pesaron 2,1-2,2 mg de cada muestra en cápsulas de estaño de 8 mm por 5 mm (Microanálisis elemental Ltd., Devon, Reino Unido) en una microbalanza Sartorius (Göttingen, Alemania). Luego, las muestras se incineraron en un analizador Fisons NA 1500 (Serie 2) CHN (Fisons Instrumentos SpA, Milán, Italia).

La relación isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ se calculó como:

$$\mathbf{\delta^{15}\text{N} = [R \text{ (muestra) / R (estándar) - 1] \times 1000}$$

Donde R: es la relación molar del isótopo más pesado sobre el más ligero ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) de la muestra y los estándares definidos por Farquhar *et al.*, (1989). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para los gases de nitrógeno liberados se determinaron en un espectrómetro de masas Finnigan Matt 252 (Finnigan MAT GmbH, Bremen, Alemania) conectado a un analizador CHN por una unidad de control Finnigan MAT Conflo. Se usaron tres estándares para corregir las corridas de las muestras; dos estándares internos (Merck Gel y Capuchina) y uno de la OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica): estándar- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El %NDA se calculó de acuerdo a Shearer y Kohl (1986):

$$\% \text{ NDA} = 100 ((\delta^{15}\text{N planta de referencia} - \delta^{15}\text{N leguminosa de interés}) / (\delta^{15}\text{N planta de referencia} - \text{B}))$$

La planta de referencia utilizada fue trigo (*Triticum aestivum*) cultivado bajo las mismas condiciones de invernadero. El valor B es la abundancia natural del $\delta^{15}\text{N}$ derivado de la fijación biológica del N de la parte aérea de *Lupinus luteus*, cultivado en una solución sin N (Mortimer *et al.*, 2008, 2009). Los análisis se llevaron a cabo en el Departamento de Arqueometría de la Universidad de Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

4. Composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$): para el análisis de composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ se siguió el mismo procedimiento que el descrito para $\delta^{15}\text{N}$: las hojas de las plantas secadas en estufa, se molieron y pesaron 2,1-2,2 mg. Las muestras fueron incineradas en un analizador Fisons NA 1500 (Serie 2) CHN (Fisons Instrumentos SpA., Milán, Italia). El fundamento de la metodología es que la enzima de fijación del carbono (Rubisco) tiene una mayor afinidad por el isótopo más abundante ^{12}C sobre el menos abundante ^{13}C . A medida que la $[\text{CO}_2]$ interno cae en la hoja, la proporción $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ cae, provocando menos discriminación en favor de ^{13}C . Una baja $[\text{CO}_2]$ interna se asocia normalmente con una reducción de la conductancia de los estomas.

La relación isotópica de carbono de una muestra se expresa como:

$$\delta^{13}\text{C} = [\text{R (muestra)} / \text{R (estándar)} - 1] \times 1000$$

Donde: $\delta^{13}\text{C}$ es la relación isotópica en unidades delta con relación al CO_2 derivado de un estándar de piedra caliza de la formación Pee Dee Belemnite en Carolina del Sur, y R (muestra) y R (estándar) son las proporciones de isótopos absolutos de la muestra y el

estándar, respectivamente (Mortimer *et al.*, 2008, 2009). Así, los valores $\delta^{13}\text{C}$ se expresan en partes por mil. Estos análisis se llevaron a cabo en el Departamento de Arqueometría de la Universidad de Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

5. Relacion Carbono:Nitrógeno (C:N): a partir de las determinaciones de N y C descriptas, el N se expresó en términos de su valor relativo al N atmosférico, mientras que el C se expresó en términos de su valor relativo a Pee Dee Belemnite.

Análisis estadísticos

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan para las comparaciones múltiples de las medias con un nivel de significancia de 5%. Se realizaron correlaciones de Pearson de las variables apropiadas. El análisis de los datos corresponde a 2 ensayos con 10 réplicas (n) para cada tratamiento. Programa estadístico Infostat Versión 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014).

Resultados y discusión

Características del crecimiento y la viabilidad de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*

Con el propósito de conocer la concentración de rizobios viables para su uso como inoculante para soja, se analizó el crecimiento y la viabilidad de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* [USDA110, USDA110/CC41 (mutante defectiva en nitrato reductasa), Per 1.12, Per 3.61 y Per 3.64] determinando las unidades formadoras de colonia UFC ml⁻¹ en el medio de cultivo YEMA. Las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* alcanzaron la fase estacionaria a las 72 horas de incubación (Figura 8).

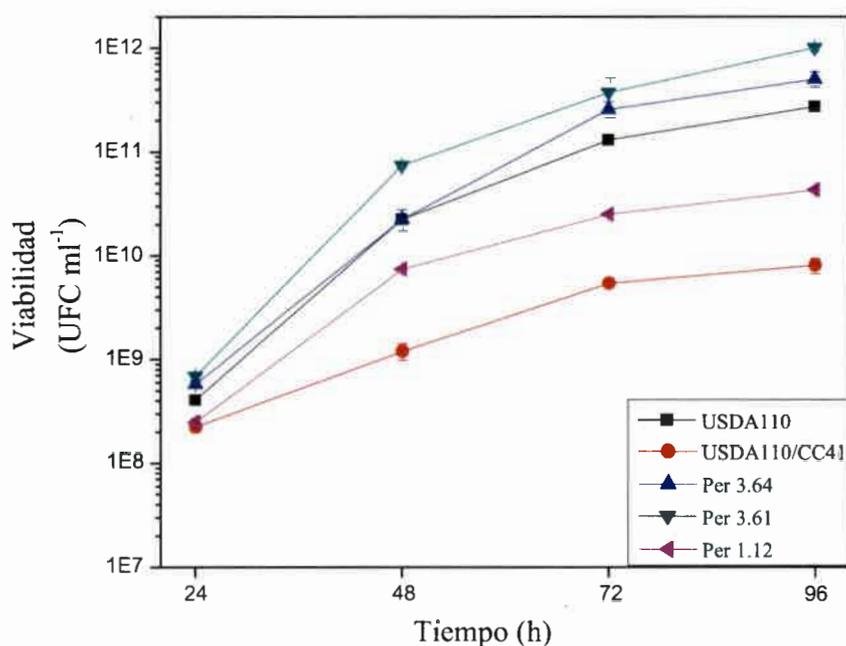


Figura 8. Viabilidad de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* en medio de cultivo YEM. Los datos representan la media \pm error estándar (n=3).

A partir de estos resultados, se decidió usar los cultivos bacterianos de 72 horas de crecimiento donde se alcanza la máxima concentración de rizobios viables. Por otra parte, en nuestro grupo de investigación se realizó un estudio tendiente a corroborar la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) de la cepa salvaje USDA110 y su mutante USDA110/CC41 defectiva en NR. Para ello, se determinó la actividad de la enzima mediante la técnica de Delgado *et al.*, (2003) obteniéndose los valores $777,45 \pm 25,22$ y $23,89 \pm 0,78$ nmoles nitrito/minuto/mg proteína para la cepa salvaje y mutante, respectivamente (Fullana, 2012). Este dato resulta de interés para confirmar que la cepa

USDA110/CC41 obtenida por mutagénesis usando el transposón Tn-5 (Camacho *et al.*, 2003) tiene solamente un 3% de la actividad enzimática de NR en vida libre.

Actividad de promoción de crecimiento de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*

Los datos obtenidos del análisis de capacidades adicionales de promoción de crecimiento de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas en este estudio, tales como producción de ácido indolacético (AIA), sideróforos, cianidas (HCN) y solubilización de fosfatos resultaron ser negativo indicando que ninguna de las cepas presentó estas actividades PGPB.

En referencia a la producción de AIA por la cepa de *B. japonicum* USDA110 existen resultados contradictorios dependiendo del método de análisis usado. Así, León-Barrios *et al.*, (2006) detectaron cantidades mínimas de AIA producidas por la cepa USDA110 a través de la determinación de la actividad aminotransferasa sobre triptófano por electroforesis en geles de poliacrilamida, por lo que se consideró a esta cepa como no productora de AIA. Sin embargo, Boiero *et. at*, (2007) encontraron producción de AIA en la cepa *B. japonicum* USDA110 por análisis de HPLC.

Por otra parte, la solubilización de fosfato resulta ser una capacidad adicional de promoción de crecimiento de suma importancia, ya que el fósforo es un nutriente esencial para las plantas interviniendo en numerosas reacciones metabólicas (Chabot *et al.*, 1996). Fernández *et al.*, (2005) han demostrado que los aislamientos de *Bradyrhizobium* sp., obtenidos de suelos sojeros, tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico.

Considerando que las cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12) no mostraron las actividades PGPB analizadas, se procedió a evaluar si las mismas promuevan el crecimiento vegetal por su capacidad de fijación de N₂ atmosférico en condiciones control y con la adición de 5 mM de nitrato.

Efecto del nitrato sobre la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del crecimiento de las plantas de soja cosechadas en el estado fenológico R2, inoculadas con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* en ausencia y presencia de 5 mM de nitrato en ensayos de invernáculo bajo condiciones controladas.

Tabla 3. Estimación del crecimiento aéreo y radical y del contenido de N en plantas de soja en asociación con *Bradyrhizobium japonicum*.

Concentración de KNO ₃ (mM)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Peso seco aéreo mg/planta	Peso seco raíz mg/planta	Contenido de N mg/planta
0	Control	590,00±142,79 c	342,61±54,60 bcd	12,94±8,46 c
	USDA110	595,79±135,07 c	198,00±67,61 cd	12,72±8,46 c
	USDA110/CC41	514,74±135,07 c	290,43±54,60 bcd	15,64±8,46 c
	PER 3.64	1625,29±142,79 b	312,00±52,37 bcd	51,81±7,73 a
	PER 3.61	2121,00±186,18 a	683,00±82,80 a	58,00±10,93 a
	PER 1.12	805,00±186,18 c	169,00±82,80 d	16,00±10,93 c
5	Control	870,00±138,77 c	382,31±51,35 bc	35,53±7,73 b
	USDA110	775,00±138,77 c	304,67±67,61 bcd	19,57±7,73 c
	USDA110/CC41	632,38±128,48 c	418,26±54,60 b	21,73±8,46 c
	PER 3.64	1505,71±128,48 b	460,80±52,37 b	67,79±7,73 a
	PER 3.61	2544,00±186,18 a	668,00±82,60 a	55,33±10,93 a
	PER 1.12	875,00±186,18 c	165,00±82,80 d	15,67±10,93 c

Los datos representan la media ± error estándar (n=20). Las letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas (p<0,05) según prueba de Duncan.

Las plantas de soja inoculadas con la cepa Per 3.61 mostraron un aumento significativo en el peso seco de la parte aérea (PSA) y de la raíz (PSR) en comparación a las otras cepas usadas en este trabajo en ambas condiciones (0 y 5 mM de nitrato). Es de destacar que no se observó diferencia en el comportamiento de las cepas salvaje (USDA110) y la mutante defectiva en nitrato reductasa (USDA110/CC41) en el crecimiento de las plantas de soja en ausencia y presencia de nitrato. El contenido de nitrógeno de las plantas de soja, inoculadas con las cepas Per 3.64 y Per 3.61, mostró un

aumento significativo en ambas condiciones de crecimiento comparadas con las demás cepas. Las plantas de soja sin inocular en presencia de 5 mM (usada como control fertilizado) mostraron un aumento del contenido de N en relación al tratamiento control no fertilizado. Por otra parte, el análisis de correlación de Pearson reveló una asociación alta y significativa entre PSA y PSR ($r=0,86$ $p< 0,05$) en los tratamientos control e inoculados con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* sin adición de nitrato.

En la tabla 4 se muestra los resultados de la nodulación de las plantas de soja inoculadas con las diferentes cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* en ambas condiciones de crecimiento.

Tabla 4. Estimación de la nodulación en la asociación *Bradyrhizobium japonicum*-soja.

Concentración de KNO ₃ (mM)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Número de nódulos/planta	Peso seco de nódulos mg/planta	Peso normalizado de nódulos
0	USDA110	14,60±2,25 b	34,37±5,23 de	0,07±0,01 cd
	USDA110/CC41	9,27±2,25 c	25,82±4,73 de	0,04±0,01 def
	PER 3.64	16,00±2,11 bc	17,43±4,73 ef	0,03±0,01 ef
	PER 3.61	39,00±3,90 a	330,00±9,06 a	0,17±0,02 a
	PER 1.12	21,60±3,90 b	88,00±11,09 c	0,11±0,01 b
5	USDA110	9,67±2,25 c	33,03±9,06 de	0,08±0,02 c
	USDA110/CC41	8,47±2,25 c	6,11±4,96 f	0,01±0,01 f
	PER 3.64	13,00±2,05 c	6,24±5,93 f	0,01±0,01 f
	PER 3.61	22,60±3,90 b	140,00±7,02 b	0,04±0,02 def
	PER 1.12	12,60±3,90 c	44,00±7,02 d	0,06±0,01 cde

Los datos representan la media ± error estándar (n=20). Las letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p<0,05$) según prueba de Duncan.

La cepa Per 3.61 resultó ser la que mayor número y peso seco de nódulos presentó en comparación con las otras cepas de *Bradyrhizobium japonicum* en las mismas condiciones. Sin embargo, es de destacar que la adición de nitrato ejerció un efecto negativo en las variables simbióticas analizadas de esta cepa, pero aún mantuvo valores

superiores a las otras cepas. En presencia de nitrato, el número de nódulos formados en la planta de soja inoculada con la cepa mutante USDA110/CC41 fue similar a lo de la cepa salvaje USDA110, pero con una disminución significativa del peso seco de los nódulos. El análisis de correlación de Pearson reveló una asociación alta y significativa entre PSN y número de nódulos ($r=0.90$ $p<0.05$) con la adición de nitrato observándose una asociación moderada y significativa entre el PSN y el número de nódulos ($r=0,76$ $p<0.05$) sin la adición de nitrato. Además, se demostró que entre las variables PSN y PNN existe una asociación moderada y significativa ($r=0,76$ $p<0.05$) al igual que entre el número de nódulos y el PNN ($r=0,70$ $p<0.05$) sin la presencia de 5 mM de nitrato.

El análisis de correlación de Pearson, entre las variables de crecimiento y de la simbiosis, indicó que entre PSA y número de nódulos existió una asociación alta y significativa ($r=0,81$ $p<0.05$) con nitrato y moderada ($r=0,74$ $p<0.05$) sin nitrato. Entre el PSA y PSN la asociación fue alta y significativa sin y con adición de nitrato ($r=0,88$ $p<0.05$) y ($r=0,83$ $p<0.05$), respectivamente. Asimismo, se observó una asociación alta entre PSR y PSN ($r=0,88$ $p<0.05$) y entre PSR y PNN ($r=0,86$ $p<0.05$) sin adición de nitrato.

Las plantas de soja, además de fijar el N por simbiosis, absorben N inorgánico del suelo y pueden contar además con el aporte de N derivado de la fertilización, cuando se aplica esta alternativa, la importancia relativa de todas estas fuentes depende del estadio de desarrollo y de la abundancia de N inorgánico disponible en el suelo (Ohyama *et al.*, 2012). El N mineral disponible en el suelo es la fuente más importante durante las primeras etapas del ciclo, ya que el proceso de FBN no se establece hasta alrededor de los 30 días desde la emergencia (Purcell *et al.*, 2004), aumenta hasta alcanzar un máximo durante el período reproductivo, y desciende durante el llenado de los granos (Salvagiotti *et al.*, 2009). Es por ello, que la adición de una concentración mínima de N se requiere como iniciador, proveniente del suelo o de material orgánico, para estimular el crecimiento de la soja sin deprimir la nodulación y la FBN (Miransari, 2016). Sin embargo, es conocido que una concentración elevada de N mineral deprime la formación de nódulos y la actividad de fijación de nitrógeno, especialmente, cuando las raíces noduladas de soja están en contacto directo con la solución del suelo que contiene nitrato (Fujikake *et al.*, 2002; Fernández-Canigia, 2003; Ohyama *et al.*, 2012). No obstante, existen diferencias entre las especies y cultivares de leguminosas en cuanto a su sensibilidad a la adición de nitrato (Lucinski *et al.*, 2002).

Niveles altos de NO_3^- en el suelo pueden inhibir tanto la formación de nuevos nódulos como la actividad de los nódulos ya formados. Se conoce que una mayor absorción de NO_3^- cambia el patrón de distribución de asimilados en la planta, disminuyendo la partición de los mismos a los nódulos. La disminución en la fijación de N por la disponibilidad de N del suelo se debe a efectos directos del nivel de NO_3^- sobre el metabolismo de los nódulos (Salvagiotti *et al.*, 2009).

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, las plantas de soja inoculadas con las cepas *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.64 y Per 3.61 presentaron un alto valor de PSA y contenido de nitrógeno, pero hubo una disminución en el número de nódulos, PSN y en el PNN en presencia de nitrato. Este comportamiento indicaría que la estimulación del crecimiento vegetativo como consecuencia de la aplicación del nitrato, ocurre en detrimento de la producción de la biomasa nodular. Resultados hallados por Arrese-Igor *et al.*, (1997) en planta de poroto con la adición de 5 mM de nitrato mostraron un efecto antagónico entre la adición nitrato y la FBN. Saito *et al.*, (2014) demostraron que la adición de 5 mM de nitrato suprimió el crecimiento y la actividad nodular en las plantas de soja después de 7 horas de agregado al medio de cultivo. En cultivo de soja, el suministro de 10 mM de nitrato produjo una disminución en el peso seco de los tallos; peso seco y número de nódulos, pero un aumento en el peso seco de la raíz (Arrese-Igor *et al.*, 1997). Otros autores, Leidi y Rodríguez-Navarro, (2000) en plantas de *Phaseolus vulgaris* determinaron un aumento de peso seco aéreo de las plantas y una inhibición en la nodulación (número y peso seco de nódulos) en presencia de 10 mM de KNO_3 . Estos resultados que concuerdan ampliamente con los encontrados en el presente trabajo, aunque con el doble del nivel de nitrato adicionado. Reid *et al.*, (2011) informaron que para contrarrestar estos efectos adversos podrían existir mecanismos que controlan la implicancia del nitrato sobre la nodulación y el proceso de autorregulación de la misma.

La tabla 5 muestra los resultados de la cantidad de N_2 fijado y la efectividad simbiótica (ambos estimados en base al contenido de N total de las plantas) de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, los cuales se mantuvieron inalterados en ausencia y presencia de nitrato. Es de destacar que, la efectividad simbiótica de la cepa mutante USDA/CC41 resultó ser similar a la cepa salvaje USDA110 en ambas condiciones de crecimiento. En base a estos datos se puede inferir que todas las cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum*, utilizadas en este trabajo de tesis doctoral, poseen una elevada capacidad para fijar simbióticamente el nitrógeno atmosférico.

Tabla 5. Estimación del N₂ fijado y de la efectividad simbiótica en la asociación *Bradyrhizobium japonicum*-soja.

Concentración de KNO ₃ (mM)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	N ₂ fijado mg/planta	% Efectividad simbiótica
0	USDA110	2,01±0,35 abc	88,30±11,01 abc
	USDA110/CC41	2,07±0,41 ab	90,43±12,72 ab
	PER 3.64	2,32±0,50 ab	98,15±15,57 ab
	PER 3.61	1,23±0,50 bc	64,20±15,57 bc
	PER 1.12	1,60±0,41 bc	75,60±12,72 bc
5	USDA110	1,58±0,29 bc	74,95± 8,99 bc
	USDA110/CC41	2,14±0,41 ab	92,50± 12,72 ab
	PER 3.64	3,26±0,41 a	97,37±12, 72 a
	PER 3.61	2,25±0,41 ab	96,07±12,72 ab
	PER 1.12	0,71±0,41 c	48,10±12,721 c

Los datos representan la media ± error estándar (n=20). Las letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas (p<0,05) según prueba de Duncan.

La utilización de urea como iniciador, cuando la planta y los rizobios simbióticos aún no han establecido la asociación simbiótica, es esencial para el crecimiento adecuado de las plantas de soja. Como resultado, las plantas serán capaces de crecer y absorber nutrientes esenciales para su desarrollo. Sin embargo, antes del inicio del proceso simbiótico, las cantidades de fertilización nitrogenada deben ser mínimas para que la planta y las bacterias puedan establecer el proceso simbiótico (Miransari, 2011). Pero, si las leguminosas mantienen la fijación de nitrógeno, aún en presencia de nitrato, la adición conjunta es mayor y se produce una menor remoción de N del suelo. Diversos ensayos de fertilización nitrogenada mostraron una sustitución del N fijado por el aportado por el fertilizante, sin un aumento neto en la asimilación del nutriente (Salvagiotti *et al.*, 2008).

O'Hara y Daniel (1985) informaron que las plantas de lupino inoculadas con cepas de *Rhizobium* sp., capaces de desnitrificar en vida libre, tendrían una ventaja competitiva si las concentraciones inhibitorias de nitrato y nitrito fueran eliminadas de la rizósfera mediante la actividad desnitrificante de dichas cepas. En este trabajo de tesis doctoral, es de destacar que la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas *Bradyrhizobium japonicum* no se vio afectada en presencia de nitrato, posiblemente debido a la capacidad desnitrificante de las mismas.

Indicadores de la fijación de nitrógeno y de carbono en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum* -soja

Los métodos basados en isótopos proporcionan el enfoque más preciso para las mediciones de la cantidad de FBN en las plantas (Unkovich, 2008). Uno de los métodos más validados para estimar la fijación de N₂ atmosférico es el porcentaje de N derivado de aire (%NDA) el cual puede calcularse a partir del valor $\delta^{15}\text{N}$ (Barbosa-Torres, 2016).

La tabla 6 muestra el análisis del porcentaje de N₂ derivado de la atmósfera (%NDA) revelando que la inoculación de la soja con la cepa *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 presentó el mayor valor del %NDA respecto a las cepas nativas Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12 en ausencia de nitrato. Entre las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y USDA110/CC41 (mutante defectiva en la enzima nitrato reductasa) no se observaron diferencias significativas sin la adición de nitrato, sin embargo, ambas cepas mostraron una reducción significativa del %NDA en presencia de 5 mM de nitrato. Estos datos coinciden con lo expresado por Ohyama *et al.*, (2012) que demostraron que la adición de 5 mM de nitrato en plantas de soja inoculada con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 produjo una disminución en el peso de los nódulos y en el %NDA.

Tabla 6. Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera en plantas de soja inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*.

Concentración de KNO ₃ (mM)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	% NDA
0	USDA110	100 ± 0,10 a
	USDA110/CC41	91,15 ± 1,08 abcd
	PER 3.64	83,80 ± 3,58 bcd
	PER 3.61	86,08 ± 1,37 bcd
	PER 1.12	82,16 ± 7,46 bc
5	USDA110	96,08 ± 5,87 cd
	USDA110/CC41	80,17 ± 2,55 e
	PER 3.64	92,61 ± 3,38 bcd
	PER 3.61	85,88 ± 2,17 bcde
	PER 1.12	90,11 ± 4,02 bcd

Los datos representan la media ± error estándar (n=3). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan (p<0,05).

En contraste a lo observado con las cepas salvaje y mutante de USDA110, el %NDA de las plantas de soja inoculadas con las cepas nativas (Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12) no mostraron diferencias significativas en ambas condiciones (sin y con la adición de nitrato). Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos del contenido de nitrógeno total de las plantas de soja inoculadas con las cepas nativas (Tabla 6). Es de destacar, que todas las cepas estudiadas en este trabajo de tesis mantuvieron la efectividad simbiótica en presencia de nitrato. Estos datos ponen en evidencia la capacidad de las cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* de contribuir a la optimización de la fijación biológica del nitrógeno de la planta de soja cultivada en presencia de un alto contenido de nitrato.

La estimación de la contribución de la FBN es crucial para analizar la eficiencia del uso de nutrientes y el impacto humano en el ciclo del N en los agroecosistemas de América Latina (Austin *et al.*, 2013). En campos bien manejados de Brasil, Hungria *et al.*, (2006)

informaron que los valores de %NDA fueron superiores al 75%, con contribuciones de 70-250 kg N ha⁻¹. En campos de Argentina, Collino *et al.*, (2015) encontraron una contribución media de FBN de 60% (15-337 kg N ha⁻¹), con un valor medio de 153 kg N ha⁻¹, presentando valores inferiores a los estimados en Brasil. Herridge *et al.*, (2008) demostraron un valor promedio del %NDA en el cultivo de soja de 68%, con un rango de 0-95%. Las variaciones de dicho porcentaje podrían deberse a los factores que controlan el crecimiento de las leguminosas: genéticos, agronómicos, ambientales y experimentales, la disponibilidad de NO₃⁻ en el suelo, al número y a la efectividad de los rizobios en las proximidades del sistema radical. Dentro de las limitaciones ambientales se incluyen: temperatura (Soares-Novo *et al.*, 1999), humedad del suelo (Serraj *et al.*, 1999), pH del suelo (Parker y Harris, 1977), disponibilidad de P (Sa e Israel, 1995), suelos salinos y sódicos (Elsheikh, 1998), y cantidad de agua disponible (Bacanamwo y Purcell, 1999).

La regulación de la FBN se asocia con los altos costos energéticos que requiere este proceso para la planta, correspondientes a 16 moléculas de ATP por cada molécula de N₂ fijado y una demanda del 33% de los asimilados de fotosíntesis. Para ello, la planta debe destinar entre 6 y 12 g de compuestos carbonados por cada gramo de N fijado. La asimilación de N a partir de nitratos del suelo es entre 6 a 8 veces más eficiente para el cultivo, desde el punto de vista energético. Como la planta debe producir los compuestos carbonados, existe una relación directa entre fotosíntesis y fijación biológica. Por lo tanto, la fijación biológica se relaciona estrechamente a la producción de biomasa aérea y rendimiento así que a mayor biomasa aérea mayor será la fotosíntesis, y habrá más fijación de nitrógeno (Fernández-Canigia, 2003).

Los isótopos estables de carbono, como indicadores fisiológicos, presentan una nueva perspectiva en el estudio de la incidencia de los estreses abióticos ocasionados por procesos naturales o antropogénicos (hídrico, irradiación, temperatura y concentración de CO₂ atmosférico) sobre la producción de las plantas cultivadas. En este contexto, los isótopos estables del carbono pueden ser considerados registros de cambios fisiológicos (Cregg y Zhang, 2000; Pierre-Vitoria *et al.*, 2016; Mapope y Dakora, 2016; Xu *et al.*, 2016). Bellaloui (2011) encontró un aumento de δ¹³C (mayor relación ¹³C/¹²C = menos negativo) en plantas de soja bajo condiciones de estrés hídrico. Esta alteración en la relación de ¹³C a ¹²C se asocia al cierre de los estomas, el cual se traduciría en un aumento de la fijación de ¹³C y una reducción de la discriminación de ¹³C.

En la figura 9 se observa que las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.64 y Per 3.61 mostraron valores de δ¹³C (-31‰) con respecto a las cepas USDA110

y a USDA110/CC41 que en promedio fueron más bajos (-33‰) en ambas condiciones de crecimiento (0 y 5 mM de nitrato). En base a estos resultados se puede inferir que la discriminación del $\delta^{13}\text{C}$ depende del comportamiento simbiótico de cada cepa y es independiente de la presencia de nitrato. Así, las cepas Per 3.64 y Per 3.61 en simbiosis con la planta de soja demostraron tener un mayor enriquecimiento de carbono, además de tener un alto valor del %NDA y aumentar el crecimiento. Si bien en la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos que vinculen el estrés por alta concentración de nitrato y discriminación $\delta^{13}\text{C}$, a partir del análisis integral de los resultados se puede inferir que estas cepas demostraron un comportamiento superior con respecto a las otras cepas analizadas en ambas condiciones de crecimiento.

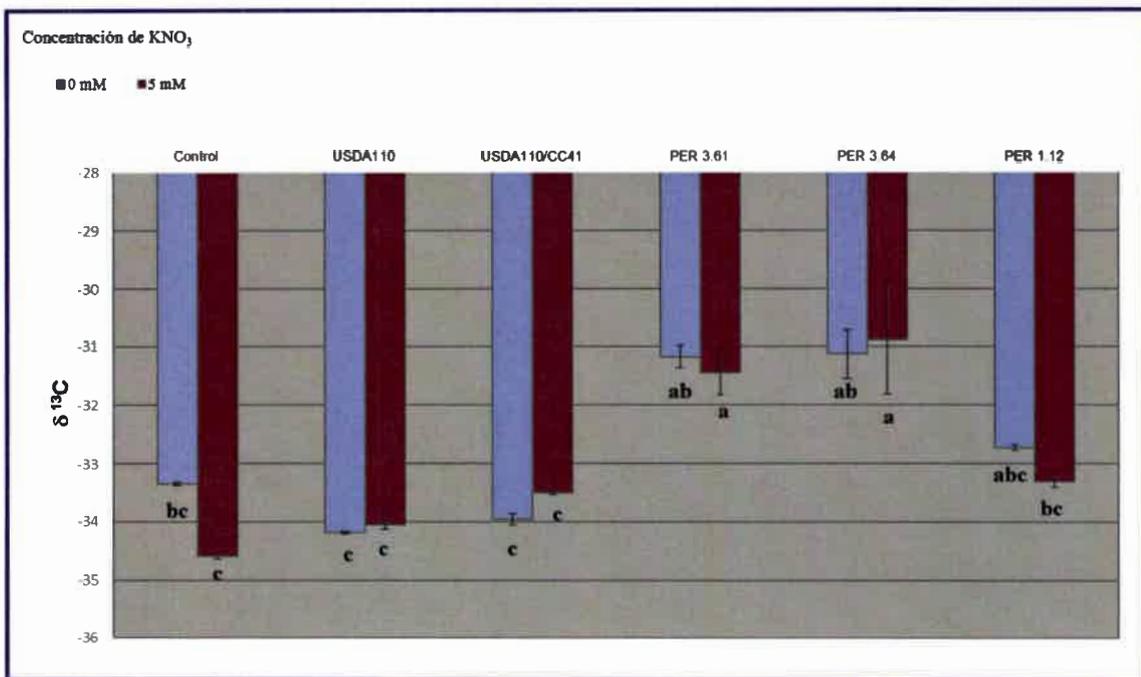


Figura 9. $\delta^{13}\text{C}$ en plantas de soja inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*. Los datos representan la media \pm error estándar (n=3). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

La magnitud del proceso de FBN en la simbiosis rizobio-leguminosa está condicionada por la relación C:N del suelo y de la savia. Así, cuando la relación C:N es alta, la favorece; cuando es baja, la limita. La adición de N inorgánico al suelo a través de fertilizantes reduce esta relación y produce habitualmente una disminución concomitante del N incorporado por FBN (Racca y Collino, 2005). Diversos trabajos (Fernández-Canigia, 2003; Bianchini, 2007; Paredes, 2013) demostraron que el porcentaje de N

derivado de la atmósfera desciende proporcionalmente a la cantidad de N incorporado con el fertilizante, sin diferencias significativas en los rendimientos. Es decir que, cuando hay suficiente disponibilidad de N en el suelo, la planta por razones de economía energética, privilegia la incorporación del nitrógeno edáfico por sobre el derivado de la atmósfera. En base a estos antecedentes, se decidió analizar si la adición de nitrato afectaba la relación C:N en las plantas de soja inoculadas con las diferentes cepas desnitrificantes de *B. japonicum*.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos de la relación C:N indicando que las plantas controles crecidas en ausencia de nitrato tuvieron una mayor relación C:N en comparación a las mismas con 5 mM de nitrato. En cambio, las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, USDA110/CC41, Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12) no presentaron diferencias significativas entre ambas condiciones ensayadas. Estos datos sugieren que la adición de nitrato no estaría afectando la relación C:N en la asociación simbiótica de la soja con las diferentes cepas desnitrificantes de *B. japonicum*. Considerando que todas las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* mostraron una eficiente fijación biológica del nitrógeno, la relación C:N no se modificó por la complementariedad de otra fuente de N.

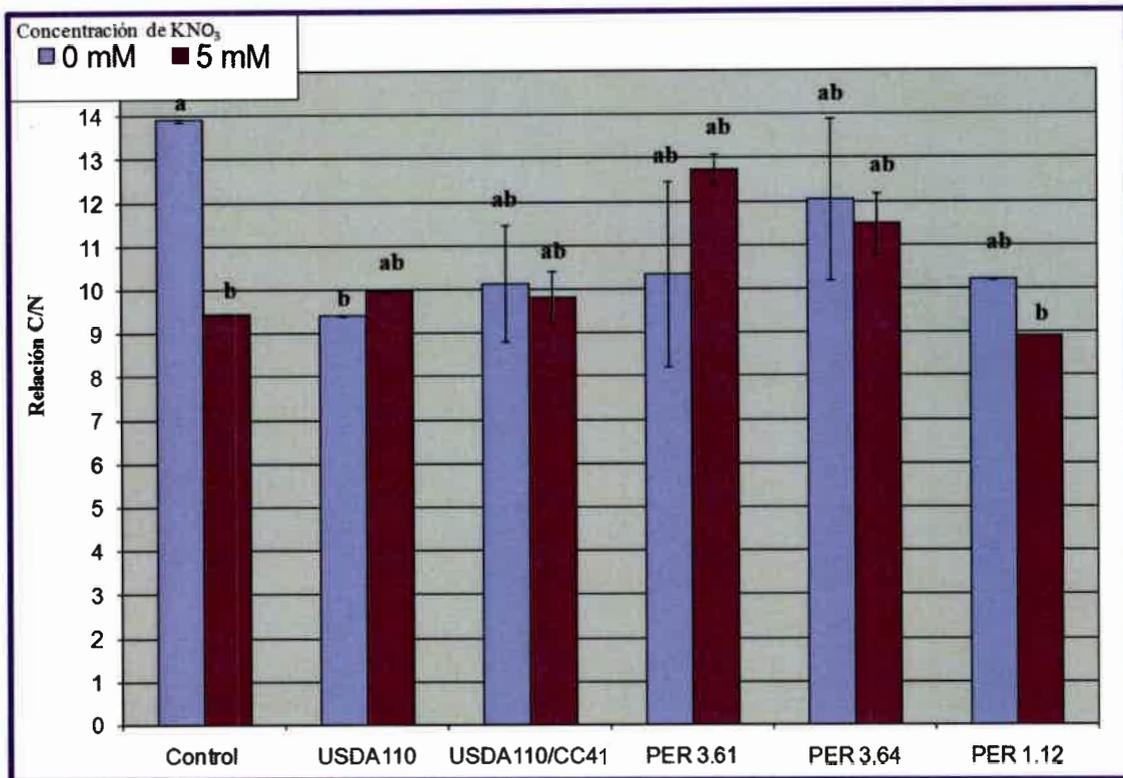


Figura 10. Relación C:N en plantas de soja control e inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* sin y con nitrato. Los datos representan la media \pm error estándar (n=3). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo demostraron que las cepas nativas de *Bradyrhizobium japonicum* (Per 3.64, Per 3.61 y Per 1.12) fueron capaces de nodular y fijar nitrógeno en presencia de elevada concentración de nitrato adicionado al medio de crecimiento de las plantas de soja en ensayo de invernáculo. Además, es de destacar que la FBN fue el único proceso demostrado en estas cepas bacterianas en simbiosis con la soja que permitió el crecimiento de las plantas manteniendo una alta relación C:N para el funcionamiento de la misma en las condiciones ensayadas.

Capítulo 3: Rol de los compuestos
nitrogenados y el proceso de
desnitrificación en la asociación simbiótica
Bradyrhizobium japonicum- soja.

Introducción

Rol de los compuestos nitrogenados en la asociación simbiótica rizobio-leguminosa

Las plantas incorporan una gran cantidad de nitrógeno (N) durante los estados vegetativo y reproductivo, estando este N altamente correlacionado, con el crecimiento y la producción del grano (Ohyama *et al.*, 2012). El N del suelo está disponible para las plantas principalmente, como nitrato o amonio (NH_4^+) y en menor grado, aminoácidos (Trewavas, 1983). El amonio y el nitrato constituyen las principales fuentes de N inorgánico, siendo el ion NH_4^+ la forma más reducida y el nitrato la más oxidada. Además del N inorgánico, el requerimiento se satisface por medio de la fijación biológica del mismo, cabe destacar que en condiciones de cultivo las leguminosas, obtienen el N por ambos procesos.

El N fijado en los nódulos es transportado vía xilema, desde los llamados órganos de origen: raíz y hojas maduras, hacia los tallos y pecíolos y finalmente traslocado a los órganos de destino, tales como hojas en desarrollo, flores, vainas y semillas, vía floema (Rentsch *et al.*, 2007; Ohyama *et al.*, 2012; Tegeder, 2014). Xilema y floema, además de conectar los órganos de origen con los de destino, sirven como rutas para el transporte a larga distancia del nitrógeno orgánico (Shelp y Da Silva, 1990). Estos autores mostraron que durante el desarrollo las demandas cambian y la oferta de solutos por las hojas de la planta aumentan, por lo tanto, la contribución del xilema debe adecuarse en relación a las necesidades del floema. En este sentido, se sugirió que los metabolitos del N, dentro de la planta, pueden indicar el estado de nitrógeno, proporcionando una señal de retroalimentación, que puede regular la absorción de nitratos por la planta (Lee y Rudge, 1986; Cooper y Clarkson, 1989; Miller *et al.*, 2007) para satisfacer dichas demandas. Estos solutos que se mueven corriente arriba están disponibles para el transporte por el floema hacia los órganos inmaduros, direccionando el remanente hacia las hojas maduras que son importantes en el metabolismo del N además de su actividad fotosintética con capacidad transpiratoria, que pueden transformar el N ingresante. Esta transferencia de nutrientes entre órganos, es el medio, también, de eliminación de productos no deseados. Estos últimos autores sugirieron en particular, que el mecanismo de absorción por las raíces cambia según sea el suministro del N, logrando así regular el proceso. La comprensión de estos mecanismos es clave para intentar mejorar la eficiencia del uso de N por los cultivos.

En la mayoría de las especies vegetales, los aminoácidos son la forma química predominante en el transporte del nitrógeno (Tegeder, 2014). En leguminosas de origen templado el nitrógeno es exportado principalmente en forma de glutamina y asparagina

(entre un 60-70% del total de compuestos nitrogenados exportados es en forma de asparagina). Las leguminosas de origen tropical y subtropical exportan principalmente ureidos. Dicho grupo de plantas exportan amidas, glutamina y asparagina fundamentalmente, cuando crece a expensas de una fuente de nitrógeno mineral y, sin embargo, al establecer una interacción simbiótica, estas especies pasan a sintetizar ureidos como compuesto para distribuir el nitrógeno al resto de la planta (González *et al.*, 2006) (Figura 11).

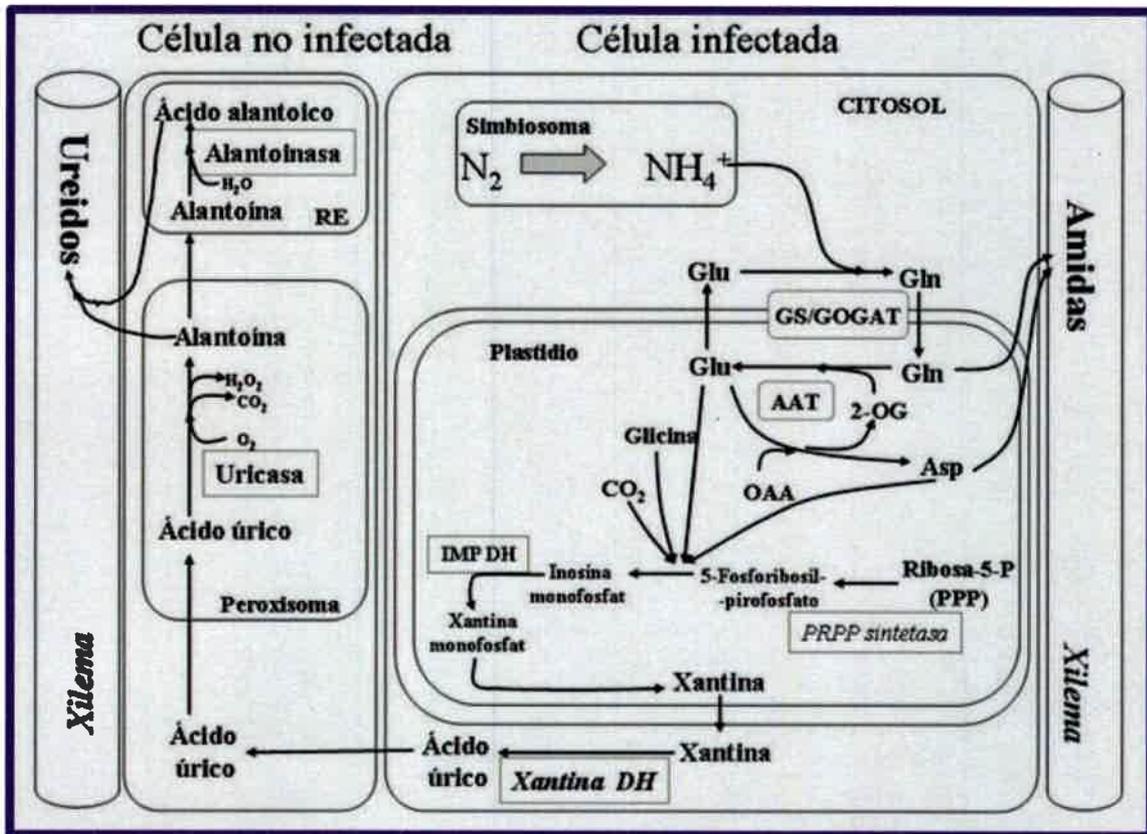


Figura 11. Biosíntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de leguminosas.

Fuente: González *et al.*, 2006.

A continuación, se describen las características más relevantes de los compuestos nitrogenados (nitrato, ureidos y aminoácidos):

NITRATO

El nitrato (NO_3^-) es la fuente de N de mayor abundancia en los suelos destinados a los cultivos. Es una molécula señal en plantas que coordina múltiples, procesos celulares (Wang, 2012) por lo que alguna vez se sugirió que el NO_3^- se comporta como una hormona vegetal (Trewavas, 1983).

En la mayoría de las plantas los sistemas de absorción de nitrato, amonio y aminoácidos están presentes en las raíces. En particular el ion NO_3^- se absorbe por un transportador de nitrato con 2H^+ como co-transporte (Ohyama *et al.*, 2012). Es asimilado por conversión a nitrito por la nitrato reductasa y el NO_2^- , es reducido a NH_4^+ en el citosol, por la nitrito reductasa de los plástidos y posteriormente a aminoácidos siguiendo la asimilación vía GS/GOGAT (Baral *et al.*, 2016).

Cierto porcentaje del NO_3^- absorbido en las raíces se reduce en el sitio y es transportado en forma de asparagina, es por ello que al adicionar NO_3^- en solución, la concentración de asparagina aumenta marcadamente, lo que indica que este aminoácido es el principal compuesto asimilatorio del NO_3^- en las raíces de soja (Ohyama *et al.*, 2012).

Desde la raíz, el NO_3^- es transportado inmediatamente por el xilema a los tallos, o se almacena temporariamente en las vacuolas de las células radiculares y luego gradualmente es liberado al xilema, transportado a las hojas a través de la corriente transpiratoria, asimilándose como aminoácidos. La removilización de lo almacenado en hojas y raíces es uno de los mayores aportes para el N de la semilla en el caso de nutrición por NO_3^- (Wang *et al.*, 2012; Ohyama *et al.*, 2012). Para la traslocación del nitrato desde las raíces a los tallos, el primer paso es la carga del nitrato en los vasos del xilema, actualmente solo un transportador ha sido identificado NRT1.5 (Wang *et al.*, 2012).

La asimilación del N en raíces en comparación con los tallos depende en gran medida de la especie de la planta, pero también está influenciado por condiciones medioambientales y el fotoperíodo (Pate, 1983; Lam *et al.*, 1995). Por mucho tiempo se pensó que el NO_3^- solo podía ser transportado por el xilema mientras que, los compuestos orgánicos (aminoácidos) podían ser transportados vía xilema y floema. Actualmente, se conoce que el transporte desde la raíz al tallo es conducido en el xilema por la corriente transpiratoria, ruta primaria de transporte de larga distancia, y que el transporte de NO_3^- en el floema por el gradiente osmótico, provee una segunda ruta que modula la redistribución del N (Wang *et al.*, 2012).

Cuando se suministra una alta concentración de NO_3^- , una parte se almacena temporariamente en las vacuolas de las células del córtex, en la raíz. Parte de los NO_3^- son transportados de célula en célula, para fluir finalmente en los vasos conductores (Harper, 1987; Rentsch *et al.*, 2007). Los efectos directos e indirectos del nitrato y el efecto inhibitorio del N combinado, dependen de la forma, del sitio de aplicación y del estado de crecimiento de la soja. Cabe destacar que el efecto directo o local está dado por el contacto íntimo del NO_3^- con la parte nodulada de las raíces (Harper, 1987; Ohyama *et al.*, 2012).

Esta situación afecta la FBN, por la extremada sensibilidad de los nódulos a la presencia de nitratos en el área circundante (Salvagiotti *et al.*, 2009). Las condiciones que dificultan la asimilación del N por fijación biológica en la soja, pueden conducir a cambios específicos en la composición de aminoácidos en el xilema en plantas que exportan ureidos (Amarante, 2006). Sin embargo, la presencia de nitrato en bajas concentraciones, es recomendable al comienzo de la estación, de manera que la bacteria y la planta puedan establecer el proceso simbiótico (Becana y Sprent, 1987; Miransari, 2016).

UREIDOS

Los ureidos constituyen los principales compuestos nitrogenados, que contribuyen al crecimiento y a la producción de las leguminosas noduladas por *Rhizobium* que crecen en suelos con un contenido bajo de N (Baral *et al.*, 2016). Son los principales compuestos que utilizan las plantas para transportar N, principalmente en forma de alantoína y ácido alantoico, comprenden aproximadamente el 90% del N₂ transportado en el xilema de las leguminosas tropicales fijadoras de N (Todd *et al.*, 2006). Se caracterizan por su solubilidad relativa en sistemas acuosos, baja reactividad química (más estables), tienen una relación C:N 1:1, por lo que, en comparación con los aminoácidos, cuya relación C:N es 2:1, representan un ahorro de carbono que la planta huésped invierte para transportar el N₂ fijado (Castro y Acuña, 1992; Pélassier y Tegeder, 2007). Al constituir una forma concentrada de nitrógeno orgánico, su síntesis es menos costosa que la de otros transportadores de N en términos de ATP, actuando además como donantes de grupo amino en el metabolismo (Smith y Atkins, 2002). Además, son moléculas antioxidantes ante diversas situaciones de estrés para la planta (Nakagawa *et al.*, 2011), más precisamente amortiguando la acción de los radicales (ROS) generados en el estrés abiótico (Werner y Witte, 2011).

Las leguminosas exportadoras de ureidos (soja, poroto y garbanzo) realizan su transporte de N a través de una vía compleja que involucra al menos 20 diferentes enzimas que actúan sincrónicamente en los dos tipos de células del nódulo, que poseen grandes diferencias en ultraestructura debido a las distintas funciones que poseen las organelas del nódulo (Tegeder *et al.*, 2013; Baral *et al.*, 2016). Las membranas biológicas proveen de barrera natural para el libre transporte de los compuestos nitrogenados y otras sustancias por los diferentes compartimentos de la célula, las plantas desarrollan mecanismos especializados que regulan la actividad de los transportadores para asegurar una óptima nutrición (Rentsch *et al.*, 2007).

La biogénesis de ureidos en los nódulos y su transporte a las partes aéreas de las plantas requiere de la participación de un gran número de organelas, enzimas y transportadores de membrana coordinados por la expresión de varias familias de genes (Baral *et al.*, 2014).

La síntesis de ureidos depende en gran medida de la nodulación y de la fijación de N_2 (Mc Clure, 1979; Ohyama *et al.*, 2012) que se lleva a cabo dentro de nódulos radiculares, en las leguminosas tropicales que producen grano, estos nódulos son esféricos y con crecimiento determinado, caracterizados por una anatomía compleja. Poseen un núcleo central que contiene las células infectadas por el bacteroide cuya función es la fijación de N_2 y su asimilación, como así también células no infectadas donde ocurre la síntesis de los ureidos (Collier y Tegeder, 2012; Downie, 2014). Alantoína y ácido alantoico (Figura 12), constituyen parte del N atmosférico fijado, son productos de la oxidación de la síntesis de *novoo* de purinas en el nódulo y también productos de la renovación de las purinas en los tejidos senescentes tales como los cotiledones de las plántulas (Tod *et al.*, 2006).

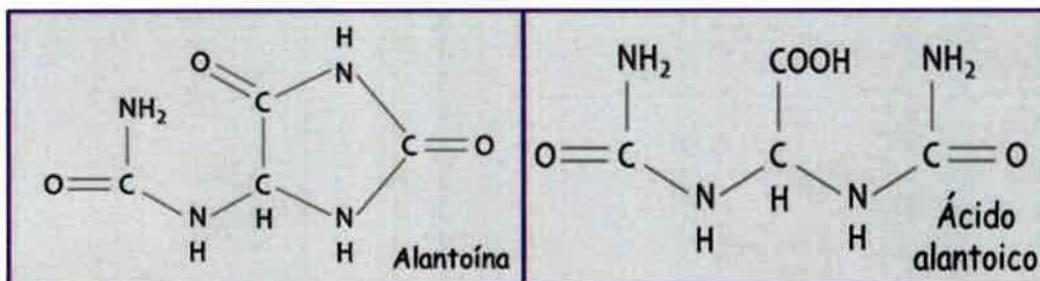


Figura 12. Fórmula estructural de los principales ureidos transportados por el xilema.

El proceso de fijación de N_2 en NH_3^+ comienza en las células infectadas por el nódulo que contiene los bacteroides (Swain y Abhijita, 2013), por acción de la nitrogenasa, el NH_3^+ generado en el interior del bacteroide se difunde a través de la membrana del mismo, al espacio peribacteroidal de carácter ácido donde es protonado a NH_4^+ para ser finalmente exportado al citosol de la célula infectada del nódulo a través de la membrana del simbiosoma (Udvardi y Poole, 2013). Una vez en el citosol de las células infectadas del nódulo, el NH_4^+ es convertido enzimáticamente a glutamina que se transforma a su vez en xantina (Werner y Witte, 2011) y finalmente por acción enzimática la xantina se convierte en ácido úrico (Yin *et al.*, 2014). Este último es transportado vía plasmodesmo al citosol de las células no infectadas para ser exportado a los peroxisomas, posiblemente a

través de estructuras similares a poros que se encuentran en la membrana externa, de estas organelas sub celulares unidas a la membrana (Kunze y Hartig, 2013; Sandalio y Romero-Puertas, 2015). En los peroxisomas, por medio de enzimas, el ácido úrico se convierte, en la (S)-alantoína estéreo específica, la que, en el retículo endotelial de la célula no infectada, por hidrólisis da ácido alantoico (Ho *et al.*, 2011). Una vez que los ureidos comienzan a acumularse en las células no infectadas del nódulo, se cargan en la red de vasos del xilema de la raíz y se transportan a los órganos aéreos principalmente, las hojas maduras bien expandidas, para alcanzar el sistema vascular, los ureidos deben moverse intracelularmente en el periciclo de la corteza, la endodermis y el parénquima interior de las raíces noduladas (Tegeder, 2014; Baral *et al.*, 2016). Además de transportar el nitrógeno fijado en los nódulos de las plantas actúan como moléculas de almacenamiento del N (Sprent, 1980; Schubert y Boland, 1990; Ohyama *et al.*, 2012).

Es importante destacar que, las leguminosas exportadoras de ureidos transportan mayoritariamente ureidos sólo cuando la planta se encuentra fijando nitrógeno simbióticamente, siendo el nitrato y los aminoácidos, principalmente asparagina, los compuestos nitrogenados fundamentales en plantas cultivadas en presencia de nitrato como fuente de nitrógeno (Quiles Luque, 2012) (Figura 13).

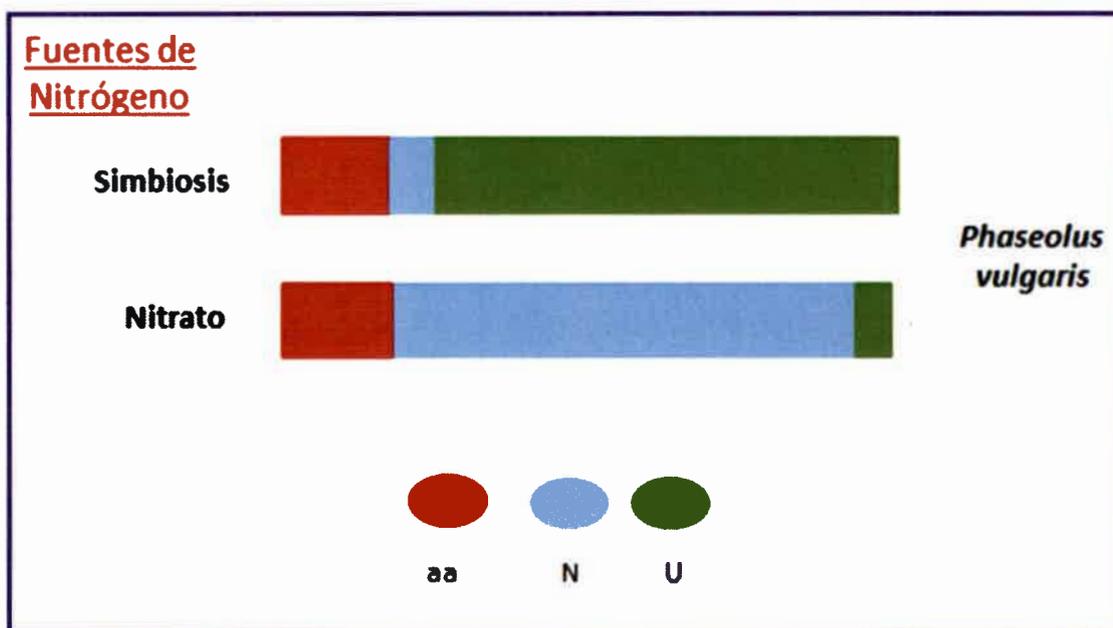


Figura 13. Composición de la fracción nitrogenada de la savia bruta en función de la fuente de nitrógeno usada por la leguminosa *Phaseolus vulgaris*. aa: aminoácidos; N: nitrato; U: ureidos. *Phaseolus vulgaris*. Fuente: Modificado de Quiles-Luque, 2012.

Herridge *et al.*, (2005) demostraron un cambio en la composición del xilema de la leguminosa exportadora de ureidos *Vigna radiata* cuando se regó con una solución de amonio o nitrato. También, en el xilema de las plantas de soja, que utilizaron el nitrato como única fuente de N, un 80-90% correspondió a nitrato y asparagina y el restante 10-20% a ureidos (Ohyama *et al.*, 2012). Mc Clure e Israel (1979) mencionaron que solamente una cantidad reducida de ureidos es sintetizada en la raíz. En las leguminosas tropicales y subtropicales no noduladas, la asimilación de N en las raíces conduce en mayor medida a la síntesis y el transporte a larga distancia de aminoácidos, sin embargo, también se produce síntesis de ureidos.

Numerosos trabajos han demostrado una correlación directa entre la cantidad de ureidos y la fijación de nitrógeno, por lo dicho anteriormente, el porcentaje de ureidos en la savia de xilema puede utilizarse como indicador de la contribución relativa de la FBN al aporte total de N de plantas y como índice de la nodulación efectiva de plantas cultivadas en el campo (Mc Clure e Israel, 1979; Ciampitti, 2016 comunicación personal). No obstante, tanto en leguminosas exportadoras de ureidos no noduladas (fertilizadas con nitrato) como en plantas no leguminosas se han observado niveles significativos de ureidos, contradiciendo la frecuente idea de que sólo en leguminosas exportadoras de ureidos cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno se encuentran concentraciones altas de ureidos (Díaz-Leal, 2012).

AMINOÁCIDOS

En las plantas, el nitrato y el amonio absorbido por las raíces se asimilan por dos vías metabólicas GS-GOGAT y GDH a aminoácidos y se incorporan como glutamina y glutamato (asimilación primaria de nitrógeno), que se utiliza para sintetizar otros aminoácidos y compuestos nitrogenados por transaminación (Rentsch *et al.*, 2007). Este proceso ocurre tanto en el tejido de la raíz como en los tallos, dependiendo del tipo de molécula de nitrógeno absorbido y el equilibrio C:N de la planta (Marschner, 1995; Kruse *et al.*, 2002).

Los compuestos nitrogenados (aminoácidos o ureidos), una vez sintetizados, se exportan desde los nódulos a través del sistema vascular de los mismos, que está conectado al sistema vascular de la raíz, para alcanzar en última instancia el tallo por la corriente de transpiración del xilema. Un proceso fundamental es la distribución selectiva de aminoácidos y ureidos entre distintas células, organelas, tejidos y órganos mediados por varios mecanismos de transporte. A lo largo de la vía de transporte a larga distancia, puede

ocurrir transferencia de aminoácidos o ureidos desde el xilema al floema para la entrega directa de N, a los órganos de destino de rápido crecimiento (Pate *et al.*, 1975; van Bel, 1990; Atkins, 2000). Esta distribución se produce debido a las altas tasas de transpiración, y de este modo, los principales productos sintetizados en raíz y nódulos alcanzan también las hojas maduras, en donde el intercambio ocurre en los vasos principales y el N reducido es importado por las células del mesófilo (Zhang *et al.*, 2010; Tegeder, 2014).

Una vez importado, los ureidos pueden ser catabolizados y el NH_4^+ liberado se utiliza para la reasimilación en aminoácidos para los procesos metabólicos de la hoja en la planta de soja, para el almacenamiento transitorio dentro de las células que rodean los vasos del mesófilo en forma de proteínas de almacenamiento (Tod *et al.*, 2006). En órganos terminales de destino, como ápices de raíz, hojas, flores, frutos y semillas, el transporte inicial de aminoácidos y ureidos y su liberación desde el floema a las células del parénquima adyacente puede ser simplástico (Tegeder *et al.*, 2013). Este autor concluye que, para lograr un mejor rendimiento de semilla y una acumulación de proteínas de almacenamiento, es necesaria la regulación simultánea de la translocación del N orgánico, entre órganos de origen-destino. La carga de compuestos en el floema y en la semilla constituye el mayor desafío a superar, frente a la optimización del rendimiento del cultivo.

Proceso de desnitrificación en el ciclo del nitrógeno

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno en la naturaleza, ya que es el único mecanismo por el cual los nitratos y nitritos pueden convertirse en nitrógeno atmosférico, retornan de nuevo a la atmósfera, cerrándose así el ciclo del nitrógeno en la biosfera.

La reducción de los óxidos de nitrógeno está acoplada a la formación de ATP, que brinda la energía necesaria para el crecimiento en ausencia de oxígeno (Simon *et al.*, 2008). La desnitrificación es una de las vías más importantes por medio de la cual se elimina o reduce el exceso de nitratos que contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos. El óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N_2O), tienen un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica ya que son gases invernadero que se liberan a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, el calentamiento global de la atmósfera y en la destrucción de la capa de ozono (Robles *et al.*, 2007). Otro papel fisiológico que se le podría atribuir a la desnitrificación en bacteroides podría ser el mecanismo de detoxificación, mediante la eliminación de compuestos, como el nitrito y el NO, de elevado poder citotóxico (Sánchez, 2009). Por lo que, es una paradoja que siendo la

desnitrificación el único proceso biológico conocido para eliminar el exceso de nitratos que contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos, sea también un mecanismo cuyos productos intermediarios tienen un impacto sobre la contaminación atmosférica (Talbi, 2011).

Este proceso se lleva a cabo generalmente en condiciones de alta humedad en el suelo, disminuyendo el contenido de oxígeno disponible en el mismo. De esta manera, algunos de los microorganismos que proliferan en este ambiente son aquellos capaces de emplear NO_3^- en vez de oxígeno en su respiración. Este tipo de transformación es una forma de respiración alternativa por la que, en condiciones limitantes de oxígeno, el nitrato, y sus óxidos de nitrógeno derivados, actúan como aceptores finales de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de nitrógeno molecular (Bedmar *et al.*, 2014) (Figura 14).

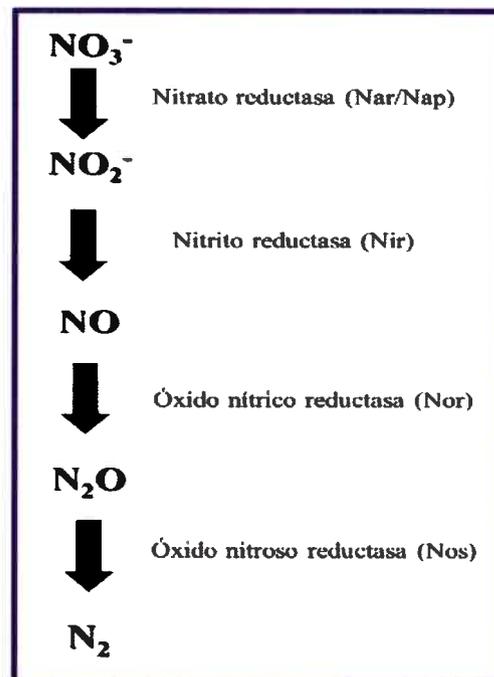


Figura 14. Proceso completo de desnitrificación. Fuente: Bedmar *et al.*, 2014.

La reducción de NO_3^- a N_2 se lleva a cabo de forma secuencial por la acción consecutiva de las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa (Cu- Nir/cd1-Nir), óxido nítrico reductasa (qNor/cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap/nar*, *nirK/nirS*, *c-nor/q-nor* y *nos*, respectivamente (Bedmar *et al.*, 2014). En general, se considera que un microorganismo es desnitrificante si es capaz de crecer microaeróbicamente con nitrato/nitrito como única fuente de energía y como fuente de N para los procesos biosintéticos (Sánchez *et al.*, 2011).

Enzimas involucradas en la desnitrificación

Nitrato reductasas

La enzima nitrato reductasa es la responsable del primer paso del proceso de la desnitrificación ya que reduce el NO_3^- a NO_2^- . Dicha reducción puede ocurrir por la utilización del nitrato como fuente de nitrógeno para el crecimiento (asimilación del nitrato); la generación de energía usando el nitrato como aceptor final de electrones (respiración del nitrato); y para disipar el exceso de poder reductor y así mantener el balance redox (desasimilación del nitrato) (Moreno-Vivián *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2010). Se han descrito tres tipos de nitrato reductasa que pueden iniciar los procesos de desnitrificación o amonificación en procariontes. Todas ellas se caracterizan por contener como cofactor bis-molibdopterina guanina dinucleótido (bis-MGD) y al menos, un clúster de 4Fe-4S.

1. **Nitrato reductasa asimilatoria (Nas)**: es la enzima responsable de la reducción del nitrato durante el proceso de amonificación y su actividad es reprimida por el amonio. Su localización es citoplasmática (Bedmar *et al.*, 2005).

2. **Nitrato reductasa de membrana (Nar)**: es la más conocida de las tres enzimas. Está involucrada en la respiración anaeróbica de nitrato y en la desnitrificación y se encuentra regulada negativamente por el oxígeno (Bedmar *et al.*, 2005).

3. **Nitrato reductasa periplásmica (Nap)**: se localiza en el periplasma y está asociado a la proteína NapC de localización transmembrana. Los genes *napABC* se agrupan con otros genes que codifican proteínas necesarias para la síntesis y actividad enzimática (Delgado y Bedmar, 2006).

El oxígeno inhibe la desnitrificación a nivel del transporte de nitrato y el sistema Nap no requiere de este paso, por lo que, algunas bacterias pueden desnitrificar aeróbicamente acoplado la Nap con NO_2^- y la enzima N-óxido reductasa, una enzima óxido reductasa capaz de ceder electrones a compuestos oxidados, permitiendo mantener un estado reducido bajo condiciones oxidantes (Berks *et al.*, 1995).

Nitrito reductasas

Las enzimas nitrito reductasas son las responsables de la reducción de NO_2^- a NO. Existen dos tipos de nitrito reductasas (Nir) en la naturaleza, la primera contiene un tetrahemo cdI en el centro activo de la enzima (cdI-NirS) y en la segunda el cobre es el que forma parte del centro activo (Cu-NirK). Aunque la reducción de NO_3^- inicia la

desnitrificación, se considera que la reducción de NO_2^- a NO es, en sentido estricto, la reacción clave que define el proceso ya que la reducción de nitrato también puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes (van Spanning *et al.*, 2007).

Óxido nítrico reductasas

Esta enzima es la responsable de la reducción del NO a N_2O . Existen tres tipos de enzimas encargadas de la reducción de NO : cNor, qNor y qCuANor (Zumft, 2005; van Spanning, 2011). El cNor es una enzima de membrana integral compuesta de dos subunidades, el heme c conformado por NorC y la subunidad NorB, que contiene hemes b y un hierro no hemo. La transferencia de electrones a cNor está mediada por el complejo citocromo bc₁ y un citocromo c o pseudoazurina soluble (van Spanning *et al.*, 2007).

Óxido nitroso reductasas

La reducción del N_2O a N_2 es el último paso de la desnitrificación e implica la formación de un triple enlace entre dos átomos de N en una reacción que cataliza la enzima óxido nitroso reductasa (Nos). Dicha enzima es un dímero de localización periplasmática que contiene Cu (Zumft y Kroneck, 2007).

Rol de la desnitrificación en los nódulos de las leguminosas

El proceso de desnitrificación podría tener una función dual ya que podría remover los nitritos tóxicos o bien suministrar ATP a la nitrogenasa en los nódulos de las leguminosas. Esta habilidad permite a los bacteroides sobrevivir durante período de anoxia. Una disminución de la concentración de oxígeno en los bacteroides podría deberse a estrés abiótico (encharcamiento, sequía, salinidad), lo que daría lugar a la disminución de la difusión de oxígeno hacia el interior del nódulo y, consecuentemente, en la capacidad de producción de ATP (O'Hara y Daniel, 1985). Otro papel fisiológico que se le podía atribuir a la desnitrificación en bacteroides podría ser el de funcionar como un mecanismo de detoxificación eliminando compuestos, como el nitrito y el óxido nítrico, de elevado poder citotóxico. Estos compuestos, que pueden producirse por la bacteria como intermediarios de la reducción de nitrato en los bacteroides, o por la planta como producto de la nitrato reductasa o óxido nítrico sintasa, puede dañar a la nitrogenasa o unirse a la leghemoglobina y formar complejos nitrosil-leghemoglobina afectando de esta manera a la FBN (Sánchez *et al.*, 2010). Además, el óxido nitroso es un inhibidor competitivo de la nitrogenasa, ya que es el sustrato de la misma que puede reducirlo a N_2 . La fijación de nitrógeno y la

desnitrificación dos procesos que son antagonistas en el ciclo del N pueden actuar en forma complementaria y permitirían la sobrevivencia de la bacteria en el interior de los nódulos de las raíces (Chamber-Pérez *et al.*, 1997) (Figura 15).

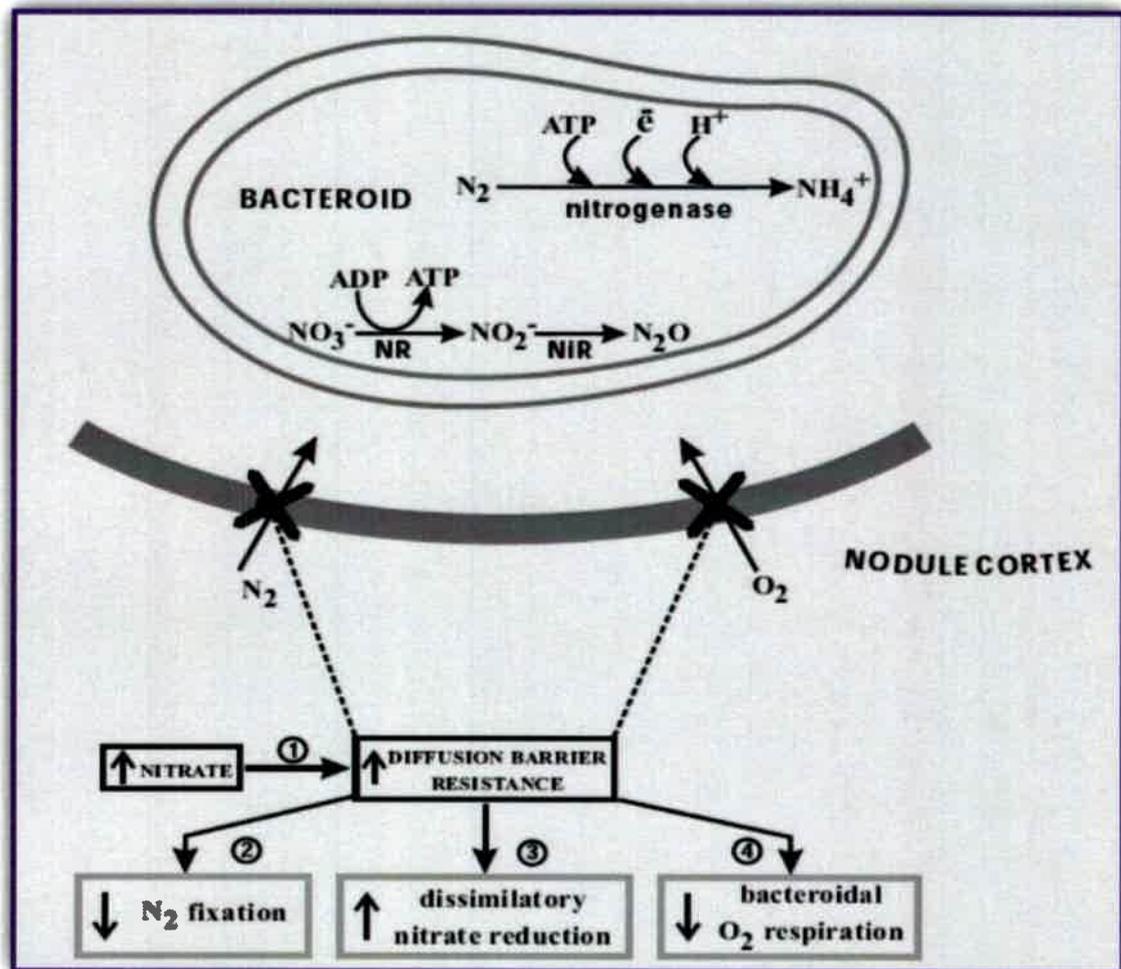


Figura 15. Efecto del nitrato en la difusión de gases al nódulo. Fijación de nitrógeno y reducción del nitrato en bacteroide. 1: el nitrato directa o indirectamente causa un incremento en la resistencia de la barrera de difusión, 2: cuando hay nitrato disminuye la FBN, 3: en condiciones de baja tensión de oxígeno ocurre la reducción de nitrato, 4: cuando hay nitrato disminuye la respiración aerobia en el bacteroide. Fuente: Lucinski *et al.*, 2002.

Objetivos específicos

- ✿ Determinar si el contenido de los compuestos nitrogenados (nitrato, ureidos y aminoácidos) se encuentra alterado en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja por la adición de nitrato.

- ✿ Caracterizar el rol de la enzima nitrato reductasa desnitrificante en los bacteroides obtenidos de los nódulos de soja en respuesta al nitrato.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Las determinaciones de los compuestos del nitrógeno se realizaron a partir del primer entrenudo de las plantas de soja.

Determinaciones Químicas

Contenido de nitrato

El contenido de nitrato se determinó según el método del ácido salicílico (Cataldo *et al.*, 1975). 100 mg de materia seca del primer entrenudo de soja se disolvió en 10 ml de agua destilada deionizada y 0,5 g de carbón activado. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó 10 min en reposo para su posterior filtración en papel de filtro Whatman N° 1. A partir de 0,2 ml del extracto incoloro se adicionaron 0,8 ml de Ácido Salicílico/Ácido Sulfúrico (50 g l⁻¹) y 19 ml de Hidróxido de Sodio (2N) y finalmente se midió la absorbancia a 410 nm.

Preparación de reactivos

Ácido salicílico/Ácido Sulfúrico (50 g l⁻¹): 50 g de ácido salicílico se disolvió en ácido sulfúrico concentrado completando a 1 litro de solución.

Hidróxido de Sodio (2N): 80 g de NaOH se disolvió en agua bidestilada completando a 1 litro.

Contenido de ureidos

El contenido de ureidos se determinó según el método propuesto por Vogels y Van Der Drift (1970) que consiste en la conversión de la alantoína y ácido alantoico en glioxilato por una hidrólisis alcalina y ácida, el glioxilato es luego convertido a una fenilhidrazona, que es después fuertemente oxidada con ácido y ferricianida para producir un formazán intensamente coloreado.

A partir de 150 mg de material vegetal previamente secado a 60 °C se agregaron 10 ml de H₂O destilada, se calentó a 100 °C por 20 min y se filtró con papel de filtro Whatman N° 40. Del filtrado se tomaron 0,5 ml se agregó 1 ml de H₂O destilada y 0,5 ml de NaOH 0,5 N, se calentó a 100 °C por 8 min y se mantuvo por 15 a 20 min a temperatura ambiente. Después se adicionó 0,5 ml de HCl 0,65 N y se calentó a 100 °C por 4 min. A continuación se agregó 0,5 ml buffer fosfato de sodio (0,4 M, pH 7.0) y 0,5 de fenilhidrazina-HCl 0,33% y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente, las

muestras se enfriaron en baño de hielo a 0 °C por 3 min adicionando 0,5 ml de HCl concentrado y 0,5 ml de ferricianida de potasio 1,67 % a intervalos de 1 min. A los 15 minutos exactos, las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 530 nm.

Contenido de aminoácidos

El contenido de aminoácidos se determinó usando el método de la ninhidrina descrito por Rosen (1957). La materia fresca del primer entrenado de soja se maceró en un mortero con una solución de etanol-agua al 80% en una proporción de 1:10 y luego se centrifugaron a 1000 rev.min⁻¹ durante 3 min para obtener los sobrenadantes. Los tubos de reacción conteniendo 0,5 ml de sobrenadante, 0,5 ml buffer acetato de sodio y 0,5 ml 2% ninhidrina. Los mismos se llevaron a baño María (100°C) durante 10 min y después de enfriar en hielo, se midió la absorbancia a 570 nm. Se utilizó como testigo L-leucina 0,1 mg ml⁻¹.

Preparación de reactivos

Buffer acetato: 27 g de acetato de sodio se disolvieron en 20 ml agua deionizada y se adicionó 5 ml ácido acético para completar a un volumen final, más 50 ml agua destilada.

Ninhidrina: se disolvieron 2 g de ninhidrina en 100 ml de agua destilada deionizada.

Buffer acetato de sodio 4 M (pH 5,5):

Acetato de sodio	27 g
Agua	20 ml
Ácido acético	5 ml
Agua destilada c.s.p	50 ml

Determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa

La actividad específica de la enzima nitrato reductasa (NR) [EC 1.7.99.4] de los bacteroides se determinó *in vitro* mediante la formación de nitrito con metil viológeno como dador de electrones (Becana *et al.*, 1985).

Aislamiento de bacteroides: los nódulos frescos de los diferentes tratamientos se maceraron en una relación 1:4 usando buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) suplementado con 250 mM de manitol (1 g de nódulo en 4 ml de buffer). El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 250 x g a 4 °C durante 5 minutos para eliminar

los restos de nódulos. El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar a 12000 x g (4 °C durante 10 min) para sedimentar los bacteroides, se lavaron dos veces y se resuspendieron en el mismo buffer (Mesa *et al.*, 2004).

Actividad Específica Nitrato Reductasa: para la cuantificación de la enzima se utilizaron: 740 µl de buffer tris/HCl (50 mM, pH 7,5), 100 µl de metil viológeno 10 mM y 50 µl del homogenato (0,3-0,5 mg proteína). La reacción se inició con la adición de 50 µl de ditionito de sodio preparado en el día (8 mg ml⁻¹ buffer Tris/HCl), posteriormente se incubó a 30 °C durante 15 minutos, y luego la mezcla se agitó vigorosamente hasta la desaparición del color azul de la solución. Por último, se adicionó 1 ml de sulfanilamida, 1 ml de N-NEDA y se midió la absorbancia a 540 nm a 25 °C.

La concentración de nitrito se determinó utilizando como testigo una solución de 10 nmoles de nitrito de potasio y la actividad específica de la enzima se expresa como nmol NO₂⁻ /min /mg proteínas.

Preparación de reactivos

Reactivo de Sulfanilamida al 1% (P/V) en 3 N de HCl: 1 g del reactivo se disolvió en 20 ml de HCl y se diluyó hasta 100 ml con agua bidestilada.

Reactivo de N-1-naftil-etilendiamida diclorhidrato (N-NEDA) al 0,02% (P/V): 0,02 g del reactivo se disolvió hasta 100 ml con agua bidestilada.

Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976) utilizando como estándar albúmina bovina (1 mg ml⁻¹).

Preparación del Reactivo de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G	100 mg
Etanol	50 ml
Ácido fosfórico concentrado	100 ml
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Una vez preparada se dejó a temperatura ambiente 24 horas. Luego se filtró con un papel de filtro y se guardó en frasco color caramelo.

Resultados y discusión

Efecto del nitrato sobre los compuestos nitrogenados de la planta de soja

En la figura 16 se muestra el contenido de nitrato extraído del primer entrenudo de las plantas. Las plantas inoculadas con las cepas Per 3.64 y Per 1.12 mostraron un mayor contenido de nitrato con respecto al valor encontrado en plantas de soja sin inocular e inoculadas con las otras cepas (USDA110, USDA110/CC41 y Per 3.61) en ausencia de nitrato. Las plantas controles aumentaron su contenido en presencia de 5 mM de nitrato por ser la única fuente de nitrógeno disponible para su crecimiento. Las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.64 mostraron el mayor contenido de nitrato superando al resto de los tratamientos con la adición de 5 mM de nitrato.

Los resultados obtenidos en la simbiosis soja-*Bradyrhizobium japonicum* Per 3.64 coincide con lo informado por Mc Clure e Israel, (1979), los cuales hallaron un aumento abrupto en el contenido de nitrato en plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA110 y fertilizadas con 20 mM KNO₃. Una explicación a estos resultados podría deberse a que el nitrógeno fue transportado a los tallos como nitrato, traslocado hacia el sistema radicular vía floema y redepositado en el xilema de las raíces. También, Pliego *et al.*, (2003) obtuvieron similares resultados en plantas de poroto inoculadas con la cepa *Rhizobium tropici* (CIAT 899) en diferentes órganos (raíz, hoja y nódulos) con la adición de 5 mM de nitrato, sugiriendo una complementariedad de las fuentes de N. Asimismo, Leidi y Rodríguez-Navarro, (2000) observaron un aumento del contenido de nitrato en plantas de poroto con la adición de 10 mM de nitrato.

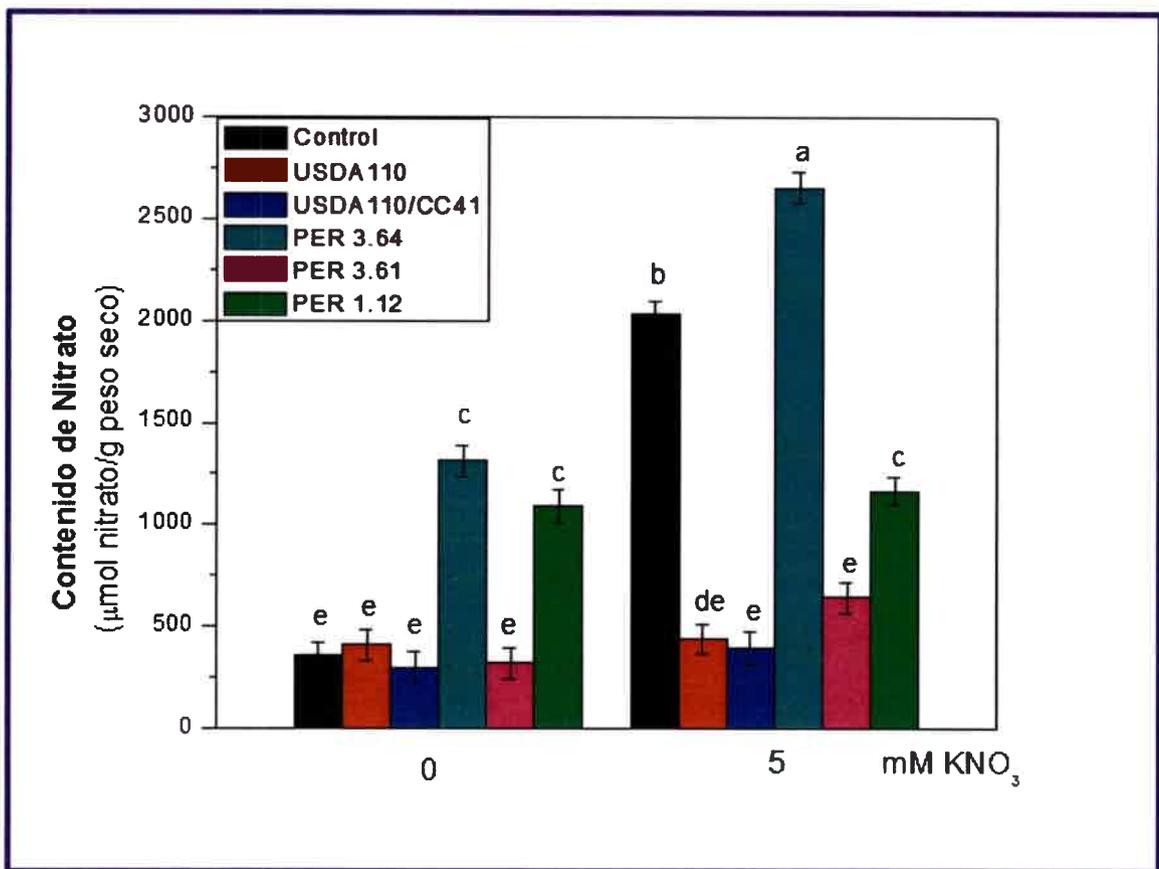


Figura 16. Contenido de nitrato en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja. Los datos representan la media \pm error estándar (n=10). Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas (p<0,05) según prueba Duncan.

La evaluación de la FBN en la interacción rizobio-soja, por la determinación del contenido de ureidos resulta ser un método específico para valorar la proporción de N transportado en los tallos (Schweiger, 2012; Ciampitti, 2016 comunicación personal). La figura 17 muestra el contenido de ureidos en tallo de soja observándose que las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* presentaron altos valores de ureidos en comparación a las plantas sin inocular y en ausencia de nitrato. En presencia de 5 mM de nitrato, el contenido de ureidos no mostró diferencias entre las plantas de soja sin inocular e inoculadas con las diferentes cepas. Aunque, es de notar que en el caso de la cepa Per 1.12 se observó un menor contenido de ureidos comparado con el valor hallado en plantas inoculadas con esta cepa y sin la adición de nitrato.

El tratamiento control fertilizado presentó valores de ureidos que superaron alrededor de 5 veces el contenido del mismo en el tratamiento control. Esta particularidad también se encontró en leguminosas exportadoras de ureidos (*Phaseolus vulgaris*)

fertilizadas con nitrato, contradiciendo así la idea de que sólo las leguminosas exportadoras de ureidos cuando se cultivan en condiciones de fijación de nitrógeno presentan altas concentraciones de ureidos (Díaz-Leal, 2012).

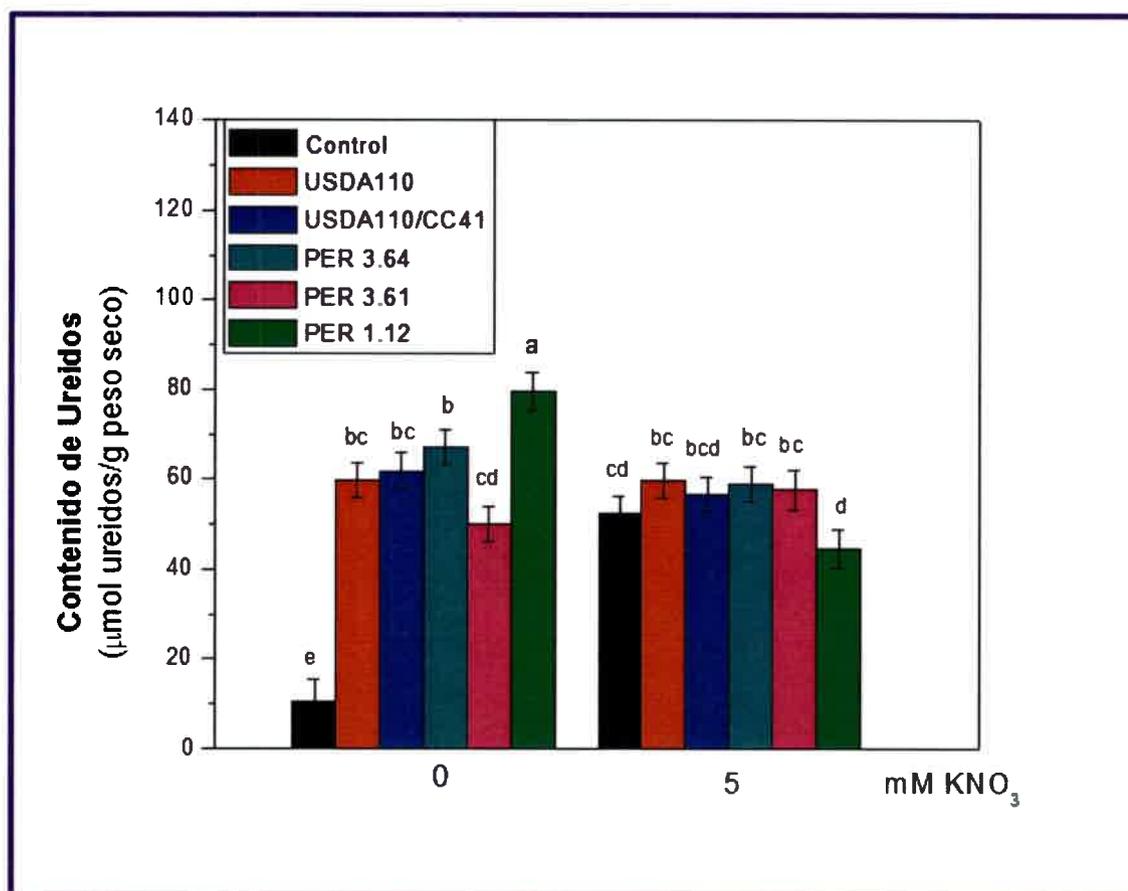


Figura 17. Contenido de ureidos en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja. Los datos representan la media \pm error estándar (n=10). Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba Duncan.

Los resultados obtenidos en el contenido de ureidos coinciden con los hallados por Camacho *et al.*, (2003) quienes informaron que la cepa salvaje *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y las cepas mutantes defectivas en nitrato reductasa (entre ellas la USDA110/CC41) no presentaron variaciones en el contenido de N total y ureidos en presencia de nitrato. Asimismo, las plantas de soja inoculadas con las cepas nativas desnitrificantes Per 3.64 y 3.61 exceptuando a la cepa Per 1.12 demostraron no ser afectadas en su contenido de ureidos con la adición del nitrato.

Schuller *et al.*, (1986) informaron que el mecanismo primario por el cual el tratamiento de nitrato produce una severa inhibición en la fijación de nitrógeno en las

plantas de soja permanece desconocido, sin embargo, la inhibición *in vitro* de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno fijado y la biosíntesis de ureidos, serían respuestas secundarias al tratamiento de nitrato. Contrario a los resultados informados por estos autores, en este trabajo de tesis la adición de 5 mM de nitrato no inhibió ni la fijación de nitrógeno (estimado por el contenido de N total y %NDA) ni la concentración de ureidos en las plantas de soja inoculadas con las diferentes cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum*.

En la figura 18 se presentan los resultados de la determinación del contenido de aminoácidos extraídos del primer entrenudo de las plantas de soja. Las plantas inoculadas con la cepa *B. japonicum* Per 3.61 mostró un alto contenido de aminoácidos con respecto a los valores encontrados en plantas controles e inoculadas con las cepas (USDA110, USDA110/CC41, Per 3.64, Per 1.12) en ausencia de nitrato. La adición de 5 mM de nitrato en la interacción *Bradyrhizobium japonicum*-soja, no mostró cambios en el contenido de aminoácidos en los diferentes tratamientos. Estos resultados coinciden con lo informado por Leidi y Rodríguez-Navarro (2000) quienes indicaron que, en plantas de *Phaseolus*, la adición de 10 mM de nitrato no produjo cambios en el contenido de aminoácidos.

El contenido de aminoácidos en plantas de soja inoculadas con Per 3.61, sin adición de nitrato, duplicó al contenido de los mismos en el tratamiento control (sin inocular y nitrato), lo cual indicaría la contribución realizada por la FBN. En contraste a estos resultados, Mc Clure e Israel (1979) encontraron una disminución en el contenido de aminoácidos del 20% y del 36% entre plantas de soja no inoculadas e inoculadas cuando se adicionó 20 mM de nitrato (4 veces superior al usado en este trabajo de tesis).

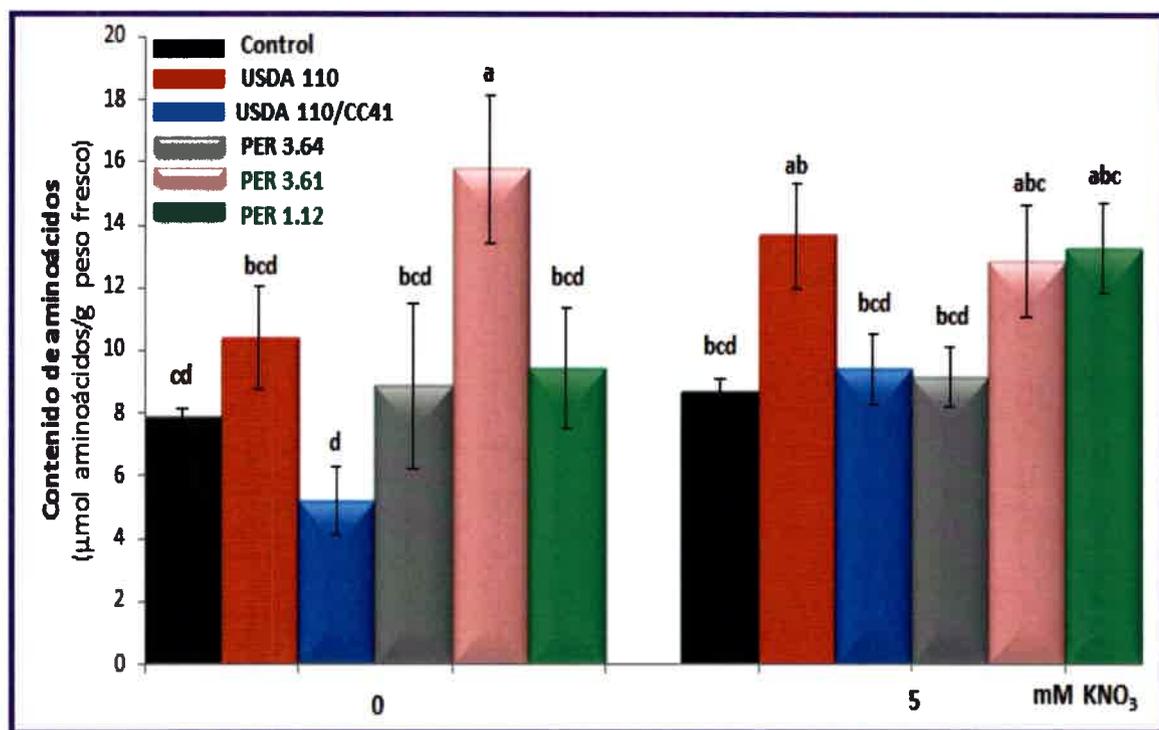


Figura 18. Contenido de aminoácidos en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja. Los datos representan la media \pm error estándar (n=10). Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba Duncan.

Actividad nitrato reductasa bacteroidal

Lucinski *et al.*, (2002) revelaron que las asociaciones simbióticas de leguminosas con cepas de rizobios caracterizadas por poseer una elevada actividad nitrato reductasa (NR) son menos susceptibles a la inhibición por nitrato. Cuando la función de la NR bacteroidal en los nódulos sea complementaria con la función de la enzima nitrogenasa, la primera dependerá de la capacidad de los mismos de reducir el NO_3^- por la vía desnitrificante (Meakin *et al.*, 2007). Aunque varias especies de leguminosas reducen simultáneamente nitrato y N atmosférico en nódulos, es poco conocido el mecanismo molecular y el papel fisiológico de la reducción del nitrato en la nutrición de las plantas (Vessey y Waterer, 1992; Kanayama *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la combinación de estas dos vías de reducción de nitrógeno podrían ser un importante factor en el proceso evolutivo de las leguminosas sobre la optimización de la utilización del nitrógeno disponible (Caba *et al.*, 1990).

Con el propósito de seleccionar las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* que posean elevada actividad NR para los ensayos a campo, se procedió a aislar los bacteroides de los

nódulos de soja. Los resultados obtenidos (Tabla 7) demostraron que en los bacteroides de los nódulos de plantas de soja inoculadas con la cepa *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61, la actividad específica de NR se mantuvo elevada en presencia de nitrato. Asimismo, las actividades específicas NR de las cepas *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y Per 1.12 no mostraron diferencias significativas en ambas condiciones ensayadas. En cambio, en la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.64 se observó una disminución de la actividad específica NR en presencia de 5 mM de nitrato.

Tabla 7. Actividad específica de la enzima nitrato reductasa en bacteroides de nódulos de soja.

Concentración de KNO ₃ (mM)	Cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Actividad específica de nitrato reductasa (nmoles nitrito/min. /mg proteína)
0	USDA110	1,65±0,86 ab
	PER 3.61	2,20±0,90 a
	PER 3.64	1,42±0,67 ab
	PER 1.12	0,79±0,32 bc
5	USDA 110	1,63±0,54 ab
	PER 3.61	1,97±0,28 a
	PER 3.64	0,35±0,06 c
	PER 1.12	0,76±0,02 bc

Los datos representan la media ± error estándar (n=5). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan (p<0,05).

En relación a los resultados sobre la actividad NR bacteroidal en respuesta a nitrato en nódulos de leguminosas, obtenidos en esta tesis doctoral, se puede concluir que la adición de nitrato no afectó la actividad específica de la enzima nitrato reductasa bacteroidal de las cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, Per 3.61

y Per 1.12, a excepción de Per 3.64, permitiendo así la sobrevivencia de la bacteria en el interior de los nódulos y el proceso de fijación de nitrógeno.

En la bibliografía existe controversia si la adición de nitrato puede o no estimular la actividad de la enzima. Así, Kanayama *et al.*, (1999) encontraron un incremento de la actividad de NR bacteroidal en nódulos de alfalfa en presencia de nitrato, mientras que no fue claro si la enzima localizada en el bacteroide fue inducida por nitrato (Becana *et al.*, 1988). Por el contrario, Arrese-Igor *et al.*, (1997) observaron que la actividad de la nitrato reductasa de los bacteroides fueron afectadas de diferentes formas a los 8 días del suministro de 10 mM de nitrato.

Considerando que la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 presentó una elevada actividad específica de la enzima nitrato reductasa, si bien no fue estadísticamente significativo, se seleccionó la misma junto con la cepa de referencia *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, para realizar los ensayos a campo.

Capítulo 4: Ensayos a campo de la asociación simbiótica entre soja y cepas de bradirrizobios, seleccionadas por su alta actividad nitrato reductasa.

Introducción

Fertilidad del suelo

La fertilidad del suelo es generalmente considerada a partir del abastecimiento de nutrientes para los cultivos, puede considerarse en un aspecto parcial como su capacidad de aportar nutrientes, sin embargo, los conceptos actuales de fertilidad trascienden esa definición “fertilidad química” e incluyen a la “fertilidad física” y la “fertilidad biológica”. Todas estas visiones de fertilidad edáfica convergen en la materia orgánica del suelo (MOS) cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas la identifican como un indicador global de la calidad del suelo (Larson y Pierce, 1994). La fertilidad del suelo es vital para su productividad y capacidad para generar los alimentos y fibras, que demanda la población mundial, siendo necesario por lo tanto establecer los factores que limitan o favorecen la producción incluyendo como premisa básica, la nutrición de los cultivos y las relaciones suelo-planta (Picone, 2014). A diferencia del agua y del aire, el suelo es un recurso natural sin estándares de calidad definidos, debido a su variabilidad, por lo tanto, es casi imposible establecer una medida física, química o biológica que pueda reflejar adecuadamente la calidad; sin tomar en consideración otros factores que afectan la formación y funcionamiento del suelo (Bandinck y Dick, 1999).

La intensificación y expansión de la agricultura en los últimos 15 años y las perspectivas mundiales de creciente demanda de alimentos, forrajes, fibras, y en particular “biocombustibles”, plantean interrogantes significativos en lo que hace a la sustentabilidad de los sistemas de producción y de los suelos en particular. Además, el riego y la fertilización, cuando no son usados racionalmente, son factores con efectos negativos a mediano y largo plazo, para los cultivos y para el medioambiente, con la consecuente reducción de la productividad y modificación del sistema (por ejemplo, salinización de suelos, pérdida de biodiversidad edáfica). Es importante aclarar que el enorme incremento en la producción de alimentos mundial, sin embargo, fue posible por la disponibilidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Quiñones *et al.*, 2011).

En este marco, el rol de la fertilidad y su relación con la biología del suelo es de vital importancia para definir sistemas de producción agronómica, económica y ambientalmente sustentable (García, 2007). Uno de los objetivos más importantes en la investigación agraria a nivel mundial es la utilización de mecanismos alternativos de reposición de nitrógeno, siendo el sistema más estudiado la interacción simbiótica rizobio-leguminosa (Quiñones *et al.*, 2011).

La eficiencia del proceso de FBN depende de diversos factores que condicionan la adecuada formación de nódulos con cepas de rizobios seleccionadas. Entre ellos, la temperatura y la humedad son factores importantes que afectan el crecimiento del rizobio, su supervivencia en el suelo y la simbiosis (Graham, 1992). También, la concentración de nitratos en el suelo constituye un factor que interfiere en la normal nodulación de las leguminosas (Mc Clure y Israel, 1979) y sobre la FBN (Miransari, 2016).

La evaluación de la FBN por métodos cuantitativos es uno de los aspectos más importantes, a tener en cuenta, en la selección de cepas de rizobios (Bergersen, 1980). Entre ellos el **método de diferencia de N**, entre una planta fijadora y una no fijadora en el cual se asume que la planta no fijadora absorbe la misma cantidad de N del suelo que la planta fijadora. El **balance de N** en el sistema suelo-planta, que mide las entradas y salidas de N en el sistema, incluyendo la FBN (Barea, 1991); el **contenido relativo de ureidos** de la parte aérea de las plantas, basado en que leguminosas de clima tropical y subtropical transportan por el xilema, ácido alantoico y alantofina (ureidos) como principal producto de la FBN que se acumulan en la planta. Estos compuestos se determinan por un método colorimétrico (Herridge y Peoples, 1990; Barea, 1991). Asimismo, se usan las determinaciones **isotópicas de ^{15}N** que dan una estimación directa de la FBN: distinguen el N del suelo, fertilizante y de la atmósfera. El de abundancia natural en ^{15}N (AN) se basa en la abundancia de los isótopos ^{15}N y ^{14}N en la atmósfera, cuyos valores son 0,336% y 99,664%, respectivamente (Hardarson, 1990). Éste determina la diferencia en ^{15}N entre plantas fijadoras de N_2 y no fijadoras (controles), cuantificando el N_2 fijado por el cultivo fijador (Unkovich *et al.*, 2008).

Importancia del cultivo de soja en Argentina

La soja se encuentra entre los cultivos agrícolas más importantes del mundo, se están realizando investigaciones para encontrar detalles relacionados con la producción de soja en diferentes condiciones, incluyendo el estrés. En la actualidad, es un cultivo de gran importancia por su alto contenido proteico y subproductos industriales y es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo. Los países de mayor producción: Estados Unidos, Brasil, Argentina y China, siendo este último el principal consumidor a nivel mundial (Pagano y Miransari, 2016).

Los primeros registros de siembra de soja en nuestro país datan de 1962, pero fue en los años '70 cuando la producción nacional aumentó notoriamente, superando los 2 millones de hectáreas (ha) sembradas a finales de la década, con una producción de 3,5

millones de toneladas (Tn). A principios del año 2000, la siembra alcanzaba los 9 millones de ha, con una producción de 20,2 millones de Tn. Finalmente, en las últimas campañas de la primera década del siglo actual, la ocupación sembrada por dicho cultivo era de 18,3 millones de ha, con producción de 52,6 millones de Tn (Domingo-Yagües *et al.*, 2012).

En la actualidad, de las leguminosas cultivadas en la Argentina, la soja ocupa la mayor superficie cultivada (20,2 millones de hectáreas) siendo una de las principales fuentes de ingreso de dinero en los últimos años, produjo 56,9 millones de toneladas de grano en la campaña 2014-2015 (Bolsa de Cereales de Rosario, 2015). Dado que la soja tiene una gran demanda de N (requiere 80 kg N ha⁻¹ para producir 1 Tn de grano) y casi su totalidad se exporta, por lo que, si la fijación de N₂ no es eficiente, junto con ese grano estaremos exportando una parte importante de la fertilidad nitrogenada de nuestros suelos (Racca y Collino, 2005; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011). Por ejemplo, con un rendimiento de 2500 kg por hectárea, se estarían extrayendo del suelo entre 54 y 61 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Lodeiro, 2015). Esto sucede en todas las zonas donde se produce soja en el país, independientemente de las características edafoclimáticas, del manejo y de la conservación del suelo, lo cual se convierte en un problema de la competencia para la nodulación (Piccinetti *et al.*, 2013).

La FBN contribuye con aportes de N entre el 30% y el 94% de sus requerimientos (Hungria y Campo, 2005), ya que es muy bajo el consumo de fertilizantes químicos nitrogenados. Los cálculos que asignan un valor equivalente en fertilizantes a las producciones nacionales de Argentina, Brasil y el resto del MERCOSUR, indican que se requerirían 280 millones de dólares para suplir las cantidades adicionales de N fijado (Hungria *et al.*, 2008). En la Argentina, desde su inició el cultivo de soja se ha inoculado debido a la inexistencia o escasa presencia de rizobios específicos en los suelos (Piccinetti *et al.*, 2013). Ensayos experimentales empleando inoculantes de excelente calidad mostraron que el uso de cepas rizobianas potencian el incremento de los rendimientos, incluso aún en ambientes con monocultivos de soja (Peticari *et al.*, 2003; Covelli, 2013).

Las cepas naturalizadas son más competitivas y menos efectivas que las cepas introducidas. Por ello, se recomienda inocular los cultivos sembrados en lotes con historia sojera, aunque ya tienen alto número de rizobios naturalizados (Mumns, 1987). Sin embargo, no se puede generalizar el concepto de que todas las cepas naturalizadas en el suelo son ineficientes o han perdido atributos asociados a la fijación de nitrógeno (González, 2002). Los aportes de la FBN están entre 50 y 80% de los requerimientos de N del cultivo de soja, según el sistema de producción y sin que haya limitantes ambientales

para su desarrollo (Salvagiotti *et al.*, 2008). Collino *et al.*, (2007) informaron que el N aportado a través de la FBN tiene valores entre 26 y 71%, dicha variación está determinada por el contenido de N mineral y las condiciones hídricas. En la Argentina, la soja se cultiva en secano, lo cual afecta al proceso de FBN que es altamente sensible a la disminución de la condición hídrica del cultivo (Serraj *et al.*, 1999).

Perticari (2004) utilizando cepas rizobianas eficientes y métodos de inoculación apropiados, encontró un aumento en el rendimiento promedio de 265 kg ha⁻¹ en campos con historia previa de soja, es decir, con poblaciones de rizobios naturalizadas. En Brasil, Hungria *et al.*, (2005) indicaron los beneficios económicos y ambientales resultantes de la sustitución del fertilizante nitrogenado por la inoculación, incluso en suelos con altas poblaciones de bradirrizobios.

La fertilización con nitrógeno e inoculación es un tópico controversial, ya que, si bien está probado que existen evidencias objetivas de respuestas al agregado de N, es difícil aceptar la práctica como tal (Melgar, 2009). Además, no necesariamente el balance de N en el suelo es positivo, es más, se argumenta que en general es negativo a nulo (Gutiérrez-Boem y Salvagiotti, 2014). La planta utiliza nitrógeno del suelo mientras se genera el sistema nodular, si hay mucho nitrógeno en el ambiente de la raíz, el número de nódulos formados será menor (Miransari, 2016). Pero, a medida que el nitrógeno proveniente del suelo o del fertilizante aumenta, el nitrógeno derivado de la fijación biológica y la nodulación disminuyen. Así, el aporte global por FBN para la soja es menor en suelos bien provistos de N que en aquéllos en que el nutriente es deficitario (Pietrarelli *et al.*, 2008). Así, se ha encontrado una disminución del peso de los nódulos por planta de aproximadamente 90 mg de materia seca (MS) por cada ppm de N-NO₃⁻ del suelo (Cicore *et al.*, 2004).

La base fundamental del manejo del N en el cultivo de soja es la optimización del proceso de fijación biológica. El manejo del cultivo debe estar dirigido a mejorar el aporte de esta fuente de N, principalmente a través de la inoculación con cepas de alta efectividad y utilizando productos que tengan calidad en cuanto al número de bacterias y las condiciones de conservación (Salvagiotti *et al.*, 2009).

Objetivos específicos

- ✿ Analizar e interpretar las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo, así como las condiciones climáticas para el desarrollo del cultivo de soja inoculado con cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, que presentan una elevada actividad nitrato reductasa, en ensayos a campo.

- ✿ Estimar la contribución relativa del nitrógeno del suelo y el proveniente de la fijación biológica en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja.

- ✿ Evaluar el impacto de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* sobre el rendimiento del cultivo de soja durante dos campañas consecutivas.

Materiales y métodos

Características del sitio experimental

Los estudios se realizaron en el campo experimental (CAMDOCEX) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria ubicado en la Universidad Nacional de Río Cuarto (33° 06' 23.46" de latitud sur y 64° 17' 54" de longitud oeste) en dos campañas consecutivas (2014-2015 y 2015-2016). El suelo es clasificado como Hapludol típico (materia orgánica 2,3%; pH 6,8; arcilla 14,17%; limo 41,97% y arena 43,9%) (INTA, 2006), presenta relieve normal, es profundo, bien drenado, desarrollado a partir de material loésico de textura franca arenosa muy fina, con baja diferenciación horizontal y características de buen suelo agrícola (Uberto, 2008).

El clima de la región de Río Cuarto es templado subhúmedo, con un régimen de precipitaciones de tipo monzónico (80% de las lluvias se concentran en el semestre más cálido, octubre a marzo) con una precipitación media anual de 801 mm. Las fechas medias de primera y última heladas meteorológicas (temperaturas iguales o menores a 0°C registradas en la casilla meteorológica a 1,5m de altura) para el periodo 1974-1993 corresponden al 25 de mayo ($\pm 14,3$ días) y 12 de septiembre ($\pm 20,3$ días), respectivamente. Para ese mismo período, las fechas extremas de primera y última helada fueron el 29 de abril y el 4 de noviembre, respectivamente. El periodo medio libre de heladas meteorológicas resultante es de 255 días. Durante ese lapso de tiempo las temperaturas máximas variaron de 22,1 a 29,1 °C (media= 26,7°C) y las mínimas de 9,5 a 17,1°C (media= 14,5°C), con una temperatura media anual de 16,4°C (Seiler *et al.*, 1995).

Análisis de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo

Previo a la siembra del cultivo se aplicó glifosato, en una formulación estándar líquida soluble de la sal isopropilamina a una concentración del 48% (1200 g i.a. ha⁻¹), en el área experimental como un barbecho químico para el control de malezas. Además, se tomaron submuestras de suelo de los primeros 20 cm de profundidad utilizando transectas para analizar las propiedades físico-químicas del suelo midiendo las siguientes variables:

- pH (1:2,5 suelo/agua) (Mc Lean, 1982)
- Materia orgánica (Bremmer y Mulvaney, 1982)
- Calcio intercambiable (Jackson, 1984)
- Fósforo (Bray y Kurtz, 1945)
- N-NO₃⁻ por el método de la reducción de cadmio (Lambert y Dubois, 1971)

-Complejo de Intercambio Catiónico (CIC) (Thomas, 1982; Page, 1982; Rhoades, 1982)

También, previo a la siembra, se determinó el número de rizobios naturalizados por gramo de suelo mediante la técnica del Número Más Probable (Somasegaran y Hoben, 1984). Para el recuento de rizobios en plantas estériles por el método del número más probable (NMP) se utilizó la siguiente fórmula:

$$NMP = \frac{m \times d}{v \times n}$$

Donde:

m: número más probable (por ml) en la primera dilución considerada

d: dilución de la primera dilución considerada

v: volumen inoculado (2 ml)

n: peso del suelo (10 g)

Posterior a las cosechas del cultivo se tomaron submuestras de suelo en dos estratos superiores del perfil del suelo (0-20 y 20-40 cm) para analizar contenido de N-NO₃⁻. La metodología utilizada para medir la densidad aparente (DAP), dato necesario para expresar los resultados en kg ha⁻¹, fue la del método del cilindro (Blake y Hartge, 1986).

Diseño experimental de los ensayos a campo

Para ello, se utilizó el diseño de bloques al azar con tres repeticiones por cada tratamiento. Los tratamientos en las campañas (2014-2015) y (2015-2016) fueron los siguientes:

1-Control: sin inocular y fertilizar

2-Fertilizado: sin inocular y con la adición de 180 kg ha⁻¹ de urea a la siembra (46% de nitrógeno)

3-Inoculado con cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

4-Inoculado con cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61

Con el propósito de evaluar, a campo, el efecto conjunto del fertilizante (urea) con cada una de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y Per 3.61, en la campaña

(2015-2016) además de los tratamientos anteriormente descritos se agregaron los siguientes:

5-Inoculado con cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 + Fertilizado

6-Inoculado con cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 + Fertilizado

Para la formulación del inoculante, se usaron los cultivos bacterianos: *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y Per 3.61 en medio YEM con un recuento igual o superior a 1×10^9 UFC ml⁻¹. Los mismos se trasvasaron a una vejiga estéril de 250 ml adicionando goma arábica (0,6 g en 100 ml de agua estéril) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. La inoculación de las semillas de soja se realizó al momento de la siembra, aplicando la suspensión de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* para alcanzar una densidad estimada de 10^5 células por semilla.

El tamaño de las parcelas fue de 15 m de largo y 9 surcos de ancho distanciados a 0,35 m, con una densidad de siembra de 15 semillas por metro lineal de surco. El sistema de labranza utilizado fue de siembra directa.

Fecha de siembra: se realizó el 13 de noviembre de 2014 para la primera campaña de soja y el 2 de diciembre de 2015 para la segunda campaña.

Toma de muestras: los muestreos se realizaron en las etapas fenológicas R2, R6 y R8. En las etapas fenológicas R2 y R6 se tomaron muestras de los tres bloques con las tres repeticiones de cada tratamiento para determinar: peso seco de parte aérea; contenido de N de la parte aérea por el método de Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973); actividad simbiótica a través del número y peso seco de nódulos; modelo de distribución espacial de los nódulos. En R8 se analizó el balance relativo del nitrógeno y el rendimiento.

Riego: se ejecutó a través de un equipo de avance lateral 87,6 m de longitud de trabajo, la distribución del agua es por medio de tuberías de bajada y emisión mediante difusores con reguladores de presión. El método de balance hídrico utilizado fue el Balance Hídrico de Cultivos Extensivos (BAHICU) versión 1.01 (Andriani, 2012); considerando valores diarios de Evapotranspiración de referencia (ET_o) (calculado a través de la Ecuación de Penman-Monteith (Allen *et al.*, 1998), contenido de humedad al momento de siembra, valores de constantes hídricas de capacidad de campo (CC), punto de marchitez permanente (PMP) y agua útil para el suelo donde se desarrolló el ensayo. También para este balance se utilizaron datos de precipitación efectiva que se estimaron por el método de “Bureau of Reclamations” de los EE. UU. (Doorenbos y Pruitt, 1977), factores cualitativos

como la intensidad de lluvias, estado de humedad del suelo previo a la precipitación. Se consideró como umbral de riego, cuando el agua realmente disponible era del 50%. Para determinar el momento de riego, se tuvo en cuenta el pronóstico del tiempo con 72 horas de antelación. Estos datos fueron proporcionados por la cátedra de Agrometeorología (UNRC).

Fecha de cosecha: se realizó manualmente el día 13 de abril de 2015 para la primera campaña de soja y el 25 de abril de 2016 para la segunda campaña del cultivo. En la segunda campaña, se realizó en forma mecánica el 2 de mayo de 2016. Las pérdidas de cosecha mecánica se evaluaron de acuerdo a Bragachini *et al.*, (2013).

Estimación del balance de nitrógeno

Con los datos de contenido de N en suelo y cultivo se calculó el Balance Relativo de N (Cholaky *et al.*, 1986), para estimar las variaciones de su contenido en el sistema suelo-planta resultante de los cambios en las entradas y salidas del sistema y de las transformaciones internas durante el ciclo del cultivo. Así, el aporte por FBN se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{FBN} = \text{Npc} - [(\text{Nss} + \text{Nm} + \text{NII}) - \text{Nsc}]$$

Donde:

FBN: fijación biológica del nitrógeno.

Npc: contenido total de N en la planta a la cosecha (R8).

Nss: contenido de N-NO₃⁻ en el suelo a la siembra.

Nm: N derivado de la mineralización de la materia orgánica del suelo. Este valor es de 3% para los 6 meses de duración el ciclo del cultivo (Álvarez y Steinbach, 2006).

NII: N aportado por las lluvias registradas durante el ciclo, estimando en 2,5 ppm de N por cada mm (Harpaz, 1975).

Nsc: contenido de N-NO₃⁻ en el suelo a la cosecha.

También se calculó la variación del N en el suelo según:

$$\text{VNS} = (\text{Nss} + \text{Nm}) - (\text{Nsc} + \text{Nrastrojo})$$

Donde:

VNS: variación del N en el suelo.

Nrastrojo: contenido de N del rastrojo.

Estimación de rendimiento del cultivo de soja

En la etapa fenológica R8 se tomaron muestras presentes en 1m^2 por tratamiento y repetición y se determinó el rendimiento del cultivo expresados en (Kg ha^{-1}) basado en los siguientes componentes, según Kantolic *et al.*, (2003) (Figura 19):

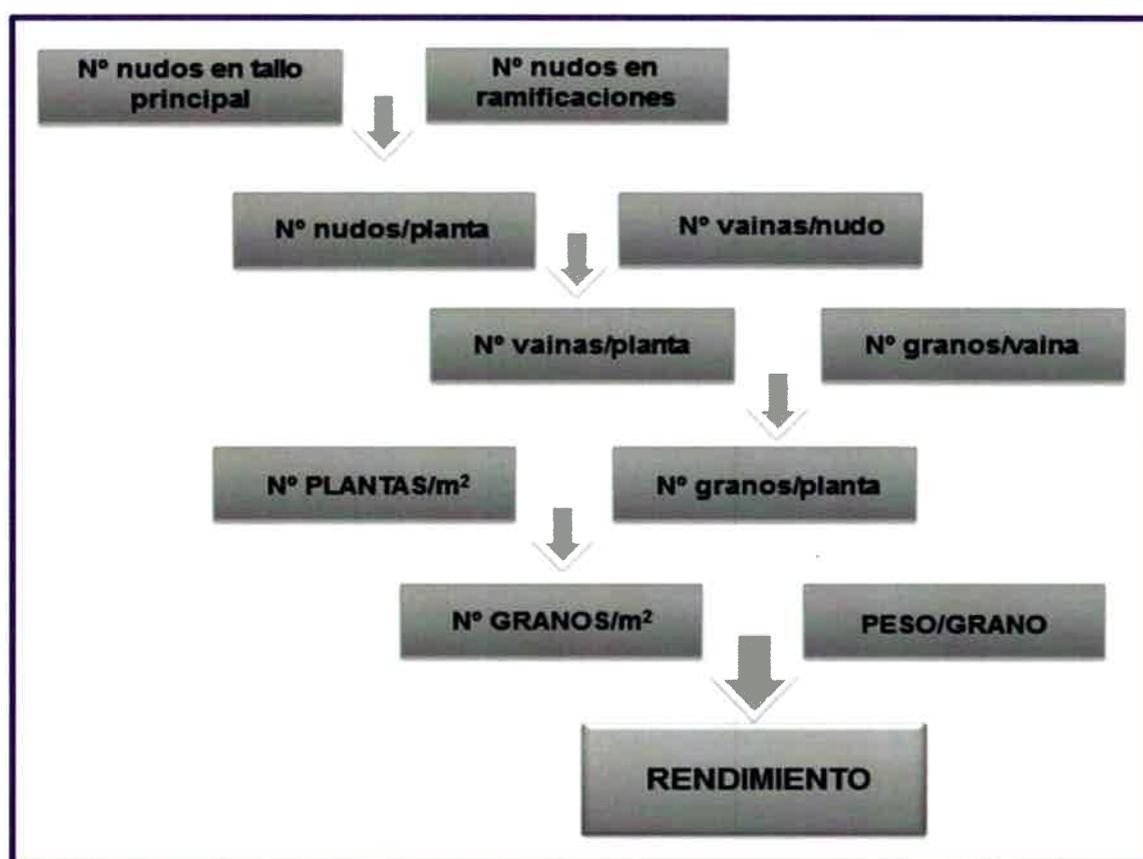


Figura 19. Componentes del rendimiento del cultivo de soja.

Análisis estadísticos

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan para las comparaciones múltiples de las medias con un nivel de significancia de 5%, con el

programa estadístico Infostat Versión 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014). También se realizó un análisis exploratorio de componentes principales (ACP) siguiendo el marco metodológico de Crivisqui (1993, 2002), las aplicaciones del método en Baronio y Vianco, (2013, 2014) y con la utilización del software SPAD 3.5.

El estudio para el ACP comprendió observaciones de dos campañas consecutivas del cultivo de soja en las etapas fenológicas R2 y R6. Para ello, se analizaron 878 casos, de los cuales 261 corresponden a la primera campaña (2014-2015) y los restantes a la segunda (2015-2016). Las características observadas comprenden:

Estado fenológico: Etapa 2 (R2) y Etapa 6 (R6)

Bloque aleatorizado de muestreo: Bloque

Tratamientos ensayados: Tratamiento

Cantidad de plantas por metro cuadrado: Planta

Número de nódulos en raíz principal por planta: NNod RP

Número de nódulos en raíces secundarias por planta: NNod RS

Peso seco de nódulos por planta en raíz principal: PSN RP

Peso seco de nódulos por planta en raíces secundarias: PSN RS

Nitrato entre 0 y 20 cm al momento de siembra: n0020s

Nitrato entre 20 y 40 cm al momento de siembra: n2040s

Nitrato entre 0 y 20 cm al momento de cosecha: n0020c

Nitrato entre 20 y 40 cm al momento de cosecha: n2040c

Nitrógeno de nitrato entre 0 y 20 cm al momento de siembra: NNO30020s

Nitrógeno de nitrato entre 20 y 40 cm al momento de la siembra: NNO32040s

Nitrógeno de nitrato entre 0 y 20 cm al momento de cosecha: NNO30020c

Nitrógeno de nitrato entre 20 y 40 cm al momento de cosecha: NNO32040c

Humedad del suelo entre 0 y 20 cm al momento de siembra: H0020s

Humedad del suelo entre 20 y 40 cm al momento de siembra: H2040s

Humedad del suelo entre 0 y 20 cm al momento de cosecha: H0020c

Humedad del suelo entre 20 y 40 cm al momento de la cosecha: H2040c.

Resultados y discusión

Establecimiento de las condiciones edáficas y climáticas para el desarrollo del cultivo de soja

Los ensayos se realizaron en el campo experimental de la universidad, en un sitio sin historia sojera, durante dos campañas consecutivas (2014-2015) y (2015-2016). Previo a la siembra, se evaluaron las propiedades físico-químicas del suelo mostrando una alta condición de fertilidad por el elevado contenido de nitrógeno disponible para el cultivo ($107,90 \text{ kg ha}^{-1}$) para la primera campaña de soja y $63,20 \text{ kg ha}^{-1}$ para la segunda campaña, calculado a partir de la DAp y del Npc. En las tablas 8 y 9 se observan los resultados del análisis del suelo que se realizaron previos de la siembra de cada campaña.

Tabla 8. Propiedades físico-químicos del suelo del área experimental campaña (2014-2015).

Propiedades	0-20 cm	20-40 cm
Materia orgánica (%)	2,51	
Nitratos (ppm)	96,60	84,20
Fósforo (ppm)	22,90	
Humedad (%)	22,00	18,92
pH (1:2,5 suelo:agua)	6,80	
Calcio (cmol kg^{-1})	9,00	
CIC (cmol kg^{-1})	20,50	

Tabla 9. Propiedades físico-químicos del suelo del área experimental campaña (2015-2016).

Propiedades	0-20 cm	20-40 cm
Materia orgánica (%)	2,10	
Nitratos (ppm)	56,30	49,80
Fósforo (ppm)	15,00	
Humedad (%)	11,50	17,00
pH (1:2,5 suelo:agua)	7,01	
Calcio (cmol kg^{-1})	8,00	
CIC (cmol kg^{-1})	19,50	

Los resultados obtenidos del análisis del suelo, en ambas campañas, mostraron un buen aporte de la mineralización derivado de la materia orgánica y la disponibilidad de

fósforo (P) 60,46 kg P en la primera campaña y 39,6 kg P en la segunda campaña para el cultivo de soja, siendo su requerimiento de 7 kg P Tn⁻¹ de grano (García y Correndo, 2012). El fósforo es uno de los 17 nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, junto al nitrógeno y al potasio conforman el grupo de macronutrientes principales, tanto por las cantidades requeridas como por la frecuencia de su deficiencia en los cultivos (García *et al.*, 2014), se considera que la disponibilidad de P es óptima a pH 6-7. El pH óptimo del suelo para la mayoría de los cultivos es el que se encuentra entre 5,5 y 8,3, cabe destacar que los valores hallados en ambos ensayos se encuentran dentro del rango establecido (Picone, 2014). Además, los altos porcentajes de saturación con Ca²⁺ asociados a un pH óptimo son propicios para el crecimiento de las plantas y microorganismos (Vázquez y Pagani, 2014). Las propiedades físico-químicas detalladas anteriormente y la alta CIC (indicador del potencial del suelo para retener e intercambiar nutrientes vegetales) fueron favorables para el desarrollo del cultivo en el suelo experimental.

Por otra parte, se estimó la población nativa de rizobios nodulantes de soja con valores de 1,55 x 10³ rizobios g⁻¹ de suelo para la primera campaña y 2,9 x 10³ rizobios g⁻¹ de suelo para la segunda campaña. En suelos de nuestro país, se ha encontrado que los rizobios naturalizados fluctúan entre 10² a 10⁵ rizobios g⁻¹ de suelo (González *et al.*, 1997). La presencia de rizobios nativos en el suelo es considerada una barrera para el éxito de la inoculación, estos microorganismos están bien adaptados en condiciones del suelo, sin embargo, con una tasa baja de fijación (Miransari, 2014). Estudios realizados por IMYZA - INTA (Castelar) donde evaluaron la capacidad simbiótica de cepas aisladas de diferentes suelos, determinaron que la gran mayoría presenta buena capacidad de nodulación, pero mediana capacidad para la fijación del N₂. Los valores de población naturalizada superiores al orden de 10³ provocan el fenómeno de competencia por la ocupación de los nódulos y menores beneficios en la inoculación con las cepas introducidas (Toresani *et al.*, 2007). En los ensayos a campo durante las dos campañas consecutivas, los valores detectados de la población nativa de rizobios en el suelo fueron bajos (del orden de 10³) resultando favorable para la práctica de inoculación con las cepas eficientes de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y Per 3.61.

En las figuras 20 y 21 se muestran los registros climáticos, precipitaciones y temperaturas máximas, mínimas y medias diarias registradas para las campañas del cultivo de soja (2014-2015) y (2015-2016). La temperatura media mostró diferencias entre las distintas campañas, los valores promedios registrados fueron 20,97±0,28 °C para la

primera campaña y $18,37 \pm 0,34$ °C para la segunda campaña del cultivo de soja. También, se observó diferencias en las precipitaciones caídas 782,89 mm y 868,90 mm para la primera y segunda campaña, respectivamente.

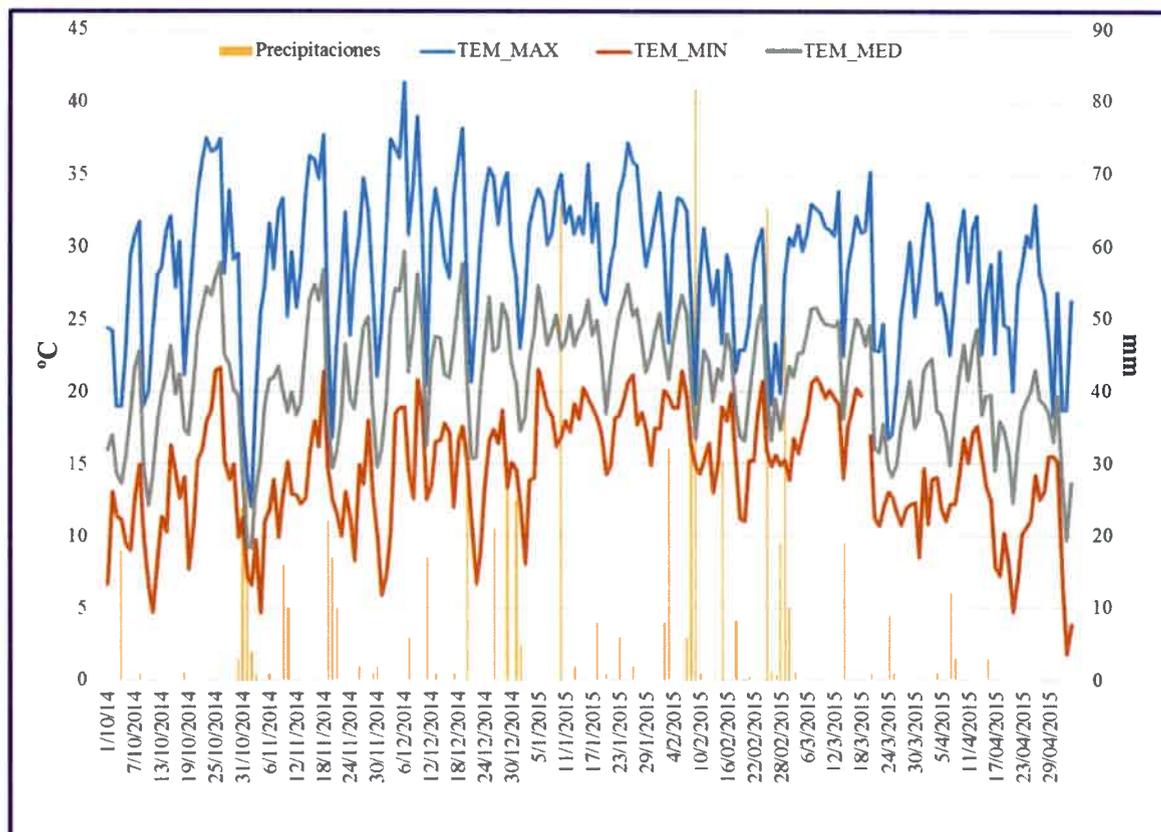


Figura 20. Precipitaciones, temperatura medias, máximas y mínimas diarias registradas en la campaña (2014-2015). Fuente: Servicios Agrometeorológicos, UNRC.

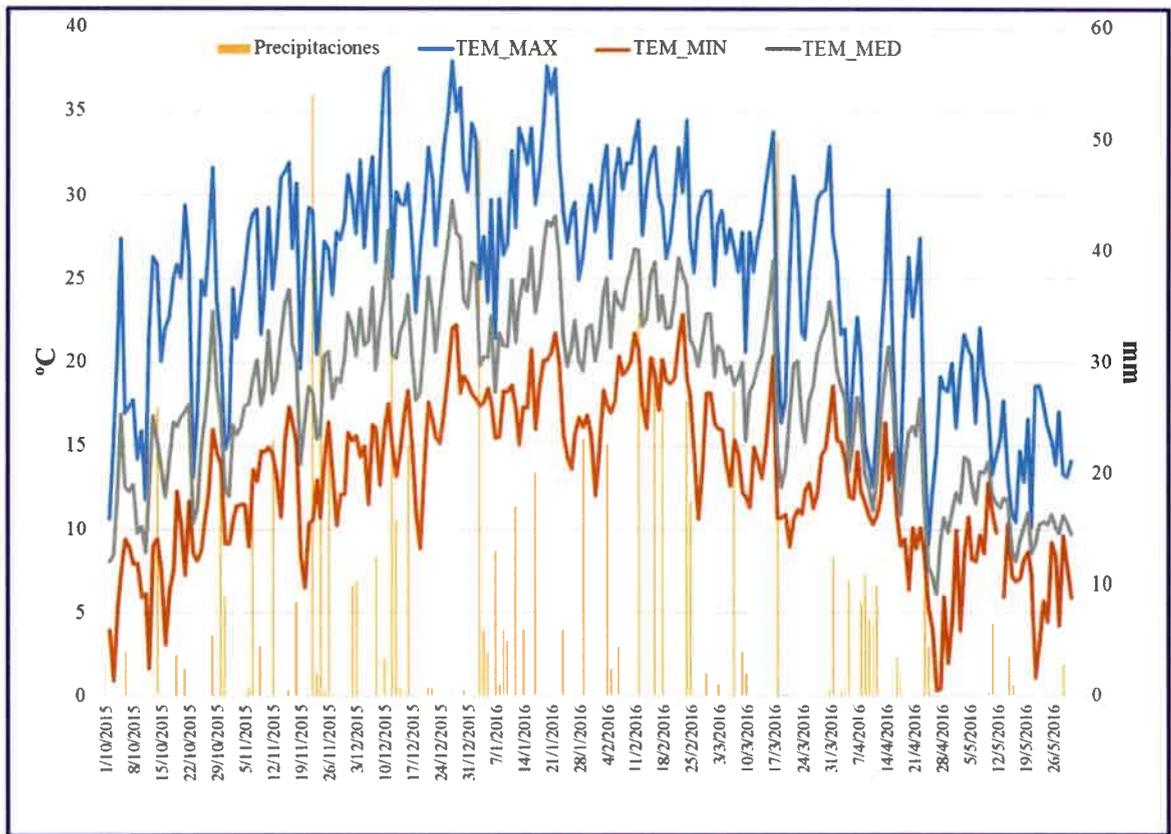


Figura 21. Precipitaciones, temperatura medias, máximas y mínimas diarias registrada en la campaña (2015-2016). Fuente: Servicios Agrometeorológicos, UNRC.

El estado de la evolución del agua en el perfil del suelo en el ciclo del cultivo de soja fue favorable, el buen nivel de precipitaciones registradas en ambas campañas, sumado al riego, hicieron que los aportes de agua disponible para el cultivo nunca estuvieron, por largo período, por debajo del límite de estrés establecido (cuando el agua útil disponible era del 50%) (Figuras 22 y 23).

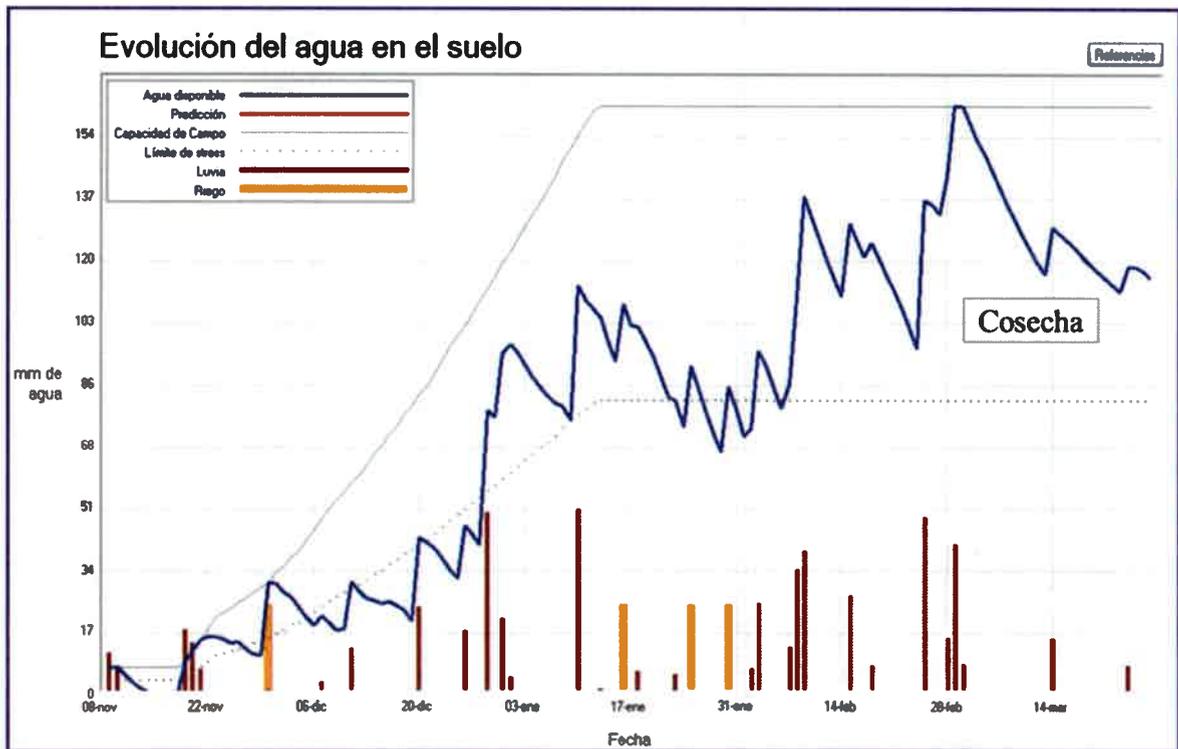


Figura 22. Evolución del agua en el suelo del cultivo de soja en la campaña (2014-2015). Fuente: Servicios Hidrología Agrícola, UNRC.

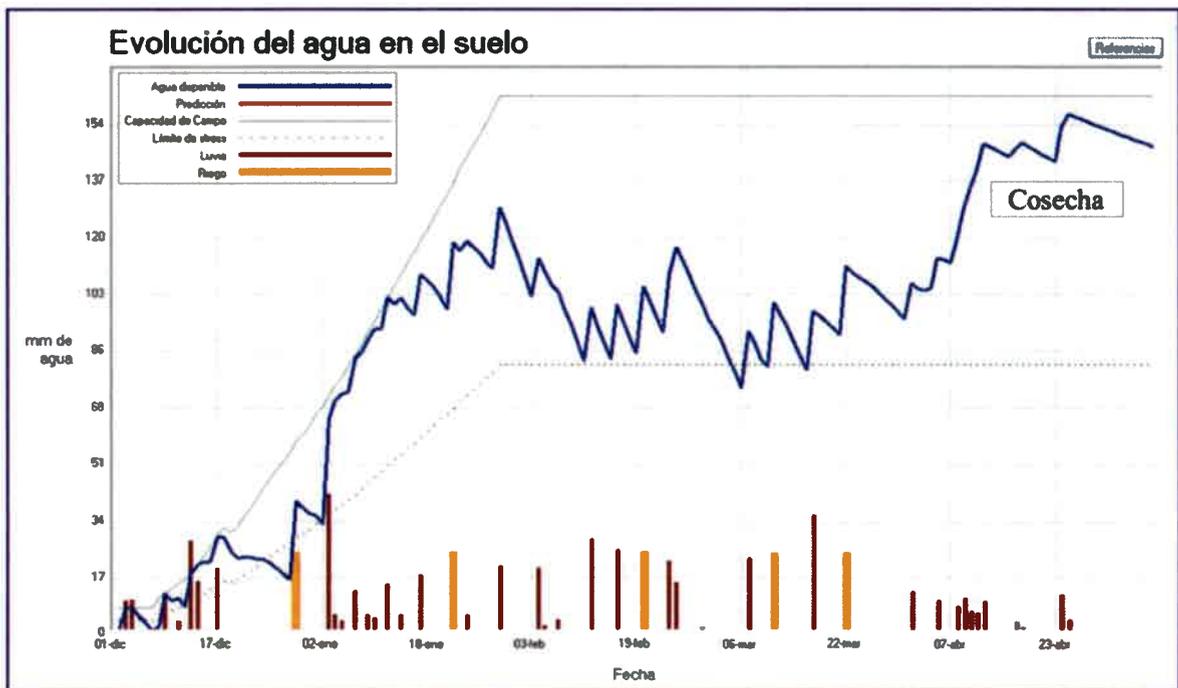


Figura 23. Evolución del agua en el suelo del cultivo de soja en la campaña (2015-2016). Fuente: Servicios Hidrología Agrícola, UNRC.

Interacción de la nodulación con las variables edáficas

Para obtener una buena nodulación y una fijación de nitrógeno eficiente, las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo son importantes sumado al método apropiado de cultivo (fertilización, fecha de siembra, densidad de siembra, malezas y plagas). Además, resulta esencial el empleo de inoculantes basado en cepas de *Bradyrhizobium japonicum* eficientes para mejorar el rendimiento de la soja (Ohyama *et al.*, 2012).

En las dos campañas realizadas, el porcentaje de nodulación de las plantas de soja inoculadas con las cepas introducidas de *B. japonicum* fue del 100% presentando nódulos funcionales. Considerando la población nativa de rizobios encontrada en el suelo experimental del orden de 10^3 , la respuesta de nodulación de las plantas de soja en los tratamientos control y fertilizado fue del orden del 20%, siendo los nódulos no funcionales.

En las plantas de soja inoculadas con las cepas introducidas de *B. japonicum* (USDA110 y Per 3.61), los nódulos se distribuyeron tanto en la raíz principal como en las raíces laterales. Mc Dermott y Graham (1989) informaron que, en el cultivo de soja, el desarrollo de nódulos en la raíz principal, es una característica cualitativa útil como un índice del nivel de eficiencia y de la actividad bacteriana en la interacción planta-rizobio en el momento del desarrollo de la plántula. Estos nódulos contribuirán en mayor medida al pool de N en la planta derivado de la FBN ya que tendrán mayor actividad entre R1 y R5, etapas en la cuales las tasas de FBN son más altas. Por otra parte, estos mismos autores han observado que la actividad de los nódulos ubicados en las raíces laterales tendría una mayor importancia durante el llenado de granos, cuando las tasas de FBN decrecen.

El análisis de componentes principales realizado sobre las 17 variables cuantitativas detalladas en material y método (Planta, NNod RP, NNod RS, PSN RP, PSN RS, n0020s, n2040s, n0020c, n2040c, NNO30020s, NNO32040s, NNO30020c, NNO32040c, H0020s, H2040s, H0020c y H2040c) correspondientes a ambas campañas, confirmó la existencia de grupos con características diferenciadas (Figura 24).

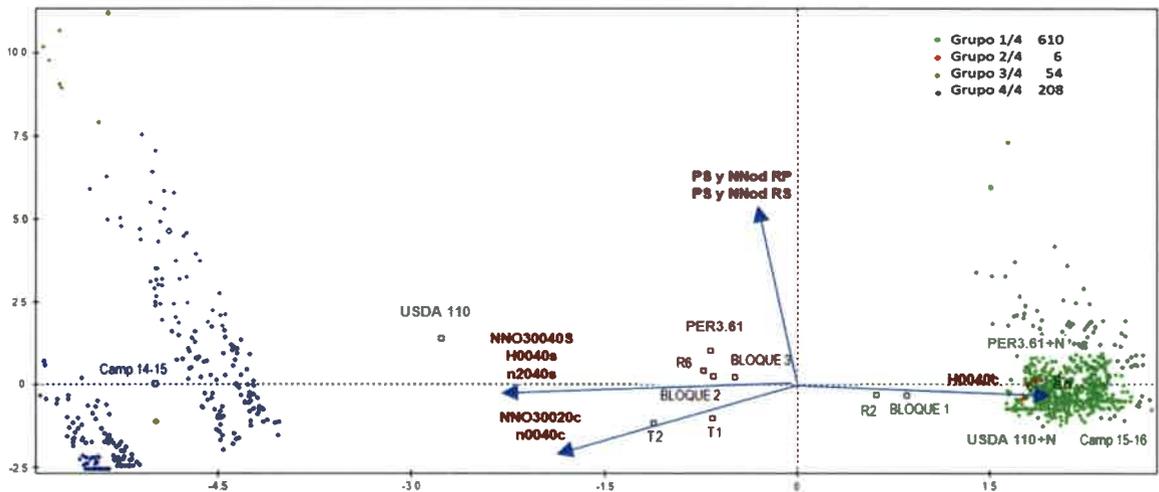


Figura 24. Agrupamiento de las observaciones en función de Peso Seco y Número de nódulos, Humedad, Nitrato y Nitrógeno de Nitrato.

La clasificación por el método jerárquico a través del vecino más próximo dio lugar a la partición de la nube de observaciones en 4 grupos que comprendieron:

Grupo 1: reunió el 69,48% de las observaciones, se caracterizó por tener mayor humedad en el suelo a cosecha y mayor presencia de plantas por metro cuadrado respecto del total de observaciones consideradas (Anexo Tabla 10). La totalidad de observaciones pertenecieron a la campaña (2015-2016), el 99,38% del tratamiento Per 3.61+N y el 96,18% del tratamiento USDA110+N observados en el estudio estuvieron presentes en este grupo, predominaron las observaciones del Bloque 1 y Etapa 2 (Anexo Tabla 11).

Grupo 2: reunió el 0,60% de las observaciones, se caracterizó por tener un valor promedio de nitrógeno de nitrato entre 20-40 cm a cosecha superior en 48 veces al total de las observaciones consideradas (Anexo Tabla 12). La totalidad de observaciones pertenecieron al tratamiento USDA110+N, Bloque 2 y Etapa 6 (Anexo Tabla 13).

Grupo 3: reunió el 6,15% de las observaciones, se caracterizó por tener mayor peso seco de nódulos en raíces secundarias (cerca de 5 veces) y en raíz primaria (cerca de 4 veces) respecto del total de observaciones; también, predominaron el número de nódulos en raíz primaria y raíces secundarias, nitrógeno de nitratos en la siembra y a cosecha, mayor humedad en el suelo al momento de siembra y nitratos en suelo a cosecha (Anexo Tabla 14). En este grupo predominaron las observaciones de la campaña (2014-2015), Etapa 6, tratamientos USDA110 y Per 3.61 y Bloque 2 (Anexo Tabla 15).

Grupo 4: reunió el 23,69% de las observaciones, se caracterizó por tener valores superiores de nitrógeno de nitratos, humedad y nitratos en el suelo al momento de la siembra con respecto al total de las observaciones consideradas. Se observó mayor nitrógeno de nitratos

entre 0-20 cm y nitratos en el suelo a cosecha (Anexo Tabla 16). La totalidad de observaciones de este grupo pertenecen a la campaña (2014-2015), predominaron los tratamientos USDA110, T1, T2 y Bloque 2 (Anexo Tabla 17).

Considerando la heterogeneidad de los datos entre las dos campañas, se decidió analizar cada campaña por separado y las diferencias que pudieran existir al interior de cada una de ellas.

Campaña 2014-2015

En la figura 25 se muestra el análisis de componentes principales, realizado sobre las 11 variables cuantitativas (Planta, NNod RP, NNod RS, PSN RP, PSN RS, n0020c, n2040c, NNO30020c, NNO32040c, H0020c y H2040c) de la campaña (2014-2015), confirmando la existencia de grupos con características diferenciadas.

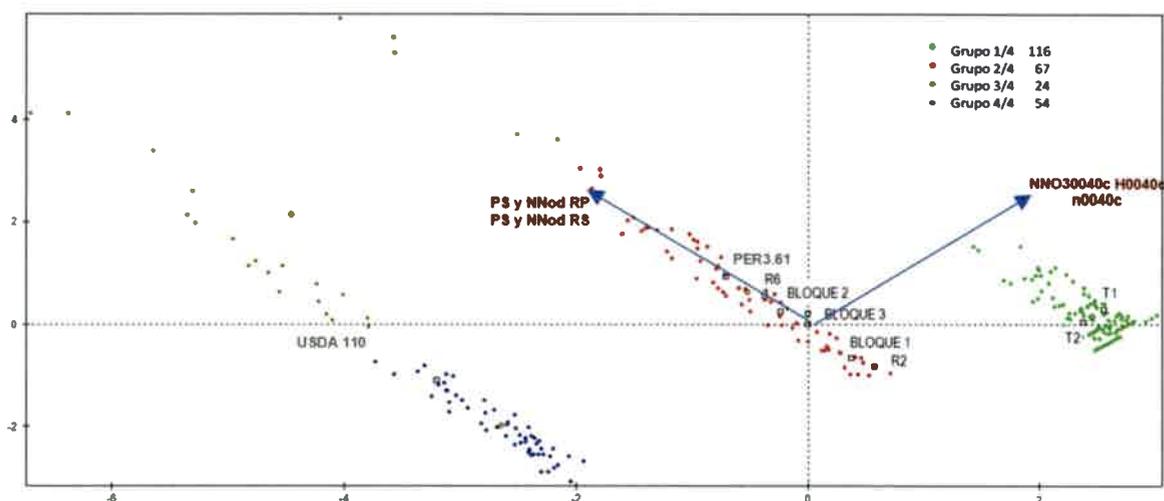


Figura 25. Agrupamiento de las observaciones en función de Peso Seco y Número de nódulos, Humedad, Nitrato y Nitrógeno de Nitrato, campaña (2014-2015).

La clasificación por el método jerárquico a través del vecino más próximo dio lugar a la partición de la nube de observaciones en 4 grupos que comprendieron:

Grupo 1: reunió el 44,44% de las observaciones, se caracterizó por tener mayor nivel de nitrógeno de nitrato y nitratos entre 0-20 cm y entre 20-40 cm a cosecha respecto del total de observaciones consideradas en la campaña (2014-2015) (Anexo Tabla 18). El 54,31% de las observaciones pertenecieron al tratamiento T2 y el 45,69% al tratamiento T1 (Anexo Tabla 19).

Grupo 2: reunió el 25,67% de las observaciones, se caracterizó por tener mayor humedad entre 20-40 cm a cosecha, número y peso seco de nódulos en raíz principal y

raíces secundarias (Anexo Tabla 20). La totalidad de observaciones pertenecieron al tratamiento con la cepa Per 3.61 (Anexo Tabla 21).

Grupo 3: reunió el 9,20% de las observaciones, se caracterizó por tener mayor número y peso seco de nódulos en raíz primaria y raíces secundarias, alrededor de 4 veces más respecto del total observaciones en la campaña (2014-2015) (Anexo Tabla 22). En este grupo, la totalidad de observaciones pertenecieron a la Etapa 6, tratamiento con la cepa USDA110 y Bloque 2 (Anexo Tabla 23).

Grupo 4: reunió el 20,69% de las observaciones, se caracterizó por tener cantidad de plantas y número de nódulos en la raíz principal superiores al total de observaciones consideradas en la campaña 2014-2015 (Anexo Tabla 24). La totalidad de observaciones de este grupo pertenecieron al tratamiento con la cepa USDA110 (Anexo Tabla 25).

Tal como indica la descripción de los grupos, la partición de los datos mostró la heterogeneidad entre las cepas utilizadas en la campaña (2014-2015). La cepa de referencia *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 presentó mayor número y peso de nódulos en raíz principal y raíces secundarias con respecto a la cepa nativa Per 3.61.

Campaña 2015-2016

En la figura 26 se muestra el análisis de componentes principales, realizado sobre las 11 variables cuantitativas (Planta, NNod RP, NNod RS, PSN RP, PSN RS, n0020c, n2040c, NNO30020c, NNO32040c, H0020c y H2040c) de la campaña (2015-2016) mostrando también la existencia de grupos con características diferenciadas.

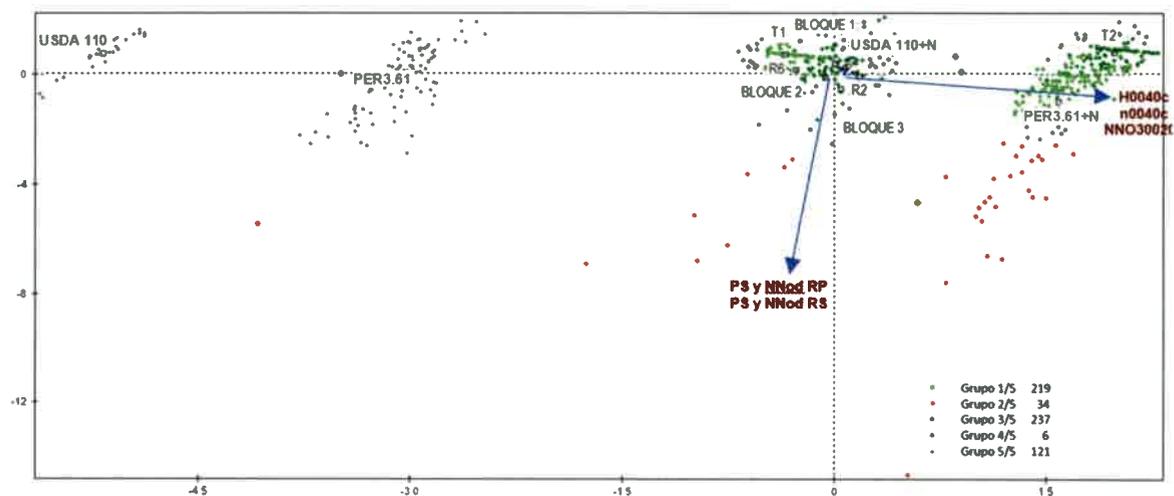


Figura 26. Agrupamiento de las observaciones en función de Peso Seco y Número de nódulos, Humedad, Nitrato y Nitrógeno de Nitrato, campaña (2015-2016).

La clasificación por el método jerárquico a través del vecino más próximo dio lugar a la partición de la nube de observaciones en 5 grupos que comprendieron:

Grupo 1: reunió el 35,49% de las observaciones, se caracterizó por tener un nivel mayor de nitratos entre 20-40 cm a cosecha del 15%; también se observaron valores superiores en humedad del suelo a cosecha y mayor presencia de plantas por metro cuadrado respecto del total de observaciones consideradas (Anexo Tabla 26). Las observaciones de este grupo fueron 62,10% para el tratamiento Per 3.61+N y 37,90% para el tratamiento T1, todas las observaciones de T1 estuvieron en este grupo (Anexo Tabla 27).

Grupo 2: reunió el 5,51% de las observaciones, se caracterizó por tener valor promedio de peso seco de nódulos en raíces secundarias y número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias que triplica los valores promedio de la campaña (2014-2015) y el peso seco de nódulos en raíz principal que duplica los valores promedio de la campaña anterior (Anexo Tabla 28). La totalidad de observaciones pertenecieron a la Etapa 2, el tratamiento con la cepa Per 3.61+N tuvo una presencia del 73,53% y el Bloque 3 del 70,59% (Anexo Tabla 29).

Grupo 3: reunió el 38,41% de las observaciones, se caracterizó por tener mayores niveles de nitrato y nitrógeno de nitrato entre 0-20 cm a cosecha respecto del total observaciones (Anexo Tabla 30). En este grupo predominaron las observaciones de los tratamientos con la cepa USDA110+N (60,34%) y T2 (39,66%); la totalidad de observaciones de T2 se encontraron en este grupo (Anexo Tabla 31).

Grupo 4: reunió el 0,97% de las observaciones, se caracterizó por tener valores de nitrógenos de nitratos, entre 20-40 cm al momento de la cosecha, 49 veces superiores a los valores promedio de la campaña (2015-2016). Los valores de nitratos y de nitrógeno de nitrato, ambos entre 0-20 cm a cosecha, fueron superiores al promedio observado en la campaña (2015-2016) a un nivel de significatividad de 0,10 (Anexo Tabla 32). La totalidad de observaciones de este grupo pertenecieron a los tratamientos con la cepa USDA110+N, Bloque 2 y Etapa 6 (Anexo Tabla 33).

Grupo 5: reunió el 19,61% de las observaciones, se caracterizó por tener valores superiores en número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias (Anexo Tabla 34). Las observaciones de este grupo pertenecieron a los tratamientos con las cepas Per 3.61 (79,34%) y USDA110 (20,66%), la totalidad de observaciones de este último tratamiento se encontraron en este grupo. Las observaciones provenientes de la Etapa 6 fueron predominantes (Anexo Tabla 35).

En base a lo indicado en la descripción de los grupos, la partición de los datos mostró una heterogeneidad entre los diferentes tratamientos en la campaña (2015-2016). La cepa Per 3.61 +N presentó mayor número y peso de nódulos en raíz principal y raíces secundarias en relación a las plantas inoculadas con la cepa USDA110+N, destacando que ésta última cepa presentó mayores niveles de nitrógeno de nitrato entre 20-40 cm a cosecha.

Balance relativo de nitrógeno en el cultivo de soja

El balance de nitrógeno de un agrosistema resulta de utilidad para inferir a largo plazo cómo evolucionará su nivel en el suelo. Si bien es fácil estimar la extracción de nitrógeno por cosecha de los granos, no es posible establecer balances confiables pues se carece de estimaciones a campo del ingreso de nitrógeno al sistema suelo-planta por fijación biológica, dicho proceso tiene una importancia central para el balance de N en cultivos de soja (Di Ciocco, 2004; Di Ciocco *et al.*, 2008).

Los métodos de balance de N y diferencia de N proporcionan estimaciones de la fijación de N₂ sobre una base de área, es decir, kg N ha⁻¹. Por otro lado, los métodos ¹⁵N y ureidos proporcionan estimaciones de %NDA, es decir, el porcentaje de N total de la planta que deriva de la FBN. Una cantidad de N₂ fijado por unidad de superficie o unidad de producción sólo se puede calcular cuando se combina el %NDA con una estimación de la biomasa del vegetal y del contenido total de N. Aunque todos los métodos tienen sus limitaciones y fuentes de error únicas, el balance de N, la diferencia de N, los métodos ¹⁵N (dilución de isótopos y abundancia natural) y ureidos, sin duda, representan lo mejor que está disponible (Herridge *et al.*, 2008).

En la bibliografía existen diferentes métodos para estimar el balance relativo de nitrógeno en condiciones controladas (por ejemplo, dilución del isótopo ¹⁵N, uso de variedades no nodulantes). Sin embargo, para experimentos llevado a cabo en condiciones de campo, como los implementados en este trabajo de tesis, el método del balance de nitrógeno usado, es una alternativa válida para fines comparativos ya que tiene en cuenta las condiciones edáficas y de manejo del cultivo (Cholaky *et al.*, 1986). Así, estudiar el aporte relativo de la FBN asociada a la fertilidad del suelo, es una consideración importante a tener en cuenta en el manejo del cultivo de leguminosas.

Los resultados obtenidos demostraron que el balance de nitrógeno fue positivo en todos los tratamientos en ambas campañas del cultivo de soja. En la primera campaña (Tabla 36), el aporte de la FBN en las plantas inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium*

japonicum USDA110 fue del 56% y con la cepa *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 del 64% del N acumulado por el cultivo, representando un aumento del 20% y 39% en relación a los tratamientos control y fertilizado. Además, se observó una mayor variación de nitrógeno en el suelo en los tratamientos inoculados con las cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* con respecto a los restantes tratamientos, relacionado al nivel del nutriente extraído por el cultivo desde el suelo y al mayor contenido de nitrógeno determinado en el rastrojo de la soja.

Con respecto a la segunda campaña (Tabla 37), la FBN aportó de N a las plantas de soja inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (59%), *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 (70%), USDA110+Fertilizado (52%) y Per 3.61+Fertilizado (71%) de N acumulado por el cultivo, representando un importante aumento con respecto a los tratamientos control (37%) y fertilizado (35%). La variación en el contenido de nitrógeno en el suelo fue menor en todos los tratamientos en comparación a la primera campaña (2014-2015) del cultivo de soja, relacionado a una menor condición de fertilidad del suelo al momento de la siembra 107,90 y 63,20 kg ha⁻¹, en la primera y segunda campaña, respectivamente. Además, de un menor aporte en el ciclo del cultivo por mineralización de la materia orgánica 99,39 kg ha⁻¹ campaña (2014-2015) y 83,16 kg ha⁻¹ (2015-2016). Cabe destacar que los tratamientos inoculados con la cepa nativa Per 3.61 y Per 3.61+Fertilizado tuvieron mayor nitrógeno extraído por el cultivo del suelo representado en una alta contribución relativa del nitrógeno fijado biológicamente a la nutrición nitrogenada de la soja.

Tabla 36. Balance relativo de nitrógeno campaña (2014-2015).

Tratamientos	FBN (kg ha ⁻¹)	VNS (kg ha ⁻¹)
Control	111,79	85,04
Fertilizado	114,19	76,46
<i>B. japonicum</i> USDA110	215,71	115,61
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	269,14	97,64

*VNS: variación del contenido de nitrógeno del suelo.

Tabla 37. Balance relativo de nitrógeno campaña (2015-2016).

Tratamientos	FBN (kg ha ⁻¹)	VNS (kg ha ⁻¹)
Control	74,14	83,90
Fertilizado	126,60	58,53
<i>B. japonicum</i> USDA110	196,40	83,82
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	315,60	64,22
USDA110 + Fertilizado	133,40	67,35
Per 3.61 + Fertilizado	298,07	41,73

*VNS: variación del contenido de nitrógeno del suelo.

Los datos del balance de nitrógeno obtenidos en esta tesis doctoral coinciden con lo informado por otros autores como Echeverría y Sainz-Rozas (2014) que informaron rangos de nitrógeno fijado en plantas de soja entre 40-260 kg ha⁻¹ y por Ciampitti (2016) quien indicó una variación de la FBN entre 25-400 kg ha⁻¹ en soja.

En Argentina, Collino *et al.*, (2007) encontraron aportes de N a través de la FBN entre 26-71%. Dicha variación podría estar determinada no sólo por los diferentes contenidos de N mineral, que afecta la FBN (Salvagiotti *et al.*, 2008), sino también por el hecho de que la soja en nuestro país se cultiva en seco y el proceso de FBN es altamente sensible a la sequía (Xing *et al.*, 2016). En Brasil, la contribución de la FBN resultó ser superior al 80%, asociado entre otros, al uso de cepas mejoradas específicamente para esos ambientes (Hungría *et al.*, 2005). Por otra parte, un balance positivo de N en el suelo es importante para poder mantener la actividad de los microorganismos que intervienen en la dinámica de la materia orgánica y los ciclos de los nutrientes. Desde el enfoque ecológico, las leguminosas juegan un importante rol en el enriquecimiento de N en los sistemas agrícolas (Salvagiotti *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el balance relativo del nitrógeno constituyen una evidencia empírica de la contribución que la fijación simbiótica de nitrógeno hace a la economía de la nutrición nitrogenada de la soja en un suelo con alta fertilidad.

Rendimiento del cultivo de soja

Los resultados del rendimiento del cultivo de soja de la primera campaña (Tabla 38), cosechado en forma manual, mostraron que hay diferencias estadísticamente

significativas entre los tratamientos inoculados con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y fertilizado en relación con el control. El mayor rendimiento del cultivo de soja correspondió al tratamiento de soja inoculada con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61.

Tabla 38. Estimación del rendimiento del cultivo de soja cosechado en forma manual campaña (2014-2015).

Tratamientos	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
Control	4524,27 ± 415,96 c
Fertilizado	6167,55 ± 382,85 b
<i>B. japonicum</i> USDA110	6624,87 ± 455,82 b
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	7667,37 ± 524,66 a

Los datos representan el promedio de tres repeticiones por tratamiento. Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

El rendimiento del cultivo de soja inoculado con la cepa desnitrificante *B. japonicum* Per 3.61 fue 69% mayor que el control (sin inocular y fertilizar), un 24% respecto al fertilizado (con urea) y de un 15% cuando la soja fue inoculada con la cepa de referencia USDA110. En el tratamiento control, el rendimiento del cultivo estaría dado por las condiciones edáficas y climáticas tales como el aporte de nitrógeno a la siembra (N-NO₃⁻), materia orgánica, fósforo y contenido de humedad del suelo, al coeficiente de mineralización, sumados a las elevadas precipitaciones registradas en el ciclo del cultivo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el rendimiento del tratamiento fertilizado, en el cual al momento de la siembra se le agregó 180 kg ha⁻¹ de urea, en comparación a lo obtenido cuando se inoculó con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 esto demuestra la complementariedad de las fuentes de N. En relación a lo mencionado, Gutiérrez-Boem y Salvagiotti, (2014) informaron que no se observó respuesta a la fertilización nitrogenada cuando las plantas de soja noduladas se cultivaron en ambientes sin limitaciones para el crecimiento.

En la tabla 39 se muestran los rendimientos del cultivo de soja obtenido por cosecha en forma manual en la segunda campaña observándose que hubo diferencias

estadísticamente significativas del control e inoculado con USDA110+Fertilizado con respecto al resto de los tratamientos. El mayor rendimiento del cultivo de soja correspondió al tratamiento inoculado con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 siendo éste coincidente con los valores alcanzados en la primera cosecha de la soja. Al mismo tiempo, se evidenció que no hubo diferencia significativa entre el rendimiento del tratamiento fertilizado con urea y el inoculado con la cepa de *B. japonicum* Per 3.61+Fertilizado, demostrando que no hubo una complementariedad entre las fuentes de nitrógeno disponibles para las plantas. Por otra parte, entre los tratamientos fertilizado y el inoculado con la cepa USDA110 no se observó diferencia, pero si una disminución cuando ambos están juntos en el tratamiento USDA110+Fertilizado.

Tabla 39. Estimación del rendimiento del cultivo de soja cosechado en forma manual campaña (2015-2016).

Tratamientos	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
Control	3612,94 ± 183,55 c
Fertilizado	5632,57 ± 479,15 b
<i>B. japonicum</i> USDA110	5593,92 ± 304,32 b
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	6993,09 ± 527,62 a
USDA110 + Fertilizado	4034,54 ± 453,43 c
Per 3.61 + Fertilizado	5921,71 ± 476,86 b

Los datos representan el promedio de tres repeticiones por tratamiento. Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Por otra parte, en la campaña (2015-2016) se evaluó el rendimiento del cultivo de soja también en forma mecánica mostrando una tendencia similar a los valores de rendimiento estimados en la cosecha manual (Tabla 40). Durante la cosecha de la soja, se estimó la pérdida de acuerdo a la técnica de Bragachini *et al.*, (2013) obteniéndose un valor de 100 kg ha⁻¹. Dicho valor resultó inferior al valor promedio de 135 kg ha⁻¹ informado por el INTA (2013) evaluando las pérdidas de cosecha en el cultivo de soja en siete provincias argentinas en la campaña (2012-2013).

Tabla 40. Estimación del rendimiento del cultivo de soja cosechado en forma mecánica campaña (2015-2016).

Tratamientos	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
Control	3323,91 ± 168,87 c
Fertilizado	5181,97 ± 440,82 b
<i>B. japonicum</i> USDA110	5146,41 ± 279,98 b
<i>B. japonicum</i> Per 3.61	6433,64 ± 485,41 a
USDA110 + Fertilizado	3711,78 ± 417,16 c
Per 3.61 + Fertilizado	5447,97 ± 438,71 b

Los datos representan el promedio de tres repeticiones por tratamiento. Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

El rendimiento del cultivo de soja inoculado con la cepa desnitrificante *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 fue mayor a los otros tratamientos, mostrando valores superiores al 93% del valor hallado en el control, un 24% al fertilizado con urea y un 25% a la inoculación con la cepa de referencia USDA110. Además, el rendimiento de la soja del tratamiento Per 3.61+Fertilizado presentó diferencia significativa con los tratamientos control y USDA110+ Fertilizado, resultando un 61% y un 46% superior, respectivamente. Cabe destacar que los rendimientos de soja obtenidos en los tratamientos inoculados con las cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110 y Per 3.61) fueron altos, resaltando la buena performance y señalando la incidencia positiva en el medioambiente de la inoculación con ambas cepas. Estos datos corroboran lo demostrado en los ensayos de invernáculo donde las plantas de soja inoculadas con la cepa Per 3.61 presentó un óptimo crecimiento y una eficiente fijación simbiótica de nitrógeno en presencia de nitrato.

Los altos valores obtenidos de rendimiento de la soja durante las dos campañas consecutivas concuerdan con lo informado por Ruiz-Díaz *et al.*, (2009) que lograron un aumento del rendimiento por hectárea de 130 kg, cuando la soja se inoculó con *Bradyrhizobium* sp., sugiriendo que la práctica de inoculación de las semillas tuvo efectos positivos sobre la absorción de N, la acumulación de N en el grano y de la materia seca.

Esta aseveración se fundamentó en un meta análisis de Salvagiotti *et al.*, (2008), indicando que el 50-60% de la demanda de nitrógeno de la planta de soja proviene del proceso de FBN, sin embargo, la tasa de FBN disminuyó con la fertilización nitrogenada (Pagano y Miransari, 2016).

El rendimiento de las plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* Per 3.61 fue mayor en comparación al resto de los tratamientos en las dos campañas consecutivas. En la campaña (2015-2016) no se observaron diferencias significativas entre la soja inoculada con la cepa de referencia USDA110 y el tratamiento fertilizado, aunque dicha cepa mostró una disminución en el rendimiento cuando estaba fertilizada con urea. Estos resultados concuerdan con Kaschuk *et al.*, (2016) quienes informaron que la aplicación de fertilizante nitrogenado afectó negativamente las distintas variables simbióticas, lo cual podría estar indicando una disminución de la simbiosis, lo que repercutiría en los rendimientos del cultivo de soja. Por otra parte, el rendimiento del cultivo de soja del tratamiento Per 3.61+Fertilizado no presentó diferencia significativa con el tratamiento fertilizado. Considerando la alta disponibilidad de N en el suelo y que la inoculación de la soja sólo con la cepa Per 3.61 mostró un alto porcentaje de nodulación y el mayor aporte de FBN en el balance de nitrógeno, el rendimiento obtenido en el tratamiento (Per 3.61+Fertilizado) podría atribuirse a la capacidad fijadora y desnitrificante de la cepa en presencia de elevada concentración de nitrato en el suelo.

En base a los estudios realizados en este trabajo de tesis, la inoculación de la soja resulta ser una práctica económicamente y ambientalmente viable. Así, el manejo de la nutrición nitrogenada en el cultivo de soja es tratar de garantizar un adecuado establecimiento de la nodulación y maximizar la provisión de N derivado de la fijación simbiótica. Aplicaciones de altas dosis de fertilizante nitrogenado a la siembra en superficie sólo consiguen inhibir la FBN sin ningún beneficio adicional sobre la producción del cultivo (Gutiérrez-Boem y Salvagiotti, 2014). Estas consideraciones coinciden con los resultados obtenidos en el rendimiento de la soja en la campaña (2015-2016), demostrando que cuando sólo estaban inoculadas con las cepas USDA110 y Per 3.61 obtuvieron mayores rendimientos que cuando estaban inoculadas y con una dosis adicional de 180 kg de urea.

Tomados estos datos en conjunto, los ensayos a campo realizados en un suelo con alto contenido de nitrato, permitieron demostrar que la cepa desnitrificante *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 (caracterizada por una elevada actividad nitrato reductasa) representa

un aporte promisorio para su uso como inoculante para soja con el fin de mejorar el rendimiento del cultivo.

Capítulo 5: Conclusiones

En presencia de nitrato, la inoculación de la soja con las diferentes cepas desnitrificantes de *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, Per 3.61, Per 3.64 y Per 1.12) no mostró cambios en los componentes del crecimiento de la planta, sin embargo, se observó una reducción en la nodulación. No obstante, este efecto negativo sobre la nodulación, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) permitió mantener la producción y la traslocación de los compuestos nitrogenados en la planta.

Es de destacar que las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 y Per 3.64 reflejaron su preponderancia en el enriquecimiento de carbono en las plantas de soja. Además, la relación C:N en la asociación simbiótica de la soja con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* no se modificó por la adición de una fuente complementaria de nitrógeno, lo cual indica que la FBN contribuyó a mantener una óptima nutrición para el desarrollo de las plantas.

La actividad específica de la enzima nitrato reductasa (NR) de los bacteroides, extraídos de los nódulos de soja inoculados con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, mostró un comportamiento similar en respuesta a la adición de nitrato. Así, la capacidad desnitrificantes de estas cepas permitieron la sobrevivencia de la bacteria en el interior de los nódulos y el proceso FBN. Considerando que la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61 presentó la mayor actividad NR se seleccionó la misma junto con la cepa de referencia *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 para realizar los ensayos a campo.

El rendimiento del cultivo de soja inoculado con la cepa Per 3.61 fue superior a todos los tratamientos ensayados a campo con elevada concentración de nitrato en el suelo, observándose un aporte significativo de la FBN en el balance relativo de nitrógeno. Todos estos datos demostraron que la cepa desnitrificante *Bradyrhizobium japonicum* Per 3.61, caracterizada por una elevada actividad nitrato reductasa, representa un aporte promisorio para su uso como inoculante para soja, mejorando la FBN y el rendimiento del cultivo en suelos con alto contenido de nitrato.



En suelo con alto nivel de nitrato, la optimización de la fijación biológica del nitrógeno en la asociación simbiótica Bradyrhizobium japonicum-soja es dependiente de la presencia de una activa nitrato reductasa bacteroidal capaz de reducir el nitrato y suministrar la energía necesaria para la actividad nitrogenasa, favoreciendo así la producción de los compuestos nitrogenados.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados de esta tesis doctoral brindan nuevos aportes al conocimiento de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, caracterizadas por su actividad desnitrificante, las cuales presentaron diferentes comportamiento agronómico y simbiótico en su interacción con la planta de soja en presencia de nitrato. De este modo pueden contribuir a la optimización de la fijación de nitrógeno en el cultivo de soja para lograr mayor producción y mantener la calidad del recurso suelo.

Referencias Bibliográficas

- Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, A., y Miransari, M. (2010). Plant growth-promoting activities of *Pseudomonas fluorescens*, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum* 32:281-288.
- Aguilar-Pérez, J. (2014). Manual para el manejo orgánico del Nogal Pecanero. ISBN: 978-1-4633-8202-5.
- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University Science* 26:1-20.
- Alexander, B., y Zuberer, D. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology of Fertility Soils* 12:39-45.
- Allen, R., Pereira, L., Raes, D., y Smith, M. (1998). Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO. *Irrigation and drainage* 56:300.
- Álvarez, R., y Steinbach, H. (2006). Balance de carbono en suelos cultivados. Materia Orgánica. Valor Agronómico y Dinámica en Suelos Pampeanos. ISBN 950-29-0911-9. pp:55-78.
- Amarante, L., Lima, J., y Sodek, L. (2006). Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. *Environmental and Experimental Botany* 58:123-129.
- Andrade, F., y Sadras, V. (2000). Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. INTA. ISBN: 987-521-016-1, 978-987-521-016-5. pp:443.
- Andriani, J. (2012). Desarrollo y validación del software de balance hídrico de cultivos extensivos "BAHICU". XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Actas del Congreso, Mar del Plata, Argentina.
- Angelini, J., Ibáñez, F., Taurian, T., Tonelli, M., Valetti, L. y Fabra, A. (2011). A Study on the Prevalence of Bacteria that Occupy Nodules within Single Peanut Plants. *Current Microbiology* 62(6):1752-1759.
- Arrese-Igor, C., Minchin, F., Gordon, A., y Nath, A. (1997). Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. *Journal Experimental Botany* 48:905-913.
- Atkins, C. (2000). Biochemical aspects of assimilate transfers along the phloem path: N-solutes in lupins. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:531-537.
- Austin, A., Bustamante, M., Nardoto, G., Mitre, S., Perez, T., Ometto, J., Ascarrunz, N., Forti, M., Longo, K., Gavito, M., Enrich-Prast, A., y Martinelli, L. (2013). Latin America's nitrogen challenge. *Science* 340:149.
- Bacanamwo, M., y Purcell, L. (1999). Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *Journal Experimental Botany* 50:689-696.
- Bailly, A., y Weisskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth. *Plant Signaling and Behavior* 7:1-7.
- Bakker, A., y Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. Mediated plant growthstimulation. *Soil Biology Biochemistry* 19 (4):451-457.
- Balatti, P. (2007). De la biología del Suelos a la Agricultura. (Thuar, A., Cassan, F., y Olmedo, C., eds). La diversidad de los rizobios que nodulan soja. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Argentina. pp:53-62.

- Bandinck, A., y Dick, R. (1999). Field management effects on soil enzymes activities. *Soil Biology Biochemistry* 31:1471-1479.
- Baral, B., Teixeira da Silva, J., y Izaguirre-Mayoral, M. (2016). Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. *Journal of Plant Physiology* 193:97-109.
- Barbosa-Torres, N. (2016). Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia.
- Barea, J. (1991). Cuantificación de la fijación. (Olivares, J., Barea, J. M). Fijación y movilización biológica de nutrientes. Madrid, CSIC. Pp:105-120.
- Baronio, A., y Vianco, A. (2013). Análisis exploratorio, estrategia para la selección de variables. Universidad Nacional de Villa María. Universidad Nacional de Río Cuarto. <http://www.econometricos.com.ar/wcontent/uploads/2012/11/BARONIO-VIANCO>
Análisis-exploratorio-Guia-de-Clase.pdf.
- Baronio, A., y Vianco, A. (2014). Análisis Exploratorio ACP interpretación de resultados. Universidad Nacional de Villa María. Universidad Nacional de Río Cuarto. <http://www.econometricos.com.ar/wpcontent/uploads/2012/11/BARONIO-VIANCO-Analisis-exploratorio-ACP-Guia-de-Clases.pdf>.
- Bashan, Y. (2005). Encyclopaedia of soils in the environment. Ed Hillel, D. pp:103-115.
- Bazin, M., Markham, P., Scott, E., y Lynch, J. (1990). Population dynamics and rhizosphere interactions. The Rhizosphere. Lynch, J.M. (ed). Chichester: Wiley and Sons. pp:99-127.
- Becana, M., Aparicio-Tejo, P., y Sánchez-Díaz, M. (1985). Nitrate and nitrite reduction by alfalfa root nodules: Accumulation of nitrite in *Rhizobium meliloti* bacteroids and senescence of nodules. *Physiology Plant* 64:353-358.
- Becana, M., Aparicio-Tejo, P., y Sánchez-Díaz, M. (1988). Nitrate and hydrogen peroxide metabolism in *Medicago sativa* nodules and possible effect of leghemoglobin function. *Physiology Plant*. 82:755-761.
- Becana, M., y Klucas, R. (1992). Transition metals in legume root-nodules. Iron dependent free radical production increases during nodule senescence. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 89: 8958-8962.
- Becana, M., y Sprent, J. (1987). Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiologia Plantarum. International Journal of Plant Biology* 70:757-765.
- Bedmar E., Robles, E., y Delgado, M. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogenfixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society* 33:141-144.
- Bedmar, E., Bueno, E., Correa, D., Torres, M., Delgado, M., y Mesa, S. (2014). Ecology of Denitrification in Soils and Plant-Associated Bacteria. *Beneficial Plant Microbial Interactions* 8:164-182.
- Bellaloui, N. (2011). Effect of water stress and foliar boron application on seed protein, oil, fatty acids, and nitrogen metabolism in soybean. *American Journal of Plant Sciences* 2:692-701.
- Bergersen, J. (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. J. Wiley and sons, New York. pp:50-75.
- Berks, B., Ferguson, S., Moir, J., y Richardson, D. (1995). Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1232:97-173.

- Bianchini, A. (2007). Nutrición en soja. Aapresid. VIII Congreso Nacional de Soja. Rosario. Argentina.
- Bianco, C., Kraus, T., y Núñez, C. (2007). Botánica Agrícola. (Segunda edición). Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina. pp:498.
- Blake, G., y Hartge, K. (1986). Bulk Density, en Methods of soil análisis. Part 1. Segunda edición, ASA.SSSA. *Physical and Mineralogical Methods* 9:363-375.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., y Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum*, and posible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (4):874-880.
- Bolsa de Cereales Rosario. (2015). En: <http://www.bcr.com.ar/default.asp>. Consultado: 15-06-2015.
- Booger, F., y Van Rossum, D. (1997). Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 5-27.
- Bowen, G., y Rovira, A. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bragachini, M., von Martini, A., Méndez, A. (2013). Pérdidas de cosecha. Evaluación y tolerancias en cosecha de Soja, Maíz, Girasol y Trigo. Proyecto Agricultura de Precisión INTA Manfredi. Argentina.
- Bray, R., y Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science* 59:9-45.
- Bremner, J., y Mulvaney, C. (1982). Regular Kjeldahl Method. *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. Page AL (ed). American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of América, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA.
- Brewin, N. (2004). Plant Cell Wall remogelling in *Rhizobium*-Legume simbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23(4):293-316.
- Bric, J., Bostock, R., y Silverstone, S. (1991). Rapid in Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2):535-538.
- Broughton, W., Zhang, F., Perret, X., y Staehelin, C. (2003). Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil* 252:129-137.
- Caba, J., Lluch, C., Hervás, A., y Ligeró, F. (1990). Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiologia Plantarum* 79:531-539.
- Camacho, M., Burgos, A., y Chamber-Pérez, M. (2003). Nitrogen fixation in transposon mutants from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 impaired in nitrate reductase. *Journal Plant Physiology* 160:377-386.
- Camargo, D. (2012). Efecto de la inoculación con rizobios en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de grado. Universidad del Táchira. Venezuela.
- Carpena, R., Esteban, E., Lucena, J., Peñalosa, J., Vázquez, S., Zorzona, P., y Gárate, A. (2006). Simbiosis y recuperación de suelos. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada. pp: 255-268.

- Castro, L., y Acuña, O. (1992). Determinación de la concentración de ureídos en tres leguminosas fijadoras de nitrógeno: Soya, Frijol y Maní. *Agronomía Costarricense* 16(2):187-193.
- Cataldo, D., Haroon, N., y Schrader-Young, V. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Soil Science and Plant Analysis* 6:71-80.
- Cattelan, A., Hartel, P., Fuhmann, J. (1999). Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* 63:1670-1680.
- Cebon, A., y Garnier, J. (2005). *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research* 39:4979-4992.
- Chabot, R., Antoun, H., y Cescas, M. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli*. *Plant and Soil* 184:311-321.
- Chamber-Pérez, M., Camacho-Martínez, M., Soriano-Niebla, J. (1997). Nitrate reductase activities of *Bradyrhizobium* spp. in tropical legumes: effects of nitrate on O₂ diffusion in nodules and carbon costs of N₂ fixation. *Journal Plant Physiology* 150:92-96.
- Cholaky, S., Cantero-Gutiérrez, A., Giayetto, O., Bonadeo, E., y Neuman, E. (1986). Fertilización nitrogenada y modelos de siembra en soja de hábito determinado. *Rev. UNRC* 6(2):133-166.
- Ciampitti, I. (2016). Fijación Biológica del Nitrógeno: una mirada desde el cultivo de soja. XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo. UniRío ed. Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN: 978-987-688-170-8.
- Cicore, P., Sainz-Rozas, H., Echeverría, H., y Barbieri, P. (2004). Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en un cultivo de soja bajo diferentes condiciones de manejo. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo - II Simposio Nacional sobre Suelos Vertisólicos. Quintero, C.E., Boschetti N.G. y E.L. Díaz (Ed.), Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo. Argentina.
- Collier, R., y Tegeder, M. (2012). Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *The Plant Journal* 72:355-367.
- Collino, D., de Luca, M., Peticari, A., Urquiaga, S., y Racca, R. (2007). Aporte de la FBN a la nutrición de la soja y factores que la limitan en diferentes regiones del país. Actas XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Los Cocos. Córdoba. Argentina.
- Collino, D., Salvagiotti, F., Peticari, A., Piccinetti, C., Ovando, G., Urquiaga, S., y Racca, R. (2015). Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with cop, soil, and meteorological factors. *Plant and Soil* 392: 239-252.
- Cooper, H., y Clarkson, D. (1989). Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals: a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany* 40:753-762.
- Covelli, J. (2013). Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: Aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. IBBM-CONICET.
- Cregg, B., y Zhang, J. (2000). Carbon Isotope Discrimination as a Tool to Screen for Improved Drought Tolerance. Proceedings of the 11th Metropolitan Tree Improvement Alliance (METRIA) Conference held in Gresham, Oregon, August 23-24. Landscape Plant Development Center.

- Crivisqui, E. (1993). Análisis factorial de Correspondencias: Un instrumento de Investigación en Ciencias Sociales. Bruselas, LMTD Université Libre de Bruxelles. Universidad Católica de Asunción. Asunción. Paraguay.
- Crivisqui, E. (2002). Iniciación a los métodos estadísticos multivariados. Université Libre de Bruxelles, Bélgica. <http://www.econometricos.com.ar/teoria/analisis/exploratorio/>.
- D'Antuono, A. (2006). Aspectos moleculares de la interacción *Mesorhizobium loti* –*Lotus* spp. Tesis presentada para optar al título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional de General San Martín. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas.
- de Felipe, M. (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada. pp. 9-16.
- Delamuta, J., Ribeiro, R., Ormenño-Orrillo, E., Melo, I., Martínez-Romero, E., y Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:3342-3351.
- Delfini, R., Belgoff, C., Fernández, E., Fabra, A., y Castro, S. (2010). Symbiotic nitrogen fixation and nitrate reduction in two peanut cultivars with different growth habit and branching pattern structures. *Plant Growth Regulation* 61:153-159.
- Delgado, M., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E., y Muller, P. (2003). *Microbiology* 149:3395-3403.
- Delgado, M., Casella, S., y Bedmar, E. (2007). Denitrification in rhizobia-legume symbiosis. Bothe H, Ferguson S. J; Newton WE (eds). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier. The Netherlands. pp:83-93.
- Delgado, M., y Bedmar, E. (2006). Metabolismo anaeróbico del nitrato en bacterias simbióticas: respiración y desnitrificación. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Universidad de Granada. ISBN: 84-611-1198-5. pp:93-101.
- Derka, C., y Sánchez, A. (2006). Cultivo del maní (*Arachis hypogaea*). En: http://www.inta.gov.ar/saenzpe/actual/06/marzo/Cultivo_de_mani.pdf.
- Di Ciocco, C., Álvarez, R., Andrada, Y., y Momo, F. (2004). Balance de nitrógeno en un cultivo de soja de segunda en la pampa ondulada. *Ciencia del Suelo* 22(1):48-51.
- Di Ciocco, C., Coviella, C., Penón, E., Díaz-Zorita, M., y López, S. (2008). Short communication. Biological fixation of nitrogen and N balance in soybean crops in the pampas region. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6:114-119.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., y Robledo, C. (2014). Infostat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Diaz, R., y Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321:5891. pp:926-929.
- Díaz-Leal, J. (2012). Caracterización molecular del metabolismo del alantoato en judía (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Córdoba, España.
- Dixon, R., y Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2:621-631.

- Domingo-Yagües, J., Ferreyra, R., Langhi, R., Pausich, G., Pezzola, A., y Coma, C. (2012). Campaña Sojera 2010-2011. INTA, Red de Información Agropecuaria Nacional (RIAN). <http://inta.gob.ar/documentos/campana-sojera-2010-2011-republica-argentina>. Consultado: diciembre 2016.
- Doorenbos, J., y Pruitt, W. (1997). Las necesidades de agua de los cultivos. Serie, Riego y Drenaje. Estudio FAO. Roma. *Irrigation and drainage* 56:194.
- Downie, J. (2014). Legume nodulation. *Current Biology* 24:184-190.
- Doyle, J. (2001). Leguminosae. San Diego, Academic Press. In *Encyclopedia of Genetics*. Brenner S, Miller JH. pp:1081-1085.
- Doyle, J. (2011). Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:1289-1295.
- Doyle, J., y Luckow, M. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131:900-910.
- Echeverría, H., y Sainz Rozas, H. (2014). Nitrógeno. Capítulo 7. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. (Echeverría, H., y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp:189-228.
- Elsheikh, E. (1998). Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Annals of Applied Biology*. FAO 132:507-524.
- FAO. (2015). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. Perspectivas para el medio ambiente. Agricultura y medio ambiente. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. ISBN 92-5-304761-5. pp:97.
- Farquhar, G., Ehleringer, J., y Hubick, K. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:503-537.
- Fehr, W., y Caviness, C. (1977). Stages of soybean development. Economics Experiment Station-Iowa State University. Ames, Iowa. Special Report. Agriculture and Environment Extension Publications. *Agriculture and Natural Resources* 80:11.
- Fernández, L., Perotti, E., Sagardoy, M., y Gómez, M. (2008). Denitrification activity of *Bradyrhizobium* sp. isolated from argentine soybean cultivated soils. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24:2577-2585.
- Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M., y Sagardoy, M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo* 23(1):31-37.
- Fernández-Canigia, M. (2003). Factores determinantes de la nodulación. Manual de nodulación. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp:53.
- Francis, C., Beman, J., y Marcel, M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *International Society for Microbial Ecology* 1: 19-27.
- Fujikake, H., Yashima, H., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., y Ohyama, T. (2002). Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N₂ fixation activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Nutrition and Soil Science* 48:211-217.
- Fullana, C. (2012). Efecto del cadmio en cepas de *Bradyrhizobium japonicum* caracterizadas por su actividad desnitrificante: implicancia del glutatión en la estrategia de tolerancia. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina.

- Fulltec. (2012). Paleta de productos para soja. Taller en el congreso de Aapresid. <https://fitoestimulantesfulltec.wordpress.com/2012/09>.
- Gage, D. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2)280-300.
- Galloway, J., Dentener, F., Capone, D., Boyer, E., Howarth, R., Seitzinger, S., Asner, G., Cleveland, C., Green, P., Holland, E., Karl, D., Michaels, A. Porter, J., Townsend, A., y Vöosmarty, C. (2004). Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70(2)153-226. DOI:10.1007/s10533-004-0370-0.
- García de Salamone, I. (2013). Utilización de la rizobacteria *Azospirillum* para aumentar el crecimiento vegetal y la sostenibilidad agrícola. Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación en Argentina. (Segunda edición). Ed. Magna. ISBN 978-987-1726-17-2. pp:367-381.
- García, F. (2007). Sustentabilidad de los suelos agrícolas de la región pampeana: Rol de la fertilidad y su relación con la biología del suelo. De la biología del suelo a la agricultura. (Thuar, A., Cassán, F., Omedo, C.). 1º Ed. Rio Cuarto: Universidad Nacional de Río Cuarto. pp:261-273.
- García, F., Boxler, M., Minteguiaga, J., Pozzi, R., Firpo, L., Ciampitti, I., Correndo, A., Bauschen, F., Berardo, A., y Reussi-Calvo. (2010). La red de nutrición de la región CREA sur de Santa Fe. Resultado y conclusiones de los primeros diez años 2000-2009. AACREA. Buenos Aires. pp:64-79.
- García, F., Picone, L., y Ciampitti, I. (2014). Fósforo. Capítulo 8. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. (Echeverría, H., y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp:229-264.
- García, F., y Correndo, A. (2012). Cálculo de requerimientos nutricionales. IPNI. Programa Latinoamérica. Cono Sur. <http://lacs.ipni.net/article/LACS-2014>.
- García-Plazaola, J., Becceril, J., Arrese-Igor, C., Hernández, A., González-Murua, C., y Aparicio-Tejo, P. (1993). Denitrifying ability of thirteen *Rhizobium meliloti* strains. *Plant Soil* 149:43-50.
- Giller, K. (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems. (Segunda edición). CAB International, Wallingford, UK., ISBN-10:0851986714.
- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. Volume: 2012. Article ID 963401. pp:15.
- González, E., Gálvez, L., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., y Arrese-Igor, C. (2006). Metabolismo carbonado y nitrogenado en nódulos. *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones* 18:194-206.
- González, N. (2002). Algunos elementos de juicio para interpretar el fenómeno de la nodulación en soja. Publicación de las Jornadas de Cosecha Gruesa. INTA CIAM, Mar del Plata. pp:4.
- González, N., Peticari, A., Stegman, B., y Rodríguez-Cáceres, E. (1997). Nutrición nitrogenada. (Giorda, L.M. y Baigorri, H.E.J. Eds.) El cultivo de la soja en Argentina. INTA. Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez EE Manfredi. Coordinación Subprograma Soja. pp:187-198.
- Graham, P. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 38:475-484.

- Graham, P., y Vance, C. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877.
- Gutiérrez-Boem, F., y Salvaggiotti, F. (2014). Soja. Capítulo 16. *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos*. (Echeverría, H., y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp:479-508.
- Gutiérrez-Mañero, F., Lucas-García, J., Probanza-Lobo, A., y Ramos-Solano, B. (2006). Interacción planta-microorganismos en un ecosistema denominado rizósfera. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Universidad de Granada. Granada. ISBN: 84-611-1198-5. 22. pp:244-254.
- Hadri, A., Spaink, H., Bisseling, T., y Brewin, N. (1998). Diversity of root nodulation and rhizobial infection process. The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria (Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp:347-360.
- Hardarson, G. (1990). Use of Nuclear Techniques in Studies of Soil- Plant Relationships. Vienna. Training course series No 2. Vienna. International Atomic energy Agency (IAEA). pp:129-155.
- Harpaz, Y. (1975). Simulation of the nitrogen balance in semi-arid regions. Thesis for the Degree Doctor of Philosophy, Hebrew University, Jerusalem, Israel.
- Harper, J. (1987). Nitrogen Metabolism. In Soybeans: Improvement, Production and Uses (Segunda edición) American Society of Agronomy. Inc.-Crop Science Society of America, Inc.-Soil Science Society of America, Inc.: Madison, WI, USA. pp:497-533.
- Harper, J. (1987). Nitrogen metabolism. Soybeans: Improvement, production and Uses. (Segunda edición). Agronomy Monograph 16. ASA-CSSA-SSSA. pp:497-533.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Mahmud, J., Hossain, M., y Fujita, M. (2016). Soybean Production and Environmental Stresses. *Environmental Stresses in Soybean Production* 2:61-102.
- Herridge, D., Peoples, M., y Boddey, R. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311:1-18.
- Herridge, D., Robertson, M., Cocks, B., Peoples, M., Holland, J., y Heuke, L. (2005). Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. *Journal Experimental Agriculture* 45:269-277.
- Herridge, D., y Peoples, M. (1990). The ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. *Plant Physiology* 93:425-503.
- Ho, Y., Hsieh, H., y Huang, C. (2011). Biochemical characterization of allantoinase from *Escherichia coli* BL21. *The Protein Journal* 30:384-394.
- Hoagland, D., y Arnon, D. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station 347:1-39.
- Hossain, M., y Martensson, A. (2008). Potential use of *Rhizobium* spp. to improve fitness of non-nitrogen-fixing plants. Acta Agriculturae Scandinavica Section B. *Soil and Plant Science* 58:352-358.
- Hungria, M., Boddey, L., Santos, M., y Vargas, M. (1998). Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biology and Fertility of Soils* 27(4):393-399.

- Hungria, M., Franchini, J., Campo, R., Crispino, C., Moraes, J., Sibaldelli, R., Mendes, I., y Arihara, J. (2008). Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science* 86:927-939.
- Hungria, M., Franchini, J., Campo, R., y Graham, P. (2005). The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer. Netherlands. pp:25-42.
- Hungria, M., y Campo, R. (2005). Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30, Pernambuco. Solos, sustentabilidade e qualidade ambiental. Pernambuco: SBCS, UFPE; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. pp:1-30.
- Hungria, M., y Vargas, M. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65 (2-3):151-164.
- Hymowitz, T., y Shurtleff, W. (2005). Debunking Soybean Myths and Legends in the Historical and Popular Literature. *Crops Science* (45):473-476.
- Ibañez, F. (2009). Estudios genéticos, moleculares y fisiológicos de la interacción entre maní (*Arachis hypogaea* L.) y bacterias asociadas a sus nódulos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Río Cuarto.
- ICARDA. (1990). Chickpea biological nitrogen fixation. ICARDA. Food legume improvement program. The internacional center of agricultural research in the dry area. Annual reporter, Aleppo, Syria. pp:96-107.
- INTA. (2006). Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba. Los Suelos. Agencia Córdoba Ambiente. Área Subcoordinación Suelo. EEA Manfredi. Córdoba. Argentina.
- INTA. (2013). Cosecha de Soja con Valor Agregado en Origen. Actualización técnica N° 77. Ed. Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria. pp:32.
- Jackson, M. (1964). Método: Extracción de los cationes canjeables del suelo mediante acetato de amonio a pH 7. Análisis Químico de Suelos. Omega. Barcelona.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., y Barea, J. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustentable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology Fertility Soils* 37:1-16.
- Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga, E., y Walker, G. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology* 5:619-633.
- Kanayama, Y., Kimura, K., e Ike, T. (1999). Purification and characterization of nitrate reductase from nodule cytosol of soybean plants. *Physiology Plant* 105:396-401.
- Kantolic, A., Giménez, P., de la Fuente, E. (2003). Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en soja. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. ISBN 950-29- 0713-2. pp:166-201.
- Kaschuk, G., Nogueira, M., de Luca, M., y Hungria, M. (2016). Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. *Field Crops Research* 195:21-27.
- Kerstens, K., y Vancanneyt, M. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. Segunda edición. Michigan State University. East Lansing, MI 48:824-1101.
- Khan, F., y Ansari, A. (2014). Eutrophication: An Ecological Vision. *The Botanical Review* 71(4):449-482.

- Kruse, J., Hetzger, I., Hänsch, R., Mendel, R., Walch-Liu, P., Engels, C., y Rennenberg, H. (2002). Elevated pCO₂ favours nitrate reduction in the roots of wild-type tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Gat.) and significantly alters N-metabolism in transformants lacking functional nitrate reductase in the roots. *Journal Experimental Botany* 53:2351-2367.
- Kunze, M., y Hartig, A. (2013). Permeability of the peroxisomal membrane: lessons from the glyoxylate cycle. *Frontiers Physiology* 4:1-12.
- Labandera, C. (2007). Biofertilizante en Iberoamérica: Una visión técnica científica y empresarial. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. (Izaguirre- Mayoral, M., Labandera, C., Sanjuán, J.). Montevideo. Cooperación Iberoamericana CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo-MGAP. pp:75-78.
- Lam, H., Coschigano, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M., y Coruzzi, G. (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *The Plant Cell* 7:887-898.
- Lambert, R., y Dubois, R. (1971). Spectrophotometric determination of nitrate in the presence of chloride. *International Journal of Analytical Chemistry* 43:955-957.
- Lang, P., Martin, R., Golvano, M. (1993). Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in root nodules of *Lupinus albus*. *Plant Physiology Biochemistry* 31:639-648.
- Larson, W., y Pierce, F. (1994). The dynamics of soil quality as a measure of a sustainable management. Defining soil quality for a sustainable environment. *Soil Science*. Soc América Spec. Doran J. (ed). Pub. No 35 Madison, USA. pp:37-51.
- Lavania, M., y Nautiyal, C. (2013). Solubilization of tricalcium phosphate by temperature and salt tolerant *Serratia marcescens* NBRI1213 isolated from alkaline soils. *African Journal of Microbiology* 7(34):4403-4413.
- Lee, R., y Rudge, K. (1986). Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. *Annals of Botany* 57:471-486.
- Leidi, E., y Rodríguez-Navarro, D. (2000). Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytologist* 147:337-346.
- León-Barrios, M., Vega-Hernández, M., y Pérez-Galdona, R. (2006). El ácido indol-3-acético, una hormona vegetal sintetizada por los rizobios. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Universidad de Granada. Granada. ISBN: 84611-1198-5. 7. pp:64-78.
- Li, X., Jiang, H., Liu, F., Cai, J., Dai, T., Cao, W., y Jiang, D. (2013). Induction of chilling tolerance in wheat during germination by pre-soaking seed with nitric oxide and gibberellin. *Journal Plant Growth Regulation* 71:31-40.
- Ligero, F., Caba, J., Lluch Plá, C., y Olivares, J. (1991). Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiology* 97:1221-1225.
- Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J., y Watson, C. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31:155-172.
- Lluch Plá, C. (2015). Microorganismos para la Agricultura del Futuro. Discurso para el Acto de su Recepción como Académica Numeraria. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada.
- Lodeiro, A. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología* 47(3):261-273. ISSN 0325-7541.

- Lodwig, E., y Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(1):37-78.
- López, S. (2015). Análisis de las alteraciones estructurales y/o regulatorias en los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, en aislados de *Bradyrhizobium japonicum* que difieren en su capacidad para fijar nitrógeno. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- López, S., Pastorino, G., Martínez-Alcántara, V., Salvucci, D., y Balatti, P. (2013). Microbiología Agrícola: un aporte de la investigación en Argentina. Los rizobios que nodulan soja en sitios con ambientes nativos y cultivados de la Argentina. (Segunda edición). Tucumán: Magna Publicaciones. pp:237-252.
- Lucinski, R., Polcyn, W., y Ratajczak, L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica* 49:537-546.
- Mahne, I., y Tiedje, J. (1995). Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1110-1115.
- Mapope, N., y Dakora, F. (2016). N₂ fixation, carbon accumulation, and plant water relations in soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties sampled from farmers' fields in South Africa, measured using ¹⁵N and ¹³C natural abundance. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 221: 74-186.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. London and San Diego: Academic Press. (Segunda edición). pp:889.
- Mateo- Box, J. (2005). Prontuario de agricultura, Madrid, Mundi Prensa. pp:940.
- Mattson, M., Lundborg, T., y Larson, C. (1991). Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. I. Growth and nitrate uptake kinetics in vegetative cultures grown at different relative addition rates of nitrate-N. *Journal Experimental Botany* 43:15-23.
- Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., y Mergaert, P. (2008). Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. Cell biology of nodule infection and development. (Dilworth, M., James, E., Sprent, J., y Newton, W. eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp:153-189.
- Mc Clure, P., e Israel, D. (1979). Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology* 64:411-416.
- Mc Dermott, T., y Graham, P. (1989). *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Applied Environmental Microbiology* 55: 2493-2498.
- Mc Lean, E. (1982). Soil pH and lime requirement. In Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. Page AL (ed) American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher. Madison. Wisconsin, USA.
- Meakin, G., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E., Richardson, D., y Delgado, M. (2007). The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* 53:411-419.
- Melgar, R. (2009). How much more can South America farmers pay for fertilizers. Fertilizantes Latinoamerica. Panama City, Panama. January. pp:18-20.
- Melgar, R., Vitti, G., y Benites, V. (2011). Fertilizando para altos rendimientos. Soja en Latinoamérica. IIP Boletín No 20. Estación Experimental de Pergamino, Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

- Menna, P., Barcellos, F., y Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(12):2934-2950.
- Mesa, S., de Dios Alché, J., Bedmar, E., y Delgado, M. (2004). Expresión on the *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiology Plant* 120:205-211.
- Miller, A., Fan, X., Shen, Q., y Smith, S. (2007). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* 59(1)111-119.
- Minchin, F., James, E., y Becana, M. (2008). Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. y Newton W.E. (eds.). Springer Science. pp:321-362.
- Miransari, M. (2011). Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology Biotechnology* 92:875-885.
- Miransari, M. (2014). Plant growth promoting rhizobacteria. *Journal Plant Nutrition* 37:2227-2235.
- Miransari, M. (2016). Soybean N fixation and production of soybean inocula. Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production. Soybean Production. pp:107-129.
- Miransari, M. (2016). Soybean production and N fertilization. Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production. Soybean Production. pp:241-260.
- Monza, J., y Palacios, J. (2004). El Metabolismo del Nitrógeno en las plantas. Fijación Biológica de Nitrógeno en la simbiosis rizobio -leguminosa. (Monza, J., y Márquez, A. eds.). Córdoba, Almuzara. pp:15-38.
- Moreno-Vivian, C., y Ferguson S. (1998). Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Molecular Microbiology* 29:664-666.
- Morón, B., Dardanelli, M., Sousa, C., y Megías, M. (2006). Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada. pp: 160-171.
- Mortimer, P., Perez-Fernandez, M., y Valentine, A. (2008). Photosynthetic and respiratory C costs of N and P nutrition in the dual symbiosis of a mycorrhizal legume. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1091-1027.
- Mortimer, P., Perez-Fernandez, M., y Valentine, A. (2009). NH₄⁺ nutrition affects the photosynthetic and respiratory C sinks in the dual symbiosis of a mycorrhizal legume. *Soil Biology and Biochemistry* 41:2115-2121.
- Mumns, D. (1987). Nitrogen fixation potential of bean (*P. vulgaris*) compared with other grains legumes under controlled conditions. *Plant and Soil* 98(2):169-182.
- Myrold, D. (2005). Transformations of nitrogen. Principles and Applications of Soil Microbiology (Segunda edición). Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, Eds. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. pp:333-372.
- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., Sugiyama, A., Shimamura, M., Takanashi, K., Yazaki, K., Aoki, T., Shibuya, N., y Kouchi, H. (2011). From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptorlike kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Journal Plant* 65:169-180.

- Näsholm, T., Kielland, K., y Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182:31-48.
- Nelson, D., y Sommers, L. (1973). Determination of total nitrogen in plant material. *Journal Agronomy* 65:109-112.
- Nelson, L. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for new inoculants. *Crop Manage.* <http://plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria>. doi: 10.1094/CM-2004-0301-05. pp:305-310.
- Niklas, K. (2008). The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. Carbon/nitrogen/phosphorus allometric relations across species. (White, P., y Hammond, J. eds.). pp:9-30.
- O' Hara, G., y Daniel, R. (1985). Rhizobial denitrification: a review. *Soil Biology Biochemistry* 17:1-9.
- Obando-Castellanos, M., Donadio, F., Bedmar, E., Cassán, F., Bashan, Y., y Bashan, L. (2016). Emisión de gases invernadero en la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja. XXVII Reunión Latinoamericana de Rizobiología (RELAR). Londrina, Brasil. pp:195.
- Ohyama, T., Minagawa, R., Ishikawa, S., Yamamoto, M., Van Phi Hung, N., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Sato, T., Nagumo, Y., y Takahashi, Y. (2012). Soybean Seed Production and Nitrogen Nutrition. *Intech open science/open minds*. Chapter 6. pp:115-157.
- Okumoto, S., y Pilot, G. (2011). Amino acid export in plants: a missing link in nitrogen cycling. *Molecular Plant* 4:453-463.
- Oldroyd, G., y Downie, J. (2008). Coordination nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Reviews Plant Biology* 59:519-546.
- Olivares-Pascual, J. (2008). www.eez.csic.es/olivares/ciencia/fijacion/index.html.
- Pagano, M., y Miransari, M. (2016). The importance of soybean production worldwide. *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. Soybean Production. pp:1-26.
- Paredes, M. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Tesis de grado de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- Parker, M., y Harris, H. (1977). Yield and leaf nitrogen of nodulating and non-nodulating soybeans as affected by nitrogen and molybdenum. *Agronomy Journal* 69:551-554.
- Parsons, R. (2004). Plant - Microbe Metabolism. Disponible en: www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm.
- Pate, J. (1983). Patterns of nitrogen metabolism in higher plants and their ecological significance. (Lee JA, McNeill S, Rorison H, eds). *Nitrogen as an ecological factor*. Oxford: Blackwell Scientific Publishing. pp:225-255.
- Pate, J., Sharkey, P., y Lewis, O. (1975). Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique [*Lupine*, *Spartium junceum*]. *Journal Plant* 122:11-26.
- Patriarca, E., Taté, R., Ferraioli, S., y Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *International Reviews of Cytology* 234:201-262.
- Perret, X., Staehelin, C., y Broughton, W. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(1):180-201.

- Perticari, A. (2004). Impacto de la fijación biológica de nitrógeno en la producción de soja. *Fertilizar* N° 34.
- Perticari, A., Arias, N., Baigorri, H., de Battista, J., Montecchia, M., Pacheco-Basrco, J., Simonella, A., Toresani, S., Ventimiglia, L., y Vicente, R. (2003). Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. (Satorre, E., ed). *El libro de la soja*. Buenos Aires. Servicios y Marketing Agropecuario. pp:69-76.
- Perticari, A., Puente, M., Echegaray, R., y Piccinetti, C. (2007). Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica de nitrógeno. De la biología del Suelos a la Agricultura. (Thuar, A., Cassan, F., y Olmedo, C. eds). Río Cuarto. Córdoba. pp:277-291.
- Piccinetti, C., Arias, N., Ventimiglia, L., Díaz-Zorita, M., Murua, L., Sánchez, H., Ferraris, G., Mousegne, F., Fontanetto, H., Sá-Pereira, E., Capurro, J., Enrico, J., López, C., Carrizo, A., Salvaggiotti, F., Collino, D., y Perticari, A. (2013). Efectos positivos de la inoculación de soja sobre la nodulación, FBN y en los parámetros de producción del cultivo. *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación en Argentina. (Segunda Edición)*. pp:283-297.
- Picone, L. (2014). El ambiente fisico-químico del suelo relacionado con la fertilidad. Capítulo 1. *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos*. (Echeverría, H., y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp:31-51.
- Pierre-Vitoria, A., Oliveira-Vieira, T., Barbosa-Camargo, P., y Louis, S. (2016). Using leaf $\delta^{13}\text{C}$ and photosynthetic parameters to understand acclimation to irradiance and leaf age effects during tropical forest regeneration. *Forest Ecology and Management* 379:50-60.
- Pietrarelli, L., Zamar, J., Leguía, H., Alessandria, E., Sánchez, J., Arborno, M., y Luque, S. (2008). Efectos de diferentes prácticas de manejo en la nodulación y en el rendimiento del cultivo de soja. *Agriscientia* 25(2):81-87.
- Pliego, L., Ocaña, A., y Lluch, C. (2003). Crecimiento, Fijación de nitrógeno, acumulación y asimilación de nitratos con dosis de nitrógeno en frijol. *Terra Latinoamericana*, Volume: 21, núm. 2. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo. México. pp:213-223
- Popp, C., y Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14:458-467.
- Puente, M., Gracia, J., Perticari, A., Cassán, F., y Carletti, S. (2013). Efectos de la coinoculación de *Rhizobium* con bacterias del género *Azospirillum* en leguminosas de interés agronómico. *Microbiología Agrícola: Un aporte de la investigación en Argentina. (Segunda Edición)* Ed. Magna. ISBN 978-987-1726-17-2. pp:401-418.
- Purcell, L., Serraj, R., Sinclair, T., y De, A. (2004). Soybean N_2 fixation estimates, Ureide concentration, and yield responses to drought. *Crop Science* 44:484-492.
- Quiles-Luque, F. (2012). Metabolismo de ureidos y nucleótidos durante la germinación y desarrollo inicial de plántulas de *Phaseolus vulgaris*. Tesis doctoral. Universidad Nacional Córdoba. Facultad de Ciencias. Córdoba, España.
- Quiñones, M., Coba de la Peña, T., Ruiz-Díez, B., Ochoa-Hueso, C., García de la Torre, V., Cordero, I., Nonnoi, F., de Felipe, M., Rincón, A., Manrique, E., Fernández-Pascual, M., Lucas, M., Herrera-Cervera, J., y Pueyo, J. (2011). Estrategias para mejorar la tolerancia a estreses abióticos de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Capítulo 8. *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosa plantas-microorganismos*. pp:111-125.

- Racca, R., y Collino, D. (2005). Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. *Actas del Congreso Mundo Soja*. Buenos Aires Argentina. pp:111-120.
- Racca, R., y Collino, D. (2006). Memorias Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde laboratorio hasta la aplicación en campo. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. Universidad Nacional de Bogotá, Colombia.
- Ralston, E., e Ismande, J. (1983). Nodulation of hydroponically grown soybean plants and inhibition of nodule development by nitrate. *Journal Experimental Botany* 34:1371-1378.
- Redondo-Nieto, M., Bonilla, I., y Bolaños, L. (2003). Fijación Biológica de Nitrógeno. www.uam.es/personal_pdi/ciencia/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm.
- Reid, D., Ferguson, B., y Gresshoff, P. (2011). Inoculation and nitrate induced CLE peptides of soybean control NARK dependent nodule formation. Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:606-618.
- Rentsch, D., Schmidt, S., y Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. Edited by Ulf-Ingo Flügge and Julian Schroeder. *FEBS Letters* 581: 2281-2289.
- Robles, E., Delgado, M., y Bedmar, E. (2007). Desnitrificación: de los genes a la agricultura y al medio ambiente. De la Biología del suelo a la Agricultura. (Thuar, A., Cassan, F y Olmedo, C. eds) ISBN: 978-950-665-439-9. pp:15-24.
- Rodríguez, H., y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.
- Rodríguez, J. (1993). Manual de Fertilización. Colección en Agricultura. Facultad de Agronomía. Ediciones de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. pp:362.
- Rodríguez-Navarro, D., Margaret-Oliver, I., Albareda-Contreras, M., Ruiz-Sainz, J. (2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development* 31:173-190.
- Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry Biophysics* 67:10-15.
- Rugova, A., Puschenreiter, M., Koellensperger, G., y Hann, S. (2017). Elucidating rhizosphere processes by mass spectrometry-A review. *Analytica Chimica Acta* 956:1-13.
- Ruiz-Díaz, D., Pedersen, P., y Sawyer, J. (2009). Soybean response to inoculation and nitrogen application following long-term grass pasture. *Crop Science* 49:1058-1062.
- Sa, T., e Israel, D. (1995). Nitrogen assimilation in nitrogen-fixing soybean plants during phosphorus deficiency. *Crop Science* 35:814-820.
- Saito, A., Tanabata, S., Tanabata, T., Tajima, S., Ueno, M., Ishikama, S., Ohtake, N., Sueyoshi, K., y Ohyama, T. (2014). Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *International Journal of Molecular Science* 15:4464-4480.
- Salvagiotti, F., Cassman, K., Specht, J. Walters, D., Weiss, y A., Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. *Field Crops Research* 108:1-13.
- Salvagiotti, F., Specht, J., Cassman, K., Walters, D., Weiss, A., y Dobermann, A. (2009). Growth and nitrogen fixation in highyielding soybean: impact of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* 101:958-970.

- Sánchez, C. (2009). Producción de óxido nítrico en nódulos de soja. Implicación de la desnitrificación. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín. Universidad de Granada. España.
- Sánchez, C., Gates, A., Meakin, G., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D., Bedmar, E., y Delgado, M. (2010). Production of nitric oxide and nitrosyl-leghaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 23:702-711.
- Sánchez, C., Tortosa, G., Granados, A., Delgado, A., Bedmar, E., y Delgado, M. (2011). Involvement of *Bradyrhizobium japonicum* denitrification in symbiotic nitrogen fixation by soybean plants subjected to flooding. *Soil Biology and Biochemistry* 55:381.
- Sandalio, L., y Romero-Puertas, M. (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Annals of Botany* 116:475-485.
- Schubert, K., y Boland, M. (1990). The ureides. The biochemistry of plants. Academic Press, San Diego. pp:197-283.
- Schultze, M., y Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics* 32:297-319.
- Schweiger, P., Hofer, M., Hartl, W., Wanek, W., y Vollmann, J. (2012). N₂ fixation by organically grown soybean in Central Europe: Method of quantification and agronomic effects. *European Journal Agronomy* 41:11-17.
- Seefeldt, L., Dance, I., y Dean, D. (2004). Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry* 43:1401-1409.
- Seiler, R., Fabricius, R., Rotondo, V., Vinocur, M., y Bonacci, B. (1995). Agroclimatología de Río Cuarto 1974/1993. Volume: 1. Cátedra de Agrometeorología-Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.
- Seitzinger, S. (1992). Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Drug Metabolism and Disposition* 20:714-718.
- Serraj, R., Sinclair, T., y Allen, L. (1999). Soybean nodulation and N₂ fixation response to drought under carbon dioxide enrichment. *Plant Cell and Environment* 21:491-500.
- Serraj, R., Sinclair, T., y Purcell, L. (1999). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal Experimental Botany* 50:43-155.
- Serrano, A., y Chamber, M. (1990). Nitrate reduction in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology* 136:240-246.
- Shearer, G., y Kohl, D. (1986). N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:699-756.
- Shelp, B., y Da Silva, M. (1990). Distribution and Metabolism of Xylem-Borne Ureido and Amino Compounds in Developing Soybean Shoots. *Plant Physiology* 94:1505-1511.
- Simon, J., van Spanning, R., y Richardson, D. (2008). The organization of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1777:1480-1490.
- Sinclair, T., Kitani, S., Hinson, K., Bruniard, J., y Horie, T. (1991). Soybean flowering date: linear and logistic models based on temperature and photoperiod. *Crop Science* 31:786-790.

- Sinclair, T., Purcell, L., Vadez, V., Serraj, R., King, C., y Nelson, R. (2000). Identification of Soybean Genotypes with N₂ Fixation Tolerance to Water Deficits. *Crop Science* 40(6):1803-1809.
- Sinclair, T., Vadez, V., y Chenu, K. (2003). Ureide accumulation in response to Mn nutrition by eight soybean genotypes with N fixation tolerance to soil drying. *Crop Science* 43:592-597.
- Siqueira, A., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R., Rodrigues, E., Almeida, L., Barcellos, F., Batista, J., Nakatani, A., Martínez-Romero, E., Vasconcelos, A., y Hungria, M. (2014). Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. *BMC Genomics* 15:420.
- Smith, P., y Atkins, C. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128:793-802.
- Soares-Novo, M., Tanaka, R., Mascarenhas, H., Bortoletto, N., Gallo, P., Alves-Pereira, J., y Teixeira, A. (1999). Nitrogen and potassium in nitrogen symbiotic fixation of winter soybean. *Scientia Agricola* 56:143-156.
- Somasegaran, P., y Hoben, H. (1994). Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer-Verlag, New York. Inc. Sección III, pp:382.
- Spaink, H. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews Microbiology* 54:257-288.
- Sprent, J. (1980). Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant, Cell and Environment* 3:35-43.
- Sprent, J. (2008). 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *Journal of Experimental Botany* 59:1081-1084.
- Sprent, J., y James, E. (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144(2):571-581.
- Stougaard, J. (2000). Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiology* 124:531-540.
- Stouthamer, A., de Boer, A., van der Oost, J., y van Spanning, R. (1997). Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:33-41.
- Streng, A., Camp, R., Bisseling, T., y Geurts, R. (2011). Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling. *Plant Signaling and Behavior* 6:1510-1514.
- Sugiyama, A., Ueda, Y., Takase, H., y Yazaki, K. (2015). Do soybeans select specific species of *Bradyrhizobium* during growth? *Communicative Integrative Biology* 8. e992734.
- Sutton, M., Howard, C., Erisman, J., Billen, G., Bleeker, A., Grenfelt, P., van Grinsven, H., y Grizeti, B. (2011). The European Nitrogen Assessment. Beneficial Plant-microbial Interactions. pp:506-510
- Swain, H., y Abhijita, S. (2013). Nitrogen fixation and its improvement through genetic engineering. *Journal Global Bioscience* 2:98-112.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2010). Cytokinins: regulators of division. En: Licoln Taiz y Eduardo Zeiger (Eds) *Plant Physiology*. (Quinta edición). Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. pp:621-648.
- Takaya, N. (2002). Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94:506-510.

- Talbi, C., Delgado, M., Giraldo, L., Ramírez-Trujillo, A., Caballero-Mellado, J., y Bedmar, E. (2011). *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Applied Environmental Microbiology* 76:4587-4591.
- Tegeder, M. (2014). Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* 65(7):1865-1878.
- Tegeder, M., Ruan, Y., y Patrick, J. (2013). Roles of membrane transporters in phloem functions. (Thompson G, Van Bel A, eds). *Biochemistry of phloem*. Oxford: Wiley-Blackwell. pp:63-101.
- Thomas, 1982; Page, 1982, Rhoades, 1982. SAMLA SAGPyA. (2004). Sistema de Apoyo Metodológico a los Laboratorios de Análisis de Suelos, Agua, Vegetales y Enmiendas Orgánicas. Primera edición, SAGPyA, Dirección de Agricultura. ISBN 987-918440-8.
- Todd, C., Tipton, P., Blevins, D., Piedras, P., Pineda, M., y Polacco, J. (2006). Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* 57:5-12.
- Toresani, S., Bodrero, M., y Enrico, J. (2007). Comportamiento de inoculantes para soja en la zona sur de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR*. Año VII-Nº 11. pp:35-40.
- Torres, D., Benavidez, I., Obando, M., Gualpa, J., y Cassán, F. (2014). Metabolismo del ácido indol-3-acético (AIA) y otras auxinas por *Bradyrhizobium japonicum* E109. II Workshop Latinoamericano sobre PGPR. 21 al 26 de septiembre. La Falda, Argentina.
- Trewavas, A. (1983). Nitrate as a plant hormone. *British Plant Growth Regulator Group Monograph* 9:97-110.
- Tsvetkova, G., Teofilova, T., y Georgiev, G. (2006). Effect of naringenin and quercetin on Activity of nodABC genes of strain d293 and Following nodulation and nitrogen fixation Response of inoculated pea plants (*Pisum sativum* L.). *Applied Plant Physiology* 67-71.
- Uberto, M. (2008). Adaptación de un modelo de simulación para el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) en las condiciones edafoclimáticas de Río Cuarto. Tesis MSc. Ingeniero Agrónomo. FAV-UNRC. Río Cuarto. Córdoba, Argentina. pp:123.
- Udvardi, M., y Poole, P. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobiasymbioses. *Annual Review of Plant Biology* 64:781-805.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, R., Giller, K., Alves, B., y Chalk, P. (2008). Measuring Plant-associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. ACIAR (Australian Council for International Agricultural Research). pp:136-258.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, R., Giller, K., Alves, B., y Chalk, P. (2008). Measuring Plant-associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. ACIAR (Australian Council for International Agricultural Research). pp:136-258.
- van Spanning, R. (2011). Nitrogen Cycling in Bacteria. Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductases: denitrification enzymes with a β -propeller fold. (Moir, J. ed.) Caister Academic Press. Norfolk, UK. pp:135-161.
- van Spanning, R., Richardson, D., y Ferguson, S. (2007). Biology of the Nitrogen Cycle. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. (Bothe, H., Ferguson, S., y Newton, W. eds). *Elsevier*. The Netherlands. pp:83-93.
- Vance, C. (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. (Sapink, H., Kondorosi, A., y Hooykas, J. eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp:509-530.

- Vance, C. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* 127:390-397.
- Vázquez, M., y Pagani, A. (2014). Calcio y magnesio. Manejo de fertilización y enmiendas. Capítulo 11. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. (Echeverría, H., y García, F.). INTA ediciones. (Segunda Edición). Buenos Aires. Argentina. ISBN: 978-987-521-565-8. pp:317-350.
- Velázquez, E., Mateos, P., Trujillo, M., Rivas, R., y Martínez-Molina, E. (2006). Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada. pp:45-52.
- Verma, D., y Hong, Z. (1996). Biogénesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiology* 4:364-368.
- Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N° 15, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Vogels, G., y Van der Drift, C. (1970). Differential Analyses of Glyoxylate Derivatives. *Analytical Biochemistry* 33:143-157.
- Wagner, S. (2011). Biological nitrogen fixation. *Nature Education Knowledge*. pp:3-15.
- Wang, E., Martínez, J., y López, I. (2001). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Microbios. Capítulo 8. www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea.
- Wang, N., Khan, W., y Smith, D. (2012). Changes in soybean global gene expression after application of lipo-chitoooligosaccharide from *Bradyrhizobium japonicum* under sub-optimal temperature. *PLoS One* 7, e31571.
- Werner, A., y Witte, C. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purinering catabolism. *Trends Plant Science* 16:381-387.
- Werner, D. (1992). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:968-989.
- Werner, G., Cornwell, W., Sprent, J., Kattge, J., y Kiers, E. (2014). A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms. *Nature Communications* 5:1-9.
- Xie, F., Murray, J., Kim, J., Heckmann, A., Edwards, A., Oldroyd, G., y Downie, J. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 109. pp:633-638.
- Xing, X., Fang, C., Li, L., Jiang, H., Zhou, Q., Jiang, H., y Wang, S. (2016). Improved drought tolerance by α -naphthaleneacetic acid-induced ROS accumulation in two soybean cultivars. *Journal of Integrative Agriculture* 15(8):1770-1784.
- Xu, G., Singh, S., Reddy, V., Barnaby, J., Sicher, R., y Li, T. (2016). Soybean grown under elevated CO₂ benefits more under low temperature than high temperature stress: Varying response of photosynthetic limitations, leaf metabolites, growth, and seed yield. *Journal of Plant Physiology* 205:20-32.
- Yin, Y., Katahira, R., y Ashihara, H. (2014). Metabolism of purine nucleosides and bases in suspensis on-cultured *Arabidopsis thaliana* cells. *European Chemical Bulletin* 3:925-934.
- Zhang, L., Tan, Q., Lee, R., Trethewy, A., Lee, Y., y Tegeder, M. (2010). Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22:3603-3620.

- Zumft, W. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:533-616.
- Zumft, W. (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal Inorganic Biochemistry* 99:194-215.
- Zumft, W., y Kroneck, P. (2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by bacteria and archaea. *Advances in Microbiology Physiology* 52:107-227.

Anexas

Campañas (2014-2015) y (2015-2016)

Tabla 10. Características activas del Grupo 1

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
H0020c	24,397	21,824	0,247	3,974	28,92	0,000
H2040c	22,393	19,702	0,491	4,199	28,62	0,000
Planta	11,684	9,605	7,515	7,183	12,84	0,000

Tabla 11. Características ilustrativas del Grupo 1

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Variables	Categorías	% Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	1516	100,00	70,27	98,87	31,49	0,000	617
Tratamiento	PER+N	26,23	18,34	99,38	10,81	0,000	161
Tratamiento	USDA+N	24,75	17,88	96,18	9,03	0,000	157
Bloque	1	46,89	39,86	81,71	6,47	0,000	350
Etapa	2	60,16	53,53	78,09	5,88	0,000	470

Tabla 12. Características activas del Grupo 2

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
NNO32040c	629,500	13,130	1,708	51,296	29,52	0,000

Tabla 13. Características ilustrativas del Grupo 2

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Rotulo de variables	Categorías	% Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Tratamiento	USDA+N	100,00	17,88	3,82	4,01	0,000	157
Bloque	2	100,00	30,52	2,24	3,16	0,001	268
Etapa	6	100,00	46,47	1,47	2,33	0,010	408

Tabla 14. Características activas del Grupo 3

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
NNod RS	62,426	16,229	32,523	18,817	18,61	0,000
PSN RS	0,366	0,076	0,202	0,125	17,91	0,000
PSN RP	0,155	0,039	0,085	0,055	16,25	0,000
NNod RP	18,333	5,694	8,557	7,203	13,30	0,000
NNO30020s	21,632	15,405	1,227	4,159	11,35	0,000
NNO32040s	18,856	13,547	1,046	3,547	11,35	0,000
H0020s	21,806	14,621	1,416	4,799	11,35	0,000
n0020s	95,854	68,280	5,433	18,419	11,35	0,000
n2040s	83,563	60,026	4,638	15,723	11,35	0,000
H2040s	18,884	17,571	0,259	0,878	11,35	0,000
NNO30020c	14,205	11,035	0,977	4,555	5,28	0,000
n0020c	62,925	48,891	4,333	20,174	5,27	0,000
n2040c	49,452	39,265	12,898	18,278	4,23	0,000

Tabla 15. Características ilustrativas del Grupo 3

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	1415	98,15	29,73	20,31	11,08	0,000	261
Etapa	6	98,15	46,47	12,99	8,49	0,000	408
Tratamiento	USDA	46,30	11,16	25,51	6,70	0,000	98
Tratamiento	PER	51,85	19,25	16,57	5,45	0,000	169
Bloque	2	48,15	30,52	9,70	2,67	0,004	268

Tabla 16. Características activas del Grupo 4

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
NNO30020s	21,800	15,405	0,000	4,159	25,37	0,000
NNO32040s	19,000	13,547	0,000	3,547	25,37	0,000
H0020s	22,000	14,621	0,000	4,799	25,37	0,000
n2040s	84,200	60,026	0,000	15,723	25,37	0,000
n0020s	96,600	68,280	0,000	18,419	25,37	0,000
H2040s	18,920	17,571	0,000	0,878	25,37	0,000
NNO30020c	17,909	11,035	3,331	4,555	24,90	0,000
n0020c	79,336	48,891	14,758	20,174	24,90	0,000
n2040c	65,045	39,265	17,143	18,278	23,27	0,000

Tabla 17. Características ilustrativas del grupo 4

Cantidad de observaciones: 610. 69,48% del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	1415	100,00	29,73	79,69	26,23	0,000	261
Tratamiento	USDA	23,08	11,16	48,98	5,73	0,000	98
Tratamiento	T2	30,29	17,88	40,13	5,02	0,000	157
Tratamiento	T1	25,48	15,49	38,97	4,27	0,000	136
Bloque	2	37,50	30,52	29,10	2,39	0,008	268

Campaña 2014-2015

Tabla 18. Características activas del Grupo 1 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 116. 44,44% del total

Variables Características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
NNO30020c	20,813	17,178	0,727	3,319	15,80	0,000
n0020c	92,200	76,098	3,238	14,705	15,79	0,000
NNO32040c	17,725	14,006	0,377	3,983	13,47	0,000
n2040c	78,256	61,925	0,125	17,500	13,46	0,000
H0020c	16,118	15,742	0,488	0,578	9,37	0,000
H2040c	13,993	13,348	0,095	1,136	8,20	0,000

Tabla 19. Características ilustrativas del Grupo 1 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 116. 44,44% del total

VARIABLES	Categorías	% Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1415	100,00	100,00	44,44	99,99	0,000	261
Tratamiento	C6=T2	54,31	24,14	100,00	11,02	0,000	63
Tratamiento	C6=T1	45,69	20,31	100,00	9,84	0,000	53

Tabla 20. Características activas del Grupo 2 en la campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 67. 25,67% del total

VARIABLES CARACTERÍSTICAS	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
H2040c	14,150	13,348	0,000	1,136	6,69	0,000
NNod RS	34,224	23,376	20,007	27,288	3,77	0,000
NNod RP	9,687	6,801	6,067	7,678	3,56	0,000
H0020c	15,900	15,742	0,000	0,578	2,59	0,005
PSN RP	0,060	0,046	0,055	0,070	1,91	0,028
PSN RS	0,143	0,113	0,129	0,167	1,69	0,046
Planta	5,015	4,789	2,729	2,689	0,80	0,213

Tabla 21. Características ilustrativas del Grupo 2 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 67. 25,67% del total

Rotulo de variables	Categorías	% Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1415	100,00	100,00	25,67	99,99	0,000	261
Tratamiento	C6=PER	100,00	27,59	93,06	15,84	0,000	72

Tabla 22. Características activas del Grupo 3 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 24. 9,20% del total

VARIABLES CARACTERÍSTICAS	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
PSN RS	0,479	0,113	0,242	0,167	11,27	0,000
NNod RP	23,125	6,801	7,120	7,678	10,91	0,000
NNod RS	80,833	23,376	37,785	27,288	10,80	0,000
PSN RP	0,193	0,046	0,104	0,070	10,79	0,000

Tabla 23. Características ilustrativas del Grupo 3 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 24. 9,20% del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1415	100,00	100,00	9,20	99,99	0,000	261
Tratamiento	C6=USDA	79,17	27,97	26,03	5,30	0,000	73
ETAPA	C4=6	100,00	60,92	15,09	4,51	0,000	159
Bloque	C5=2	66,67	39,46	15,53	2,61	0,004	103

Tabla 24. Características activas del Grupo 4 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 54. 20,69% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
Planta	5,667	4,789	3,091	2,689	2,69	0,004
NNod RP	7,333	6,801	3,873	7,678	0,57	0,284

Tabla 25. Características ilustrativas del grupo 4 en campaña 2014-2015

Cantidad de observaciones: 54. 20,69% del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1415	100,00	100,00	20,69	99,99	0,000	261
Tratamiento	C6=USDA	100,00	27,97	73,97	13,20	0,000	73

Campaña 2015-2016

Tabla 26. Características activas del Grupo 1 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 219. 35,49 del total

Variables características	Media del grupo	Media Global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
H2040c	22,884	22,391	0,277	0,490	18,53	0,000
n2040c	34,238	29,679	3,881	6,064	13,84	0,000
H0020c	24,530	24,397	0,102	0,246	9,98	0,000
Planta	11,950	11,659	7,443	7,511	0,72	0,237

Tabla 27. Características ilustrativas del Grupo 1 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 219. 35,49 del total

Variables	Categorías	% Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1516	100,00	100,00	35,49	99,99	0,000	617
Tratamiento	PER+N	62,10	26,09	84,47	15,09	0,000	161
Tratamiento	C6=T1	37,90	13,45	100,00	13,76	0,000	83

Tabla 28. Características activas del Grupo 2 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 34. 5,51 del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
PSN RS	0,128	0,041	0,060	0,044	12,36	0,000
NNod RS	38,471	13,206	15,538	12,574	12,04	0,000
NNod RP	18,500	5,225	15,722	6,939	11,47	0,000
PSN RP	0,077	0,032	0,054	0,033	8,69	0,000
H2040c	22,820	22,391	0,467	0,490	5,25	0,000
n2040c	34,529	29,679	4,730	6,064	4,79	0,000
H0020c	24,549	24,397	0,112	0,246	3,70	0,000
Planta	13,559	11,659	6,856	7,511	1,52	0,065
NNO30020c	8,700	8,437	0,495	1,465	1,08	0,141
n0020c	38,548	37,382	2,195	6,488	1,08	0,141

Tabla 29. Características ilustrativas del Grupo 2 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 34. 5,51 del total

Rotulo de variables	Categorías	% Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1516	100,00	100,00	5,51	99,99	0,000	617
Tratamiento	C6=PER+N	73,53	26,09	15,53	5,80	0,000	161
ETAPA	C4=2	100,00	59,64	9,24	5,58	0,000	368
Bloque	C5=3	70,59	26,90	14,46	5,31	0,000	166

Tabla 30. Características activas del Grupo 3 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 237. 38,41 del total

Variables características	Media del grupo	Media Global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
n0020c	43,420	37,382	3,268	6,488	18,24	0,000
NNO30020c	9,799	8,437	0,739	1,465	18,23	0,000
H0020c	24,458	24,397	0,059	0,246	4,82	0,000
Planta	12,797	11,659	7,933	7,511	2,93	0,002

Tabla 31. Características ilustrativas del Grupo 3 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 237. 38,41 del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1516	100,00	100,00	38,41	99,99	0,000	617
Tratamiento	C6=USDA+N	60,34	25,45	91,08	16,06	0,000	157
Tratamiento	C6=T2	39,66	15,24	100,00	14,17	0,000	94

Tabla 32. Características activas del Grupo 4 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 6. 0,97% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
NNO32040c	629,500	12,760	1,708	61,132	24,81	0,000
n0020c	40,770	37,382	0,000	6,488	1,28	0,100
NNO30020c	9,200	8,437	0,000	1,465	1,28	0,100

Tabla 33. Características ilustrativas del grupo 4 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 6. 0,97% del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1516	100,00	100,00	0,97	99,99	0,000	617
Tratamiento	C6=USDA+N	100,00	25,45	3,82	3,48	0,000	157
Bloque	C5=2	100,00	26,74	3,64	3,40	0,000	165
ETAPA	C4=6	100,00	40,36	2,41	2,64	0,004	249

Tabla 34. Características activas del Grupo 5 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 121. 19,61% del total

Variables características	Media del grupo	Media global	Desviación estándar del grupo	Desviación estándar global	Prueba de valor	Probabilidad
NNod RS	19,653	13,206	13,514	12,574	6,29	0,000
NNod RP	8,165	5,225	6,491	6,939	5,19	0,000
PSN RP	0,037	0,032	0,026	0,033	1,27	0,102

Tabla 35. Características ilustrativas del grupo 5 en campaña 2015-2016

Cantidad de observaciones: 121. 19,61% del total

Rotulo de variables	Categorías	% de Categoría en el grupo	% Categoría en el conjunto	% del grupo en categoría	Prueba de valor	Probabilidad	Peso
Campaña	C3=1516	100,00	100,00	19,61	99,99	0,000	617
Tratamiento	C6=PER	79,34	15,72	98,97	19,78	0,000	97
Tratamiento	C6=USDA	20,66	4,05	100,00	8,92	0,000	25
ETAPA	C4=6	50,41	40,36	24,50	2,40	0,008	249

26