

Paredes, María Carolina

*Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas
y gramíneas*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Paredes, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf> [Fecha de consulta:.....]

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: María Carolina Paredes

Profesor Tutor: María Cristina Zarrabeitía de Amuchástegui

Febrero 2013

Prefacio

Quiero expresar mis agradecimientos a:

Mi madre, que fue y es la persona que me acompaña y contiene en todo momento. Me apoyó incondicionalmente durante mi carrera y a lo largo de todos mis estudios.

Mis tíos, Alicia y Horacio y mis primos, Diego y Eduardo. Ellos me han acompañado a mí y a mi mamá a lo largo de todos aquellos momentos importantes de la vida.

Mi sobrina Clarita, que es la luz de mis ojos.

Mis amigas de la infancia (Soledad, Florencia, Diana, Luciana, Oky, Rocío, Bárbara y Natalí), que siempre me han aconsejado y ayudado a ser mejor persona.

Mi tutora, María Cristina por su apoyo y entrega, ayudándome a la distancia para que no baje los brazos y complete mi trabajo final.

Índice de Contenidos

Resumen	5
Capítulo I: Introducción general	6
Capítulo II: Fijación Biológica de Nitrógeno en Leguminosas.....	12
Introducción	12
Descripción del género <i>Rhizobium</i>	14
Descripción del género <i>Bradyrhizobium</i>	15
Descripción breve del cultivo de Soja.....	17
Clasificación taxonómica	17
Etapas de Desarrollo.....	17
Estados de Desarrollo.....	19
Factores que afectan el desarrollo	26
Crecimiento	28
Factores que afectan el crecimiento	29
Rendimiento	30
Período Crítico – Ubicación e importancia	32
Manejo del cultivo de Soja.....	32
Interacción Soja- <i>Bradyrhizobium</i>	36
Inoculación.....	36
Infección y formación del nódulo	37
Estructura y diferenciación del simbiosoma	41
Fijación biológica de nitrógeno por el bacteroide	42
Nódulos activos y no activos – Senescencia nodular	43
Factores que afectan la simbiosis	44
Inoculantes	47
Tipos de Inoculantes.....	47
Selección y preparación de un soporte para inoculante.....	48
Métodos de Inoculación	55
Evaluación de inoculantes por SENASA	56
Actualidad y perspectivas en la Argentina	57
Inoculación Soja- <i>Bradyrhizobium</i> - Actualidad.....	57
Rendimiento de soja con y sin inoculación con <i>Bradyrhizobium</i>	59
Capítulo III: Fijación Biológica de Nitrógeno en Gramíneas	61

Introducción	61
Descripción del Familia Azospirillaceae y la género <i>Azospirillum</i>	62
Descripción breve del cultivo de Maíz.....	63
Clasificación taxonómica	63
Crecimiento	71
Factores que controlan el crecimiento.....	75
Rendimiento y periodo crítico.....	77
Manejo del cultivo de Maíz.....	79
Interacción <i>Azospirillum</i> - Maíz	85
Asociación bacteria-planta - Quimiotaxis	85
Producción de fitohormonas - Biosíntesis.....	87
Interacción de las fitohormonas y su efecto sobre el crecimiento de la planta	92
Fijación biológica de nitrógeno por <i>Azospirillum brasilense</i>	92
Algunos factores que afectan a la interacción planta- <i>Azospirillum</i>	93
Inoculantes	93
Tipos de Inoculantes.....	93
Selección y preparación de cultivos y soportes.....	95
Métodos de inoculación	97
Actualidad y perspectivas en Argentina.....	98
Biofertilizantes en Maíz- <i>Azospirillum</i> - Actualidad.....	98
Rendimientos de maíces con y sin inoculación con <i>Azospirillum</i>	99
Capítulo IV: Conclusión.....	101
Bibliografía	105

Resumen

Al inicio de la década del '70, se retomaron los estudios de los microorganismos que se asocian a las raíces de los vegetales. El desarrollo de estas prácticas, crearon el concepto de biofertilización, que es la manera de suministrar a las plantas algún nutriente que ellas necesitan para su crecimiento, mediante un proceso biológico en el que intervienen diferentes microorganismos. En la actualidad existen diferentes tratamientos para lograr la biofertilización:

1. La inoculación de leguminosas con bacteria endosimbióticas fijadoras de nitrógeno atmosférico; estos son microorganismos del género, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, etc. que efectúan una asociación simbiótica con la planta, mediante la formación de nódulos.
2. La inoculación de gramíneas con bacteria diazótrofes fijadoras de nitrógeno atmosférico; estos microorganismos del género *Azospirillum*, *Azotobacter*, etc., no forman una asociación simbiótica, sino que su accionar, se produce alrededor del área de las raíces (rizósfera), produciendo sustancias promotoras del desarrollo radicular (fitohormonas).

Estas asociaciones permiten mantener la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, beneficiando, no sólo a los rendimientos de los cultivos, sino también a las condiciones físico químicas de los suelos cultivados. En el siguiente trabajo, se presentarán los casos de asociación simbiótica en leguminosas y gramíneas, tomando como ejemplo a los cultivos de soja y maíz respectivamente.

Capítulo I: Introducción general

El nitrógeno es uno de los elementos esenciales en la nutrición de las plantas. El nitrógeno es uno de los factores limitantes más comunes de la producción vegetal.

En las plantas, el N es utilizado para sintetizar:

- ARN
- ADN
- Aminoácidos
- Proteínas
- Azúcares aaminados
- Compuestos aromáticos heterocíclicos: indol, triptofano, piridina, quinolina, melanina, etc.

El nitrógeno en el suelo

El ciclo del nitrógeno en el suelo representa solamente una parte del ciclo total del nitrógeno en la naturaleza. La disponibilidad de este elemento es de gran importancia para las plantas, las que absorben nitratos y amonio que utilizan en la síntesis de las proteínas y de otros compuestos orgánicos vegetales. Cuando los restos vegetales y animales regresan al suelo, son objeto de numerosas transformaciones, en su mayoría de carácter biológico. Todos estos procesos son muy dinámicos.

Las reservas de nitrógeno existentes en la biosfera son muy pequeñas. Aproximadamente el 98% del N total de la tierra se presenta en la litosfera (suelos, rocas, sedimentos, materiales fósiles). El resto del N se encuentra casi en su totalidad en el aire, del que constituye el 78%, presentándose en forma molecular (N_2).

El contenido de nitrógeno en el suelo está asociado con el desarrollo y evolución de las rocas parentales a largo plazo.

La transformación del nitrógeno molecular atmosférico en nitrógeno del suelo utilizable actual o potencialmente por las plantas, se realiza principalmente según dos procesos: 1) El nitrógeno puede oxidarse y pasar a la forma de óxidos, por acción de las descargas eléctricas, y éstos compuestos, a su vez, son trasladados al suelo por la lluvia y depositados en él como ácido nitroso o nítrico. La magnitud de éste proceso es pequeña en comparación a las cantidades de nitrógeno molecular que se convierte en orgánico por medio de dicho proceso. 2) Fijación biológica por medio del conjunto de reacciones gracias a las cuales los organismos vivos integran el nitrógeno molecular en sus estructuras como componente de diversos compuestos. Ciertos microorganismos que viven libremente en el suelo, y otros que viven simbióticamente con determinadas plantas (principalmente leguminosas), son capaces de realizar esta incorporación, ambos grupos son los principales responsables de que se mantenga a un cierto nivel el nitrógeno contenido en el suelo.

El nitrógeno del suelo es el elemento esencial que más varía en cantidad y puede ser absorbido por el suelo. El contenido de nitrógeno del suelo varía según las condiciones de drenaje, vegetación, material parental, topografía, cantidad de materia orgánica, textura del suelo, actividad del hombre etc.

En el perfil del suelo, se observa que las cantidades de nitrógeno disminuyen a medida que aumenta la profundidad debido a la influencia de factores anteriormente nombrados como vegetación, topografía y clima.

El clima tiene una influencia determinante sobre el nivel de N en los suelos a través del efecto de la temperatura y las condiciones de humedad (régimen de lluvias) sobre el desarrollo de las plantas y microorganismos. Las condiciones climáticas influyen notablemente sobre el contenido de nitrógeno en los suelos. El aumento de temperatura disminuye el contenido de nitrógeno, debido a que aumenta la velocidad de mineralización de la materia orgánica, apareciendo compuestos simples que son fácilmente lixiviados. Al aumentar la humedad, por efecto de las precipitaciones o riego (a temperatura constante), el contenido de N en el suelo aumenta. Esto se debe al cese de la actividad microbiana y a la aparición de una mayor cantidad de vegetación bajo éstas condiciones.

Los suelos arenosos, de texturas gruesas poseen menor cantidad de materia orgánica por lo que contienen menor cantidad de nitrógeno que aquellos de textura más fina. En suelos con una misma textura, topografía y drenaje, el contenido de nitrógeno puede variar según las prácticas de manejo de los cultivos.

En el suelo el nitrógeno se encuentra en diferentes formas. El nitrógeno del suelo se puede clasificar en orgánico e inorgánico.

La forma predominante es el nitrógeno orgánico en forma proteínica, nucleica, azúcares aminados, etc. El nitrógeno orgánico representa entre el 85 y 95% del nitrógeno total del suelo. El nitrógeno inorgánico del suelo incluye las formas: NH_4^+ , NO_3^- , N_2O y NO , representado entre el 5 a 15% del nitrógeno total del suelo. Las formas de nitrito y nitrato se encuentran casi exclusivamente como iones libres en la solución del suelo. El amonio, mayormente se encuentra como amonio cambiante y no cambiante (nativo fijo) y una pequeña porción en la solución del suelo. El amonio cambiante, los nitratos y nitritos sólo constituyen el 2% del nitrógeno total del suelo. Estas son las formas utilizadas por las plantas.

En el suelo, el nitrógeno está asociado al C, en función de la relación C/N. Esta relación en condiciones de suelo normal tiene un valor entre 10 y 20, en casos extremos puede tomar un valor de 30. En suelos con alto contenido de materia orgánica, el contenido de N es alto. En cambio, valores de C/N bajos, indican la presencia de mayores cantidades de N inorgánico, especialmente de NH_4^+ fijado en los coloides. La relación C/N y el pH se encuentran inversamente relacionados.

El ciclo de nitrógeno en el suelo (Figura N° 1) es parte del ciclo integral del nitrógeno en la naturaleza.

Dentro de los ecosistemas, el nitrógeno sufre varias transformaciones:

- Mineralización de nitrógeno orgánico (fertilizantes, desechos vegetales, rastrojos de cosechas, carcasas y heces de animales, etc.) a amonio. Este proceso recibe el nombre de amonificación y es realizado por la microflora del suelo. Es un proceso muy lento. Se considera que solamente el 2% del nitrógeno total del suelo es mineralizado (en condiciones de clima templado).
- Oxidación de amonio a nitrito y luego a nitrato, proceso que recibe el nombre de nitrificación. Microflora específica del suelo es la encargada de este proceso como nlos Nitrosomas y Nitrobacter entre otros.
- Absorción de nitrato y amonio por las raíces de las plantas.

- Inmovilización por la microflora del suelo incorporando nitrógeno mineral en sus proteínas.
- Adsorción o fijación de NH_4^+ por arcillas y materia orgánica del suelo.

A su vez el nitrógeno se puede perder dentro del perfil del suelo debido a variadas razones, las cuales serán descriptas más adelante.

La amonificación ocurre en dos pasos principales: 1) depolimerización y luego 2) desaminación y decarboxilación. A través de la amonificación, las proteínas, ácidos nucleicos y otros, son depolimerizados por enzimas proteolíticas en peptonas y polipéptidos que luego se descompondrán en aminoácidos. Ésta descomposición es mediada por bacterias aeróbicas como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus*, *B. megaterium* y *Pseudomonas* sp. y bacterias anaeróbicas como *Clostridium putrificum*, *C. tetani* y *C. sporogenes*. También participan hongos (*Trichoderma* sp., *Arpergillus* sp. y *Penicillium* sp.). Los aminoácidos resultantes pueden: 1) ser metabolizados por microorganismos (inmovilizados), 2) adsorbidos por arcillas formando complejos agrominerales, 3) incorporados en la fracción de humus, 4) utilizados por las plantas o 5) seguir siendo mineralizados hasta transformarse en amonio. La amonificación de los aminoácidos se produce bioquímicamente a través de procesos de desaminación y decarboxilación, realizado por enzimas, las cuales dan como resultado amonio y ácidos grasos (acético, láctico, butírico) y compuestos aromáticos (indol, fenol, cresol, eskatol) en el caso de la desaminación y en el caso de la decarboxilación se obtiene amonio más aminas metiladas. El amonio resultante del proceso de amonificación puede: 1) ser absorbido por las plantas, 2) adsorbido por minerales arcillosos o por la materia orgánica, 3) fijado por minerales 2:1 no expandibles, 4) inmovilizados por microorganismos, 5) lixiviado a través del perfil del suelo u 6) oxidado hasta el nivel de nitratos.

Como se ha nombrado previamente, el NH_4^+ (mineralizado de N orgánico o aplicado al suelo en forma de fertilizante) en el suelo está sujeto a un proceso de transformación llamado nitrificación, pasando de NH_4^+ a NO_2^- y a NO_3^- .

Este ciclo está a cargo de una serie de bacterias. La primera reacción de transformación en nitritos es realizada por bacterias de los grupos: *Nitrosomas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosoglea*. El segundo paso a nitratos es realizado por bacterias del grupo *Nitrobacter* y *Nitrocystis*. El proceso de transformación de NO_2^- a NO_3^- es rápido. Se debe tener en cuenta que el NO_2^- es tóxico para las plantas. La reacción química es la siguiente:



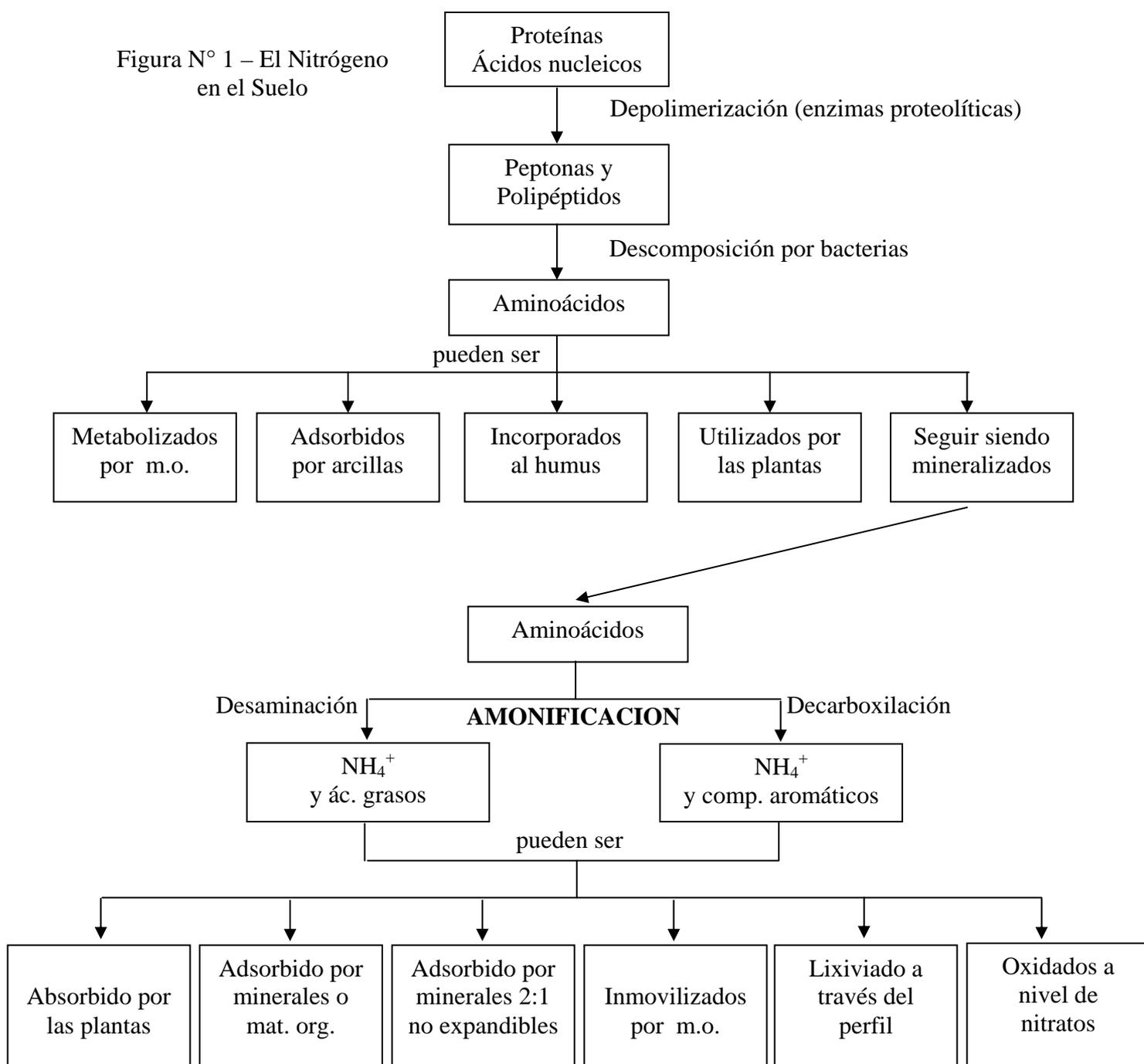
Las condiciones óptimas para la nitrificación se dan a temperaturas de alrededor de 25° a 35° C, pH ligeramente ácido y niveles intermedios de humedad, condiciones reluctantes inhiben completamente el proceso.

Las pérdidas de nitrógeno del suelo son variadas y de diferentes formas. Algunas pérdidas que se describirán a continuación son: desnitrificación biológica, volatilización de amonio, intercambio y fijación de amonio y lixiviación.

La desnitrificación agrupa una serie de procesos biológicos o abiológicos que conducen a la reducción de nitratos, lo que produce pérdidas de nitrógeno del suelo que, muchas veces, son considerables.

La desnitrificación biológica es producida por microorganismos desnitrificantes heterotróficos, como por ejemplo: *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Bacterium* sp. y *Bacillus* sp. En su mayoría son anaerobios facultativos. En la reacción de desnitrificación éstos organismos pasan de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), luego a hiponitrito (N_2O_2), monóxido de dinitrógeno (N_2O) y luego a nitrógeno molecular (N_2). Estas reacciones son mediadas por enzimas como la nitrato reductasa, que actúa sobre la primer parte de la reacción, y la nitrito reductasa y la hiponitrito reductasa. La velocidad de la desnitrificación biológica depende de las condiciones del suelo. Generalmente ocurre cuando el oxígeno es limitante y en condiciones de alta humedad. También influyen el pH, temperatura, concentración de nitratos y condiciones redox. La desnitrificación abiológica se presenta cuando existen condiciones muy específicas para determinadas reacciones químicas, dentro de los diferentes grupos nitrogenados. En función a estas reacciones se pierde N a la atmósfera.

Figura N° 1 – El Nitrógeno en el Suelo



Se llama desnitrificación abiológica a la volatilización de amonio. Resulta de reacciones químicas entre los diferentes componentes nitrogenados inorgánicos que se encuentran presentes en el suelo y los aplicados por fertilizantes. La volatilización del amonio tiene cada vez mayor importancia debido al marcado incremento en la dosis aplicadas de N en la fertilización, el uso creciente de amonio anhidro y la preferencia de la urea como fuente de fertilización. Las diferentes reacciones que dan paso a la volatilización de amonio son: suelos con pH mayor a 7 (en particular si la superficie se deseca temporalmente), la descomposición espontánea del ácido nitroso en un medio ácido (pH 4 ó 5), descomposición de nitritos del suelo a nitritos de amonio, reacción entre amonio y óxido nitroso en condiciones de acidez y alta temperatura o cuando la urea reacciona en el suelo.

En el caso de la pérdida de nitrógeno por intercambio y fijación de amonio, se debe recordar que el amonio es un catión, es decir tiene carga positiva, por lo que participa de procesos de intercambio catiónico del suelo. Los suelos que presentan minerales arcillosos del tipo 2:1 con alta C.I.C. (Capacidad de Intercambio Catiónico), son propensos a inmovilizar el amonio. Los iones K^+ y NH_4^+ tienen diámetro similares por lo que se pueden intercambiar de forma no reversible. Tanto el amonio como los nitratos, poseen carga electrostática. El amonio tiene una carga positiva y los nitratos carga negativa. El catión amonio tiene interacción con las partículas coloidales del suelo y los óxidos de Fe y Al (los cuales poseen cargas negativas). De este modo se forma una fase intercambiable entre el NH_4^+ adsorbido por los coloides y los óxidos y el que se encuentra en la solución del suelo. Ambas porciones de NH_4^+ se encuentran en constante equilibrio: en el momento que la planta absorbe amonio, se libera NH_4^+ del complejo coloidal. El NH_4^+ puede ser lixiviado por exceso de agua en el perfil del suelo. Lo mismo ocurre para el caso de NO_3^- , siempre y cuando en la superficie de los coloides existan cargas positivas.

Otra pérdida de nitrógeno importante es la lixiviación. Ésta ocurre cuando el nitrógeno se encuentra en forma de nitratos o amonio, los cuales se encuentran en la solución del suelo, la que a su vez percola por gravedad pasando a la napa freática. La formación de reservas de NH_4^+ y NO_3^- es absolutamente dependiente del pH. Con valores bajos de pH se generan cargas electropositivas donde se absorben los NO_3^- . Existe un momento en el cual las cargas positivas y negativas se equilibran, y los NO_3^- pueden ser lavados a través del perfil del suelo.

En contraposición a las pérdidas de nitrógeno del suelo, encontramos a las ganancias, dentro de las cuales las más importantes son: fertilización, fijación no biológica de nitrógeno (deposición por lluvias), fijación biológica asimbiótica, fijación biológica simbiótica y deposición de residuos vegetales.

La deposición de nitrógeno por las lluvias se da por descargas eléctricas y tormentas en la atmósfera, que hacen que el nitrógeno molecular se oxide y en las nubes reaccione hasta ácido nítrico (HNO_3). Con las lluvias se produce una transferencia de nitrógeno, las cantidades dependen de la intensidad de las descargas, de la cantidad de lluvia y la contaminación del aire.

La fijación biológica asimbiótica de nitrógeno ocurre gracias a microorganismos libres que tienen la capacidad de fijar nitrógeno. Son heterótrofos con respecto al carbono, para su desarrollo necesitan azúcares, celulosa o almidón que encuentran en el suelo. Éstos microorganismos se pueden clasificar en bacterias heterotróficas aeróbicas (*Achromobacter*, *Azotobacter*, *Aerobacter*, etc.), bacterias heterotróficas anaeróbicas (*Clostridium*, *Desulfavibrio*), bacterias heterotróficas facultativas anaeróbicas (*Bacillus*,

Klebsiella), quimioautótroficas, algas azules-verdes (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira*) y bacterias fotosintéticas.

La fijación simbiótica de nitrógeno es aquella que realizan los microorganismos que se encuentran en asociación con plantas u hongos. La fijación simbiótica ocurre generalmente en la rizosfera, pero también puede ocurrir a nivel de las hojas o los tallos. Dentro de los organismos fijadores de nitrógeno, uno de los más importantes es la especie *Rhizobium* que se asocian con plantas de las subfamilias Papilionoideae, Cesalpinioideae, y Mimosoideae. La vida de las bacterias se acomoda al ritmo de la planta hospedadora. Las cantidades de N fijadas en el proceso simbiótico son muy diversas, con valores de 20 a 1000 Kg de N.ha⁻¹ en un ciclo de producción. El proceso de fijación simbiótica con plantas es el que será desarrollado a lo largo de todo el trabajo. Se describirá y analizará la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas, para lo cual tomaremos a la soja (*Glycine max*) como ejemplo y en gramíneas para lo cual estudiaremos el caso particular del maíz (*Zea mays*).

La forma de asimilación del nitrógeno por parte de las plantas, ya sea en forma nítrica o amoniacal, depende de la edad de la planta y de la especie, así como también del pH del suelo, su composición e incluso pluviometría.

Capítulo II: Fijación Biológica de Nitrógeno en Leguminosas

Introducción

La fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es el proceso por el cual algunos microorganismos utilizan el nitrógeno contenido en el aire, reduciéndolo a amoníaco a través de una enzima llamada nitrogenasa para la producción de proteínas. Los microorganismos fijadores de nitrógeno son bacterias y cianobacterias, de vida libre en el suelo, eventualmente asociados a una planta, o viviendo en simbiosis con una planta. Se ha reconocido que las subfamilias Papilionáceas, Mimosáceas y Cesalpináceas poseen la propiedad de aprovechar el nitrógeno mediante la fijación biológica. Las Papilionáceas son las que presentan mayor número de especies formadoras de nódulos entre un 80 – 90%, las Mimosáceas un 25% y las Cesalpináceas sólo unas pocas. Entre las tres subfamilias agrupan 12000 especies con capacidad fijadora de nitrógeno.

En la atmósfera, el nitrógeno se encuentra en forma molecular (N₂) con una disponibilidad del 80%. Como se ha comentado anteriormente, las plantas solamente pueden asimilar el nitrógeno mayormente en forma de nitratos (NO₃⁻) y en forma de amonio (NH₄⁺). Para poder convertir el nitrógeno de su forma no asimilable (N₂) por las plantas a una que sí lo sea, las bacterias realizan la FBN.

La energía requerida por las bacterias para desarrollar este proceso proviene de:

- Los carbohidratos del suelo cuando los microorganismos son de vida libre.
- Los exudados radiculares para aquellos asociados en la rizósfera de una planta
- Directamente de los productos de la fotosíntesis de la planta huésped cuando existe una simbiosis.

Como hemos descrito anteriormente, la FBN representa un papel de suma importancia para las plantas, en especial para los cultivos agrícolas, lo cual se analizará diversos ítems más adelante.

Existen varios organismos fijadores de nitrógenos para el caso de las leguminosas. Algunos casos de bacterias fijadoras son nombrados en los cuadros a continuación (Stewart, 1977):

Tabla N° 1 – Organismos fijadores de Nitrógeno.

Organismos Fijadores Simbióticos		
Microsimbionte	Macrosimbionte	Capacidad Fijadora de Nitrógeno
<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	Angiospermas Leguminosas (20000 especies): 90% <i>Papilionoideae</i> (90% Mimosoideae) 30% <i>Cesalpinoideae</i>	Prom. 200 Kg. N/ha/año 500 Kg N/ha/año para algunas asociaciones.
<i>Rhizobium</i> (caupí)	Angiospermas <i>Parasponia</i> (<i>Zygophyllaceae</i>)	
Actinomycetos Frankia	Angiospermas <i>Casuarina</i> <i>Coriaria</i> <i>Almas, Prusia</i> <i>Myricaceae</i>	40 a 200 Kg N/ha/año

Cianobacterias <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i>	Angiospermas Gimnospermas: <i>Cycas, Bowenia</i> Líquenes Musgos Helechos	2 a 5 Kg N/ha/año 100 a 200 Kg N/ha/año
--	--	--

Tabla N° 2 – Organismos fijadores de Nitrógeno libre

Fijadores Libres de Nitrógeno		
Características Fisiológicas	Género	Capacidad fijadora de nitrógeno
Bacterias Heterotróficas		
Aeróbicas	<i>Azotobacter, Beijerinckia, Pseudomonas, Azospirillum, Methylococcus, Methylobacter</i>	Fijan en presencia de O ₂ pero con muy baja eficiencia: 05 a 1 Kg N/ha/año.
Aerobios facultativos	<i>Bacillus, Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Clostridia</i>	Fijan sólo en ausencia de O ₂ : 1 Kg N/ha/año.
Bacterias	<i>Rhodopseudomonas</i>	Fijan sólo en ambientes pobres en O ₂ .
Autotróficas fotosintéticas	<i>Chromatium, Rhodospirillum</i>	
Quimioautotróficas	<i>Thiobacillus</i>	
Cianobacterias (antes algas azulverdosas)		
Filamentosas con heterocistos	<i>Anabaena, Nostoc</i>	10 a 50 Kg N/ha/año.
Filamentosas heterocistos	<i>Plectonema, Trichodesmium</i>	Fijan solo en ambientes pobres en O ₂ .
Unicelulares	<i>Gloeocapsa</i>	Fijan en presencia de O ₂ .
Fijación asociativa		
Rizósfera de <i>Paspalum noratum</i>	<i>Azotobacter paspali</i>	5 a 10 Kg N/ha/año.
<i>Digitaria decumbens</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	Hasta 30 Kg N/ha/año.
<i>Oriza sativa</i> (arroz)	<i>Azotobacter, Beijerinckia, Pseudomonas, Arthrobacter</i>	20 a 50 Kg N/ha/año.
Filósfera de Plantas		Parece ser muy baja.

Tomando la contribución La mayor contribución de nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres proviene de las siguientes asociaciones:

- Asociación Rhizobium-leguminosa que se encuentran: en sistemas cultivados o pasturas naturales de leguminosas. Se puede estimar que el 50% del nitrógeno fijado en la tierra proviene de las asociaciones Rhizobium-leguminosa.
- Asociaciones Oriza-Azotobacter, Beijerinckia, Pseudomonas o Arthrobacter en sistemas inundados (arroz).
- Asociaciones Actomycetes-plantas en ciertos forestales de regiones templadas.

En éste momento nos ocuparemos de las bacterias Rhizobium, que viven en simbiosis con las leguminosas. En particular se analizará la bacteria Bradyrhizobium japonicum y su hospedador, la soja.

Descripción del género Rhizobium

Los Rhizobium son microorganismos capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico en las raíces de las plantas de la familia Leguminosae (y en sólo otra no leguminosa, Parasponia). Algunos rizobios también son capaces de inducir nódulos en el tallo de leguminosas (Sesbania, Aeschynomene).

Los rizobios se encuentran dentro del orden Eubacteriales y la familia Rhizobiaceae. Son bacilos de 0,5 a 0,9 nm de ancho y 1,2 a 3,0 nm de longitud, son bacterias Gram negativas y no esporulan. Son móviles debido a flagelos peritricos o a un flagelo polar o subpolar.

En la antigua clasificación se han definido seis especies de Rhizobium, como se muestra en la siguiente table (Tabla N° 3):

Tabla N° 3 – Clasificación antigua de Rhizobium.

Especies	Planta Huésped
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Vicia, Lens, Lathyrus</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Especies de Phaseolus de clima templado</i>
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>

Estudios taxonómicos llevan a cambiar ésta clasificación. En sentido amplio, se divide a los rizobios en dos grandes grupos:

- Rhizobium: cepas de crecimiento rápido (tiempo de generación: de 2 a 4 horas), con varios flagelos, acidificantes en diferentes medios. Estos rizobios generan nodulación en leguminosas de zonas templadas.
- Bradyrhizobium: cepas de crecimiento lento (tiempo de generación mayor a 6 horas), con un solo flagelo, alcalinizante de diversos medios.

A esta clasificación se le agregó el género *Azorhizobium*, cepa capaz de formar nódulos en tallos y raíces. Fijan y asimilan nitrógeno atmosférico en cultivos puros.

Tradicionalmente su clasificación se ha basado en el concepto de especificidad rizobio-leguminosa: las bacterias que nodulan a la misma leguminosa se incluirían en la misma especie. La clasificación actual es la siguiente (Jordan 1983):

Tabla N° 4 – Clasificación actual de Rhizobium (Jordan, 1983).

Especies	Planta Huésped	Crecimiento
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Rápido
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Biovar <i>trifolii</i> Biovar <i>phaseoli</i> Biovar <i>veceae</i>	<i>Trifolium</i> <i>Phaseolus</i> <i>Pisum, Vicia, Lens, Lathyrus</i>	Rápido
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lupinus, Lotus, Anthyllis, Ornithopus</i>	Rápido
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega</i>	Lento

<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Lento
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Lento
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Lento

Se considera crecimiento rápido cuando desarrollan colonias de 1 a 5 mm de tamaño en un periodo de tiempo de 3 a 5 días a una temperatura de 25° a 28°C. en un medio de agar con extracto de levadura y manitol, y de crecimiento lento cuando para el periodo de tiempo indicado, la colonia, no supera un milímetro de tamaño (Vincent, 1982). La clasificación según la planta con la cual realizan simbiosis, es la siguiente:

Tabla N° 5 – Clasificación de Rhizobium según la planta con la que realizan simbiosis.

Grupo	Hospedador
Grupo I	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
Grupo II	<i>Trifolium</i>
Grupo III	<i>Vicia, Lens, Pisum, Lathyrus, Cicer</i>
Grupo IV	<i>Vigna, Cajanus, Canavalia, Arachis y parte de Phaseolus.</i>
Grupo V	<i>Glycine</i>
Grupo VI	<i>Parte de Phaseolus (Ph. Vulgaris)</i>
Grupo VII	<i>Lupinus, Ornithopus</i>

Descripción del género Bradyrhizobium

Las bacterias del género Bradyrhizobium son bacilos de 0,5 a 0,9 nm por 1,2 a 3 nm. Se desplazan con un flagelo polar o subpolar. Consiste en cepas de lento crecimiento, productoras de álcali, crecen en colonias circulares hasta 1 mm. de diámetro, opacas y raramente translúcidas, blancas, convexas y contundencia a tener textura granulosa.

Dentro de los Bradyrhizobium han sido descritas cuatro especies con base en el análisis polifásico incluyendo caracterización fenotípica, hibridación de ADN-ADN, polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de genes de 16S rRNA amplificados por PCR, nodulación con plantas selectivas y otros métodos.

Tres especies *B. japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular a la soja (*Glycine max*). La única especie que no puede vivir en simbiosis con la soja es *B. yuanmingense*, que nodula a *Lespedeza cuneata*.

B. japonicum, que es la especie que estudiaremos en éste trabajo, tiene un amplio rango de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas. Algunas cepas fijan nitrógeno en vida libre bajo ciertas circunstancias. Se distingue de *B. elkanii* por diferencias en algunas secuencias de ADN, en los patrones de enzimas metabólicas y de expolisacáridos, en su contenido de ácidos grasos y hemoproteínas al igual que por diferencias en sus patrones de resistencia a antibióticos.

En el siguiente cuadro se muestran algunas características fisiológicas y bioquímicas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Tabla N° 6: Características fisiológicas y bioquímicas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Característica	Tiempo de Crecimiento	
	Rhizobium	Bradyrhizobium
Crecimiento en medio de cultivo ElMarc (extracto de levadura-manitol-agar-rojo congo)	Rápido	Lento
Crecimiento en ácidos orgánicos	+	+
Crecimiento con ramosa	+	-
Crecimiento con 2% NaCl (0.0025%)	Algunas cepas de <i>R. meliloti</i>	-
Alta afinidad por fosfato	+	+

(+): crecimiento (-): no crecimiento

El proceso de aislamiento de las bacterias de los nódulos incluye varios pasos para separarlos de los contaminantes presentes, es necesaria una serie de pruebas para caracterizar y autenticar los rizobios aislados, una vez autenticados, se puede evaluar su efectividad potencial: capacidad de fijar N₂ con leguminosas en condiciones óptimas.

El aislamiento del rizobio se inicia esterilizando la superficie del nódulo, macerándolo y estriándolo. En cultivos in Vitro, los rizobios por lo general pueden ser fácilmente suplementados con levaduras y una fuente de carbohidratos como el manitol y compuestos nitrogenados y cantidades menores de magnesio.

El medio de cultivo comúnmente utilizado para el aislamiento de rizobios es el EL-MARC (Extracto de Levadura, Manitol, agar, rojo congo), que además contiene fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y carbonato de calcio.

El extracto de levadura le proporciona a las bacterias productos de degradación de las proteínas, sustrato para la respiración, vitaminas y ciertos elementos. El manitol funciona como fuente de carbono, mientras que el rojo congo ayuda a diferenciar los rizobios de otras bacterias, en general las colonias de rizobios presentan tensión débil con éste colorante, en tanto que las colonias de muchas otras bacterias adquieren un color más intenso (la coloración varía con la concentración de los reactivos, edad del cultivo y la exposición de la caja a la luz). La temperatura óptima de crecimiento de rizobios en condiciones artificiales es de 25°C y su tolerancia al pH entra dentro de 5 a 8.

Para analizar la FBN en leguminosas, nos centraremos en el estudio de la simbiosis entre *Bradyrhizobium japonicum* y la soja (*Glycine max*).

Características genéticas específicas de *Bradyrhizobium japonicum*

B. japonicum es el único rizobio donde se han aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación napEDABC, nirK, norCBQD y nosRZDFYLX, que codifican la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Cu-NirK), óxido nítrico reductasa (cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos).

Otros aspectos importantes de la genética del género serán descriptos posteriormente.

Descripción breve del cultivo de Soja

Clasificación taxonómica

Según Melchior (1964), la soja se clasifica de la siguiente forma:

- Subreino: Cormobionta
- División: Spermatophyta
- Subdivisión: Angiospermae
- Clasi: Dicotyledoneae
- Subclase: Archichlamydae
- Orden: Rosales
- Suborden: Leguminosinae
- Familia: Leguminosae
- Subfamilia: Papilionaceae, Fabaceae
- Tribu: Phaseoleae
- Subtribu: Phaseiolinae
- Género: Glycine L.
- Subgénero: Glycine subg. Soja
- Especie: Glycine max

La soja (*Glycine max*) es una planta con una importante respuesta fotoperiódica, una alta plasticidad reproductiva y producción de semillas con elevados contenidos de proteína y aceite.

Etapas de Desarrollo

El desarrollo comprende varios cambios cualitativos que ocurren en una planta a lo largo de su ciclo biológico.

Etapas Embrional

La etapa embrional se inicia con la formación del cigoto y prosigue con el crecimiento de la semilla, su maduración, germinación y emergencia, hasta la constitución de una planta autótrofa, capaz de autoabastecerse de fotoasimilados.

Una vez realizada la siembra, se produce la hidratación de las semillas, que cambian de forma ovalada a arriñonadas. La hidratación es la primera fase de la germinación. Si la semilla es viable, luego de la imbibición ocurre la emergencia de la radícula, desgarrando el tegumento. Entre el segundo y tercer día de la germinación, se extiende la radícula unos 2 a 3 cm. hacia abajo para luego emitir ramificaciones. Más tarde se da el alargamiento del hipocótilo, que arrastra a los cotiledones hacia la superficie. El gancho hipocotilar es el que realiza la fuerza para emerger sobre la superficie del suelo. La oscuridad y la resistencia del suelo determinan la formación del gancho, que se endereza luego de la emergencia. Los cotiledones unidos son los que protegen al epicótilo.

La luz provoca el enderezamiento del gancho hipocotilar, promueve la síntesis de clorofila en los tejidos expuestos al sol, incluso los cotiledones (que quedan horizontales a cada lado del eje caulinar).

La expansión de las hojas unifoliadas y de la primera trifoliada se da posteriormente a los procesos nombrados. Aunque los cotiledones realizan fotosíntesis, la contribución

de fotoasimilados es muy baja. Por éste motivo es muy importante la removilización de las reservas orgánicas e inorgánicas de los cotiledones, que sostienen a la plántula hasta que pueda autoabastecerse. Una vez que los cotiledones finalizan la removilización de sus reservas, se tornan amarillos y caen.

Cualquier daño que sufran los cotiledones durante la primera semana luego de la emergencia, retrasan el crecimiento inicial, pudiendo afectar el crecimiento total de la planta.

El tiempo requerido para el establecimiento de la plántula varía con el vigor de la semilla, el agua disponible y la temperatura ambiente. Después del estado V1 la fotosíntesis de las hojas puede sostener todos los requerimientos de la planta.

Etapa Juvenil

La etapa juvenil tiene como característica principal la incapacidad para formar órganos reproductivos. Esta etapa también recibe el nombre de pre-inductiva, ya que es incapaz de recibir el estímulo fotoperiódico.

Etapa de Madurez

La planta puede recibir el estímulo fotoperiódico, transformando sus meristemas vegetativos en reproductivos a una velocidad variables según el genotipo y fotoperiodo. Esta etapa es subdividida en:

1.Fase inductiva: desde que se percibe el estímulo hasta la transformación del meristema vegetativo a reproductivo (diferenciación).

2.Fase posinductiva: desde la diferenciación hasta la floración o antesis.

La duración de la etapa de madurez depende del grado de sensibilidad al fotoperiodo y a la temperatura que tiene el cultivo y de las condiciones ambientales.

La inducción floral provoca la transformación de los meristemas que diferencian hojas y tallos (vegetativos) en meristemas diferenciadores de primordios florales (reproductivos). La edad de la planta en la que se produce éste cambio determina el tamaño final de la planta y su rendimiento potencial.

La transformación de los meristemas se inicia en la axila de una hoja del tallo principal o de una ramificación. La posición del primer nudo que cambia los meristemas de vegetativos a reproductivos depende del hábito de crecimiento del tallo. Luego que ocurre la diferenciación del primer nudo, comienza la diferenciación del resto de los nudos de la planta. Cuando se diferencian las yemas apicales del tallo y las ramificaciones, todos los meristemas de han convertido en reproductivos, anulándose los puntos de crecimiento, es decir que cesa la generación de nuevas estructuras vegetativas en la planta.

Etapa Senil

La etapa senil se da con la fructificación. Se modifica la partición de los fotoasimilados y se desencadenan una serie de mecanismos que llevan a la muerte de la planta, llamado senescencia monocárpica.

Estados de Desarrollo

Para describir las etapas de desarrollo del cultivo de soja, generalmente se utiliza la clasificación de Fehr y Caviness, que emplea dos escalas: una para estados vegetativos y otra para reproductivos (como muestra la Tabla N° 7).

Los estados vegetativos (V) son identificados con números, con excepción de los dos primeros, que caracterizan a la emergencia (VE) y a la etapa cotiledonar (VC).

Luego del estado VC, los estados se identifican con el número del nudo, sobre el tallo principal, que presenta la hoja recientemente desarrollada, es decir el nudo que tiene las hojas totalmente expandidas y el superior posee hojas cuyos bordes de los folíolos no se tocan entre sí.

Los cotiledones y las hojas unifoliadas se presentan de a pares en el primer y segundo nudo del tallo principal en posición opuesta. El resto de las hojas son todas trifoliadas y se presentan una por nudo, en posición alterna.

El estado VE corresponde a la emergencia de los cotiledones (como indica la Figuras N° 2); VC, cotiledones desplegados (como indican las Figuras N° 3 y 4); V1, hojas unifoliadas totalmente expandidas (Figura N° 5); V2, segundo nudo, primer hoja trifoliada totalmente expandida y así sucesivamente (Figura N° 6 y 7); Vn, número de nudos sobre el tallo principal con hojas totalmente expandidas. Cuando se quiere determinar el estado fenológico de una parcela o lote, se considera que ha alcanzado un determinado estado cuando el mismo se ha manifestado en el 50% de las plantas.



Figura N° 2: Soja en estadio VE (el coleoptilo rompe la superficie del suelo).



Figura N° 3: Soja en estadio VE (cotiledones desplegándose).



Figura N° 4: Soja en estadio VE (cotiledones desplegándose).

El tiempo de aparición de un nuevo nudo con hoja desarrollada es de aproximadamente cinco días entre los estados VC y V5 y de tres días entre V5 y R5. En este último estado, la planta cuenta con el mayor número de nudos.

Tabla N° 7: Estados vegetativos y reproductivos de la soja según la clasificación de Fehr et al.

Estado Vegetativo		Estado Reproductivo	
VE	Emergencia	R1	Inicio de floración
VC	Cotiledonar	R2	Plenitud de floración
V1	Primer nudo	R3	Inicio de formación de vainas
V2	Segundo nudo	R4	Plenitud de formación de vainas
V3	Tercer nudo	R5	Inicio de llenado de granos
R6	Plenitud del llenado de granos	R7	Inicio de madurez
V(n)	(n) nudos	R8	Plenitud de madurez



Figura N° 5: Plántula de soja en estadio V1.

Figura N° 6: Plántula de soja en estadio V2.

Como se explicó anteriormente, en ésta escala se marca Vn según el número de nudos sobre el tallo principal con hojas totalmente expandidas. La Figura N° 8 muestra una planta de soja en estado V3 y la Figura N° 9 un planta en estadio V5.

Las etapas reproductivas son: R1 (Figura N° 10) y R2 (Figura N° 11), floración; R3 y R4, formación de vainas; R5 y R6, llenado de granos; R7 y R8, madurez. En los cultivares indeterminados, el crecimiento vegetativo y la producción de nudos continúa a través de los estados reproductivos, sobre el tallo principal, mientras que en los cultivares de crecimiento determinado continúa el crecimiento de los nudos sobre las ramificaciones.

A continuación se describirán las etapas reproductivas:

- Estado R1 – Una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal. La floración comienza en el tercer a sexto nudo del tallo principal y progresa hacia arriba y hacia abajo. Las ramas empiezan a florecer pocos días después que el tallo principal. En los racimos, la floración empieza desde la base hacia el ápice. La aparición de flores alcanza su máximo entre R2,5 y R3 y se completa en R5.
- Estado R2 – Una flor abierta en uno de los dos nudos superiores. El inicio de la etapa de acumulación rápida y constante (lineal) de materia seca y nutrientes puede coincidir

con éste estado en aquellos cultivares de ciclo corto e intermedio, pero se adelanta el cultivares de crecimiento determinado. Mientras más largo es el ciclo de un cultivar, más se anticipa el inicio de ésta etapa.



Figura N° 8:
Planta en V3

Figura N° 7: Planta
en V2

Estadios	Días promedio de duración
Siembra a VE	10
VE a VC	5
VC a V1	5
V1 a V2	5
V2 a V3	5
V3 a V4	5
V4 a V5	5
V5 a V6	3
> a V6	3
R1 a R2	0-3
R2 a R3	10
R3 a R4	9
R4 a R5	9
R5 a R6	15
R6 a R7	18
R7 a R8	9

Tabla N° 8: Número de días desde un estado fenológico al siguiente. Valores propuestos por Fehr et al (*₁) y observados por Asgrow 3127 en Balcarce (*₂).

*₁: Fehr, W. R. and Caviness, C.E. 1977. Stages of soybean development. Iowa St. Univ. Special Report 80. 11pp.

*₂: Baigorri, H. E. J.1997. Fotoperiodo, temperatura y radiación: sus efectos sobre el desarrollo y crecimiento del cultivar de soja Asgrow 3127 en Balcarce. Tesis M.S. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. 86 pp.



Figura N° 9: Planta en V5.



Figura N° 10:
Planta en R1.



Figura N° 11: Planta en R2.

- Estado R3 – Una vaina de 5 mm de largo en uno de los cuatro nudos superiores, con hojas totalmente desplegadas. Es común encontrar, en un mismo momento, vainas en desarrollo, flores marchitas, flores abiertas y yemas florales.

- Estado R4 – Una vaina de 2 cm. en uno de los cuatro nudos superiores, con hojas totalmente desplegadas. Hay un rápido crecimiento de las vainas. Se inicia el desarrollo de la semilla. Entre R4 y R5,5 las vainas incrementan rápidamente su pedo seco. Las vainas alcanzan la mayor parte de su largo y ancho antes que las semillas inicien su crecimiento (Figura N° 12).

- Estado R5 – Una vaina con una semilla de 3 mm de largo, en uno de los cuatro nudos superiores, con hojas totalmente desplegadas (Figura N° 13, N° 14 y N° 15). Se inicia el crecimiento rápido de la semilla, también llamado llenado de granos. Se da la redistribución de la materia seca y nutrientes de la planta a las semillas. Al inicio de R5, el grado de desarrollo reproductivo varía desde flores recién abiertas a vainas



Figura N° 12: Planta en R4.



Figura N° 13: Planta en R5.



Figura N° 14: Inflorescencia en R5.

conteniendo semillas de 8 mm de largo (Figura N° 16). Al promediar el estado de R5,5, (Figura N° 17) ocurren varios sucesos de importancia: la planta alcanza su máxima altura, número de nudos e índice foliar; se producen las mayores tasas de fijación biológica de nitrógeno, que luego comienzan a caer abruptamente; y las semillas inician un periodo de rápida acumulación de materia seca y nutrientes. Poco después de R5,5 se hace máxima la acumulación de materia seca en hojas, pecíolos, tallos para luego repartirse hacia la semilla. La rápida acumulación de materia seca de la semilla continúa hasta poco después de R6,5, período durante el cual la semilla alcanza el 80% de su

peso seco. Durante el llenado de granos, la semilla acumula la mitad del nitrógeno, fósforo y potasio por redistribución de los órganos vegetativos de la planta y la otra mitad la toma del suelo. En el caso del nitrógeno, la actividad de los nódulos complementa la provisión del suelo.

- Estado R6 – Una vaina que contiene una semilla que ocupa toda la cavidad de la misma, en uno de los cuatro nudos superiores, con hojas totalmente expandidas (Figura N° 18). La planta posee semillas de todos los tamaños. Se alcanza el máximo peso de vainas. Las tasas de crecimiento de la semilla y de la planta entera aún son altas. La tasa de acumulación de materia seca comienza a declinar poco después de R6 en la planta entera y poco después de R6,5 en la semilla. El peso seco y la acumulación de nutrientes de hacen máximos en la planta entera poco después de R6,5 y en la semilla en R7. El amarillamiento rápido de las hojas empieza poco después de R6 y continúa rápidamente hasta R8. El amarillamiento y caída de las hojas empieza en los nudos basales y progresa hacia los superiores. La velocidad de éste proceso está ligada a la cantidad de granos y al grado de desarrollo que han adquirido los mismos. Un bajo número de granos determinan la retención de una masa importante de hojas verdes hasta el momento de las primeras heladas. La deficiencia de potasio y la presencia de ciertas virosis pueden provocar retención foliar.

Figura N° 15: Detalle de floración en R5.

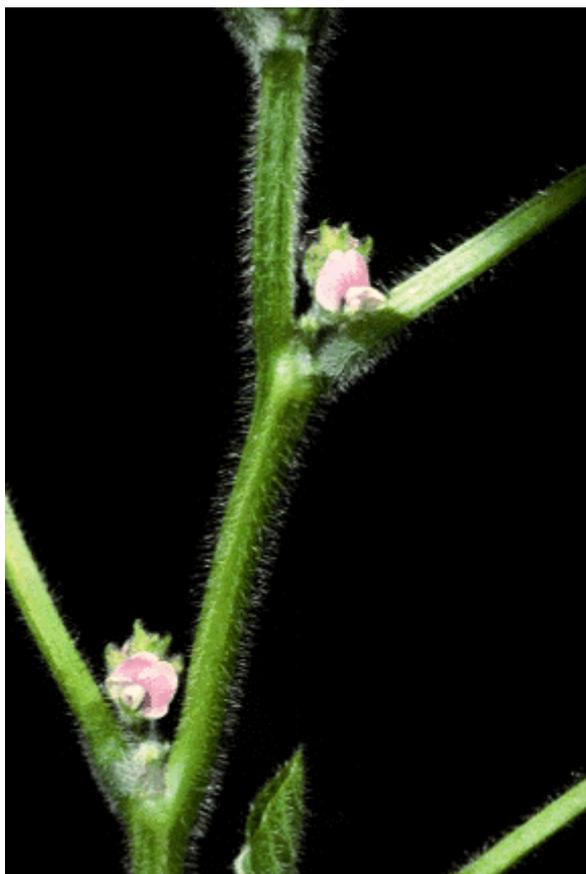


Figura N° 16: Vainas formándose y totalmente desarrolladas.



- R7 – Una vaina normal ha alcanzado su color de madurez, en cualquier nudo del tallo principal. Se considera que una semilla que ha alcanzado la madurez fisiológica cuando cesa su acumulación de materia seca. Se produce cuando la semilla y la vaina se tornan amarillas. En éste estado no todas las vainas han perdido el color verde. Se considera a

éste estado como la madurez fisiológica. En este momento, la semilla posee 60% de humedad.



Figura N° 17: Vainas en estado R 5,5.

Figura N° 18: Vaina en estado R6.



Figura N° 19: Cultivo en estado R8.



- Estado R8 – El 95% de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez (Figura N° 19). Una vez alcanzado el estado R8, con 5 y 10 días de tiempo seco, las semillas reducen su humedad a menos de un 15%, permitiendo la cosecha. La duración de ésta etapa depende de la humedad relativa, cuánto más alta, más demora el secado del grano.

Factores que afectan el desarrollo

El fotoperiodo y la temperatura son los dos factores más importantes que afectan el crecimiento y desarrollo del cultivo de soja.

Fotoperiodo

Las hojas reciben el estímulo fotoperiódico que inicia la transformación de los meristemas vegetativos en reproductivos. La mayoría de los cultivares comerciales pueden recibir el estímulo fotoperiódico cuando las hojas unifoliadas se encuentran totalmente expandidas y están desplegando la primer hoja trifoliada, ya que se estima que la planta posee un área foliar suficiente para percibir dicho estímulo.

La soja es una especie de días cortos con respuesta cuantitativa. Cada cultivar tiene un fotoperiodo crítico, por debajo del cual el período emergencia-floración no ve incrementada su duración por efecto fotoperiódico. Con fotoperiodos más largos que el crítico, la tasa de desarrollo de los órganos reproductivos se vuelve más lenta y la floración se retrasa. El control fotoperiódico ocurre hasta la madurez.

El fotoperiodo varía con la latitud y la época del año. Los diferentes tipos de genotipos de soja exhiben un rango muy amplio de sensibilidad fotoperiódica. Existen desde cultivares insensibles al fotoperiodo hasta aquellos con fotoperiodos críticos muy altos, adaptados a latitudes altas. Para latitudes bajas, se utilizan cultivares que florecen con fotoperiodos más cortos y poseen alta sensibilidad fotoperiódica. Por éste motivo existe una clasificación americana que divide a los cultivares en grupos de madurez (GM). Cada GM está adaptado a una franja latitudinal relativamente estrecha (200 Km.), como demuestra la Figura N° 20. Si se traslada el cultivar de una zona a otra con una latitud más alta que la de su rango, encontrará un fotoperiodo natural más largo, con lo cual se favorecerá el crecimiento vegetativo, retrasando la floración y maduración. El caso contrario ocurre si llevamos un cultivar de latitudes más bajas que las de su rango de adaptación, la planta estará expuesta a fotoperiodo más cortos, por lo que su inducción floral se verá adelantada, dando como resultado plantas más pequeñas.

Debido a la respuesta fotoperiodica de la soja, los cambios latitudinales modifican la longitud del ciclo de cada cultivar. Por estos motivos, existe un rango de GM adaptados a cada región que se comportarán como ciclo corto, medio o largo. Un error en la elección del GM determinará pérdidas de rendimiento de un nivel variable de acuerdo a las condiciones climáticas.

Los requerimientos de fecha de siembra, stand de plantas, distribución de las plantas, condiciones de suelo y malezas son diferentes para cada uno de los ciclos (como muestra la Tabla N° 9).

Cuando se siembran cultivares de ciclo más corto que lo recomendado, los mismos reducen su crecimiento y, por lo tanto, su rendimiento. Si se siembran cultivares de ciclo más largo que lo recomendado, se retrasa demasiado el inicio de la fructificación, aumentando el riesgo de heladas que afecten el llenado de granos.

Cada cultivar cuenta con una franja latitudinal en la cual con fechas de siembra de noviembre se comporta como de ciclo corto y al sur como ciclo largo.

Tabla N° 9: Requerimientos y características de los cultivares de ciclo corto, medio y largo.

Ciclo CORTO	Ciclo MEDIO	Ciclo LARGO
<ul style="list-style-type: none"> • Fecha de siembra temprana. • Mayor stand de plantas. • Mejor distribución del stand de plantas. • Suelo con pocas limitaciones físico-químicas. • Mayor control de plagas y malezas. • Menor vuelco. • Mayor rendimiento en condiciones de alta fertilidad y disponibilidad hídrica. • Baja estabilidad de rendimiento, debido a mayor consumo de agua diario promedio durante el llenado de granos. • Desocupan antes el lote. <p>Menor calidad de semilla, debido a la mayor humedad y temperatura ambiente durante la madurez.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fechas de siembra intermedias. • Menor stand de plantas. • Suelo con más limitaciones físico-químicas. • Menor control de plagas y malezas. • Mayor plasticidad en la época y densidad de siembra. • Mayor estabilidad de rendimiento, al retrasar su llenado de granos hacia período con menor probabilidad de ocurrencia de estrés hídrico. • Mayor tendencia al vuelco. • Mayor predisposición a ser afectados por la podredumbre húmeda del tallo (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>). • Mejor calidad de semilla. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fechas de siembra tardías. • Menor stand de plantas. • Suelo con más limitaciones físico-químicas. • Menor control de plagas y malezas. • Mayor susceptibilidad al vuelco. • Mejor comportamiento en suelos con limitaciones físicas y/o químicas. • Mayor competencia con las malezas por su mayor crecimiento. • Mejor comportamiento ante deficiencias en el manejo del cultivo.

Temperatura

Las temperaturas bajo las cuales los procesos ocurren con mayor velocidad oscilan entre 26 y 34°C de día y 22 a 30°C de noche. Las bajas temperaturas disminuyen el número de primordios reproductivos y su tasa de desarrollo, estimulándose el crecimiento vegetativo.

Otro factor que afecta al cultivo es el estrés hídrico, que reduce el número de estructuras reproductivas y modifica la tasa de desarrollo hasta antesis. La magnitud de éste efecto varía con el momento, la extensión y la intensidad del estrés.

La deficiencia de nutrientes, la humedad u otras condiciones de estrés en general alargan la duración de las etapas vegetativas y acortan la duración de las etapas reproductivas.

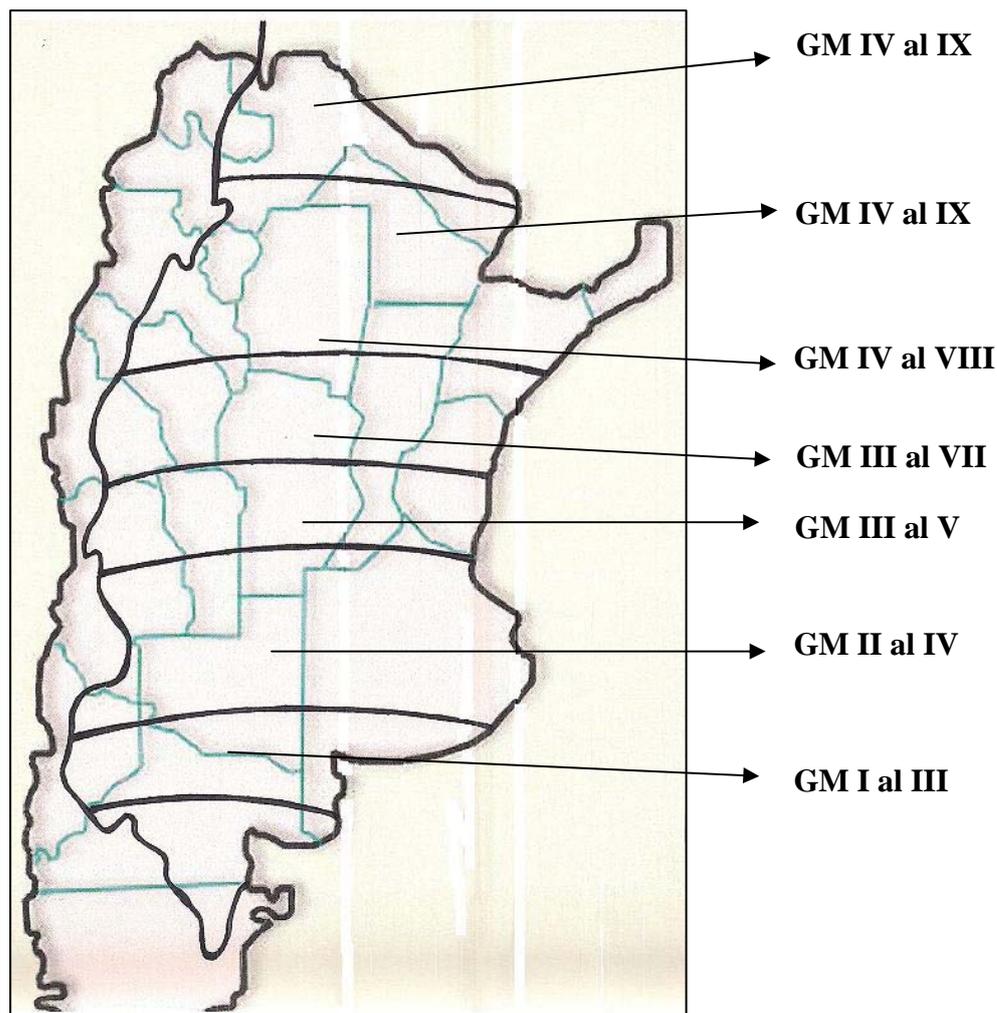


Figura N° 20: Franjas latitudinales de adaptación de los GM de soja en la Argentina.
GM que son posibles de utilizar según las zonas.

#

&S' "Iae E' 1-1#

Crecimiento vegetativo

El crecimiento vegetativo comienza con la germinación de la semilla y continúa hasta que finaliza la formación de tallos, hojas y raíces, aproximadamente cuando se inicia el llenado de granos o estado R5. Se establece el sistema radical y el aparato fotosintético que contribuirán a la formación y crecimiento de los frutos.

Sistema radical

La soja cuenta con una raíz principal pivotante, un gran número de raíces adventicias muy ramificadas que salen de la base del hipocótilo.

En V2, las raíces laterales proliferan rápidamente en los primeros 15 cm. de suelo y en V5 ya se entrecruzan con las raíces de los surcos vecinos (con surcos a 70 cm. de separación). Bajo condiciones favorables, en V6, la raíz principal y algunas ramificaciones pueden crecer y alcanzar el metro de profundidad.

En R1 la tasa de crecimiento radicular se incrementa pronunciadamente y se mantiene hasta R4 a R5. Luego, las raíces comienzan a deteriorarse. Desde R2 a R6, las raíces laterales mayores realizan su crecimiento en profundidad. Poco después de R6, el crecimiento radicular cesa.

La mayor parte del peso seco del sistema radicular (80%) se encuentra en los 15 cm. superiores del suelo, debido al mayor tamaño de la raíz primaria y al peso de la masa nodular. Más del 40% de la superficie absorbente se encuentra en dicha zona.

La extensión del sistema radical puede variar con el manejo del suelo y el estado estructural del mismo. El desarrollo radicular tiene relación con la longitud del ciclo.

Uno de los factores que más afecta la tasa de crecimiento y el patrón de distribución de raíces es el contenido de agua del suelo. Bajo condiciones de sequía, las raíces crecen lentamente en la capa superficial del suelo y más rápidamente en las capas profundas, con más agua disponible.

Parte aérea

El tallo principal presenta una altura variable con un número de nudos que en general oscila entre 14 y 20. La cantidad de nudos producidos a la madurez depende de la latitud, la época y densidad de siembra y la longitud del ciclo y hábito de crecimiento del cultivar. Las ramas tienen un número de nudos menor que el tallo principal.

La soja presenta yemas en las axilas de los cotiledones y de las hojas unifoliadas o trifoliadas. Dichas yemas pueden producir una rama o un ramillete floral, o permanecer latentes. El número de ramas incrementa con el espaciamiento entre surcos y la reducción de la densidad, dependiendo de la longitud del ciclo del cultivar y de su hábito de crecimiento. Las mayores son las inferiores y su tamaño se reduce hacia el ápice.

En los nudos de las hojas trifoliadas se encuentran tres yemas, una central y dos axilares. La cantidad y ubicación de los yemas otorgan a la soja una capacidad para recuperarse ante daños, como el granizo. La planta puede producir nuevas ramas y hojas después de una destrucción total del follaje, salvo en el caso que el tallo se corte por debajo del nudo cotiledonar, hecho que determina la muerte de la planta.

Si la yema central hubiese producido un ramillete floral y, por algún motivo el mismo aborta, las yemas laterales se pueden activar para formar un ramillete nuevo.

Factores que afectan el crecimiento

El fotoperiodo no solo afecta la duración del período VE-R1, sino que también modifica la duración de los demás períodos reproductivos. Los fotoperiodos cortos reducen la duración de la etapa de llenado de los granos, pero incrementan la tasa de crecimiento de las semillas.

Condiciones de estrés, como alta temperatura o deficiencia de humedad, reducen el rendimiento, debido a una reducción en uno o más de sus componentes. La reducción de un componente puede ser compensada por otro, por lo que el rendimiento puede no ser significativamente modificado. El componente afectado depende del estado reproductivo de la planta cuando se produce el estrés. A medida que la planta avanza en su estado de crecimiento de R1 a R5,5, su capacidad para compensar la ocurrencia de estrés se reduce y el potencial de reducción del rendimiento por parte del estrés aumenta.

Las temperaturas más favorables para el crecimiento radical se ubican entre 22 y 27°C. La densidad aparente del suelo afecta en forma exponencial e inversa el crecimiento de la raíz.

Aspectos del manejo del cultivo, como el espaciamiento entre surcos, también afectan la distribución y crecimiento de las raíces, dado que el acercamiento de las distancias entre las hileras aumenta la biomasa radical en profundidad.

La infección de las raíces con *Bradyrhizobium japonicum* afecta el crecimiento de las raíces. En las plantas no nodulares se acentúa el crecimiento de la raíz principal, mientras que en plantas noduladas se observa una mayor distribución tipo cabellera.

Entre los factores que inciden sobre el aborto de órganos reproductivos se pueden mencionar:

a. Factores internos

- Competencia por fotoasimilados entre las flores y pequeños frutos.
- Alteración de balances hormonales producida por el establecimiento de los primeros frutos de la inflorescencia.

b. Factores ambientales

- Sombreado. El aborto se observa con más frecuencia en las porciones inferiores del canopeo. Se incrementa en períodos prolongados de gran nubosidad durante la floración. Causa disminución de la fotosíntesis, provocando deficiencias de fotoasimilados y de nutrientes.
- Deficiencia hídrica. Provoca cierre de estomas, determinando la disminución de la fotosíntesis y el aumento de la temperatura foliar por reducción de la transpiración. Si la deshidratación es severa puede causar la muerte de los embriones. Además, puede estimular la síntesis de hormonas que aceleran la senescencia y la muerte de órganos.
- Temperaturas medias inferiores a 18°C o superiores a 36°C. los efectos de temperaturas extremas pueden ser directos sobre la sobrevivencia de los embriones o indirectos, afectando la fotosíntesis, la respiración o el balance hídrico de las plantas. Existen cultivares que pueden soportar límites de temperatura más altos o más bajos.
- Deficiencia de nutrientes. Las deficiencias de N y P provocan falta de fotoasimilados.
- Fotoperiodo. Días largos estimulan el aborto de órganos reproductivos, alargan el período reproductivo y disminuyen el traslado de asimilados hacia las semillas.
- Insectos y enfermedades. Destruyen embriones o alteran el traslado de fotoasimilados y agua hacia los mismos.
- Defoliación. Sus efectos varían de acuerdo a la intensidad de la misma y al estado de desarrollo de la planta.

Rendimiento

El rendimiento en grano puede separarse en componentes del rendimiento, cuyo producto determinará el peso final de semillas a madurez y puede expresarse de la siguiente manera:

$$R: Nr \cdot Ng \cdot Pg$$

Dónde:

R: Rendimiento en granos (g/m²)

Nr: número de estructuras reproductivas por unidad de superficie (número de frutos/ m²)
 Ng: número de semillas por unidad reproductiva (número de semillas/fruto)
 Pg: peso promedio de las semillas (g/semilla)

Los componentes del rendimiento se pueden visualizar en la figura a continuación:

Figura N° 21: Componentes del Rendimiento del cultivo de Soja.



Los componentes del rendimiento pueden ser modificados por el genotipo, el ambiente y el manejo.

El grado de sensibilidad de cada componente a los factores ambientales varía con el estado de desarrollo del cultivo. La soja tiene la capacidad de compensar (dentro de ciertos límites) reducciones en un componente del rendimiento debidas a factores de estrés.

El componente más asociado con variaciones en el rendimiento es el número de semillas por unidad de área de suelo. Hay que tener en cuenta que no todos los períodos son igualmente importantes en la determinación del número final de semillas, existen etapas más críticas que otras. Por lo tanto, es de suma importancia determinar qué etapas del ciclo deben estar sometidas a las mejores condiciones ambientales y de prácticas de manejo para que haya una óptima disponibilidad de recursos y una buena capacidad de las plantas para capturarlos y utilizarlos. Las estructuras responsables de que haya más o menos número de semillas por unidad de superficie se generan desde emergencia hasta mediados del estado R5. El número de semillas por m² es función de la fotosíntesis o la tasa de crecimiento del cultivo entre R2 y R5, siendo particularmente importante el período entre R4 y R5. A medida que disminuye la tasa de crecimiento del cultivo entre R2 y R5, es menor el número de destinos reproductivos fijados. El número de semillas por unidad de área de suelo queda determinado durante el período R2-R5 y su disminución sólo puede ser compensada parcialmente por el aumento de peso unitario de las semillas.

Se debe tener en cuenta que es normal que el aborto de estructuras que podrían dar semillas, supere el 40-60% de las flores generadas. Es importante determinar si la menor cantidad de semillas generadas se debe a una disminución de la cantidad de

flores o mayor porcentaje de aborto. Períodos de estrés durante la floración temprana producen un reducido efecto sobre el número de semillas por m², debido a que el cultivo presenta gran plasticidad y puede seguir produciendo flores una vez aliviado el estrés. Los límites de número de semillas por vaina y tamaño de semillas están determinados genéticamente.

Período Crítico – Ubicación e importancia

Para maximizar el rendimiento es necesario tener en cuenta el período crítico del cultivo, es decir la etapa durante R4 y R6. Para lograr el máximo rendimiento, debemos asegurarnos que el crecimiento del cultivo sea máximo durante ésta etapa, cumpliendo algunas prácticas de manejo.

Para poder asegurarnos la provisión de agua de suelo durante esta etapa, es recomendable la siembra directa o la labranza con cubierta de residuos, lo que aumenta las chances de llegar al período crítico con buena disponibilidad de agua en el perfil. El manejo de la densidad de plantas, también se debe tener en cuenta. Si la oferta de agua del perfil es poca, deberemos adecuar la densidad de plantas para no provocar el agotamiento del perfil.

Para maximizar la tasa de crecimiento del cultivo durante el período crítico, debemos hacer coincidir dicho período con el momento del año en el que es máxima la radiación incidente. Debemos tener en cuenta que las deficiencias hídricas son más importantes que los niveles de radiación. Para lograr éstas coincidencias, manejamos los GM y las fechas de siembra. En los cultivares de GM bajos (variedades precoces) debemos ubicar el período crítico durante la primera parte del verano cuando los niveles de radiación son altos. Si se realiza éste manejo se puede llegar a acortar la prefloración reduciendo el índice de área foliar (IAF). Si el IAF cae por debajo de valores aceptables no se captará la máxima radiación posible y por otro lado, si existen limitaciones hídricas y nutricionales la expansión foliar se verá reducida al igual que las ramas dificultando la obtención de máximos rendimientos.

Al retrasar la fecha de siembra, retrasamos la ubicación del período crítico hacia momentos con menor radiación incidente, disminuyendo la posibilidad de maximizar el rendimiento. Para poder disminuir el efecto de esta situación, se siembran genotipos precoces. Para no reducir la cantidad de nudos (por condiciones térmicas y de fotoperiodo) se debe manejar de manera apropiada la densidad de plantas y el espaciamiento.

En caso que las condiciones ambientales no sean adecuadas como ser falta de retención hídrica, baja fertilidad química o estructural, conviene seleccionar un cultivo de ciclo más largo, el cual explorará mejor el ambiente con menor radiación incidente pero manteniendo una alta eficiencia de intercepción.

Manejo del cultivo de Soja

Fecha de Siembra

La fecha de siembra óptima varía según fotoperiodos, regímenes térmicos e hídricos y características edáficas y sanitarias. Los cultivos deben ser manejados de manera de optimizar su estado fisiológico general al comienzo de su período crítico (de R4 a R6). En el área sojera la fecha de siembra óptima va del 15 de octubre al 10 de noviembre.

La temperatura condiciona la fecha de siembra al determinar el periodo libre de heladas. El periodo libre de heladas y la extensión de éste periodo se relacionan con la latitud y altitud. El periodo de siembra aumenta de sur a norte de nuestro país.

Cuando se trata de cultivos en secano, el régimen hídrico es el que condiciona la fecha de siembra, ya que la disponibilidad de agua es importante para la germinación y durante la etapa de llenado de granos. El déficit hídrico afecta la fenología, el crecimiento en altura y producción de biomasa, determinando el vuelco. Por éste motivo se recomienda modificar la fecha de siembra de un cultivar para lograr adecuado crecimiento y evitar el vuelco.

Las características edáficas, también afectan al crecimiento y vuelco.

Los problemas sanitarios a veces obligan a modificar las fechas de siembra para evitar superposición de la etapa de mayor susceptibilidad del cultivo con la de producción de inóculo y la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para que se produzca la infección.

Para un mismo cultivar, a medida que atrasamos la fecha de siembra desde una fecha normal (1° de Noviembre), aumenta la temperatura y se acelera el crecimiento y desarrollo. Fechas de siembra muy tardías hacen coincidir la etapa de llenado de grano con temperaturas y radiación menores. El atraso en la fecha de siembra acorta la duración en días del ciclo del cultivo y el período crítico de llenado de granos, se realiza con peores condiciones ambientales.

Si se utilizan cultivares de GM diferente, para una misma fecha de siembra, el periodo crítico se produce en momentos diferentes. El rendimiento para una fecha de siembra, será mayor en el GM que coincida su periodo crítico con mejores condiciones ambientales.

Siempre se debe recordar que a menor número de nudos por planta, menor será el rendimiento obtenido. Esto ocurre si se atrasa la fecha de siembra para todos los GM y en siembras más tempranas en GM más cortos.

Distancia entre surcos

La elección del espaciamiento entre surcos depende de la fecha de siembra, la latitud, las condiciones ambientales limitantes para el crecimiento del cultivo, la reducción del espaciamiento contribuye a mejorar el aprovechamiento de la radiación, el control de malezas e incrementa el rendimiento. El espaciamiento entre surcos óptimo se reduce con la latitud. Se debe recordar que el objetivo es lograr el 95% de interceptación de radiación en R3. Normalmente la distancia entre surcos más utilizada es 52 cm.

Las diferencias en rendimiento entre espaciamientos son menores a nulas en siembras de noviembre. En siembras tardías (posteriores al 15 de diciembre) y tempranas (septiembre-octubre) se obtienen mayores rendimientos con distancias inferiores a 52 cm. (siempre hablando del cultivar con el mismo GM). Reducciones del espaciamiento permiten compensar reducciones de rendimiento por adelantos y atrasos de la fecha de siembra.

Con cultivares de GM más cortos y fechas de siembra muy tempranas o muy tardías, se debe acercar la distancia entre surcos. Lo mismo ocurre en el caso que sembrar en un ambiente no adecuado. Con cultivares de GM más largos y en siembras normales no se debe acercar la distancia entre surcos porque pueden generarse condiciones favorables para enfermedades o vuelco. En fechas de siembra tardías, conviene elegir un cultivar con un GM que pueda cumplir su periodo crítico con las mejores condiciones climáticas, ajustando la distancia entre surcos y la densidad de plantas.

Densidad de siembra

La soja es un cultivo que posee gran plasticidad a la densidad de siembra ya que posee una gran capacidad de compensación a través del número de ramas y frutos por planta. La densidad de plantas óptima es aquella que: permite un buen crecimiento evitando el vuelco, reduce la incidencia de enfermedades y asegura una adecuada inserción de las vainas inferiores para facilitar la cosecha y evitar pérdidas.

La densidad óptima de plantas depende de la fecha de siembra, latitud, condiciones ambientales, características del cultivar y del espaciamiento entre surcos.

En siembras tardías o muy tempranas conviene aumentar las densidades de siembra. A mayor latitud, las densidades de siembra tienden a ser mayores, reduciendo el espacio entre surcos, como se ha descrito en el punto anterior, y de ésta manera lograr una rápida cobertura e incrementar la eficiencia de uso de la radiación.

Cuando el ambiente posiblemente limite el crecimiento del cultivo, es conveniente incrementar la densidad de siembra para lograr una mejor cobertura.

Existen casos en los que se reduce la densidad de siembra para disminuir la incidencia de enfermedades como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Generalmente se recomienda aumentar la densidad de siembra a menor longitud de ciclo y para un mismo cultivar a medida que se modifica la fecha de siembra con respecto al mes de noviembre.

Requerimientos nutricionales

La demanda de nutrientes varía proporcionalmente con los niveles de producción logrados y el índice de cosecha nutricional.

A continuación se describirá los requerimientos de los nutrientes más importantes:

- **Nitrógeno:**

La demanda de nitrógeno es alta, llegando a 80 Kg./Tn de grano. Es el elemento limitante en los cultivos de alta producción.

Las deficiencias de éste nutriente se evidencian por reducciones en el crecimiento y amarillamiento de las plantas. La aparición de los primeros síntomas se da en las hojas inferiores de las plantas.

Como ya se ha nombrado, la soja obtiene éste nutriente de dos modos diferentes: absorción desde el suelo y por fijación biológica de nitrógeno.

Más adelante se describirá con detenimiento la importancia del nitrógeno en el cultivo de soja.

- **Fósforo:**

El fósforo es el segundo elemento en importancia, considerándose el segundo limitante para la producción. La demanda del cultivo es de 8 Kg./Tn de grano. Este nutriente es de suma importancia para la nodulación y la FBN.

Los requerimientos de P son máximos a los 30 días de la emergencia de las plántulas. El diagnóstico y las correcciones de P deben realizarse al momento de la siembra o con anterioridad. Para realizar el diagnóstico de P, se recomienda calcular el contenido de P extractable en los primeros 20 cm. de suelo mediante el método de Bray y Kurtz I.

Dada la escasa movilidad del P, es recomendable la aplicación de la fertilización fosfatada en un lugar cercano a las raíces, para que las mismas puedan alcanzarlos

durante su crecimiento. También se recomienda la colocación del fertilizante en bandas angostas. Debido a que las semillas de soja son sensibles a la fototoxicidad y salinidad, es conveniente que el fertilizante se coloque cerca de la semilla, pero no en contacto con la misma. El contacto directo entre semilla y fertilizante puede dar lugar a la muerte de la misma o a la reducción de la nodulación, por lo que se verá afectada la FBN.

En el caso de los lotes trigo/soja de segunda, la fertilización se puede realizar sobre el trigo y así la soja aprovechará el remanente.

- Azufre:

El cultivo de soja requiere alrededor de 7 Kg./Tn de grano. Este elemento se vincula con el metabolismo de N, por lo que un déficit de S provoca menor asimilación de N a nivel de las hojas.

Los síntomas de deficiencia de S se asemejan a los de N, observándose un amarillamiento en las hojas en formación o nuevas. La baja disponibilidad de S afecta el número de granos y su peso individual.

Acumulación y traslocación de nitrógeno

La soja presenta una alta acumulación de proteínas en las semillas, por lo que es un cultivo con alta demanda de nitrógeno y menor producción de biomasa de semilla por unidad de fotoasimilado producido. Por estos motivos anteriormente nombrados, el nitrógeno es el nutriente crítico. Si no existen limitantes mayores, el rendimiento de la soja es función directa de la capacidad de acumular nitrógeno que exhiba el cultivo.

El contenido de nitrógeno en las semillas dependerá de: la tasa de acumulación de nitrógeno en la planta durante el desarrollo de las semillas, la tasa de acumulación de nitrógeno en semillas, la longitud del período de llenado y la cantidad de nitrógeno acumulado previamente en los órganos vegetativos, susceptibles de ser traslocados a las semillas.

Esta leguminosa tiene la capacidad de tomar nitrógeno fijado simbióticamente gracias a la asociación de bacterias *Bradyrhizobium japonicum* con sus raíces.

Las fuentes de nitrógeno para éste cultivo son:

- El nitrógeno presente en el suelo, que proviene de la transformación de residuos orgánicos y de fertilizantes.
- El nitrógeno atmosférico fijado por las bacterias.

El porcentaje de nitrógeno que aporta la fijación simbiótica depende de la composición físico química del suelo y del suministro de fotoasimilados de la planta. Condiciones de alta disponibilidad de nitratos son inhibitorias para la fijación de nitrógeno. La fijación de N es susceptible a la deficiencia hídrica en el suelo, cesando la capacidad de reducir N atmosférico. Con episodios de sequía, el cultivo deberá tomar un porcentaje mayor de N mineral presente en el suelo. Otro factor importante que reduce la fijación de N es la falta de aireación del suelo, debido a estados de compactación física o a saturación por inundaciones.

La acumulación de N sigue una función muy similar a la acumulación de materia seca, es decir que al principio del ciclo del cultivo la tasa de asimilación es baja y luego va incrementándose hasta llegar a un máximo durante el período de floración y establecimiento de los frutos. Cuando comienza el llenado de los granos, la tasa de asimilación de N comienza a declinar. La acumulación de N en las semillas es función de la acumulación de N en los tejidos vegetativos. El porcentaje de N acumulado en las

semillas respecto del N en el resto de la planta a la cosecha, es de alrededor del 90%, mientras que la partición de materia seca oscila entre el 47% y el 56%.

Durante el período de llenado de las semillas la demanda de N es muy alta y una importante proporción del N foliar es removilizado hacia las mismas. Una reducida tasa de asimilación de N, durante el periodo vegetativo o el llenado de grano, así como una redistribución incompleta del mismo, determinan pérdidas en el potencial de rendimiento de la soja. Las semillas son el principal destino de acumulación de nitrógeno proveniente de la removilización de otras partes vegetativas.

Nutrición nitrogenada

La soja se caracteriza por acumular importantes cantidades de proteína en grano, alcanzando valores del 40% en promedio. Para lograr éstos altos contenidos de proteína en el grano, el cultivo debe acumular una cantidad significativa de nitrógeno.

Si no existen limitantes importantes de otra naturaleza, el rendimiento del cultivo es en función directa de su capacidad de acumular N y la disponibilidad del mismo.

La soja puede cubrir sus requerimientos de N a partir del aporte del suelo, la fertilización y el aire, por medio de la fijación biológica de nitrógeno.

Como se ha nombrado previamente, la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es una asociación mutualista entre la planta y bacterias del género *Bradyrhizobium*. De ésta unión se forma nódulos a nivel de las raíces. Las bacterias son capaces de transformar el N₂ de la atmósfera en NH₄⁺ asimilable por las plantas. El aporte de la FBN representa un ahorro del N del suelo. El porcentaje de N acumulado en la planta por fijación biológica presenta una relación inversa a la cantidad de N disponible en el suelo. Entre el 25 y el 75% de las necesidades de N son logrados por FBN. La fijación es un proceso costoso para la planta, en cuanto a energía. Para obtener rendimientos máximos, ambas fuentes de N deben complementarse.

Los requerimientos de la planta de soja desde la germinación hasta la floración (R1) son bajos. En ésta etapa la acumulación de N está definida por la tasa de crecimiento del cultivo y es independiente de la oferta de dicho nutriente. En la etapa de fructificación (R3) a plenitud del llenado de grano (R6), los requerimientos son altos. Hasta el comienzo de los estadios reproductivos el suelo puede satisfacer los requerimientos de nitrógeno del cultivo. En las etapas de R3 a R6 es necesaria la participación de la FBN para suplir los requerimientos de N. La FBN comienza unos 30 días después de la emergencia y aumenta notablemente durante el llenado de granos, aumentando el rendimiento en grano.

El aporte de N por fertilizante reduce el aporte de N por fijación biológica. Por éste motivo, sólo se aconseja la fertilización nitrogenada en casos en los que el cultivo de soja no se inocule con rizobios o cuando se evidencia déficit de N por falta de nodulación. Se estima que el agregado de hasta 18 Kg./ha. de N no afecta la nodulación ni la FBN.

Interacción Soja-Bradyrhizobium

Inoculación

Cuando en el suelo no se dispone de los rizobios adecuados, por el método denominado inoculación, se agregan artificialmente rizobios seleccionados sobre la semilla o el suelo. El producto biológico con el que se realiza esto se denomina inoculante.

Cuando se produjo la expansión del cultivo de soja, en la década del 70', en nuestros suelos no existían las bacterias *B. japonicum* y *B. elkanii*, por lo que se consideró necesario introducirlas al suelo mediante la incorporación de las mismas a las semillas a sembrar, es decir inoculando las semillas (Pacheco Basurco, 1983). En los comienzos, la mayor parte de los productos inoculantes eran importados (EE.UU.).

Debido a la amplia difusión del cultivo y la repetida inoculación anual, los rizobios se han naturalizado en la mayoría de los suelos sojeros. Por ésta razón es posible observar, al examinar las raíces de soja no inoculada, la presencia de nódulos en suelos donde se implantó un cultivo de soja sin inocular.

Para seleccionar una cepa de bacteria, aparte de la especificidad, se deben tener algunas consideraciones básicas como: capacidad de formar nódulos (infectividad), para fijar N (efectividad), la sobrevivencia en las semillas y en el suelo, la adaptación o tolerancia a situaciones de estrés, la estabilidad genética y la capacidad de crecimiento en las condiciones de producción.

El producto inoculante que es adicionado a la semilla debe ser capaz de dejar en el exterior de la semilla, una carga bacteriana no menor a 80.000 rizobios por semilla. Las bacterias serán encargadas de infectar las raíces de las plantas, alcanzar un desarrollo específico (bacteroide) en el interior de un nódulo para luego comenzar a fijar nitrógeno derivado del aire del suelo. Más adelante se desarrollará con mayor detenimiento el tema de inoculantes.

Los estudios comienzan en laboratorio, donde se evalúa la capacidad de nodulación. Con las cepas preseleccionadas, se inician estudios de invernáculo a fin de determinar la capacidad de nodulación y de FBN. Finalmente, se realizan ensayos en condiciones de campo en diferentes áreas cultivadas con soja.

Infección y formación del nódulo

La simbiosis de la soja con los rizobios no es cíclica, ya que las bacterias no se encuentran dentro de las semillas. Para que se de la simbiosis las semillas se debe producir la infección. Cuando dos miembros de una simbiosis entran en contacto se da el "reconocimiento".

La comunicación entre los simbioses comienza con la liberación de metabolitos secundarios contenidos en exudados de semilla y de la raíz de la leguminosa (soja). Los compuestos liberados son de naturaleza flavonoides como la naringenina, geniteína y daidzeína, ácidos aldólicos y betaína. Las sustancias secretadas hacen que los rizobios sean atraídos químicamente hacia la región apical de los pelos radicales. Estos flavonoides son considerados la primera molécula señal.

Al momento que los rizobios reconocen la señal enviada por la planta, mediante los metabolitos secundarios, se inicia la transcripción (proceso mediante el cual un gen o genes codificados en el ADN se copian a ARN mensajero) de los genes de nodulación denominados genes nod. El proceso de transcripción de los genes nod de la bacteria, involucra a una proteína de origen bacteriano llamada NodD. Cuando entra en contacto con los flavonoides secretados por la planta, los genes nod de la bacteria modifican su conformación permitiendo que la enzima encargada de llevar a cabo la transcripción de los genes nod (ARN polimerasa) realice su función. La traducción de los genes nod (proceso mediante el cual los ARN mensajeros son traducidos a proteínas), da como resultado la producción de un conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y secreción de los denominados factores de nodulación (factores Nod).

Los factores Nod secretados a la rizósfera por los rizobios son reconocidos por la planta huésped. Las concentraciones necesarias de los factores Nod para poder producir las

respuestas en los pelos radicales de la planta van de 10^{-6} a 10^{-15} M. Esta concentración varía en función de la respuesta inducida y de la interacción rizobio-leguminosa. Las plantas poseen receptores tipos cinasas para los factores Nod. Los receptores cinasas tienen una región transmembranal y una región citoplasmática, ésta última con actividad específica de cinasa con capacidad de transferir un grupo fosfato.

Al ser reconocidos se suceden una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta. Dentro de las respuestas inducidas por los factores Nod encontramos cambios en los niveles del influjo y eflujo de iones calcio, cloro, potasio y protones y cambios en el pH intracelular que se convierte más alcalino. Estas modificaciones en los niveles iónicos de la célula son los responsables de inducir la despolarización de la membrana de los pelos radicales. Debido a la despolarización de las membranas se activan canales de calcio, lo que hace oscilar la concentración de éste ión a nivel citoplasmático y en la región perinuclear. Los cambios de concentración de calcio son oscilatorios y son claves para disparar cascadas de señalización. Debido a la cascada de señales, se activan las proteínas sensibles a este ión y capaces de fragmentar y reorganizar el citoesqueleto y se activan cinasas que fosforilan proteínas de una familia de factores transcripcionales llamadas proteínas GRAS.

Aparte de los cambios ya descritos, se producen modificaciones de los microfilamentos de actina y de los microtúbulos de las células de los pelos radicales. Hay un incremento en la expresión de un gran número de genes de la planta, entre los que se incluyen aquellos que codifican proteínas llamadas nodulinas. Las nodulinas están involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Hay nodulinas tempranas y tardías. Las nodulinas tempranas se expresan en las primeras etapas de la interacción simbiótica, antes de la FBN. Las nodulinas tardías, como su nombre lo indica, son aquellas transcritas en etapas más tardías, una vez que se ha iniciado la FBN. Los genes que codifican las nodulinas tempranas participan en la organogénesis del nódulo iniciando con la formación de primordios.

El primordio es el resultado de la división continua de las células del córtex, dando lugar a la formación de un grupo de células a las cuales se les ha llamado primordio de nódulo. Todas estas respuestas enumeradas ocurren en ausencia del rizobio.

Para que la bacteria se adentre en el pelo radical y llegue al córtex de la raíz se requiere de la formación de una nueva estructura conocida como hilo de infección. La formación del “camino” de infección está dirigida por la planta por la deformación del citoesqueleto que induce una invaginación en la vacuola generando los llamados puntos citoplasmáticos. El hilo se forma mediante el estímulo continuo del rizobio y los factores Nod que se producen. El hilo de infección es una estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical previniendo de esta manera el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio. Los puntos citoplasmáticos permiten la comunicación de una célula con otra y por allí irá creciendo la bacteria. La formación del hilo de infección hace que las células de las raíces dejen de crecer de forma polar (crecimiento hacia su parte apical). Previa a la formación del hilo, el primer efecto morfológico producido por los factores Nod es un hinchamiento en la zona apical del pelo. Por parte de la bacteria, se secretan glúcidos cíclicos, lipopolisacáridos (LPS), fundamentales para una correcta infección; succinoglucano y EPS, cruciales para la iniciación y posterior elongación del canal de infección. La planta, a través de los pelos radicales y las células del córtex, libera hacia el canal de infección, arabinogalactanos y proteínas ricas en prolina como ENOD12 y glucoproteína matriz (MGP). Los compuestos son almacenados en los espacios intercelulares de células no infectadas. La MGP es una glucoproteína constitutiva cuya expresión en el proceso de infección se ve incrementada y cuya presencia es necesaria para el desarrollo del hilo de infección.

El hinchamiento producido da lugar a un enroscamiento del mismo, ayudando a atrapar a las bacterias que se encuentran localizadas en ésta zona, generando un nuevo sitio de crecimiento. Hacia adentro del pelo se forma un túnel que crece desde el ápice del pelo hasta la base del mismo. Las bacterias se desplazan dentro del hilo de infección e incluso se dividen en su trayectoria al interior del pelo. Cuando las bacterias llegan a las células del primordio del nódulo, son exocitadas del hilo de infección y al mismo tiempo son endocitadas por las células vegetales que forman el primordio. Esto da como resultado una nueva estructura llamada simbiosoma, que son estructuras membranales que contienen intracelularmente a los rizobios.

Cuando los rizobios se encuentran dentro de la célula vegetal sufren diversos cambios morfológicos como aumento del tamaño de las células y una diferenciación de la bacteria a un estado de bacteroide, el cual ya puede realizar FBN. Durante éste proceso, la expresión de las nodulinas tardías aumenta.

El nódulo es un órgano nuevo producto de la interacción anteriormente descrita.

Genética molecular de la infección

Como se ha explicado en el punto anterior, la infección consta de dos etapas: 1) la pre infección o atracción quimiotáctica de la bacteria por la planta seguida de la inducción de cambios estructurales en los pelos radicales y 2) cuando la bacteria entra en el pelo y forma canales de infección que van entrando a la raíz y al ramificarse y dividirse forman el primordio del nódulo.

• Genes de nodulación

La soja tiene la información genética para la infección simbiótica y para la nodulación. El papel del rizobio, en éste caso, *Bradyrhizobium japonicum*, es el de disparar el proceso. Los genes de nodulación se definen como aquellos genes del rizobio que son necesarios para la nodulación.

A los genes de nodulación se los llama genes nod de modo general, aunque comprenden genes designados como nod, nol y noe. Estos genes están agrupados en plásmidos o en una región del cromosoma. Los plásmidos que contienen la información para la asociación de llaman plásmidos pSym y en ellos se encuentran los genes responsables de la nodulación (genes nod) y los de la fijación de nitrógeno (genes nif y fix).

Se pueden distinguir cinco grupos de genes involucrados en la fijación del nitrógeno a nivel de la bacteria:

- Genes “nod comunes”: nod ABC. Son genes imprescindibles para la nodulación. Su ausencia impide el proceso de infección.
- Genes “nod específicos”: nodFE, nodH, nodPQ. Son los responsables de la especificidad de huésped. Mutaciones entre ellos alteran o amplían el rango de especificidad.
- Genes responsables de la síntesis del exopolisacárido (exo), del lipopolisacárido (lps), de glucanos y de polisacáridos capsulares (antígenos K). Los productos de estos genes son importantes para la formación de los canales de infección.
- Genes que permiten una ocupación más eficiente del nódulo.
- Genes que permiten la infección de un tipo determinado de genotipo de planta.

• Regulación de la expresión de los genes de nodulación

La expresión de los genes bacterianos que intervienen en el establecimiento de la simbiosis se produce como consecuencia de que la planta libera al medio flavonoides que en la bacteria interaccionan con la proteína NodD (factor de transcripción). El factor NodD regula los operones y estimula la transcripción de nodABC (genes nod comunes) y de otros genes nod esenciales. Los operones de los genes nod están precedidos por un promotor que contiene una secuencia consenso llamada “caja nod” (caja de nodulación). La proteína NodD reconoce la “caja Nod” presente en los de tipo nod.

El factor NodD responde a la unión de flavonoides o de betaínas a uno de los extremos de su cadena peptídica. Se trata de una proteína de membrana que recibe la señal del flavonoide a través de la capa lipídica. Para que se produzca la infección la proteína NodD tiene que ser activada y para esto tiene que interaccionar con el flavonoide específico. Por esto, los factores NodD son determinantes de la especificidad de huésped. Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD activa la transcripción de los genes de la nodulación mediante su unión a las cajas nod.

La proteína NodD puede regular la expresión de otros genes nod en función del nitrógeno combinado presente.

Los genes nod dejan de expresarse cuando el rizobio es liberado en el nódulo y se transforma en bacteroide. Esto se produce porque la proteína NodD deja de interaccionar con la “caja nod”.

- El factor Nod

Una de las funciones de los genes nodABC es formar el factor Nod. La composición de las cadenas laterales de los factores Nod es específica de cada tipo de rizobio. Los genes nodH, nodEF, nodM y nodPQ modifican el factor Nod haciéndolo específico. Por ejemplo, el factor nodH codifica la sulfotransferasa que transfiere un grupo sulfato al extremo reductor de los factores Nod, mientras que nodPQ sintetiza la forma activada del sulfato que va a transferir nodH.

No se sabe dónde actúa el factor Nod en la planta, pero su presencia es imprescindible para que tengan lugar los cambios de la planta durante la fase temprana de la infección, aunque su sola presencia no es suficiente para que se produzca.

En la rizósfera pueden existir quitinasas y otras enzimas capaces de degradar selectivamente factores Nod determinados. En el punto a continuación se describirá detenidamente la estructura de los factores de nodulación.

Estructura de los factores de nodulación (Factores Nod)

La estructura de los factores Nod producidos por los diferentes rizobios varían en: 1) la presencia de grupos adicionales mayormente en los extremos del oligosacárido de quitina, 2) en el tipo de ácido graso presente en el extremo no reductor y 3) en la longitud del esqueleto de oligosacáridos. Estas variaciones son determinantes mayores de la especificidad del hospedador.

La estructura química de los factores de nodulación es muy compleja. Los factores Nod poseen una cadena de tres a cinco unidades de N-acetil glucosamina (quitina), unidas por enlace β -1,4 con una sustitución en el extremo no reductor de una cadena alifática de variada longitud e insaturación (C16-C20) y distintas sustituciones (acetil, carbamoil, metil, sulfato y grupos azúcares) en el extremo reductor.

Estas decoraciones del esqueleto son las que determinan la especificidad y su síntesis está determinada por los genes nod específicos, todos ellos inducidos por el gen Nod D

(proteína activadora de la transcripción), sensor de flavonoides. También se conoce a los factores Nod como lipoquitooligosacáridos o LCO.

En la producción de los factores Nod participan varias enzimas. El primer paso en la síntesis de los factores Nod es llevado a cabo por una N-acetilglucosaminiltransferasa codificada por Nod C. La elongación de la cadena por Nod C tiene lugar en el terminal no reductor. La desacetilasa Nod B remueve el ácido graso N-acetilo del extremo no reductor del oligosacárido. Finalmente una acetiltransferasa, codificada por nod A, une la cadena acil al carbono C-2 libre de acetilo del Terminal no reductor del oligosacárido. La estructura básica es modificada por la acción de otras proteínas Nod que sintetizan o añaden varias sustituciones.

La expresión de nodABC es suficiente para la síntesis del esqueleto N-acetil-D-glucosamina acilada. El resto de las sustituciones o decoraciones que posee la molécula desempeñan un papel más sutil en la nodulación.

Los lipoquitooligosacáridos afectan diferentes procesos fisiológicos en la planta: inducen la deformación de los pelos radicales, la ontogenia de la estructura completa del nódulo, la división de las células corticales y la expresión de los genes nodulina, esenciales para la formación del hilo de infección. Todos estos cambios han sido descritos en el punto de Infección y formación del nódulo.

Desarrollo del nódulo

Los nódulos formados en la simbiosis entre soja y *Bradyrhizobium japonicum* son determinados, es decir que no hay un meristema permanente. Su crecimiento se basa en la expansión en vez de en la división celular, presentando una morfología esférica en vez de cilíndrica. Las primeras divisiones celulares en respuesta a la presencia del rizobio son anticlinales y se producen en la hipodermis.

A continuación se genera otro foco de división celular en el periciclo. Posteriormente, éstos dos meristemas convergen generando el primordio nodular, en el cual podemos encontrarnos células no vacuoladas procedentes de las divisiones de la hipodermis conformando el tejido central del nódulo, y células con un elevado grado de vacuolización procedentes de las divisiones en el periciclo, componiendo el parénquima nodular que rodea al tejido central. Gran parte de la actividad mitótica en la región central del nódulo se pierde transcurridos 12 a 18 días tras la inoculación. Algunas células de éste tejido central son invadidas a través de los canales de infección y pueden ser identificadas por su gran tamaño y densidad, debidos a la elevada presencia de simbiosomas. Los simbiosomas pueden presentar más de un bacteroide en su interior.

El resto de las células no infectadas, presentan un tamaño inferior y con una elevada vacuolización, presentan enzimas uricasas encargadas de la producción de ureidos que es la forma en la que se distribuyen los compuestos nitrogenados.

En el parénquima se encuentran varias capas de células separadas por espacios intercelulares y con un alto contenido de proteínas ricas en prolina en su pared, las cuales contribuyen a limitar la difusión del oxígeno al tejido central.

El parénquima tiene función protectora y participa en la producción de ureidos.

Estructura y diferenciación del simbiosoma

De forma paralela al desarrollo del nódulo, el rizobio se distribuye por el mismo a través de canales de infección. El nódulo va sufriendo una serie de modificaciones que culmina en la formación del simbiosoma, el cual presenta una serie de características que son indispensables para realizar la actividad fijadora de nitrógeno.

En un simbiosoma se pueden distinguir los siguientes componentes:

1. Membrana peribacteoides (mpb)
2. Fluido perobacteroideo (fpb)
3. Bacteroide

Membrana peribacteroidea

Es un envoltorio absolutamente necesario para la actividad del simbiosoma, ya que sirve de intermediario de señales y nutrientes entre la bacteria y la planta. Aunque tiene su origen en la porción de la membrana plasmática vegetal que rodea al rizobio durante la invasión, la naturaleza de la mpb madura se asemeja más a la de la membrana del tonoplasto. La razón de éste cambio en la composición radica en la fusión de vesículas procedentes tanto del aparato de Golgi como del retículo endoplasmático que conduce al crecimiento de la membrana peribacteroidea. Por otro lado, esas vesículas transportan determinados componentes proteicos, como una H^+ -ATPasa, que pasan a incorporarse a esta cubierta.

La actividad de esta proteína genera una acumulación de H^+ en el espacio peribacteroideo, y por tanto un descenso de pH que el bacteroide va a combatir excretando el nitrógeno fijado en forma de amoníaco que en ese ambiente se encontrará ionizando como NH_4^+ . Los iones de amonio pasan a través de un transportador específico de la mpb al citoplasma de la célula vegetal en donde el sistema GS-GOGAT los incorpora en forma de aminoácidos. Además de un gradiente de pH, se genera un gradiente electroquímico aprovechando por determinados transportadores, como por ejemplo el de malato, con el fin de proporcionar sustratos carbonados al bacteroide.

En el simbiosoma se acumula calcio, el cual participa en la regulación de proteinquinas de membrana que controlan el transporte de malato y amonio a través de la mpb.

Fluido peribacteroideo

El fluido peribacteroideo (fpb), definido como material soluble existente entre la mpb y el bacteroide, mantiene en contacto la superficie de ambos, estableciendo una zona que permite la interacción. Como se ha mencionado anteriormente, es donde se va a acumular una alta concentración de H^+ debido a la actividad ATPasa de la mpb. Desde el aparato de Golgi se secretan proteínas al fpb características de lisosomas como proteasas, trehalasas ácidas o manosidasas, que hacen del simbiosoma un orgánulo con propiedades líticas. El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el microorganismo resulta vital para la simbiosis, de tal forma que, una alteración del mismo producida por alguno de los dos miembros de la asociación, llevaría a una acidificación en el interior del simbiosoma que conduciría a la activación de las hidrolasas y por tanto a la muerte del simbiosoma y a la senescencia del nódulo.

La fusión de vesículas del aparato de Golgi da como resultado material glucoproteico, de la familia de las lectinas, al cual se lo denominó PsNLEC-1. La presencia de estas lectinas está relacionada con la maduración de la bacteria hacia bacteroide.

Fijación biológica de nitrógeno por el bacteroide

La fijación biológica de nitrógeno en la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células del nódulo. La enzima nitrogenasa cataliza la reacción:



La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consiste de dos componentes, la proteína homodimérica que contiene Fe y es codificada por los genes *nifH*, y la proteína tetramérica que contiene Fe y molibdeno (Mo), codificada por los genes *nifD* y *nifK*. La nitrogenasa de los nódulos radicales posee una característica similar a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, incluyendo al O_2 y la capacidad de reducir acetileno y N_2 . La formación de H_2 es parte del mecanismo de la nitrogenasa, pero representa una pérdida significativa de energía.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación biológica de nitrógeno.

Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos como succinato, malato y fumarato. Éstos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP. El primer producto estable que se obtiene de la fijación de N_2 es el amonio, y varias pruebas indican que la asimilación del amonio para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radicales lo lleva principalmente la planta. El amonio también se puede asimilar en los bacteroides y pueden ser transferidos a la planta en forma de alanina.

Durante el proceso de simbiosis, la planta también expresa la leghemoglobina. Esta sustancia tiene la función de aportar O_2 a los bacteroides y controlar los niveles de oxígeno. La leghemoglobina se localiza en el citosol de las células de la planta infectada y es la que da el típico color rosado de los nódulos funcionales, que en su interior son rojizos debido a la presencia de la misma.

Nódulos activos y no activos – Senescencia nodular

El nódulo fija nitrógeno atmosférico por un periodo de tiempo determinado después del cual ésta actividad decrece dando lugar a la lisis y luego la muerte del mismo.

Como se ha descrito en el punto anterior, los nódulos activos pueden diferenciarse de los no activos debido a su coloración rosada en el exterior y rojiza en su interior. Esta coloración se debe a la presencia de leghemoglobina.

La senescencia nodular es un conjunto de alteraciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales que son inducidas por envejecimiento natural, o bien, cuando las plantas son sometidas a estrés. Diversos organelos celulares como el aparato de Golgi, mitocondrias, cloroplastos y la membrana celular sufren alteraciones durante la senescencia nodular.

El retardo de la senescencia del nódulo puede incrementar el tiempo de fijación de nitrógeno, aumentando el rendimiento y la calidad de la semilla.

Los cambios morfológicos, químicos y fisiológicos de los nódulos varían según su posición en la raíz. Los cambios están relacionados con el pasaje de la planta de estado vegetativo a reproductivo y las condiciones ambientales. En el caso de los nódulos formados por *Bradyrhizobium japonicum* en la soja (nódulos determinados), la senescencia comienza en la zona central de la corteza y se extiende hacia la periferia, hasta causar el deterioro total del nódulo. En el caso de los nódulos indeterminados (por ejemplo en la alfalfa), la senescencia se inicia en la región proximal o base del nódulo y presenta varios periodos de senescencia y recuperación durante la vida de la planta.

En el caso de la soja, una vez que se inicia el proceso de senescencia es irreversible y los bacteroides mueren. En casos como la alfalfa, que posee un ciclo perenne y los nódulos son indeterminados, éstos sufren ciclos consecutivos de senescencia y recuperación. En los nódulos indeterminados, cuando ocurre la senescencia los bacteroides salen del nódulo y vuelven a poblar el suelo.

La senescencia nodular coincide con la senescencia de la raíz, de la planta completa o durante el llenado de granos.

El primer síntoma visible se la senescencia nodular es el cambio de color y la pérdida de turgencia en los primeros nódulos formados. El color rosado por la presencia de leghemoglobina para a color oscuro debido a la alteración que sufre ésta proteína.

Durante la senescencia, los lípidos de la membrana son degradados por peroxidación, lo cual conlleva a la degradación de la membrana peribacteroidea (MPB). La MPB es degradada por radicales libres producidos por los bacteroides. También se producen alteraciones en los reguladores de crecimiento, leghemoglobina, metabolismo del nitrógeno, nitrogenasa, fitoalexinas, poliaminas y ferritina.

El proceso de senescencia es inducido por una señal sistémica, como la reducción en el aporte de carbohidratos a la raíz o a través de un regulador hormonal producido en la parte aérea de la planta y transportado hacia la raíz.

La principal fuente de oxígeno reactivo en los nódulos es la leghemoglobina, presente en concentraciones de 1 a 5 mM en el citosol autooxidada. Facilita el transporte de oxígeno a los bacteroides a flujo bajo pero constante, para prevenir la inactivación de la nitrogenasa. En los nódulos senescentes predomina la leghemoglobina oxidada, mientras que en los nódulos jóvenes y sanos está presente en estado reducido. Durante la senescencia hay presente de enzimas proteolíticas que promueven la degradación de las células infectadas y la disminución de la concentración de la leghemoglobina.

Factores que afectan la simbiosis

Los inoculantes poseen bacterias vivas por lo que deben ser protegidos del desecamiento, altas temperaturas y luz solar directa hasta su uso. Se recomienda el almacenamiento bajo refrigeración (4° C) y el uso antes de la fecha de caducidad indicada por el fabricante. Al momento de uso, el inoculante debe contener al menos 10^7 células por gramo.

Cualquier evento ambiental que comprometa tanto la FBN como la mineralización del N, compromete la acumulación de éste elemento en la biomasa y, como consecuencia el rendimiento.

Nutrición Mineral

El sistema simbiótico rizobio-soja requiere que no haya limitantes minerales, ya sea por exceso o defecto.

• Nitrógeno

Altas concentraciones de nitratos inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad de la nitrogenasa. A mayor presencia de N en el suelo, menores posibilidades hay para la FBN y, a la inversa, a menor presencia de N del suelo, hay más N de la FBN.

La presencia de formas combinadas de nitrógeno limitan la FBN. Los suelos fértiles con moderada o alta disponibilidad de formas inorgánicas de N en el momento de la

siembra, y/o importantes tasas de mineralización durante el ciclo del cultivo, afectan al establecimiento de la simbiosis ya que retardan el inicio de la nodulación y/o inhiben el funcionamiento del sistema fijador.

El fertilizante nitrogenado puede tener un efecto beneficioso o detrimental sobre la FBN, dependiendo de la cantidad y del momento en que se aplique. En la soja, la absorción del NO_3^- ocurre antes de floración, mientras que la fijación simbiótica se inicia luego de la absorción de nitratos y alcanza su pico de máxima fijación durante el llenado de las semillas. En éste caso, la aplicación de nitrógeno al momento de la siembra, estimula el desarrollo vegetativo y permite que la planta alcance una buena interceptación de la radiación solar y una alta capacidad de producción de asimilados fotosintéticos durante la fase reproductiva, que es indispensable para lograr una fijación eficiente de nitrógeno.

- Fósforo

El P es un factor que limita, considerablemente, la producción de nódulos y la actividad específica de los nódulos.

Las carencias de fósforo disminuyen notablemente la formación de nódulos y, por consiguiente, la FBN. Se considera que para una adecuada simbiosis, los suelos deben estar provistos con 20 ppm de P asimilable por lo menos.

Cuando la relación C/N es baja, el limitado suplemento de C al nódulo retrasa la FBN.

- Potasio

El ión K^+ juega un papel muy importante en el proceso de FBN, por su efecto osmorregulador en la planta y por su efecto directo en la nodulación.

- Calcio

El calcio es importante en la FBN no solamente por su importante papel en el fortalecimiento y en el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares, sino también por su papel coadyuvante en la movilización del P en las células. Cuando las concentraciones de calcio en el suelo son bajas, la producción de nódulos se retarda, generando nódulos poco firmes e ineficientes.

El Ca^{+2} juega un rol importante en la adhesión de las células bacterianas a los pelos radicales y en la actividad de enzimas pectolíticas que se requieren en el proceso de infección.

- Micronutrientes

La toxicidad debida al aluminio (Al) y manganeso (Mn) y las deficiencias de Ca y P se registran frecuentemente en suelos ácidos tropicales. El Al afecta gravemente a la división celular de las bacterias y la división de las células de las raíces, disminuyendo la iniciación de los nódulos. Se pueden tomar distintas determinaciones ante la presencia de suelos ácidos: corregir la acidez con cal y realizar una fertilización fosfatada o poner las semillas en contacto con masas de cal y P. Éstas son algunas de las opciones viables.

Los micronutrientes juegan un rol importante en la FBN. La deficiencia de Mo limita la FBN en suelos ácidos. La fertilización con Mo puede solventar esta carencia y aumentar el rendimiento en semillas. En suelos ácidos y en presencia de Mn, éste nutriente puede llegar a ser tóxico, a no ser que se corrija la acidez.

Falta de Oxígeno

La falta de oxígeno resulta una limitante importante tanto para la planta huésped como para la FBN. Esta limitante empeora en suelos pesados, produciendo efectos más severos y prolongados que en el caso de cultivos en suelos arenosos. La falta de oxígeno induce a la respiración anaeróbica (fermentación), y por consecuencia a la reducción energética, induciendo al cierre de estomas y posterior reducción de la fotosíntesis.

Déficit Hídrico

El estrés hídrico determina una caída en la FBN, cuyo impacto sobre el rendimiento depende de la intensidad y momento de ocurrencia. En casos extremos éste tipo de estrés puede llegar a anular la FBN. Las siembras en condiciones secas provocan la mortandad de bacterias y disminuyen la posibilidad de lograr una nodulación apropiada. La falta de agua en etapas tempranas, retrasa la aparición de los nódulos y la falta de agua en etapas reproductivas limita la FBN restringiendo el rendimiento. La simbiosis es sensible a condiciones de anegamiento, ya que con sólo 2-3 días de inundación se puede provocar una alta mortandad de nódulos.

Acidez del suelo

Valores bajos de pH afectan la infección, la nodulación y la FBN. Los suelos ácidos pueden causar toxicidad de aluminio y manganeso y deficiencias de Ca, Mo y P.

Textura del suelo

Los suelos con textura extrema (arenosa o arcillosa) afectan la sobrevivencia de las bacterias fijadoras. Las bacterias sobreviven mejor en suelos franco arenosos, franco limosos o franco arcillo limosos.

La FBN en soja puede verse afectada en suelos arenosos de baja humedad en climas cálidos. Puede conseguirse una disminución de la temperatura del suelo y aumento de la nodulación mediante riego o cubierta orgánica.

La mayor cantidad de nódulos y su ubicación más profunda en el perfil se da en suelos sin laboreo o labranza mínima, no así en aquellos en los cuales se practica labranza convencional.

Temperatura

El metabolismo de los nódulos aumenta con la temperatura. Cuando la temperatura sobrepasa el óptimo se ve afectada la sobrevivencia de las bacterias en el inoculante y en el suelo, la infección de los pelos radicales, la diferenciación en la forma de bacteroide, la nodulación, la estructura de los nódulos y su funcionamiento y la fijación de nitrógeno.

Con temperaturas cercanas a 15°C se retrasa el proceso de infección y la nodulación.

Compatibilidad con plaguicidas

El tratamiento directo de la semilla con fungicidas u otros plaguicidas puede matar muchas células de *Bradyrhizobium* del inoculante.

Los fungicidas compuestos por metales pesados como mercurio, zinc, cobre o plomo no deben ser usados conjunto con inoculantes debido a su alta toxicidad. Algunos plaguicidas como el Captan80 Carboxin, Ceresan, Cloranil y Tiran pueden disminuir la nodulación y la FBN. Para que esto no ocurra, se practica la inoculación del suelo o la siembra de semillas no tratadas, inviables e inoculadas, o utilizando partículas inertes de peso y tamaño similar al de las semillas de soja junto con las tratadas.

Los herbicidas generalmente son menos tóxicos que los fungicidas, aunque el ácido tricloroacético, Dalapon, Dinitramina y Nitralin reducen la supervivencia de las bacterias y la nodulación.

La mayoría de los insecticidas organoclorados y algunos organofosforados también afectan la nodulación, en contraposición a los nematocidas que no producen problemas en la inoculación.

Inoculantes

Un inoculante es un concentrado de bacterias específicas, que aplicado convenientemente a la semilla poco antes de su sembrado.

El inoculante debe contener un número alto de bacterias viables específicas para la leguminosa a ser cultivada. Los estándares mínimos de calidad de inoculantes varían según el país.

Inoculantes con concentraciones de por lo menos mil millones de bacterias por gramo de producto fresco. La producción de los inoculantes se realiza por métodos industriales, resultando importante que el mismo no sea expuesto a temperaturas mayores de 30-35°C durante el transporte y manipuleo.

La bacteria debe ser específica para la planta considerada para que se puedan formar buenos nódulos que sean efectivos en la FBN.

Tipos de Inoculantes

Existen diferentes tipos de inoculantes, los cuales se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- **Inoculantes en polvo**

Es el tipo de inoculante más común del mercado. El cultivo de bacterias se mezcla con un soporte finamente molido con pH cercano a 6,5, que protege a los rizobios durante el período de almacenamiento y provee mejor adhesión a la semilla. La turba neutra es considerada uno de los mejores soportes, pero pueden utilizarse varios productos orgánicos y minerales en lugar de la turba.

- **Inoculantes granulados**

Los microorganismos son producidos a partir de inoculantes en polvo y gránulos de arcilla. Éste tipo de inoculantes se aplican en el surco de siembra, permitiendo separar los rizobios de las semillas que han sido tratadas con pesticidas o fungicidas.

- **Inoculante líquido**

El inoculante se prepara con un cultivo líquido de bacterias que se diluye inmediatamente antes de su uso. Debe almacenarse a 4°C. Estos rizobios tienen escasa

sobrevivencia en la semilla. Puede ser agregado a la semilla antes de la siembra o puede ser aplicado directamente en el surco.

- Inoculantes en medios de agar

Esta formulación ha caído casi en completo desuso. Las bacterias tienen un bajo nivel de sobrevivencia.

- Semilla preinoculada

El proceso de inoculación lo realiza el semillerista antes de su comercialización. Las bacterias sobreviven un período de tiempo muy corto sobre las semillas (2 a 3 días).

Si dividimos los inoculantes en soporte líquidos y soportes pulverulentos, la clasificación cambia: entre los líquidos encontramos acuosos y oleosos; y dentro de los pulverulentos están los de soporte de turba y dolomita.

Tabla N° 10: Tipos de inoculantes para soja presentes en el mercado nacional.

Tipo de Soporte	Estéril*	Fungicida**	Vida útil***
Polvo turba	Si/No	No	6 meses
Polvo Dolomita	No	No	6 meses
Líquido acuoso sin turba	Si	No	6 a 18 meses
Líquido acuoso con turba	Si	No	6 a 18 meses
Líquido Oleoso	No	Si/No	3 meses

* Se refiere a que no contiene contaminantes y sólo posee rizobios

** Hay productos que en el mismo recipiente contienen inoculante y fungicida

*** Es el tiempo de vigencia del producto desde que es elaborado, según el registrado en SENASA.

Los inoculantes más utilizados son los pulverulentos o los líquidos acuosos con turba.

Selección y preparación de un soporte para inoculante

Selección del soporte

El principal criterio para la selección de un soporte es su capacidad para asegurar una buena sobrevivencia de los rizobios, ésta característica es de importancia primordial. Para hacer una rápida selección deben considerarse muchas características:

- Contenido de materia orgánica (al menor 40%)
- pH alrededor del punto de neutralidad (usualmente el óptimo entre 6 y 7)
- Bajo contenido de sales
- Alta capacidad de retención de agua en caso de ser pulverulento
- Ausencia de productos tóxicos

Preparación del soporte pulvurulento

1. Secado

En la mayoría de los casos, es necesario secar el soporte antes de molerlo. Esto no debe realizarse a altas temperaturas (menos de 70°C) porque entonces la temperatura del inoculante se incrementará cuando se mezcle con el caldo bacteriano.

2. Neutralización

Si el soporte es demasiado ácido, debemos llevar el pH a valores entre 6 y 7, con carbonato de calcio, tomando la precaución de esperar cierto tiempo para el equilibrio en el soporte. Deben evitarse agentes neutralizantes, tales como NH_4OH , Na_2CO_3 y K_2CO_3 .

3. Molienda

El soporte que de ser necesario se le agrega carbonato, se muele de manera de obtener un polvo fino (200 mallas), que permiten una buena homogenización con el caldo líquido de bacterias, facilitando el desarrollo de los rizobios al incrementar la absorción y mejora la adhesión de las partículas sobre las semillas.

4. Envasado

Después de la molienda, el soporte se coloca en recipientes que sean compatibles con las condiciones de esterilización y tengan las siguientes características:

- Permeabilidad relativa a gases (O_2 y CO_2), de manera de asegurar una buena aeración para el inoculante
- Poca pérdida de vapor de agua para limitar evaporación y secado del inoculante durante el almacenamiento
- Resistencia durante las manipulaciones
- Facilidad de almacenamiento
- Menor costo posible

Las bolsas de polietileno (densidad media, espesor 150 micrones) reúnen esas condiciones y permiten también autoclavar el soporte, fácil distribución del caldo bacteriano, conservar el inoculante y luego distribuir a los agricultores.

La cantidad de soporte en cada bolsa está relacionada al uso que se le pretende dar en el campo. Las bolsas se cierran usando un sellador eléctrico dejando el menor aire posible en la bolsa de manera de evitar su inflado cuando se autoclavan.

Esterilización del soporte

El crecimiento y la sobrevivencia de los rizobios son mejores en un soporte estéril porque no hay competencia por espacio y sustratos, por ello el uso de soporte estéril, por esto la producción de un soporte estéril es imprescindible para la obtención de un inoculante de buena calidad.

El método más fácil de esterilización consiste en autoclavar el soporte. De éste modo se matan todas las esporas existentes. Generalmente se realizan 3 ciclos de autoclavado de

una hora de duración a 120°C cada 24 horas. Es esencial verificar la esterilización mediante un estriado en placas de Petri. Es necesario esperar que las bolsas se enfríen antes de poner el caldo bacteriano dentro del soporte.

Existen otros métodos de esterilización de soporte: irradiación gamma, óxido de etileno, etc.

Preparación de un cultivo líquido para inocular

Para producir una cantidad importante de inóculo, es necesario hacer un subcultivo a partir de un cultivo en agar a un medio líquido.

Las siguientes operaciones conducen a la preparación de un cultivo líquido en un Erlenmeyer que será utilizado para inocular un fermentador.

- Equipamiento necesario

- Agua destilada estéril.
- Tubo de ensayo con un cultivo en agar inclinado de la cepa que se quiere multiplicar.
- Una anza de inoculación.
- Pipetas estériles, 5 ml.
- Un Erlenmeyer con medio de ELM (con tubo de acople en la parte inferior del matraz se lo necesita para inocular un fermentador.
- Un agitador (orbital o magnético)

El Erlenmeyer debe llenarse sólo a 1/3 de su capacidad para una apropiada aeración del medio.

- Procedimiento

Todas las operaciones deben realizarse en un ambiente estéril con cámara de flujo laminar cerca de un mechero de Bunsen. Pasos:

- 1) Usando técnicas asépticas, verter 5 ml de agua destilada estéril dentro del tubo que contiene el cultivo que se quiere multiplicar.
- 2) Esterilizar el anza de inoculación sobre la llama del mechero Bunsen y dejarla enfriar, hacer una suspensión con las bacterias que están creciendo sobre el agar.
- 3) Con una pipeta estéril, extraer asépticamente una alícuota de la suspensión bacteriana y colocarla en el Erlenmeyer con el medio ELM líquido.
- 4) Poner el Erlenmeyer en el agitador orbital en un incubador o en un cuarto con temperatura controlada a 30°C.
- 5) Deben tomarse alícuotas de control para chequear el crecimiento y la ausencia de contaminantes durante y al final del período de cultivo.

Fermentador

El primer paso en la producción masiva de inoculantes es la multiplicación de la bacteria. Para realizar ésta tarea se utilizan fermentadores con medio líquido.

El aparato fermentador está diseñado para esterilizarse en autoclave con el medio de cultivo incluido. Después de enfriado y conectado a los accesorios, el medio se inocula con la cepa elegida. El sistema de aeración y termorregulación utilizado permite obtener altas densidades bacterianas.

El fermentador consiste en un recipiente cilíndrico de acero inoxidable y una tapa conteniendo varios accesorios.

Los volúmenes y dimensiones del aparato se han definido considerando los siguientes aspectos: la necesidad de colocar la unidad en el autoclave, el diámetro interior debe ser relativamente pequeño para facilitar la aeración del medio y un volumen total de 30 a 60 litros para permitir la manipulación por dos persona.

El fermentador presenta diferentes accesorios como:

- Un bulbo metálico poroso (4) que se utiliza para airear y mezclar el caldo
- Sonda de muestreo (5) de pequeño volumen de manera de facilitar el control de calidad
- Tubo de salida de aire (6) con igual diámetro al de entrada
- Anillo que permite cerrar herméticamente la tapa (7)
- Dos perforaciones situadas en la tapa (8 y 9) para permitir la instalación de un sistema de calentamiento y una sonda de control de temperatura.

Operatoria:

1) Aeración

El aire, que entra desde un compresor (12) o desde una bomba electromagnética, activa un medidor de flujo (13) y pasa primero a través de un cartucho desecante (14) y luego a través de un prefiltro (15). Luego fluye a través de un filtro de esterilización autoclavado con el fermentador. El aire esterilizado (16) llega al bulbo poroso (4) desde donde se difunde al medio.

El aire que sale del fermentador entra en un frasco de vacío donde burbujea en una solución antiséptica (cloruro de mercurio al 1% o líquido blanqueador apenas diluido).

2) Sistema de muestreo e inoculación

Un tubo acoplado a la sonda de muestreo (5) se conecta al frasco de vacío, que tiene otro tubo lateral con un sistema de filtración de aire. Este mismo tubo (5) permite la inoculación del medio cuando comienza el cultivo.

3) Regulación de temperatura

La temperatura óptima de crecimiento está entre 28 y 30° C. Si la temperatura ambiente es demasiado baja para permitir un buen crecimiento de los rizobios, es necesario calentar el medio.

Se coloca una resistencia eléctrica (10) en una de las perforaciones (8), que contiene aceite resistente al calentamiento, en la otra perforación (9) se coloca una sonda de termorregulación (11) para controlar la resistencia eléctrica. La temperatura de crecimiento se monitorea con el dispositivo (21) en la puerta posterior.

4) Agitación

En fermentadores grandes, la inyección de aire no es suficiente para permitir una buena agitación del medio, por ello se coloca una barra magnética (22) en el fondo del tanque. La barra rota con un agitador magnético (23).

Funcionamiento del equipo

Esterilización

El fermentador con el medio de cultivo se coloca en el autoclave. La esterilización se realiza a 120° C durante 60 minutos.

Luego de autoclavar se realizan las siguientes operaciones: conectar el circuito de aire comprimido (compresor de aire, medidor de flujo, desecador) a la entrada de aire, se retiran las pinzas de ambos lados del filtro (16), se enciende el compresor de aire, se llena el frasco de burbujeo (17) con solución antiséptica y se deja que el medio se agite hasta que se enfríe por debajo de 30° C.

No se debe llenar el frasco de burbujeo con el líquido antiséptico antes de poner el sistema de aeración en funcionamiento porque la depresión causada por el enfriamiento del medio podría succionar la solución hacia el fermentador.

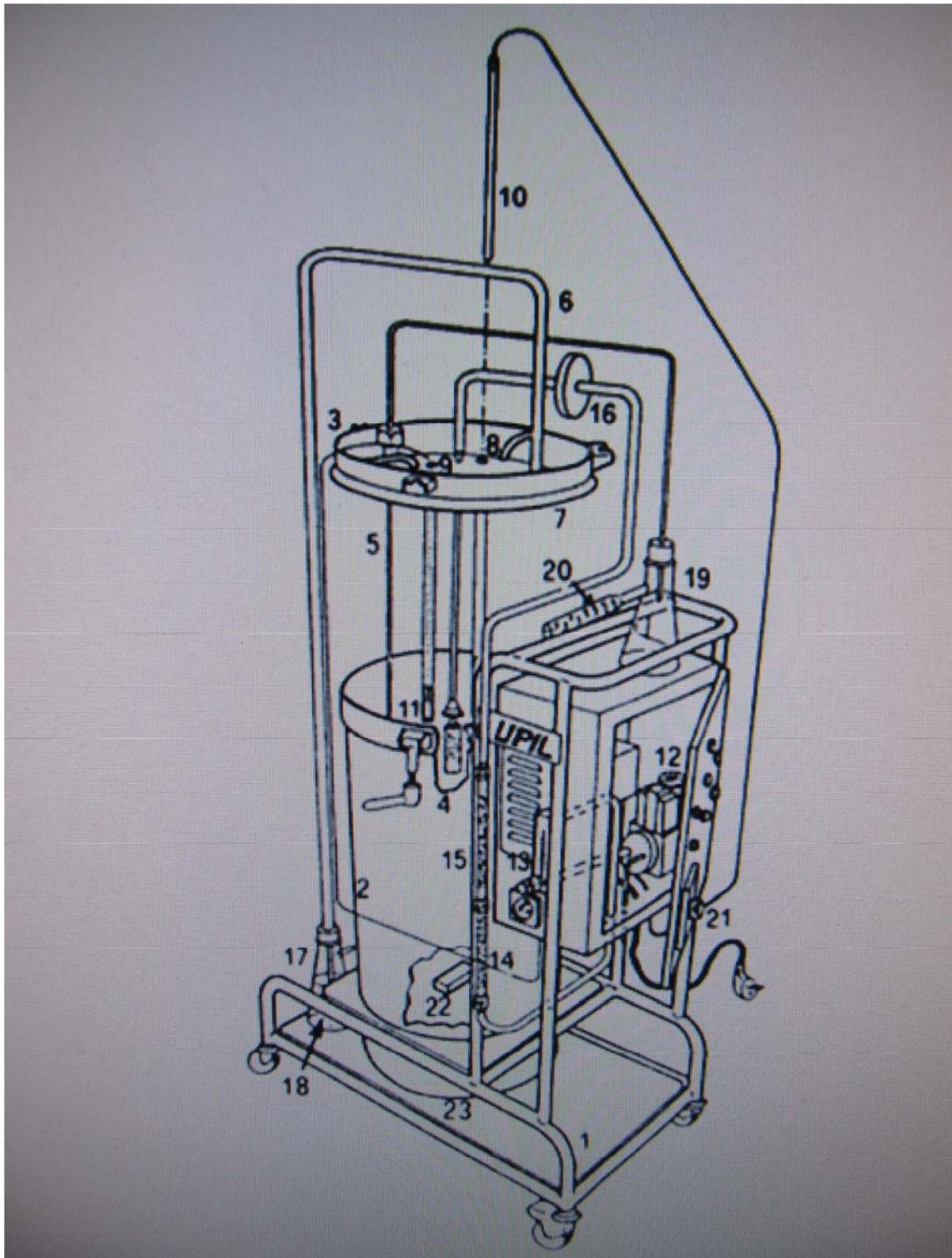
Inoculación

El cultivo inicial (500 ml de cultivo para un fermentador con un volumen útil de 25 litros o 1000 ml para 50 litros de volumen útil) utilizado para inocular el fermentador se prepara en un frasco con una salida lateral en la cual se coloca un tubo.

Después de chequear la calidad, es decir la pureza del cultivo inicial y el enfriado del fermentador, se procede a realizar los siguientes pasos:

- 1) Cerca de la llama de un mechero Bunsen, quitar la cubierta protectora (aluminio) del sistema de muestreo y el algodón, mantener el tubo cerca de la llama;
- 2) Esterilizar rápidamente sobre la llama la punta de vidrio de la sonda liberada;
- 3) Conectar a ésta punta el tubo del brazo lateral del frasco con el cultivo inicial del cual la cubierta protectora y el algodón se han retirado;
- 4) Cortar el aire y verter el cultivo dentro del fermentador por gravedad;
- 5) Cuando el cultivo inicial ha sido transferido, realizar las operaciones descriptas a la inversa: remover el tubo del frasco con el cultivo inicial, esterilizar la punta de vidrio sobre la llama, conectar el sistema de muestreo;
- 6) Volver a inyectar aire estéril. El flujo de aire inyectado debe ser 2-3 litros de aire por minuto para un fermentador de 2,5 litros y de 5 litros por minuto para uno de 50 litros;
- 7) En caso necesario encender el sistema de regulación de temperatura.

Figura N° 22: Fermentador y accesorios.



1 Carro manual **2** Recipiente de acero inoxidable **3** Tapa **4** Bulbo metálico poroso **5** Sonda de muestreo (e inoculación) **6** Tubo de salida de aire **7** Anillo de cierre hermético **8** Perforación para sistema de calentamiento **9** Perforación para sonda de control de temperatura **10** Resistencia eléctrica **11** Sonda de control de temperatura **12** Compresor **13** Medidor de flujo **14** y **15** Prefiltro y desecador **16** Filtro de esterilización **17** Frasco de vacío **18** Solución antiséptica **19** Frasco de muestreo **20** Filtración de aire (salida) **21** Regulador de temperatura **22** Barra magnética **23** Agitador magnético.

Todas las operaciones deben realizarse en condiciones de estricta limpieza, lo cual se asegura mediante una cámara de flujo laminar y un mechero de Bunsen.

El cultivo se inicia una vez que el medio del fermentador ha sido inoculado.

Muestreo y controles de contaminación durante el cultivo

El caldo en el fermentador se muestra durante el crecimiento para evaluar pureza y densidad del cultivo. Se recomienda mantener el sistema de muestreo en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar.

Un muestreo en condiciones estériles puede realizarse si se respetan las siguientes instrucciones:

- Eliminar el caldo contenido en el volumen muerto de la sonda por soplado dentro de la salida lateral del frasco de muestreo tapada con algodón;
- Retirar con la sonda el volumen deseado de suspensión bacteriana, que entra dentro del frasco;
- Tomar una alícuota del cultivo luego de abrir el frasco cerca del mechero Bunsen en la cámara de flujo laminar y
- Tapar el frasco de muestreo.

Todas las operaciones deben realizarse en condiciones de estricta limpieza, lo cual se asegura mediante una cámara de flujo laminar y un mechero de Bunsen.

El cultivo se inicia una vez que el medio del fermentador ha sido inoculado.

Muestreo y controles de contaminación durante el cultivo

El caldo en el fermentador se muestrea durante el crecimiento para evaluar pureza y densidad del cultivo. Se recomienda mantener el sistema de muestreo en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar.

Un muestreo en condiciones estériles puede realizarse si se respetan las siguientes instrucciones:

- Eliminar el caldo contenido en el volumen muerto de la sonda (5) por soplado dentro de la salida lateral del frasco de muestreo (19) tapada con algodón;
- Retirar con la sonda (5) el volumen deseado de suspensión bacteriana, que entra dentro del frasco;
- Tomar una alícuota del cultivo luego de abrir el frasco cerca del mechero Bunsen en la cámara de flujo laminar y
- Tapar el frasco de muestreo (19).

Se pueden tomar varias muestras, si se tiene la precaución de vaciar el frasco completamente de manera que las muestras previas no interfieran con la actual.

Las muestras pueden usarse para determinar la densidad óptica, el número de rizobios viables, o para tinción y observación bajo el microscopio.

Control de Calidad de un inoculante

Para controlar la calidad de un inoculante para leguminosas, se debe determinar:

- Si hay un número suficiente de rizobios vivos en el paquete (mínimo 10^7 por gramo) para asegurar por lo menos 1000 rizobios vivos en semillas pequeñas y $10^5 - 10^6$ en semillas grandes.
- Si la cepa de bacteria está adaptada al cultivar a inocular.

Métodos de Inoculación

La elección del método de inoculación apropiado, ya sea con soporte pulverulento o líquido, es básica para incorporar el número adecuado de bacterias por simiente y para disminuir la mortandad de las mismas.

Es de suma importancia leer y respetar las condiciones de uso descritas en el producto inoculante a utilizar. Siempre se debe controlar la fecha de vencimiento, la inscripción en SENASA y el número de lote.

Se debe lograr que todas las semillas queden cubiertas con el inoculante, a fin de que cada una de ellas disponga del número de rizobios adecuado.

Los métodos de inoculación son los siguientes:

- Inoculantes en polvo

- Aplicación en suspensión (húmedo o en pasta):

Consiste en la mezcla del inoculante con 10 a 25% de una solución de azúcar para producir una suspensión. La semilla se mezcla con la suspensión hasta obtener un revestimiento homogéneo, y luego se deja secar. Aunque la inoculación y la siembra se realizan el mismo día, cuando se deben sembrar superficies extensas, la preinoculación de las semillas con una suspensión de azúcar al 25% permite su almacenamiento por más de cuatro días sin que disminuya el número de células vivas por semilla y el número de nódulos por planta. Con frecuencia se utilizan otros adherentes para reemplazar el azúcar como goma arábica libre de fungicidas y bactericidas, metilcelulosa y la metilhidroxipropil celulosa. El uso de aceite combustible diesel, aceite mineral o queroseno en lugar del agua ha dado resultados deficientes.

- Aplicación por aspersión (semihúmedo o salpicado)

Las semillas son asperjadas inicialmente con agua azucarada y seguidamente espolvoreadas con un inoculante seco. Como el agua es absorbida rápidamente por la semilla, el inoculante termina por no adherirse bien. Éste método es considerado un poco mejor que el seco, el cual se explicará a continuación.

- Aplicación en seco o en polvo

Es el método menos eficaz de todos. Consiste en mezclar el inoculante seco con la semilla en la tolva sembradora. Sólo una pequeña porción de inóculo puede adherirse a la cobertura de la semilla, pero la mayor parte permanece como polvo libre y no será distribuido uniformemente en la siembra.

- Inoculantes líquidos

Consiste en el mezclado directo del inoculante con la semilla. No se recomienda la aplicación sobre la tolva de la sembradora, porque se corre riesgo de mala distribución del inoculante.

La inoculación puede realizarse empleando máquinas inoculadoras desarrolladas para tal fin. Es imprescindible ajustar el proceso de manera tal que todas las semillas reciban la misma cantidad de inoculante.

El proceso de inoculación debe realizarse a la sombra y a temperaturas moderadas. Como una importante cantidad de bacterias muere al momento de inoculación, es conveniente efectuar la siembra, en lo posible, antes de las 12 horas de aplicado el producto. Si el proceso incluye el curado con fungicidas o insecticidas, los tiempos se acortan y se recomienda sembrar no pasadas las 4 horas. La inoculación en la sembradora no es aconsejable bajo ningún concepto, ya que nunca se logra una distribución apropiada del inoculante, quedando muchas semillas sin inocular.

- **Inoculación en el suelo**

El inoculo es colocado en el surco, en el momento de la siembra, pero no entra en contacto con la semilla. Los suelos inoculantes pueden ser turba granulada o líquidos, y consistir en medios de cultivo concentrados liofilizados o concentrados o suspensiones líquidas de inoculantes con turba en polvo. Se aplican al momento de la siembra mediante dispositivos de la sembradora, pero no pueden ser mezclados con el fertilizante porque la salinidad de éste mataría a la bacteria.

Este método permite la separación de la bacteria de la semilla y la posibilidad de agregar grandes cantidades de rizobios al suelo. La principal desventaja de éste método es el costo de inoculación, debido a que la cantidad de inoculante utilizada es bastante mayor que la que se necesita para la inoculación de la semilla.

Evaluación de inoculantes por SENASA

Los inoculantes, denominados “fertilizantes biológicos” en el contexto legal, deben ser registrados en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Este organismo sanitario tiene como objetivo principal la fiscalización y certificación de los productos y subproductos de origen animal y vegetal, sus insumos y residuos agroquímicos, así como la prevención, erradicación y control de enfermedades animales, incluyendo las transmisibles al hombre, y de las plagas vegetales que afectan a la producción agropecuaria del país. El SENASA depende de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) de la República Argentina y a su vez, del Ministerio de la Producción. La Coordinación General de Agroquímicos y Biológicos dirige las tareas relacionadas con la aprobación, restricción o prohibición de la producción, comercialización o el uso y participa en la fiscalización de la distribución, despacho, conservación y condiciones de venta de productos agroquímicos o biológicos.

Dentro del ámbito de esa Coordinación se encuentran los “fertilizantes biológicos”. La normativa inicial de los procesos de inscripción fue reglamentada por la resolución N°1131 del 29/12/1988 y posteriormente la Resolución 310-94 modifica y deroga la anterior. En esta resolución y sus anexos, se establecen todos los requisitos para la inscripción, la concesión del registro, la comercialización, la habilitación, etc.

Las normativas vigentes establecen como requisitos mínimos de concentración a la elaboración de 1000 millones de ufc.g o ml-1 y de 100 millones de ufc.g o ml-1 al

vencimiento, obligando además que los biofertilizantes suministren al vencimiento un número de bacterias viables mínimo, que sea de 80 mil para semillas tamaño soja y de 1000 para semillas tamaño alfalfa. Sin embargo, no están establecidos ni descritos los métodos para realizar el control de calidad de estos parámetros además de la pureza del producto en cuanto a la presencia de microorganismos contaminantes.

En ésta normativa disponible existen algunos aspectos que deben actualizarse en base al avance de las investigaciones. Los puntos más importantes a tratar son los relacionados con la capacidad de nodulación por el método de porcentaje de plantas noduladas, números y métodos exigibles sobre las bacterias viables presentes en semilla u otros métodos que permitan una mejor evaluación de los biofertilizantes previo al empleo.

Hay que destacar que no existe en el país reglamentación respecto del origen de las bacterias, como si ocurre en otros países. Las empresas, en general, utilizan las cepas recomendadas por el INTA, evitando entonces trabajos de selección de cepas y ensayos a campo que son requeridos por el SENASA a los efectos de registrar una cepa no conocida. Tampoco existe una normativa con la descripción de los requisitos cuantitativos específicos comunes para otros tipos de microorganismos, distintos a rizobios, utilizados para la elaboración de biofertilizantes, tales como son los casos de formulaciones a base de *Azospirillum*, *Pseudomonas*, micorrizas, *Bacillus*, etc. Para estas formulaciones, ante una exigencia de control de calidad, el fabricante debe responder con la descripción oportunamente efectuada del producto; por ejemplo, si se declaró un número de bacterias presentes para la elaboración de 1×10^{10} y de 1×10^9 al vencimiento, el número exigible por el organismo fiscalizador será ese.

De acuerdo a los datos de inscripción presentes en el SENASA, se encuentran registradas cerca de 50 firmas que presentan más de 100 productos encuadrados como biofertilizantes.

Actualidad y perspectivas en la Argentina

Inoculación Soja-*Bradyrhizobium* - Actualidad

Después de lo analizado durante el presente trabajo, es claro que para que la soja sea un cultivo rentable el aporte de nitrógeno no debe ser limitante. Para satisfacer tal demanda, si se pretende continuar con el actual nivel de producción, tanto el N procedente de la mineralización de la materia orgánica del suelo, como el aportado por fertilizantes químicos deben ser considerados como recursos no renovables. La única fuente de N para la soja que puede ser identificada con el concepto de sustentabilidad es la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

En la actualidad, no se dispone de estimaciones de la tasa de fijación de N en toda la región productora de soja en el país. Resultados obtenidos en el SE bonaerense, indican que hasta rendimientos de 5000 kg ha⁻¹, el cultivo fija alrededor de 30% del N total que acumula en su rendimiento biológico (González et al, 1997). No hay información de esta naturaleza para las nuevas áreas puestas bajo cultivo. Sin embargo, no hay duda que gran parte de la producción de soja de la Argentina se construye sobre la actividad de bacterias del género *Bradyrhizobium*, asociadas a la soja. Si se efectúa una estimación cautelosa, que considere que, en la integral de la superficie cultivada, la tasa de aporte de la FBN equivale al 50% del N total acumulado por el cultivo, ésta arroja una cifra de 1,6 millones de toneladas de N ingresadas por esta vía. Este valor supera la totalidad del consumo anual de fertilizantes en la Argentina (Melgar, 2005)

Con respecto al cultivo de soja, la tasa de adopción de la técnica de inoculación se puede considerar alta en nuestro país. Una encuesta realizada por cuenta de una empresa productora de inoculantes en 2003, indica que el 79% de los productores inocula siempre sus cultivos de soja y el 93% de los técnicos asesores recomienda esta práctica. La encuesta revela, también, que el 90% de la superficie sembrada se inocula. En 2004, una segunda encuesta establece que el 87% de la soja se inocula, tanto sea de primera como de segunda y que el 94% de los productores conoce cuáles son los beneficios de la inoculación; asimismo, pone de manifiesto que el 78% de los productores elige los inoculantes líquidos, que dominan el mercado argentino.

Como se ha explicado en un capítulo anterior, la calidad de los inoculantes es muestreada y analizada por organismos como el INTA y SENASA. Cuando la calidad del inoculante es muy buena y la aplicación ha sido satisfactoria, puede ocurrir que el desarrollo de las bacterias no sea adecuado. Esto se puede deber a que el cultivo está siendo implantado en suelos sin historial sojero y de inoculación. En el sudeste de Buenos Aires, donde todavía es posible hallar algunos lotes que no registran historia de cultivo de soja, estas fallas pueden generar una disminución de rendimiento del orden de 1000kg de grano ha-1 en siembra directa y 500kg de grano ha-1 bajo labranza convencional (Calviño, 2004), en comparación con cultivos crecidos en suelos con historia sojera, en los cuales la población rizobial naturalizada enmascara la falla.

Aun utilizando inoculantes de excelente calidad y una técnica de inoculación muy buena, un estrés hídrico ocurrido inmediatamente después de la siembra, mata las bacterias que aún no han iniciado el proceso de nodulación y, si éste se prolonga, promueve la autorregulación de la planta para evitar la formación de nódulos. Una vez establecido el sistema nodular, la ocurrencia de estrés hídrico durante el ciclo puede provocar, si es extremo, la abscisión de los nódulos ya formados y, si es moderado, el compromiso de la actividad de la enzima nitrogenasa, disminuyendo el rendimiento del cultivo, a través del control de la FBN, además de hacerlo por un efecto directo sobre el metabolismo de la planta (Racca, 2003).

La alta temperatura del suelo puede ser responsable de problemas en la nodulación en parte del norte del país. A partir de 45 °C, la nodulación se inhibe. Cuando la temperatura extrema interactúa con sequía, la situación empeora. La defensa contra temperaturas de suelo extremas, asociadas o no a condiciones de sequía se aborda con la elección del sistema de labranza. En este sentido, la siembra directa, a través de la acumulación de rastrojo en superficie, provee una herramienta perfecta para ello, mejorando la disponibilidad de humedad, promoviendo la inmovilización de N en el suelo y generando incrementos en la tasa de fijación de N y en el rendimiento en condiciones tropicales.

El cultivo de soja responde al agregado de fósforo (hasta alrededor de 13-15 ppm de P (Bray1)) (Ferraris et al., 2002). Se sabe que existe una fuerte interacción entre una nutrición fosforada bien balanceada y la capacidad de fijación de N, si bien el P no influye en forma directa en el proceso. Del mismo modo que con el P, S actúa sobre la nodulación y el azufre también lo hace. Si la planta registra déficit de S, se autorregula para formar menos nódulos.

Respecto de la fertilización, es imprescindible, en un país que dedica 15 millones de hectáreas al cultivo de soja, crear conciencia de la necesidad de considerar la sustentabilidad del sistema. Aún en aquellas zonas donde el nivel de P en el suelo se

sitúa en la actualidad por encima de los niveles de respuesta, se debería considerar efectuar fertilizaciones de mantenimiento, que eviten el paulatino desgaste total del P del sistema ya que, una vez producida, es difícil de revertir en términos de la inversión necesaria en fertilizante. Asimismo, prestarse atención a la eventual deficiencia de S.

Las estrategias para paliar los problemas asociados a la inoculación incluyen la utilización de protectores bacterianos. Inicialmente fueron desarrollados para poner en práctica la técnica de preinoculado, pero se utilizan con éxito en inoculaciones antes de la siembra y aseguran una mayor supervivencia de las bacterias sobre la semilla. En esas situaciones, hay que considerar seriamente la no utilización de biocidas, ya que éstos influyen negativamente sobre las bacterias formadoras de nódulos. En suelos con rizobios naturalizados (que cuentan con una vasta historia sojera), el uso de fungicidas no produce una pérdida sustancial de masa nodular, porque las bacterias permanecen fuera del alcance de la influencia del biocida, contribuyen a definir el sistema nodular.

Una alternativa interesante que está siendo probada es la inoculación en la línea de siembra, que deposita directamente el inoculante en el fondo del surco, generando una capa de suelo enriquecido de bacterias justamente en el sitio donde la radícula de la soja comienza crecer. Las ventajas de esta técnica son: facilidad y rapidez en la operación, eliminación de algunos riesgos ambientales que atentan contra la supervivencia de los rizobios sobre la semilla, mejor localización de las bacterias para iniciar la nodulación y localización del inoculante con independencia de la de los biocidas.

Hoy en día, algunos organismos de investigación, se encuentran en la búsqueda de nuevas tecnologías para aumentar el rendimiento de la soja inoculada. Uno de los aspectos estudiados es, la adición de factores Nod producidos por las bacterias, a los inoculantes. La suplementación de inoculantes con inductores de nodulación, en general de naturaleza flavonoide, producidos por las plantas de soja.

Los microbiólogos, siguen estudiando la biodiversidad de los bradyrizobios en el suelo y esperan encontrar cepas de bacterias nodulantes para la soja, adaptadas a cada ambiente, resistentes a algunas de las condiciones extremas, como salinidad, acidez y altas temperaturas. Los suelos de la región pampeana argentina, por sus contenidos de materia orgánica y cationes y sus características de textura y pH resultan amigables para la naturalización del género *Bradyrhizobium*, la selección de cepas, deberá enfrentar, antes de poder ser utilizada, el desafío que impone el fenómeno de competencia que ejerce la flora rizobial naturalizada en el suelo.

El desafío es incrementar el rendimiento del cultivo, aprovechando el recurso renovable que implica la FBN, balanceando P y S donde corresponda, utilizando la siembra directa a conveniencia, para disminuir la temperatura del suelo donde ésta sea un problema y mejorar la economía del agua. Esto no solamente favorecerá el incremento de la tasa de fijación de N y el rendimiento; utilizada con consistencia, esta estrategia también protegerá al suelo de la degradación, única manera de asegurar que en la Argentina se puedan seguir cultivando con soja, de manera sustentable, 15 millones de hectáreas anuales.

Rendimiento de soja con y sin inoculación con *Bradyrhizobium*

Los incrementos en los rendimientos asociados a la inoculación en los cultivos de soja son variables y dependientes del suelo, por su capacidad de suministro de N por mineralización y de la presencia o no de bacterias capaces de fijar N₂ proveniente de cultivos anteriores.

Por ejemplo, para el sudeste la provincia de Buenos Aires, se citan diferencias de 500 a 1000 kg de grano por hectárea por fallas en nodulación en lotes en los que nunca se cultivó soja (Calviño, 2004). En trabajos realizados en la provincia de Entre Ríos, se han encontrado incrementos que van desde alrededor de 100 a 300 kg (en lotes en los que se ha realizado cultivo de soja con anterioridad) hasta 1400 kg por hectárea en lotes de bajos contenidos de materia orgánica y en los que nunca se cultivó soja.

Los aumentos en los rendimientos están asociados a una mayor disponibilidad de N para el cultivo debido al aporte de este elemento que brinda la asociación soja-rizobio, aunque las plantas noduladas consumen parte de los fotosintatos que producen para mantener la bacteria asociada simbióticamente. El N que aportan al cultivo estas bacterias está relacionado a la masa nodular formada por la asociación.

Según diversos estudios y ensayos, se detectó que la acumulación de materia seca aérea y de masa radical es mayor en los casos de soja inoculada con *Bradyrhizobium* que en aquellos que no se ha realizado ningún tipo de biofertilización (siempre tomando las mismas condiciones a campo).

Estimando el aporte de nitrógeno proveniente por FBN, el aporte de los nódulos por inoculación es del 22 al 52%.

Si se realizan curvas de acumulación de materia seca entre un cultivo de soja no inoculado (testigo) y otro tratado con *Bradyrhizobium*, se puede observar que hasta el estadio V5 no hay diferencias significativas en la acumulación de materia seca (siempre teniendo en cuenta similares situaciones medioambientales). A partir de éste momento (V5), las curvas comienzan a separarse y se comienza a notar una diferencia entre la acumulación de N en los cultivos inoculados y los que no.

La respuesta al rendimiento de granos se correlaciona con la biomasa nodular en forma positiva y en forma negativa con el número de nódulos. Esto indica que con pocos nódulos grandes (en general más eficientes) existe mayor probabilidad de alto rendimiento y en cambio son escasas las posibilidades de conseguirlo cuando las plantas tienen muchos nódulos chicos (de moderada eficiencia o ineficientes). El perfil ideal de nodulación eficiente en soja se estima en no más de 40 nódulos por planta y no menos de 500 mg de biomasa de nódulo por planta. Para lograrlo se requiere un manejo racional del cultivo (genotipo, nutrición, sanidad, etc.) (Peticari y col. 2000).

La relación costo/beneficio promedio es muy alta (mayor a 1:17). El costo de la inoculación promedio histórico es equivalente a 14-16 kg de soja. Se considera a esta tecnología dentro de las denominadas de costo cero. Se ha evaluado en los últimos años los niveles de presentes a nivel productivo, el promedio nacional estaría superando al 50% (Peticari y col. 2000).

Capítulo III: Fijación Biológica de Nitrógeno en Gramíneas

Introducción

La fijación del nitrógeno atmosférico y su explotación económica en la agricultura moderna, no se reduce exclusivamente a la asociación Leguminosa-*Rhizobium/Bradyrhizobium*. Existen otras asociaciones importantes que han demostrado un potencial económico alto, como el caso de la asociación maíz-*Azospirillum*.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa.

Las asociaciones entre las plantas C4, como el maíz, y las bacterias se llaman rizocenosis asociativas, por no formarse en la asociación microbio-planta, estructuras especializadas en las raíces. Entre éstas asociaciones se encuentra la formada por plantas C4 y *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* y *Azospirillum*. En estos casos, las bacterias fijan nitrógeno a expensas del exudado radical que aprovecha al colonizar los espacios intercelulares del cortex de la raíz.

En el caso particular de *Azospirillum*, está demostrado que el efecto beneficioso de la asociación es debido mayoritariamente a la capacidad que posee la bacteria de producir fitohormonas que determinan un mayor desarrollo del sistema radical y, por tanto la posibilidad de explorar un volumen más amplio del suelo.

Diversos organismos que habitan el suelo son capaces de fijar nitrógeno aeróbicamente. La mayoría de las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno son filogenéticamente alfa-, beta- o gammaproteobacterias.

Tabla N° 11: Características de los distintos géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre	
Características	Género
Gammaproteobacterias	
Bacilos grandes, producen quistes, principalmente aislados en suelos neutros o alcalinos	<i>Azotobacter</i>
Bacilos grandes, no producen quistes, principalmente acuáticas	<i>Azomonas</i>
Alfaproteobacterias	
Bacilos microaerófilos, asociados a plantas	<i>Azospirillum</i>
Bacilos con forma de pera y largos cuerpos lipídicos en cada extremo, produce secreciones mucosas en gran cantidad, habitan en suelos ácidos	<i>Beijerinckia</i>
Betaproteobacterias	
Pequeñas células curvadas, no producen quistes	<i>Azoarcus</i>
Células curvadas muy finas, no producen quistes	<i>Azovibrio</i>
Bacilos muy finos o vibrios, no producen quistes	<i>Azospira</i>
Células enrolladas de hasta 50 nm de largo, no producen quistes	<i>Azonexus</i>
Bacilos, forman colonias abundantes y arrugadas	<i>Derrxia</i>

Las proteobacterias son uno de los principales grupos de bacterias patógenas de vida libre, e incluyen muchas de las bacterias responsables de la FBN. Son Gram negativas, con pared celular formada principalmente de lipopolisacáridos. Muchas se mueven utilizando flagelos. La mayoría de las proteobacterias son anaerobias, pero hay algunas excepciones. La nutrición es usualmente heterótrofa, pero existen algunos grupos que pueden realizar fotosíntesis. Las proteobacterias se clasifican en cinco grupos, usualmente considerados clases, los cuales se diferencian por sus secuencias de ARNr. Las clases se denominan según las letras griegas que van desde alpha a épsilon.

Según lo expuesto en el cuadro anterior pasaremos a describir algunos rasgos de cada una de las clases nombradas:

- **Alfaproteobacterias:** abarcan la mayoría de los géneros fotótrofos, pero también varios géneros que metabolizan componentes C1, simbiontes de plantas y de animales y un grupo de patógenos peligrosos como Rickettsiaceae.
- **Betaproteobacterias:** abarcan varios grupos de bacterias aerobias o facultativas que son altamente versátiles en sus capacidades de degradación. También contienen géneros quimiolitótróficos y algunos fotótrofos.
- **Gammaproteobacterias:** abarcan varios grupos de bacterias importantes para la ciencia y la medicina tales como Enterobacteriaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae. Este grupo incluye patógenos importantes como *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Las principales bacterias de vida libre que realizan FBN incluyen a *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia*. Como se ha descrito con anterioridad, las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre tienen una baja eficiencia en la fijación de nitrógeno (0,5 a 1 Kg N/ha/año). En cambio cuando se asocian con plantas su capacidad fijadora aumenta (hasta 30 Kg N/ha/año).

La alfa proteobacteria *Azospirillum brasilense* es un microorganismo diazotrófico del suelo capaz de colonizar la rizósfera de muchos cereales y gramíneas económicamente importantes. Inicialmente, sólo se consideraba el beneficio que aportaba a ciertas gramíneas inoculadas se debía únicamente a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, luego de diversas experimentaciones se llega a la conclusión que el mayor beneficio aportado a los cultivos es por la mayor captación de nutrientes minerales presentes en el suelo como consecuencia de un incremento del sistema radical de las plantas infectadas. El mecanismo que produce éste efecto es la liberación de ciertas fitohormonas por parte de la bacteria en cuestión, principalmente el AIA (ácido indol-3-acético).

Descripción del Familia Azospirillaceae y la género *Azospirillum*

El Familia *Azospirillaceae* constituye un importante grupo de organismos aerobios que se comportan como microaerófilos, es decir que pueden vivir en un ambiente con baja concentración de oxígeno, cuando fijan nitrógeno.

Fueron descritos por Beijerinck desde 1922, pero recibieron poca atención hasta 1976, cuando se aislaron en raíces de pasturas tropicales.

Son bacterias Gram negativas, con forma de vibrio o espirilo, de 1 micrón de diámetro, con flagelos peritricos de corta longitud de onda, empleados para desplazarse en superficies sólidas o un flagelo polar para nadar.

Se desarrollan tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (con aporte de nitratos y una fuente de C orgánico). Son preferencialmente microaerofílicos en presencia o ausencia de N-combinado en el medio.

No poseen ningún tipo de protección de la nitrogenasa.

El crecimiento es rápido con amonio y oxígeno y más lento con N₂. Sin N combinado, el desarrollo es rápido en medio semisólido, formando una densa película debajo de la superficie, donde encuentran la tensión de oxígeno apropiada. A medida que la demanda de oxígeno se incrementa la película se desplaza hacia la superficie. Esta sensibilidad al oxígeno hizo que por mucho tiempo no fueran descritos como activos fijadores.

Se han descrito cinco especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amanzonense*, *A. halopreferans*, y *A. irakense*.

Algunos azospirilos son denitrificantes, reduciendo los nitratos a nitritos y hasta productos gaseosos.

Estos organismos son considerados responsables de la estimulación del crecimiento en importantes cultivos y pasturas naturales.

Descripción breve del cultivo de Maíz

Clasificación taxonómica

Según Goodman (1988), la clasificación del maíz es la siguiente:

- División: Magnoleophyta
- Subdivisión: Angiospermae
- Clase: Liliopsida
- Subclase: Commelinidae
- Orden: Poales
- Suborden: Poaceae
- Familia: Poaceae
- Subfamilia: Panicoideae
- Tribu: Andropogoneae
- Género: *Zea*
- Especie: *Zea mays*

El maíz (*Zea mays*) es una especie perteneciente a la familia de las gramíneas que no se encuentra en estado silvestre. Según Galinat (1988), el maíz deriva del teosinte y fue domesticado, cambiando su genotipo, en un periodo entre 7.000 y 10.000 años atrás en el sur de México. A partir del descubrimiento de América, el cultivo de maíz fue introducido en el viejo mundo, donde rápidamente se convirtió en un factor clave de la alimentación humana y animal.

Posee una gran productividad, excelente palatabilidad y alto contenido nutricional. El maíz ha ido reemplazando a otros cereales en la alimentación animal. Este cultivo tiene una gran cantidad de usos industriales como la producción de almidón, edulcorantes, alcohol, jarabes, acetona, aceites, etc.

El maíz es el tercer cultivo en importancia en el mundo, después del trigo y del arroz en cuanto a volumen de producción.

La planta de maíz es muy eficiente en cuanto a producción de biomasa. De una semilla que pesa alrededor de 300 mg se obtiene, en un lapso de 2,5 meses, una planta de más

de 2 metros de altura y de alrededor de 70 dm² de área foliar. El maíz supera ampliamente al girasol y la soja en producción de biomasa.

Estados de desarrollo del cultivo del maíz

En el cultivo de maíz, la obtención de granos cosechables al final de la estación de crecimiento es el resultado de dos procesos simultáneos e interdependientes: crecimiento y desarrollo. El crecimiento es el aumento en el número y tamaño de las células que forman los distintos órganos y el desarrollo es la sucesión progresiva de las etapas que conducen a establecer la morfología propia del órgano adulto a medida que avanza el ciclo ontogénico.

La escala fenológica más utilizada para describir el ciclo del cultivo de maíz es la de Ritchie y Hanway (1982). En ella se pueden distinguir dos grandes etapas, la vegetativa y la reproductiva. Las subdivisiones numéricas de la etapa vegetativa, identificadas con la letra V, corresponden al número de hojas totalmente expandidas. La etapa reproductiva comienza con la emergencia de los estigmas (R1) y finaliza con la madurez fisiológica de los granos (R6). Las subdivisiones de la etapa reproductiva corresponden a distintos momentos del llenado del grano.

Tabla N° 12: Etapas fenológicas del maíz según Ritchie y Hanway (1982)

Etapas fenológicas del maíz (Ritchie y Hanway, 1982)	
Estados vegetativos	Estados reproductivos
VE: Emergencia	R1: Emergencia de estigmas
V1: Primera hoja	R2: Cuaje (ampolla)
V2: Segunda hoja	R3: Grano lechoso
Vn: Enésima hoja	R4: Grano pastoso
VT: Panojamiento	R5: Grano dentado
	R6: Madurez Fisiológica

Simultáneamente a los cambios externos descritos por la escala en cuestión, el meristema apical y las yemas axilares también sufren modificaciones. Cuando las plantas presentan entre cuatro y seis hojas completamente expandidas (alrededor de un cuarto a un tercio del total de hojas), el meristema apical finaliza la diferenciación de hojas y comienza a diferenciar las espiguillas estaminadas correspondientes a la panoja. A esta altura del desarrollo queda determinado el número de hojas y el área foliar potencial que puede alcanzar la planta.

Escala de etapas fenológicas de Ritchie y Hanway

Como se ha descrito anteriormente, Ritchie y Hanway (1982) han desarrollado una escala de clasificación de las etapas fenológicas del maíz:

Etapas	DAS*	Características de importancia
VE	5	El coleoptilo emerge de la superficie del suelo.
V1	9	Es visible el cuello de la primera hoja.
V2	12	Es visible el cuello de la segunda hoja.
Vn		Es visible el cuello de la hoja número "n" ("n" es el número definitivo de hojas que tiene la planta, generalmente fluctúa entre 16 y 22, pero para la floración se habrán perdido las 4 a 5 hojas de más abajo)
R0	57	Antesis o floración masculina. El polen se comienza a liberar.

R1	59	Son visibles los estigmas.
R2	71	Etapa de ampolla. Los granos se llenan con un líquido claro y se puede ver el embrión.
R3	80	Etapa lechosa. Los granos se llenan con un líquido blanco lechoso.
R4	90	Etapa pastoso. Los granos se llenan con una pasta blanca. El embrión tiene aproximadamente la mitad del ancho del grano.
R5	102	Etapa de madurez. La parte superior de los granos se llenan con almidón sólido y, cuando el genotipo es dentado, los granos adquieren la forma dentada. En los tipos tanto cristalinos como dentados es visible la “línea de leche” cuando se observa el grano desde el costado.
R6	112	Madurez Fisiológica. Una capa negra es visible en la base del grano. La humedad del grano es generalmente de alrededor del 35%.

DAS*: número aproximado de días después de la siembra en tierras tropicales, donde las temperaturas máximas y mínimas pueden ser de 33° y 22° C, respectivamente. En los ambientes más fríos, los tiempos se amplían.

Tabla N° 13: Descripción de etapas fenológicas según Ritchie y Hanway (1982).

VE: En el estado de VE la radícula es la primera en salir del grano hinchado por la humedad absorbida. Luego le sigue el coleoptilo con la plúmula encerrada y luego tres o cuatro raíces seminales (sistema radicular seminal). El estado VE se logra por la elongación rápida del mesocótilo, el cual empuja al coleoptilo en crecimiento a la superficie del suelo. Bajo condiciones de calor y humedad, la emergencia de la planta se presentará dentro de los cuatro o cinco días después de la siembra, pero bajo condiciones de frío y sequía, se puede retrasar dos semanas o más. Con la emergencia y la exposición de la punta del coleoptilo a la luz del sol, se detiene la elongación del coleoptilo y mesocotilo (Figura N° 23). Este proceso será descrito posteriormente.

El sistema radicular nodal es iniciado alrededor de la ésta etapa, y el primer grupo de raíces nodales empieza la elongación desde el primer nudo durante la etapa V1. Desde la etapa V1 hasta alrededor de la etapa R3, un grupo de raíces nodales empieza el desarrollo en cada nudo superior en el tallo hasta siete o diez nudos en total. El sistema radicular nodal se convierte en el principal proveedor de agua y nutrientes para la planta hasta la etapa vegetativa V6.



Figura N° 23: Vista de la semilla de maíz desde Siembra a Emergencia de la plántula.

V3: Los pelos radicales están creciendo de las raíces nodales y el crecimiento del sistema radicular seminal ha cesado su crecimiento (Figura N° 24 y N° 25). Todas las hojas y primordios de mazorcas que la planta producirá eventualmente se han iniciado. Alrededor de V5, la iniciación del primordio de la mazorca se completa y una inflorescencia pequeña se inicia en el ápice del tallo. La iniciación de la punta del ápice del tallo está justo arriba de la superficie del suelo.



Figura N° 24: Planta de maíz en estado V3.



Figura N° 25: Vista de sembradío de maíz en estado V3.

V6: El punto de crecimiento y la inflorescencia están por encima de la superficie del suelo y el tallo está empezando un periodo de aumento pronunciado de elongación (Figura N° 26). Debajo de la superficie del suelo, el sistema radicular nodal es el principal y más importante para el abastecimiento de la planta. Algunos brotes de mazorcas se hacen visibles. En la etapa de V8 es común la pérdida de las dos primeras hojas basales.



Figura N° 26: Planta de maíz en estado V6.

V9: Las mazorcas potenciales son visibles con la disección de la planta (Figura N° 27). Se desarrolla una mazorca en cada uno de los nudos que se encuentran por encima de la superficie del suelo, excepto en los últimos seis a ocho nudos debajo de la panoja. Sólo

se desarrollarán una o dos espigas hasta la cosecha. La panoja se desarrolla rápidamente y el tallo se alarga rápidamente. El crecimiento del tallo se presenta debido al alargamiento de los entrenudos. Hacia la etapa V10, el tiempo entre la aparición de las nuevas etapas foliares de acorta.



Figura N° 27: Planta de maíz en estado V9

V12: El número de óvulos (granos potenciales) de cada mazorca y el tamaño de la misma queda determinado en la ésta etapa (Figuras N° 28 y N° 29). El número de hileras de granos por mazorca ya ha sido establecido, pero la determinación del número de granos por hilera no se completa hasta alrededor de una semana después de la aparición de los estigmas alrededor de la etapa V17.



Figura N° 28: Planta de maíz en estado V12.

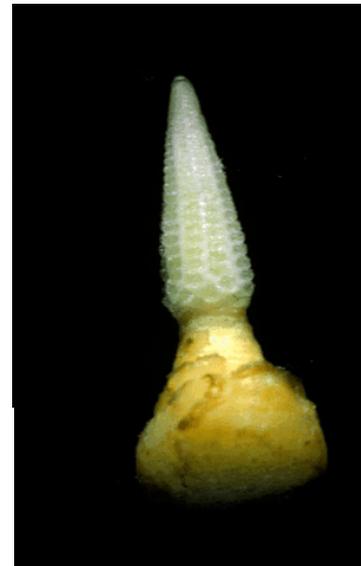


Figura N° 29: Número de hileras determinadas en la mazorca en plantas en estado V12.

V15: A partir de éste momento comienza el periodo crítico para la determinación del rendimiento de grano (Figura N° 30). El desarrollo de la espiga principal ha sobrepasado al de las espigas laterales inferiores. Los pelos de la mazorca comienzan a crecer rápidamente. Hacia la etapa V17, los brotes de la mazorca superior hacen visibles sus puntas en las vainas de las hojas que las envuelven.



Figura N° 30: Planta de maíz en estado V15.



Figura N° 31: Planta de maíz en estado V18.

V18: Los óvulos de los pelos de la mazorca comienzan a diferenciarse desde la base de la mazorca hacia arriba (Figura N° 31 y N° 32). Las raíces de anclaje comienzan a crecer de los nudos que se encuentran sobre la superficie del suelo. Éstas ayudan al anclaje de la planta y a soportar el peso de la mazorca. Las raíces nodales nutren a la planta durante los estadios reproductivos.



Figura N° 32: Raíces nodales en planta de maíz en estado V18.

VT: Esta etapa se inicia cuando la última rama de la inflorescencia es visible completamente pero los pelos de la mazorca no han emergido (Figuras N° 33 y N° 34). La etapa VT se inicia dos a tres días antes de la salida de los pelos. Durante ésta etapa la planta de maíz obtiene su altura máxima y se inicia la liberación del polen.



Figura N° 33: Planta de maíz en estado VT.



Figura N° 34: Evolución de la espiga en una planta de maíz. La última espiga representa a la de una planta en estado VT.

R1: Esta etapa comienza cuando cualquiera de los pelos de la mazorca son visibles fuera de las chalas (Figura N° 35). La polinización se presenta cuando los pelos de la mazorca están húmedos y pueden atrapar el polen que cae sobre ellas. La liberación de polen generalmente se da hacia el final de la mañana, principio de la tarde. Un grano de polen capturado toma alrededor de 24 horas para crecer dentro de los pelos receptores hacia el óvulo donde ocurre la fertilización. Generalmente son necesario dos a tres días para que todos los pelos de la mazorca sean expuestos y fertilizados. Los pelos de la mazorca crecen entre 2,5 a 3,8 cm. por día y continúan su crecimiento hasta que son fertilizadas. Durante ésta etapa (R1) los granos se encuentran recubiertos completamente por las glumas, paleas y lemnas. El material interno del grano es claro y tiene muy poco líquido presente. El embrión no está visible. El pedúnculo y las chalas alcanzan su tamaño completo entre R1 y R2.



Figura N° 35: Pelos de la mazorca en plantas de maíz en estado R1.

R2: Los granos presentan una coloración blanca por fuera y tienen forma de ampolla (Figura N° 36). El endosperma contiene abundante fluido interno de color claro y un

embrión diminuto. Los pelos de la mazorca completan su función y comienzan a tornarse amarrotadas, secándose.

R3: El grano se ve de color amarillo en su exterior, y su líquido interior es de color blanco lechoso debido a la acumulación de almidón. El embrión está creciendo rápidamente. La mayoría de los granos se encuentran por fuera de las capas protectoras (glumas, paleas y lemnas). Los pelos de la mazorca se secan.

R4: Continúa la acumulación de almidón en el endosperma. El líquido interior se torna más espeso que en la etapa anterior, adquiriendo una textura pastosa. Los granos comienzan a secarse en la base en la cual se unen con la mazorca.

R5: Todos o casi todos los granos están dentados. Los granos se encuentran en proceso de secado desde su base.



Figura N° 36: Evolución del crecimiento de la mazorca.

R6: Todos los granos de la mazorca han alcanzado su máxima acumulación de materia seca (Figura N° 37 y N° 38). La

capa dura de almidón ha avanzado completamente hasta formarse una capa de abscisión negra o color café. Las chalas y muchas hojas ya no se encuentran verdes aunque la caña puede estarlo.

Figura N° 37: Mazorca de maíz en estado R6.



Figura N° 38: Cortes laterales de un grano de maíz en estado R6. Se puede observar la parte superior, media y baja del grano.

Crecimiento

La semilla y el embrión

El grano de maíz maduro está compuesto por tres partes principales:

- La cubierta de la semilla o pericarpio
- El endosperma amiláceo
- El embrión.

Cada una de las tres partes del grano cumple una función definida. El pericarpio protege la semilla, tanto antes como después de la siembra, limitando o impidiendo la entrada de hongos o bacterias que podrían invadir el grano. Si el pericarpio resulta dañado, puede ocurrir que la germinación se retrase debido a que organismos patógenos invadan el interior de la semilla.

El endosperma es la principal reserva de energía del grano. Éste ocupa el 80% del volumen del grano. Está compuesto por: 90% de almidón, 7% de proteínas y pequeñas cantidades de aceites, minerales y otros químicos. Su función principal es proporcionar energía a la planta joven hasta que sus raíces estén bien afianzadas y sus hojas puedan realizar fotosíntesis en cantidad suficiente para satisfacer los requerimientos de la plántula.

El embrión está formado por dos partes principales: el eje embrionario y el escutelo (cotiledón). En el grano maduro, el eje embrionario se convierte en plúmula (parte foliar), un esbozo de 5 a 6 hojas y una radícula.

La germinación

El grano de maíz se debe sembrar en suelo húmedo y cálido. Cuando la semilla se pone en contacto con la humedad, absorbe agua a través de su cubierta y el grano comienza a hincharse. Los cambios químicos activan el crecimiento en el eje embrionario, la radícula se alarga y sale de la cubierta en dos o tres días. Poco después, la plúmula comienza a alargarse y se inicia la formación de nuevas hojas dentro de la plántula.

Luego de la aparición de la primera raíz, comienzan a aparecer otras raíces más pequeñas llamadas seminales, que sirven para afirmar la plántula y absorber agua y sustancias nutritivas. Estas raíces no son permanentes, sino que son reemplazadas por las raíces definitivas dando origen la corona de la planta.

Entre el punto de inserción de la semilla y la corona aparece un trozo tubular, de color blanco, semejante a un tallo llamado mesocótilo. Para que se forme la plántula, es de suma importancia que el mesocótilo se alargue. Cuando se siembra a una profundidad de 5 a 8 centímetros, el mesocótilo se alarga hasta llegar más o menos a la mitad de la distancia que lo separa de la superficie. El alargamiento del coleóptilo cubre la distancia restante y hace que las partes foliares salgan de la tierra.

El coleóptilo es firme y puntiagudo y puede abrirse camino a través del suelo. Cuando éste se rompe a mayor profundidad de 3 cm. desde la superficie del suelo, la hoja expuesta es muy ancha y sin rigidez, lo que impide que la plántula aparezca por sobre la superficie del suelo, provocando la muerte de la misma.

La Emergencia

El coleóptilo brota entre seis y ocho días después de la siembra. A penas inciden rayos de sol sobre el coleóptilo, el mismo se rompe y se despliegan dos hojas verdaderas.

En buenas condiciones de crecimiento salen del verticilo algunas hojas, abriéndose a una velocidad aproximada de una hoja cada tres días. El sistema radical primario se encuentra totalmente desarrollado.

La germinación y la implantación son las primeras etapas críticas en la vida de la planta de maíz. Si el suelo está muy frío, húmedo o seco, es posible que la germinación se retrase o que la plántula muera antes de la implantación.

La planta joven no es demasiado exigente y posee gran capacidad para recuperarse de los primeros retrocesos.

Desarrollo vegetativo

Una vez afianzada, la planta de maíz inicia la formación del sistema radicular y la estructura foliar que utilizará posteriormente para producir inflorescencias y el grano.

Las hojas nuevas se producen en un único punto de crecimiento situado en el ápice del tallo. Durante las primeras tres a cuatro semanas luego de la siembra, éste punto permanece enterrado debajo de la superficie del suelo. A medida que la planta crece, poco antes del surgimiento de la panoja, aparecen hojas nuevas.

De cinco hojas embrionarias en la semilla, la planta normal de maíz produce hasta 20 o 30 hojas, todas en el punto de crecimiento y antes del desarrollo de la panoja.

El sistema radicular se desarrolla rápidamente durante ésta etapa de crecimiento. Las raíces seminales pierden importancia. El sistema radical permanente se forma desde la corona. Las raíces primarias continúan hundiéndose y ramificándose, mientras que se forman sucesivas raíces adicionales en los nudos del tallo por encima de la corona. Los nudos que producen raíces debajo de la tierra se corresponden con los nudos situados encima, que originan hojas. Las raíces seminales dejan de crecer antes de V3. A partir de VE, se desarrollan las raíces nodales y a partir de V18, aparecen raíces en los nudos ubicados por encima de la superficie del suelo.

Después del surgimiento de la panoja, de los nudos inferiores brotan verticilos radicales que penetran en el suelo.

La etapa vegetativa no es la más importante para la determinación del rendimiento del cultivo. Las diferencias entre variedades, efectos de temperatura y otros factores ambientales, inciden en la prolongación de éste período que en cualquier otra etapa del crecimiento y del desarrollo. A pesar de los daños que pueda sufrir la planta en ésta etapa, ésta tiene una gran capacidad de recuperación, siempre que las condiciones posteriores sean favorables.

Etapa reproductiva

El punto de crecimiento que hasta el momento presenta forma circular o hemisférica, se alarga hasta formar un cilindro de ápice redondeado. En pocos días éste punto de crecimiento se desarrolla en una panoja embrionaria.

La planta comienza una etapa de crecimiento vertical veloz, los entrenudos inferiores del tallo comienzan a alargarse y el sistema radical comienza a tener una gran actividad. Con posterioridad a la iniciación de la panoja, cuando la planta tiene alrededor de siete a nueve hojas expandidas, se produce el comienzo de la diferenciación de los primordios florales de la yema axilar que dará origen a la espiga. Si bien las yemas axilares se diferencian acrópetamente (es decir, las yemas más viejas son las basales), la primera cuyo meristema cambia de estado vegetativo a reproductivo es la yema superior. Ésta yema generalmente está ubicada en la axila de la quinta a séptima hoja por debajo de la

panoja. Al igual que para el meristema apical, una vez que la yema axilar es inducida a diferenciar órganos florales, cesa la diferenciación de estructuras vegetativas (en este caso las chalas), comenzando la formación de espiguillas con flores pistiladas. La diferenciación reproductiva de las yemas axilares continúa en sentido basípeto pudiendo haber simultáneamente hasta siete yemas en estado de diferenciación floral. Las yemas correspondientes a las cuatro a cinco hojas basales, cuyos entrenudos nunca se elongan, permanecen en estado vegetativo y pueden dar lugar a ramificaciones (macollos), según el genotipo, el ambiente y la densidad de siembra. Las hojas ubicadas por encima de la correspondiente a la espiga superior, no presentan yemas axilares visibles.

Dentro de cada yema axilar que ha entrado en fase reproductiva, queda determinado tempranamente el número de hileras de espiguillas de la futura espiga, mientras que la diferenciación de espiguillas procede acrópetamente sobre cada hilera.

La diferenciación de espiguillas sobre hileras continúa hasta una o dos semanas antes de la aparición de los estigmas, fuera de la envoltura de las chalas. La finalización de la diferenciación se manifiesta por un cambio en el aspecto del domo apical. Esto suele coincidir con el comienzo de la elongación de los estigmas de las espiguillas del tercio inferior de la espiga. En ese momento queda determinado el total de espiguillas diferenciadas, y con ello el número potencial de granos que puede tener la planta.

La elongación de los entrenudos continúa hasta la aparición de los estigmas. Alrededor del momento de floración también queda determinado el índice de área foliar máximo y la altura máxima de las plantas. El orden de elongación de los entrenudos se elongan simultáneamente. A temperatura constante, la duración del período de elongación de cada entrenudo aumenta acrópetamente hasta el entrenudo correspondiente a la espiga, resultando cada entrenudo más largo que su inmediato anterior, excepto el entrenudo de la espiga. Este último presenta el mayor período de elongación pero más corto que los dos adyacentes al mismo. La longitud de los entrenudos comienza a disminuir nuevamente a partir del inmediato superior a la espiga, aunque la máxima longitud le corresponde al pedúnculo de la panoja.

El panojamiento

El panojamiento consiste en la emergencia de la panoja (inflorescencia masculina), a través del cogollo formado por las hojas superiores, y se completa al expandirse la última hoja.

Cuando surge la panoja, y puede verse el ápice del vástago correspondiente a la espiga, comienza a disminuir la velocidad de crecimiento de la planta y se inician las etapas finales de preparación para la floración. Aproximadamente una semana antes de la liberación del polen, todos los entrenudos, excepto dos o tres superiores, ya tienen su largo total y la planta ha alcanzado su altura definitiva.

Luego de la emergencia total de la panoja ocurre la antesis, que se define como la aparición de las anteras de las flores en las espiguillas de la panoja y el comienzo de la liberación del polen. Este fenómeno no progresa en sentido basípeto: comienza en el eje principal y finaliza en las ramificaciones basales de la panoja. Esta maduración progresiva del desarrollo floral de la panoja resulta en un período de varios días de liberación de polen, a pesar de que cada flor individual libera polen, generalmente, sólo por un día. La liberación de polen ocurre exclusivamente durante las horas de luz, con un máximo entre las 9 y las 11 de la mañana, para descender rápidamente hasta finalizar por completo a la puesta del sol.

La floración de la espiga

La espiga diminuta empieza a formarse al costado del punto de crecimiento, apenas una semana a diez días después de iniciada la panoja. La floración femenina consiste en la emergencia de los estigmas fuera de la envoltura de las chalas. Los estigmas de las flores que son fecundadas cesan su crecimiento inmediatamente, mientras que los de las no fecundadas continúan creciendo hasta 15 días después de su aparición. La receptividad de los estigmas decae marcadamente a partir de los siete días de su aparición, tornándose nula a los 14 días de su emergencia. Los estigmas de las flores no fecundadas se diferencian de aquellos cuya base ha sido atravesada por el tubo polínico, porque no se desprenden del ovario aunque muestren síntomas de senescencia. La emergencia de los estigmas es también un proceso progresivo. Los estigmas de una espiga toman de cuatro a ocho días en emerger, en una secuencia que sigue al patrón general de diferenciación y desarrollo de la inflorescencia. En consecuencia, el período de emisión de polen y de aparición de estigmas en el cultivo se extiende por varios días.

Polinización

La polinización ocurre cuando el polen de las flores estaminadas de la panoja se adhiere a los estigmas de las flores pistiladas de la espiga. Dado que tanto la liberación de polen como la receptividad de los estigmas son limitadas, cuanto mayor sea la sincronía floral en el desarrollo de la panoja y la espiga, mayor será la posibilidad de fecundación en condiciones de campo. Si no existen restricciones ambientales, la aparición de estigmas ocurre en general poco después del comienzo de la antesis (uno o dos días después), aunque en algunos genotipos el proceso puede invertirse.

Las situaciones de estrés, como sequía, baja irradiación, deficiencias minerales y alta densidad, pueden postergar ligeramente la liberación de polen, pero provocan un importante retraso de la floración femenina afectando el número final de granos por espiga.

Fecundación y formación de los granos

La unión del núcleo espermático masculino, proveniente del tubo polínico, con el huevo femenino y los núcleos polares pone en marcha la formación del grano embrionario de maíz. Dicha unión se llama fecundación y tiene lugar en cada una de las estructuras femeninas.

Debido a ésta fecundación se forman dos partes del grano en formación: el embrión y el endosperma amiláceo.

El número de ovarios fecundados en un cultivo queda determinado al finalizar la liberación de polen. El número de granos por planta puede disminuir durante el período de cuaje según la temperatura ambiente, ya que el período de cuaje puede extenderse entre 10 y 20 días después de la floración. El número de granos por planta, que es el principal determinante del rendimiento, queda establecido en este momento.

Durante los primeros días posteriores a la fecundación se producen cambios visibles en la espiga. Los estilos se marchitan y toman un color castaño. A la semana, aparecen sobre las mazorcas unas vejigas acuosas, que son los granos en formación. Luego, los granos crecen rápidamente, el embrión toma forma.

Si bien cada planta pudo haber llegado a diferenciar espiguillas en seis o siete yemas axilares, sólo una a dos espigas por planta dará granos. El número de espigas por planta depende del genotipo y el ambiente.

Llenado de granos

El periodo de llenado de granos transcurre desde el momento de la fecundación hasta la formación de una capa de abscisión en la base de los mismos, denominada “capa negra”. La capa negra es la necrosis de los haces vasculares que conectan al grano con los tejidos maternos. El periodo de llenado de grano presenta tres fases diferentes según su tasa de acumulación de materia seca. Las fases son las siguientes:

- Primera fase: coincide con el periodo de cuaje de los granos y presenta una muy baja tasa de llenado. En ésta etapa tiene lugar una activa división celular, que da lugar a la formación de las células endospermáticas.
- Segunda fase: recibe el nombre de llenado efectivo de granos o fase de crecimiento lineal. Durante ésta etapa se realiza la máxima tasa de llenado y suele representar más de la mitad del período total de llenado. Los granos se llenan de una sustancia lechosa, casi fluida, con gran cantidad de azúcares que contienen cuerpos formadores de almidón y proteínas. Estas sustancias van sufriendo cambios: los azúcares desaparecen y son reemplazados primero por dextrinas gomosas y luego a almidón más seco. El primer lugar de depósito del almidón seco es en la parte superior del grano o corona.
- Etapa final: es una etapa de crecimiento no lineal. Tiene una duración de una a dos semanas. La tasa de llenado declina progresivamente hasta hacerse nula, completándose el crecimiento del grano alcanzando la madurez fisiológica.

A medida que pasa el tiempo de maduración, se puede observar a través del grano, una banda definida que separa la zona amilácea en maduración de la región lechosa inferior donde se continúan depositando sustancias de reserva. Aumenta la materia seca y disminuye el porcentaje de humedad.

Al alcanzar la madurez fisiológica queda determinado el peso final del grano y por lo tanto el rendimiento en grano del cultivo.

El grano sólo alcanza el peso seco máximo cuando la humedad llega a un nivel inferior a 28 - 35%. A partir de este momento, la maduración de la espiga y del grano se da solamente por la pérdida de humedad. Si no se dispone de un buen sistema de secado y almacenamiento, el grano no está listo para la cosecha, desde el punto de vista biológico, no ha completado su maduración. Con éste contenido de humedad todavía se puede generar un proceso de descomposición y debe secarse mucho más, para poder almacenarlo fuera de riesgo. Los granos se secan al 13% de humedad para evitar el deterioro microbiano, especialmente el de origen fúngico, potencialmente generador de micotoxinas. En los granos de maíz hay alta incidencia de aflatoxinas (toxinas generadas por la hongo *Aspergillus flavus*, *nomius*, *parasiticus*, etc.). A partir del 15% de humedad existe el peligro de crecimiento fúngico.

La velocidad de pérdida de humedad luego de la madurez fisiológica depende más de las condiciones climáticas que de cualquier otro factor.

El grano se seca desde la corona hacia abajo, de manera que la parte próxima a la mazorca es la más húmeda durante la mayor parte del período de secado. Por lo tanto, el porcentaje de humedad tiende a ser mayor en la espiga completa que en el grano.

El periodo de maduración no es un período crucial para el rendimiento final, aunque desde el punto de vista práctico el maíz no está seguro hasta luego de su cosecha.

Factores que controlan el crecimiento

La duración de cada una de las etapas de desarrollo puede sufrir una gran variabilidad debido a distintos factores. El desarrollo del maíz está influido por el genotipo, temperatura y fotoperíodo. Las restricciones en la provisión de recursos edafoclimáticos

como la deficiencia de agua, luz y nutrientes, también pueden provocar modificaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Fotoperiodo

El maíz es una especie cuantitativa de días cortos. La velocidad de progreso hacia la floración se reduce con incrementos en el largo del día cuando se excede el fotoperiodo crítico, entre 12 y 13 horas.

El fotoperiodo afecta directamente la iniciación de la diferenciación de la panoja en el ápice, sin influir sobre el desarrollo en otras etapas.

El meristema apical es insensible al fotoperiodo durante la etapa juvenil temprana de su fase vegetativa, ya que diferencia los primordios foliares por influencia de la temperatura. Durante la etapa inductiva, el meristema sigue diferenciando hojas, pero la planta se vuelve sensible al estímulo fotoperiodico, comenzando a diferenciar estructuras reproductivas. Cuanto más corto es el fotoperiodo, menos durará la fase de desarrollo.

La iniciación de la formación de la panoja marca el fin de la producción de hojas, el total de hojas iniciadas es el resultado del tiempo transcurrido hasta la inducción floral y de la velocidad de iniciación de primordios foliares durante dicho lapso.

Temperatura

La temperatura tiene efecto en la duración de las etapas fenológicas. La relación entre temperatura y desarrollo sustentó la elaboración del cálculo del tiempo térmico para poder predecir el momento de ocurrencia de distintos sucesos basados en la acumulación de grados días. El cálculo de tiempo térmico es el siguiente:

$$tt = \sum^n (T_{as} - T_b)$$

- T_{as} es la temperatura media del aire o del suelo
- T_b es la temperatura base para la etapa considerada
- n es el número de días utilizados en la sumatoria.

El resultado suele definirse en grados-día necesarios para cumplir una etapa determinada.

La temperatura máxima en la que puede desarrollarse el maíz es 40 a 44° C, mientras que la temperatura base es de 8° C. A mayor temperatura, los procesos ocurren con mayor velocidad.

La germinación de la semilla depende de la temperatura y la humedad edáfica. La temperatura regula también la aparición de las hojas. La velocidad de aparición de puntas de hojas es constante a partir de la segunda hoja, en condiciones de temperatura uniforme. La emergencia de cada punta visible de hoja requiere de 36 a 40 grados-día. Existe una estrecha relación entre la velocidad de aparición de hojas totalmente expandidas y la temperatura.

La duración del período entre el cambio de estado del ápice y la emergencia de la panoja, está determinado por el número de hojas a desplegar y la velocidad de aparición de hojas. A mayor número de hojas, mayor será la acumulación de unidades térmicas necesarias para completar la fase, y cuanto mayor sea la temperatura del período, más rápido se desplegarán sus hojas. La influencia de la temperatura sobre la duración de la

fase de inducción a floración se ejerce a través de dos procesos independientes: su incidencia sobre el número final de hojas y la velocidad de aparición de hojas. El factor modulador del desarrollo es la temperatura.

Los genotipos de maíz de ciclo largo presentan mayor número total de hojas debido a su mayor requerimiento térmico para completar el período hasta el cambio de estado del ápice. Este tipo de maíces, poseen mayores requerimientos térmico total para desplegar sus hojas, incrementando la acumulación de grados-día necesaria para alcanzar la floración.

La diferenciación de espiguillas en la espiga también está controlada por la temperatura. Las diferencias genotípicas en la duración de éste período modifican el número de espiguillas diferenciadas, dando como resultado espigas de distinta longitud.

La madurez fisiológica también depende de la temperatura. Altas temperaturas, aceleran el proceso de llenado, dando como resultado un peso final de grano bajo.

Rendimiento y periodo crítico

Existen diferentes formas de expresar el rendimiento del maíz. Una de ellas consiste en multiplicar el número de granos producidos por su peso medio. El número de granos por unidad de superficie de cultivo es función del número de granos por espiga, el número de espigas por planta y el número de plantas por unidad de superficie, es decir su densidad. Se debe tener en cuenta, que el peso medio de los granos es el resultado del efecto combinado que ejercen dos factores: la duración del período efectivo de llenado y la tasa de llenado.

Tanto el número de granos como el peso medio de los mismos son variables que responden a los cambios que experimentan las condiciones ambientales y fisiológicas del maíz. La realidad es que el rendimiento del maíz está ligado a la cantidad de granos logrados por unidad de superficie.

Existen momentos específicos del ciclo, en los cuales una disminución de la tasa de crecimiento producen importantes mermas en el rendimiento, como por ejemplo la floración, ya que en durante ésta etapa se determina el número de granos por unidad de superficie. La tasa de crecimiento del cultivo en floración es indicadora de la capacidad del cultivo de maíz para fijar granos.

Durante la floración se fija el número de espigas fértiles por planta. Cada planta diferencia varias espigas, pero sólo una o dos logran un desarrollo normal. El aborto de estructuras está relacionado con el estado fisiológico de la planta en floración. El aborto o detención del crecimiento de la segunda espiga ocurre durante o apenas después de la emergencia de las barbas en la espiga superior.

Los aumentos en la densidad de plantas reducen el número de espigas logradas por planta. Las condiciones desfavorables durante la prefloración y floración aumentan el porcentaje de aborto de espigas. En una situación de alta competencia entre plantas, el período de una a tres semanas previas a la floración es crítico, ya que se establece el peso por planta. Las plantas sometidas a competencia que no superen el umbral de crecimiento para fijar una espiga, serán estériles. Por éste motivo es importante lograr un plantel de plantas uniforme.

Las espigas comienzan a diferenciarse tempranamente en la planta, pero sólo se determina el número final de las mismas en el periodo de floración.

El número de granos por espiga se determina en posfloración. El desarrollo inicial del grano depende del suministro de asimilados a la espiga durante dicha etapa. Cuanto mejores sean las condiciones ambientales durante la etapa de posfloración, menor será el porcentaje de aborto, y por lo tanto mayor el número final de granos por espiga. La

disminución en el número de granos por planta debido al sombreado, alrededor de floración, se debe al aborto de espiguillas y granos después de la emisión de estigmas. Generalmente los granos que abortan, son los más jóvenes, ubicados en la punta de la espiga.

El número de hileras por espiga está afectado por el genotipo, más que por las condiciones ambientales. Si bien el genotipo es importante, se puede ver afectado por la temperatura durante la etapa que va desde la fase de iniciación de la yema de la espiga hasta el comienzo de la diferenciación floral. Por lo tanto, para un determinado genotipo, la determinación del número de granos por espiga es función de la supervivencia de las espiguillas y de granos, más que el número total de espiguillas.

La panoja y el tallo compiten con la espiga por los fotoasimilados, por lo que la reducción de la competencia interplanta por despanojado produce un mayor número de granos por unidad de superficie.

El maíz tiene crecimiento determinado, lo que hace que el cultivo tenga escasa plasticidad, lo que le confiere baja estabilidad en producción de granos por unidad de superficie ante disminuciones de estructuras reproductivas en floración.

El periodo alrededor de la floración es clave para la determinación del número de espigas por unidad de superficie y del número de granos por espiga. El cultivo de maíz debe ser manejado de forma tal que alcance en ésta etapa un estado fisiológico óptimo: alta tasa de crecimiento y elevada partición a espigas de los asimilados disponibles.

Peso de los granos

Las primeras dos semanas pasadas la floración, el grano fecundado acumula poco peso. Es ésta primera etapa hay gran actividad mitótica en la que se determina el número de células endospermáticas y la cantidad de gránulos de almidón.

En la segunda etapa, el grano crece en forma lineal y acumula más del 90% de su peso.

La tasa de crecimiento del grano es función directa de la temperatura.

La duración efectiva de la etapa de llenado se define como el cociente entre el peso final del grano y la tasa de crecimiento de los granos durante la etapa lineal de acumulación de peso. La duración del periodo es en función de la fuente fotosintética disponible y de la temperatura. Si la provisión de fotoasimilados es pobre, se reduce la duración de la etapa, aunque el maíz posee reservas que removiliza supliendo la escasez de fotosintatos. Cuando la provisión de asimilados disminuye por debajo de un determinado umbral, cesa el crecimiento del grano, formándose una capa negra de abscisión indicando la madurez fisiológica.

Si las fuentes no son el limitante durante el llenado, la duración de ésta etapa depende estrictamente de la temperatura.

El maíz posee una reducida capacidad para compensar un bajo número de granos con mayor peso de los mismos. Esta poca plasticidad en el peso de los granos torna crítica a la etapa de llenado.

Para obtener altos rendimientos, el maíz debe lograr un óptimo estado fisiológico en floración. Las tasas de crecimiento deben ser altas, por lo que se debe lograr una cobertura total del suelo y alta eficiencia de conversión de radiación interceptada en biomasa.

El control temprano de malezas, asegura que no habrá competencia en los estadios críticos y que el cultivo llegará a floración con un estado fisiológico óptimo.

Condiciones desfavorables durante el llenado de granos adelantan la madurez fisiológica y reducen el peso de los granos. La tasa de crecimiento del grano es más estable y responde a la temperatura.

Manejo del cultivo de Maíz

Fecha de Siembra

La elección de la fecha de siembra puede variar por diferentes razones como: oportunidad de labranza, disponibilidad de insumos, adversidades climáticas o biológicas, etc. La modificación de la fecha de siembra, modifica las condiciones ambientales a las que se va a ver expuesto el cultivo a lo largo de la estación de crecimiento.

El período de siembra del maíz tiene lugar a principios de primavera, durante los meses de septiembre y octubre, variando la fecha óptima de siembra según la zona del país y el cultivar seleccionado. Siembras muy tempranas permiten un mejor desarrollo del cultivo, pero hay que contemplar que una helada tardía puede afectar al cultivo en estado de nacimiento o emergencia.

Cuando la siembra se retrasa, las mayores temperaturas ambiente por las que pasa el cultivo provocan un aceleramiento de su desarrollo.

Se efectúa la siembra cuando la temperatura del suelo alcance un valor de 12°C. Se siembra a una profundidad de 5 cm.

Cuando se atrasa la siembra, el efecto combinado de temperatura alta y fotoperiodo creciente, se modifica el total de hojas diferenciadas. Las mayores temperaturas aceleran la velocidad de aparición de las hojas, acortando el tiempo en el cual cada hoja se despliega, reduciendo así el tiempo necesario para llegar a floración. El acortamiento del tiempo entre la emergencia y la floración, reduce el aprovechamiento de la oferta estacional de radiación solar. Sin embargo el retraso de la siembra posibilita el rápido establecimiento de un canopeo eficiente en la intercepción de la luz incidente durante la etapa vegetativa.

Las siembras tardías resultan en: altas tasas de crecimiento del cultivo durante su etapa vegetativa debidas a la eficiente intercepción y utilización de los elevados valores de radiación incidente; bajas tasas de crecimiento del cultivo durante el periodo reproductivo, debidas a una baja eficiencia de conversión y menores niveles de radiación incidente.

El retraso de la siembra, desplaza el periodo reproductivo del cultivo hacia otoño, donde existen condiciones de menor radiación y temperatura, lo que incide negativamente en los procesos que determinan el rendimiento. Las condiciones del ambiente, limitan la producción de materia seca en el periodo de floración e incrementa el aborto de estructuras reproductivas en desarrollo.

Por estos motivos, se llega a la conclusión que las siembras tardías favorecen el crecimiento vegetativo mientras que las siembras tempranas favorecen el crecimiento reproductivo.

El maíz generalmente se siembra con una distancia entre hileras de 70 cm, como la mayoría de los cultivos denominados de "escarda".

La semilla de maíz es un híbrido comercial, y por lo tanto no puede ser producción propia del establecimiento. El híbrido comercial es obtenido por empresas semilleros a través del cruzamiento de líneas genéticas seleccionadas. La producción de granos obtenida de estas semillas híbridas no puede volver a ser utilizada como semilla porque

el cultivo resultante tendría gran variabilidad de tamaño de plantas y rendimientos, y, por lo tanto la producción sería muy errática. Por ello el productor debe realizar la compra de la semilla para su siembra.

Densidad de siembra

La producción de materia seca de un cultivo está directamente relacionada con el aprovechamiento de la radiación solar incidente, siendo importante la radiación incidente durante los momentos críticos de determinación del rendimiento.

El manejo correcto de la cantidad de plantas por unidad de superficie, asegura la obtención de coberturas vegetales adecuadas y uniformes, lo que posibilita lograr una intercepción eficiente de la radiación incidente. Por éste motivo la elección de la densidad es un importante factor de producción.

La intercepción de luz por parte del canopeo está estrechamente relacionada con el índice de área foliar, hasta valor crítico de IAF que permite interceptar el 95% de la radiación incidente, y que asegura las máximas tasas de crecimiento del cultivo. La cantidad de plantas necesarias para lograr el IAF crítico es función del área foliar.

La planta de maíz posee una baja plasticidad en área foliar ante variaciones en la densidad, ya que tienen reducida capacidad de macollaje y de expansión foliar.

En densidades bajas el cultivo no llega a desarrollar suficiente área foliar para lograr el IAF crítico.

El incremento en la densidad de plantas permite obtener mayor cobertura anticipadamente dentro del ciclo del cultivo, alcanzando el IAF crítico antes de tiempo. Esto favorece a la producción de biomasa o rendimiento biológico. La producción total de materia seca por unidad de área se incrementa con el aumento de la densidad de plantas, pero luego de un determinado valor de densidad, el aporte de plantas adicionales es compensado por la reducción en el peso individual de las mismas por incremento de la competencia entre ellas.

La intercepción de radiación por el cultivo es función de la densidad de plantas y del arreglo espacial de las mismas.

Requerimientos nutricionales

El nitrógeno y el fósforo son los dos macronutrientes más limitantes para la producción de maíz. Ambos nutrientes condicionan el establecimiento y el mantenimiento de la capacidad fotosintética del canopeo y la determinación de la capacidad de los destinos reproductivos. El IAF, la senescencia de las hojas y la actividad fotosintética dependen, en gran medida, de éstos nutrientes.

La producción de biomasa del cultivo de maíz es, en general, un indicador de las condiciones exploradas por el cultivo y el modo en que ellas afectaron su capacidad para la captura y uso de los recursos ambientales. Sobre el amplio rango de condiciones, a medida que aumenta la captura de un recurso, aumenta la producción de materia seca del cultivo.

La tabla a continuación, muestra el requerimiento y extracción en grano de los nutrientes esenciales para producir una tonelada de maíz.

Nutriente	Requerimiento (Kg/Ton)	Índice de Cosecha	Extracción (Kg/Ton)
Nitrógeno	22	0.66	14.5
Fósforo	4	0.75	3.0
Potasio	19	0.21	4.0
Calcio	3	0.07	0.2
Magnesio	3	0.28	0.8
Azufre	4	0.45	1.8
	Gr/Ton		Gr/Ton
Boro	20	0.25	5
Cloro	444	0.06	27
Cobre	13	0.29	4
Hierro	125	0.36	45
Manganeso	189	0.17	32
Molibdeno	1	0.63	1
Zinc	53	0.50	27

Tabla N° 14: Requerimientos y extracción de nutrientes para la producción de una tonelada de maíz (en grano).

- Nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente más deficiente para la producción de maíz. El N influye en el rendimiento y también en la calidad, ya que de él depende el contenido en proteínas del grano.

La absorción del N tiene lugar, especialmente, en las cinco semanas que transcurren desde diez días antes de la floración hasta veinticinco o treinta días después de ella. Durante estas 5 semanas la planta extrae el 75% de sus necesidades totales. La demanda de nitrógeno aumenta marcadamente a partir del estado de 5-6 hojas desarrolladas.

La cantidad de nitrógeno a aplicar depende de las necesidades de producción que se deseen alcanzar así como el tipo de textura del suelo. La cantidad aplicada va desde 20 a 30 Kg de N por ha.

Cuando la planta padece deficiencias de N, disminuye el vigor y las hojas se tornan pequeñas, las puntas de las hojas toman color amarillo, que poco a poco se va extendiendo a lo largo de la nervadura central, dando lugar a una especie de dibujo en forma de V. La deficiencia de nitrógeno no es fácil de detectar en las etapas tempranas de crecimiento y los síntomas severos para vez aparecen antes que la planta haya llegado a la altura de la rodilla.

Al acentuarse la carencia de N, la hoja entera amarillea, y paulatinamente van poniéndose amarillas las hojas por encima de la primera. Las mazorcas procedentes de plantas que han sufrido falta de nitrógeno tienen las puntas vacías de grano.

- Fósforo

Como se ha descrito en el cuadro anterior, el cultivo de maíz requiere de 4 Kg de fósforo para poder producir una tonelada de grano. El fósforo es absorbido, mayormente, en las primeras etapas del ciclo del maíz. Por éste motivo, ante un faltante del nutriente, se recomienda la fertilización a la siembra. Para que sea interceptado fácilmente por las semillas, se recomienda la fertilización en bandas al costado y por debajo de la semilla.

El diagnóstico de la fertilización fosfatada se basa en el análisis de muestras de suelo del horizonte superficial utilizando un extractante adaptado a los suelos del área en evaluación. En la región pampeana, en general, el extractante utilizado es Bray 1 (Bray y Kurtz, 1945).

La dosis recomendada depende del nivel de P Bray, del rendimiento esperado y de la relación de precios grano/fertilizante, entre otros.

La respuesta de los cultivos a la fertilización fosfatada depende del nivel de P disponible en suelo, pero también es afectada por factores del suelo, del cultivo y de manejo del fertilizante. Entre los factores del suelo, se destacan la textura, la temperatura, el contenido de materia orgánica y el pH; mientras que entre los del cultivo deben mencionarse los requerimientos y el nivel de rendimiento. La efectividad de los fertilizantes fosfatados depende también de los niveles adecuados de otros nutrimentos, como el nitrógeno y el potasio. Existe una influencia positiva de las fuentes nitrogenadas amoniacales (urea y sulfato de amonio) sobre la asimilación del fósforo, especialmente cuando se colocan en bandas junto con el fertilizante fosfatado. El exceso de fósforo puede inducir deficiencias de zinc, particularmente en suelos de pH alto. El fósforo tiende a ser inmovilizado por diversos componentes del suelo, mayormente en suelos ácidos o alcalinos. En suelos ácidos se puede reducir la inmovilización mediante aplicaciones de cal, que conllevan a la adición de calcio. Un efecto adicional del encalado es el de acelerar la mineralización de la materia orgánica, con aumento ulterior en la disponibilidad de nutrimentos. Las calces denominadas dolomíticas suministran, además del calcio, apreciables cantidades de magnesio al suelo.

Las deficiencias de fósforo en la planta, aparecen cuando las mismas son jóvenes. El síntoma se presenta como una mancha de color rojizo en las hojas. El P también controla el tamaño del tallo y la formación de la mazorca. Una muy buena indicación de la deficiencia de fósforo es la presencia de tallos retorcidos y débiles que no tienen mazorcas o éstas son deformes y pequeñas.

- Potasio

El potasio es absorbido intensamente durante la etapa juvenil de la planta de maíz. En la mayor parte de los suelos las pérdidas de potasio son relativamente pequeñas. A menos que se trate de suelos con texturas muy gruesas, se recomienda la aplicación de fertilizantes potásicos totalmente en la siembra, en forma de bandas enterradas a un lado y por debajo de la semilla.

Las fuentes comunes de fertilizantes potásicos incluyen el cloruro de potasio, el sulfato de potasio, el nitrato de potasio, y fórmulas compuestas.

Las deficiencias de potasio aparecen como una “quemadura” en el filo de las hojas más cercanas al suelo. Otro síntoma, puede ser la presencia de coloración café oscura en el interior de los nudos del tallo (lo que se observa cortando longitudinalmente el tallo).

Nutrición nitrogenada

Como se ha explicado previamente, el nitrógeno es un elemento indispensable para el desarrollo del cultivo de maíz. Este macronutriente participa en la síntesis de proteínas y es vital para toda la actividad metabólica de la planta. Su deficiencia provoca reducciones severas en el crecimiento del cultivo, básicamente por una menor tasa de crecimiento y expansión foliar que reducen la captación de la radiación fotosintéticamente activa

El maíz requiere alrededor de 20 -25 kg/ha de nitrógeno (N) por cada tonelada de grano producida. La oferta de nitrógeno para cubrir las necesidades nitrogenadas proviene de varios componentes:

- Nitrógeno de nitratos disponible a la siembra (N-NO₃- disponibles de 0-60 cm).
- Nitrógeno mineralizado de la materia orgánica: la cantidad de nitrógeno mineralizado durante el ciclo del cultivo varía según temperatura, humedad y tipo de suelo. A modo orientativo, se puede considerar alrededor del 2.5% del Nt (nitrógeno total del suelo) determinado en el estrato de 0-30 cm.
- Nitrógeno del fertilizante: en el caso de que el nitrógeno inicial medido por análisis de suelos a la siembra (nitratos) y el nitrógeno mineralizado desde la materia orgánica humificada sean inferiores al requerido por el cultivo se deberá fertilizar la diferencia para mantener el balance en equilibrio (oferta de nitrógeno=demanda de nitrógeno).

En el caso de ser necesaria la fertilización, la cantidad de fertilizante a utilizar, calculada a partir de un procedimiento denominado "criterio de balance", deberá ser ajustada por la eficiencia de fertilización. La magnitud de la eficiencia, depende del tipo de fertilizante y del manejo del mismo (fuente, tecnología de aplicación, momento de fertilización, etc.) El manejo del fertilizante debería contemplar qué pérdidas de nitrógeno se pueden presentar y diseñar la estrategia de fertilización que minimice la incidencia global de las mismas. Las pérdidas de nitrógeno que deben ser consideradas para estimar la dosis de fertilizante a agregar se caracterizan brevemente a continuación:

- Volatilización de amoníaco: Esta pérdida se genera en aplicaciones de urea o fertilizantes que contienen urea en su composición o aplicaciones de fertilizantes amoniacales en suelos con pH elevados. Cuando la urea se hidroliza en el suelo, se incrementa el pH alrededor de los gránulos del fertilizante alcanzando pH de 8.5 desplazando el equilibrio del amonio hacia el amoníaco, que se pierde como gas. La enzima que cataliza la hidrólisis de la urea en el suelo es la ureasa. La concentración de esta enzima es muy superior en los rastrojos que en suelo. Por ello, la aplicación de urea sobre residuos incrementaría la tasa de pérdida de nitrógeno por esta vía, siempre que el ambiente sea predisponente. Los otros factores que predisponen la pérdida por volatilización son la temperatura (mayores a 15-18 °C), dosis de nitrógeno, vientos, pH del suelo, etc. Una vez incorporado el fertilizante (ya sea por un implemento agrícola o por las lluvias y/o riego) la magnitud de la pérdida se reduce significativamente. En aplicaciones de fertilizantes en V6 hay que tener en cuenta las condiciones ambientales mencionadas para decidir la fuente de fertilizante a utilizar y/o la dosis de nutriente a aplicar.

- Lixiviación de nitratos: Esta pérdida es el lavado de nitratos por el agua de percolación del suelo por debajo de la zona de aprovechamiento de las raíces. Para que se genere la misma es necesario un flujo vertical de agua en el perfil del suelo saturado provocado por lluvias intensas o el riego. Esta pérdida resulta más importantes en suelos arenosos por la mayor movilidad vertical de los nitratos. Teniendo en cuenta que estamos frente a un ciclo climático húmedo, los pronósticos meteorológicos de corto plazo a nivel local deberían considerarse en las decisiones de fertilización a campo. Existen varios factores que inciden en forma integral en la magnitud de las pérdidas de nitrógeno por lixiviación de nitratos: tipo de suelo (textura, permeabilidad, etc.), cobertura de residuos o de cultivos; disponibilidad de nitratos en el suelo; intensidad de la lluvia y/o riego; etc. En términos generales, un excedente o balance positivo de agua en el sistema suelo-planta determina una salida neta de nitratos fuera del sistema suelo-planta. La estrategia de manejo del fertilizante debería procurar aplicar el nitrógeno escapando a los eventos de lluvias intensas o en etapas en donde el cultivo comienza a consumir agua y

• Desnitrificación: Este proceso es poco relevante en maíz. Se presenta en condiciones de excesos hídricos prolongados en el suelo que generan anaerobiosis que promueven la reducción de los nitratos a óxidos de nitrógeno y en casos extremos a nitrógeno molecular (N₂). La desnitrificación es mediada por una serie de bacterias del suelo del género *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* Las bacterias toman las moléculas de nitratos como aceptores de electrones para su propia respiración reemplazando al oxígeno. Situaciones de anegamiento generan condiciones de déficit de oxígeno, promoviendo entre otros procesos, la actividad bacteriana de desnitrificación. La reacción química involucrada es:



Los factores que inciden directamente en las cantidades de N perdidas por éste proceso son:

- Disponibilidad de nitratos: a mayor contenido de nitratos en el suelo, la magnitud de la pérdida aumenta. Suelos de mayor fertilidad o fertilizados previamente a la existencia de condiciones predisponentes promueven el proceso.
- Contenido hídrico del suelo: es el principal factor influyente ya que regula las condiciones de óxido-reducción en el suelo. Con elevados contenidos hídricos mayores al 70-80% del agua útil durante períodos prolongados son predisponentes a la ocurrencia de desnitrificación.
- Contenido de materia orgánica: está relacionado a la población bacteriana del suelo, y el contenido de sustrato que provee a las bacterias de la energía (compuestos de carbono) para su supervivencia. La mayor fertilidad por contenido de materia orgánica es una condición predisponente.
- Temperatura: todo proceso biológico está promovido por la temperatura. Son esperables mayores pérdidas en primavera-verano que en otoño invierno.
- Textura del suelo: suelos arcillosos poseen mayores pérdidas desnitrificación que los arenosos, ya que en los primeros, tanto la actividad biológica como la fertilidad química del suelo suelen ser mayor. En general, suelos más arcillosos poseen mayores niveles de materia orgánica y por ende mayor actividad microbiana (más sustratos carbonados)
- pH: una reacción del suelo neutra o ligeramente alcalina, promueven la desnitrificación por el efecto sobre la actividad biológica bacteriana del suelo.

El nitrógeno es un nutriente indispensable a considerar en el manejo de nutrición del cultivo de maíz. El análisis del balance de nitrógeno en el sistema suelo-planta es el criterio conceptual a tener una primera aproximación a las necesidades de fertilización nitrogenada del cultivo. De los componentes de este esquema de diagnóstico de la fertilización, el nitrógeno mineralizado y la magnitud de las pérdidas de nitrógeno son

los parámetros más variables y más difíciles de cuantificar. Para ello, es muy importante tener en cuenta la información local proveniente de la experimentación efectuada por asociaciones e institutos de investigación para basar las decisiones de fertilización en bases técnicas que permitan optimizar el aprovechamiento del nitrógeno agregado.

Interacción *Azospirillum* - Maíz

El maíz es un cereal que requiere la aplicación de fertilizante nitrógeno. Debido al deterioro y empobrecimiento de los suelos de la región pampeana, hoy en día la necesidad de reponer parte de los nutrientes extraídos en las sucesivas cosechas es fundamental para mantener la sustentabilidad de la actividad. Para reponer los nutrientes del suelo, existen dos posibilidades: la fertilización química y la fertilización biológica. Con ésta última, se evita la contaminación ambiental, se ahorra en el costo de producción y se alarga la vida útil del recurso suelo.

Para optimizar el empleo del fertilizante nitrogenado, es el aislamiento, selección e inoculación del maíz a la siembra con bacterias benéficas de raíz (BBR) o también llamadas Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP, en inglés PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria), las cuales aumentan la absorción radical del nitrógeno por estimulación fitohormonal. Las BBR causan un efecto similar al observado cuando el maíz se fertiliza con la forma de N recomendada para esa variedad y región. Los resultados muestran un efecto positivo de las BBR sobre el crecimiento del maíz en términos del incremento en su peso seco, por ciento de proteína y nitrógeno total, en comparación con el maíz sin inocular y fertilizado con nitrato de amonio.

Una estrategia para minimizar la fertilización, es la utilización de promotores de crecimiento como los microorganismos. Este tipo de bacterias, como *Azospirillum* sp. es capaz de producir hormonas tales como las auxinas (promotoras del crecimiento vegetal), citocininas (fomentan y favorecen el crecimiento de las yemas laterales) y giberelinas (induce a la germinación de las semillas y controlan el crecimiento vegetal) en la rizósfera de la planta inoculada, aumentando la masa radical de la planta. Éste aumento de raíces, permite a los cultivos un mejor anclaje temprano de las plantas y mayor exploración del perfil del suelo, posibilitando una mayor absorción de agua y nutrientes.

La inoculación de los suelos se hace utilizando turba molida como portador, conteniendo 10⁹ bacterias de *Azospirillum* por gramo de turba que se aplica antes o poco después de la siembra. El aumento de cosecha alcanza un máximo en suelos que reciben un 30-50% menos de fertilizante nitrogenado del normalmente recomendado para estos cultivos.

Asociación bacteria-planta - Quimiotaxis

La asociación que se establece entre la planta y las bacterias benéficas de la raíz es favorable para ambas. La bacteria ejerce el efecto benéfico de fijar nitrógeno y promover el crecimiento de la planta, mientras que la planta le suministra nutrientes para que ésta pueda vivir. *Azospirillum* es una bacteria fijadora de nitrógeno que prolifera en y sobre raíces de maíz, trigo, cebada, avena y otros cereales y plantas

forrajeras constituyendo una rizocenosis no nodulante que lleva a un aumento del número de espigas y de biomasa vegetal.

Las dos formas básicas de interactuar entre la planta hospedadora y las bacterias BBR o PGPR son: 1) rizosférica y 2) endofítica. Las bacterias son capaces de colonizar la rizosfera, la superficie de las raíces o incluso los espacios intercelulares superficiales de las plantas. Las plantas cambian física y químicamente la composición del suelo, generando la inducción de la capacidad de colonización de la rizósfera por parte de las bacterias.

Los exudados radicales, conformados por diversas sustancias (carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, etc.), crean un ambiente nutricional enriquecido que favorece el crecimiento bacteriano. Algunos de las modificaciones sufridas en la rizosfera, son los cambios en el pH del suelo, potencial hídrico, presión parcial de oxígeno, etc.

La quimiotaxis bacteriana es el proceso de atracción/repulsión mediante el cual la bacteria se desplaza hacia concentraciones óptimas de un atrayente o bien, en contra de un repelente que se encuentra en los exudados radiculares de las plantas. Las características bacterianas que participan del proceso de colonización de la raíz son la motilidad del microorganismo y los componentes de su superficie tales como flagelos, pili, y el antígeno O de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular.

El proceso de migración de los microorganismos se encuentra bajo la influencia de un gradiente químico. El desplazamiento de la bacteria se da por rotación flagelar que le permite moverse en la dirección requerida. Los exudados de la raíz de la planta (maíz), provocan una respuesta quimiotáctica sobre la bacteria. El flujo de electrones a través de una cadena redox y cambios en el potencial de membrana son señales positivas en la respuesta de ésta bacteria. Los compuestos aromáticos, especialmente el benzoato, son los principales atrayentes de *Azospirillum* hacia la raíz.

Los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos contribuyen al crecimiento y la supervivencia de las bacterias en la planta, favoreciendo la colonización. También ayudan a la creación de un microambiente favorable, actuando de barrera para los compuestos defensivos de la planta y modulando las reacciones del hospedador.

Azospirillum brasilense es una bacteria endofítica, es decir que tiene la capacidad de vivir dentro de los tejidos de las plantas sin ocasionarle daños. Ésta bacteria reside dentro de los espacios intercelulares o en el interior de las células huésped. La entrada de la bacteria en la planta, se da en los lugares donde ha ocurrido daño epidérmico de raíz lateral o aparición radicular, a través de aberturas naturales.

La cantidad de nitrógeno aportado directamente del microbio a la planta es pequeña debido a que el microbio exporta a la planta una parte mínima del nitrógeno fijado (sólo el 5%), por lo que el cultivo se beneficia indirectamente a través del suelo adonde va a parar el resto del nitrógeno. La bacteria promueve el crecimiento de la planta mediante la secreción de fitohormonas de crecimiento, incrementan la capacidad radical de absorber nitratos y permiten el aprovechamiento del amonio excretado. La bacteria en estudio posee los siguientes beneficios:

- Estimula el crecimiento y producción vegetal
- Aumenta la fijación biológica de nitrógeno
- Solubiliza las fuentes nutritivas
- Raíces y pelos absorbentes en mayor cantidad, mejor desarrollados y sin enfermedades
- Mejora la estructura y fertilidad de los suelos

- Crea una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta
- Producen enzimas que solubilizan los fosfatos y los hacen más accesibles a la planta, así como factores que facilitan la absorción de oligoelementos
- Se ha demostrado que resisten mejor las condiciones de sequía y los climas áridos ya que se forman alginatos en las raíces de las plantas
- Mayor índice de germinación de semillas
- Las nuevas cepas de *Azospirillum* son capaces de fijar un 72,64% más de nitrógeno atmosférico
- Reducción considerable de la aplicación de fertilizantes nitrogenados.

En la relación simbiótica de la soja con *Bradyrhizobium japonicum* se forma una estructura de fijación de N llamada nódulo. En cambio, en el caso de *Azospirillum* con maíz, no se forma una asociación simbiótica, sino que el accionar de la bacteria es alrededor de las raíces. La bacteria actúa como tal y no se convierte en otra forma, como ocurre en el caso de la soja, al formarse el bacteroide y luego el nódulo.

Producción de fitohormonas - Biosíntesis

Como ya se ha explicado en los puntos anteriores, *Azospirillum* es una bacteria que ha mostrado un mejoramiento del crecimiento de la planta y la producción de granos por la inoculación de la planta de maíz. Esto se atribuye a su capacidad de producir fitohormonas, así como también su capacidad para fijar nitrógeno.

La inoculación con *Azospirillum* modifica el sistema radicular por un mecanismo o mecanismos aún no completamente establecidos, sin embargo éste se atribuye al menos en parte, a la producción por la bacteria de sustancias que regulan el crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas y citocininas), conduciendo a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueve la captación de agua y minerales.

Los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal han sido relacionados con el metabolismo del nitrógeno, a través de la fijación biológica en condiciones de vida libre o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofítica. Los principales mecanismos propuestos para explicar la promoción del crecimiento vegetal, está relacionado con su capacidad para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, tales como ácido indol acético, citocininas, giberelinas, y etileno, así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico (ABA) y la diamina cadaverina (CAD).

Auxinas

Las auxinas son compuestos fitoreguladores que tienen la capacidad de inducir la elongación de las células del tallo en la región subapical y reproducir el efecto del ácido indol 3 – acético (AIA). Las auxinas están vinculadas a procesos de orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz y gravedad, diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical, iniciación de las raíces laterales y adventicias, estimulación de la división celular y elongación de tallos y raíces.

Existen, al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis del ácido indol acético (AIA) a partir de triptofano (Trp), denominadas vía del indol 3-piruvico (AIP), ácido 3-acetamida (AIM) y la vía de la triptamina (Tam). Además existe una vía que no requiere

de este precursor para la biosíntesis del AIA y que se denominada vía independiente del Trp.

Existe un patrón de biosíntesis de AIA característico de la interacción planta-microorganismo que depende específicamente de rol ecofisiológico de la especie bacteriana que interactúa. En el caso particular de *Azospirillum sp.*, sintetiza AIA de manera inducible a través de la vía del IPA.

La magnitud de expresión de cada vía depende fundamentalmente de las condiciones de crecimiento bacteriano. La síntesis depende de la disponibilidad del Trp en el sustrato. Si el aminoácido Trp se encuentra disponible, la vía predominante es la del ácido indol-3-piruvico (IPA) y de manera secundaria la vía de la indol 3-acetamida (IAM).

A nivel genoma, el gen bacteriano de mayor importancia en éstos procesos es el llamado "ipdC". Éste gen es regulado por el nivel de auxinas. El promotor del gen ipdC contiene un elemento de respuesta a auxinas (AuxRE).

La vía de la indol 3-acetamida (IAM) involucra la acción de dos grupos de enzimas: Trp-monooxigenasas responsables de la oxidación del Trp a indol 3-acetamida y AIM-hidrolasas responsables de la subsecuente hidrólisis del precursor a AIA.

Una tercera vía de menor importancia ha sido descrita, es la vía de la Triptamina, donde ocurre la conversión inicial del Trp a triptamina, catalizada por enzimas tipo Trpdecarboxilasas, seguida de la conversión a indolacetaldehído por aminaoxidadas.

En el caso de *Azospirillum brasilense* el 90% de la síntesis de AIA se da por las vías de IAM, AIP y 10% por la vía independiente del Trp.

La respuesta de la planta al AIA exógeno puede variar de benéfica a deletérea, dependiendo de la concentración incorporada en los tejidos de la planta. En este sentido, algunos autores consideran que el aumento del contenido endógeno de la hormona por la actividad microbiana del suelo ó sobre la planta, podría suplementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del hospedador y modificar parcialmente el metabolismo celular con la consecuente promoción del crecimiento.

El aumento excesivo del contenido de auxinas, pone en marcha un mecanismo homeostático para reducir la concentración endógena de la hormona. Este mecanismo involucra la traslocación xilemática de conjugados desde la raíz a la parte aérea y un rápido catabolismo de auxinas mediado por AIA oxidadasas.

La interacción planta-bacteria comienza en la rizósfera, donde la mayoría de los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano y el AIA son sintetizados. La presencia de AIA y compuestos derivados en los exudados vegetales, es suficiente para que *Azospirillum* incremente la expresión del gen ipdC con el consecuente aumento de la síntesis de AIA, siempre que las cantidades de precursores (como el triptofano) sean suficientes. El resultado, se traducirá en un incremento del contenido endógeno de la hormona que dará inicio a la respuesta celular, que desencadenará una cascada de señalización que tendrá como sitio primario de actividad la pared celular y el núcleo. Desde el punto de vista fisiológico, la capacidad de *Azospirillum sp.* para sintetizar auxinas y transferirlas al tejido vegetal determinaría dos tipos de respuesta, dependiendo del tipo de planta inoculada. *Azospirillum sp.* es incapáz de inducir la formación de nódulos como ocurre en el caso de las leguminosas, la aplicación exógena de auxinas sintéticas en concentraciones superfisiológicas en raíces de gramíneas, induce la formación de estructuras tumorales denominadas paranódulos que son efectivamente colonizadas por *Azospirillum*. Dentro de éstas estructuras, la bacteria fija nitrógeno de manera eficiente.

En las gramíneas, el crecimiento de la raíz es uno de los parámetros fisiológicos de mayor interés a la hora de caracterizar y seleccionar una cepa promotora del crecimiento

vegetal. El rápido establecimiento de la planta en el suelo, mediado por la elongación de la raíz principal ó por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en un estadio crítico del desarrollo vegetal. La bacteria *Azospirillum brasilense*, causa un incremento del número de raíces laterales que las plantas y esto se correlaciona con la identificación de altos niveles de AIA en cultivos. Estos compuestos producidos en forma continua y en baja concentración en el exterior de raíces ó en el interior de la planta proveen de una dosis hormonal constante que resulta suplementaria y beneficiosa para el crecimiento vegetal y un sistema mejorador a la aplicación exógena de formas sintéticas en el suelo cultivado.

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen un amplio grupo de compuestos naturales (ácidos diterpenos tetracíclicos) que regulan diversos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como la germinación, el alargamiento caulinar, la floración y la fructificación. Desde el punto de vista estructural, las giberelinas libres se dividen en dos grandes grupos: aquellas que poseen un complemento completo de átomos de carbono, (GAs-C20) y aquellas en las que el C20 se pierde (GAs-C19). Todas las GAs están carboxiladas en el C7, con la excepción de GA12-aldehído y pueden tener presentes una (GA4), dos (GA1), tres (GA8) ó cuatro (GA32) funciones hidroxilo. La posición en la molécula que presenta hidroxilación (OH), representa unos de los puntos más importantes en la determinación de la actividad biológica. La hidroxilación de los C3 y C13 en sus posiciones β y α respectivamente, produce la activación de la molécula, mientras que la hidroxilación del C2 en su posición β tiene efecto fuertemente negativo sobre su actividad biológica. Además de las formas libres, se han identificado formas conjugadas endógenas que incluyen: éter glucosídicos (GA-G), donde la glucosa se une a la estructura de la GA por un grupo hidroxilo, y los ésteres glucosídicos (GA-GE), donde la glucosa se une a la molécula de la hormona por medio de un grupo carboxilo del C7.

Sobre las más de 130 GAs conocidas en la actualidad, 13 son específicas de hongos, 100 son exclusivas de plantas y 13 son ubicuas. En los microorganismos, la producción de GAs y auxinas incrementa rápidamente al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento sugiriendo un reordenamiento celular disparado por la disminución de la fuente de C o N en el medio. Fulchieri and Frioni (1994) observaron que plantas de maíz inoculadas con cepas de *Azospirillum sp.* en el centro de Argentina, mostraban un significativo incremento en el peso seco de raíces, parte aérea y semillas con respecto a sus controles sin inocular y en una combinación planta-bacteria que presupuso la existencia de una interacción específica entre ambas. La respuesta de crecimiento es atribuida por lo menos a tres mecanismos bacterianos de promoción: la fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de fitohormonas tipo auxinas y giberelinas y el efecto indirecto de la interacción de *Azospirillum sp.* con la comunidad rizosférica. Varios ensayos de inoculación a campo, muestran que un 60-70 % de las experiencias realizadas fueron exitosas, con un incremento significativo de la producción entre un 5-30% en cultivos de interés agronómico (Bashan and Olguin 1997).

Citocininas

Son un grupo de compuestos naturales que regulan la división y diferenciación celular en tejidos no meristemáticos de plantas superiores. Químicamente son purinas, en su mayoría derivadas de la adenina. Estas fitohormonas se han asociado a un gran número de procesos fisiológicos y celulares entre los que se detallan el retardo de la senescencia por acumulación de la clorofila, la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la elongación de la raíz, la iniciación del tallo, la expansión de las hojas. Son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos o tejidos vegetales.

Muchos microorganismos de la rizósfera, entre los que se detallan bacterias y hongos, son capaces de sintetizar citocininas en cultivos definidos. Al menos el 90 % de las bacterias aisladas de la rizósfera de cultivos de interés agronómico, son capaces de producir compuestos tipo-citocinas. Como resultado de la íntima relación entre estos organismos y la superficie de la raíz, la producción exógena de esta hormona, puede tener un profundo efecto sobre el crecimiento de la planta. Al igual que las auxinas, la producción microbiana de esta hormona, podría complementar el contenido endógeno de la planta y en ciertos casos promover el crecimiento vegetal o resultar fitotóxica. La carencia de información a nivel de la síntesis de citocininas en cultivos de *Azospirillum* se debió a la complejidad del análisis de estas hormonas, lo cual ha sido determinante en la discontinuidad de esta temática. Desde el punto de vista fisiológico, existe poca información que pueda relacionar en forma directa el efecto de la inoculación con *Azospirillum sp.*, la promoción del crecimiento vegetal y la producción de citocininas. La aplicación exógena de auxinas, citocininas y giberelinas produjo cambios en la morfología de la raíz comparables a los obtenidos por la inoculación.

Etileno

Junto con auxinas, giberelinas y citocininas, el etileno es una hormona de composición gaseosa, muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El etileno es una molécula muy simple y simétrica, compuesta por 2 átomos de C (unidos en doble ligadura) y 4 átomos de H, soluble en agua. Es muy activo y puede ejercer sus efectos fisiológicos a concentraciones muy bajas en el tejido vegetal (0.1 ppm). Todos los tejidos de la planta tienen capacidad de sintetizar esta hormona, pero la magnitud de su expresión se asocia al estado de crecimiento y desarrollo de los mismos, siendo más activa en aquellos tejidos en activa división celular, que se encuentran bajo condiciones de estrés o en estado de senescencia. La capacidad de las plantas de sintetizar etileno, depende de una gran variedad de compuestos, que incluyen metionina, ácido linolénico, propanol, β -alanina, etionina, etanol, glicerol, ácidos orgánicos y hasta glucosa y sacarosa, que son precursoras de la hormona. La metionina era el precursor natural por excelencia. En el caso de la síntesis microbiana, los precursores son muy variados pero la L-metionina es el sustrato más utilizado.

La regulación de la producción de etileno también depende de las enzimas que catalizan la biosíntesis de esta hormona: S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetasa, 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) sintetasa y ACC oxidasa. La SAM sintasa cataliza la primera reacción de la biosíntesis a partir de metionina, La segunda reacción es catalizada por la ACC sintasa y determina la hidrólisis de la SAM para

formar ACC y 5'-metiltioadenosina. Finalmente la ACC oxidasa comanda la conversión de ACC a Etileno, CO₂ y cianuro.

El estadio de un órgano influye en la tasa de síntesis de esta hormona, la cual aumenta su acción en etapas donde las células están en división, maduración ó senescencia. Existe una asociación directa entre una alta tasa de respiración y la presencia de etileno, esto produce un alto contenido de etileno en los tejidos senescentes o dañados.

La aplicación de altas dosis de auxinas, puede estimular la síntesis de etileno. La adición exógena de auxinas induce la síntesis de etileno en tejidos vegetativos, pero no en frutos. La formación de etileno está directamente relacionada con una condición de estrés de los tejidos por bajas temperaturas, exceso de calor, inundación, sequía, etc.

Azospirillum puede sintetizar etileno, pero la producción depende de la presencia de metionina en el medio. La producción de etileno se evidencia en cambios morfológicos como el aumento de la masa radicular y el aumento de actividad de la ACC-sintasa, una de las enzimas clave de la ruta de síntesis de esta hormona. El limitante para la biosíntesis de etileno es la conversión de la S-adenosilmetionina (SAM) a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), catalizada por la ACC sintasa. La expresión y la actividad de esta enzima, así como la producción de etileno, incrementan por la adición de AIA (ácido indol3acético) exógeno. Esto indica que el aumento de etileno, en parte se debe a una interacción entre el AIA producido por la bacteria en la vía de síntesis del etileno. A pesar de que *Azospirillum* estimula el crecimiento de plantas, no produce ACC deaminasa, por lo que no pueden regular los niveles de etileno en tejido vegetales. El exceso de etileno puede ser tóxico para la planta.

Ácido Abscísico

El ácido abscísico es una hormona vegetal, involucrada en diferentes procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta, como la dormición de yemas y semillas, la maduración de frutos y en situaciones de estrés ambiental desfavorables como déficit hídricos o estrés salinos. El ácido abscísico (ABA) se forma en plastidios, tanto de hoja como de raíz.

La alternativa de síntesis más aceptada es la ruta metabólica de los carotenoides y su posterior clivaje para dar xantoxina y ABA. Este tipo de síntesis se da especialmente en plantas bajo condiciones de estrés hídrico y salino. El ABA está relacionado con la capacidad de las plantas para adaptarse a condiciones de estrés, a través de distintos procesos fisiológicos y moleculares que incluyen: alteraciones en la expresión de genes relacionados con estrés hídrico y cierre de estomas. Desde el punto de vista fisiológico, el ABA favorece la economía del uso del agua dentro de la planta, por su efecto regulador sobre la apertura y cierre de estomas a nivel de las hojas. Además participa en la dormición de yemas y semillas; en la acumulación de proteínas de reserva en semillas, en la inhibición del crecimiento y germinación inducido por auxinas y Gas, en la inhibición del crecimiento foliar en situaciones de estrés y en la regulación de la síntesis proteica en respuestas de aclimatación a diferentes tipos de estrés. Sin embargo, todas estas funciones están relacionadas a un objetivo común: la defensa del sistema vegetal en condiciones ambientales desfavorables.

La respuesta central de la planta a un déficit hídrico, tiene como resultado un incremento en la síntesis de ABA endógeno, que provoca los efectos fisiológicos y bioquímicos antes mencionados, que son indefectiblemente acompañados de cambios en la expresión de genes, muchos de los cuales son regulados por esta hormona. El desencadenante de la respuesta de la planta para la síntesis de ésta hormona, depende de

las variaciones del potencial químico del xilema, que modifican la capacidad de la hormona de unirse a sus receptores en las células blanco de la hoja. El parámetro que más varía como resultado de la diferencia en el potencial químico del xilema es el pH, ya que la alcalinización del xilema, impide el ingreso o salida de la hormona del simplasto, donde se encuentran los receptores específicos de las células guarda del estoma.

Es muy escasa la información documentada sobre la identificación de ABA en cultivos químicamente definidos de *Azospirillum* y su correlación al crecimiento de la planta.

Interacción de las fitohormonas y su efecto sobre el crecimiento de la planta

En lo que se refiere específicamente a *Azospirillum sp.* existe evidencia de la interacción de fitohormonas producidas por el microorganismo con la situación hormonal de las plantas inoculadas. Sin embargo, un detallado análisis de esta interacción podría revelar interacciones específicas que tendrían como resultado la promoción del crecimiento vegetal.

Fulchieri et al. (1993) encontraron que plántulas de maíz (*Zea mays*) inoculadas con las 3 cepas de *Azospirillum brasilense* mejoraron significativamente el crecimiento de la raíz y de la parte aérea. En estos ensayos GA3 fue identificada en la fracción ácida libre del extracto vegetal y estos resultados permitieron especular sobre la capacidad bacteriana de incrementar el pool de giberelinas con actividad biológica sobre el crecimiento vegetal en las raíces de plantas inoculadas. Algunos autores, sugieren que las auxinas pueden promover, la elongación del tallo por incrementar los niveles de endógenos de giberelinas. Las cepas inoculadas producían AIA lo que permite asociarlo, al aumento en el contenido endógeno de GA3 en la raíz, debido al cross-talk del AIA sobre el pool de GAs de la raíz. Parte de la respuesta del crecimiento observado en parte aérea y subterránea se debe al efecto de las GAs producidas por las diferentes cepas de *Azospirillum* ó por las GAs producidas por las plántulas inducidas por el AIA bacteriano. El aumento en la producción de etileno fue significativamente superior a los controles y los cambios morfológicos fueron acompañados de un aumento de actividad de la ACC-sintasa tisular. El limitante para la biosíntesis de etileno es la conversión de la Sadenosilmetionina (SAM) a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), catalizada por la ACC sintasa y la expresión como la actividad de esta enzima, así como la producción de etileno, incrementa por la adición de AIA exógeno. Esto indica que el aumento de etileno, al menos en parte, se debe a un cross-talk entre el AIA producido por la bacteria en la vía de síntesis del etileno.

Fijación biológica de nitrógeno por *Azospirillum brasilense*

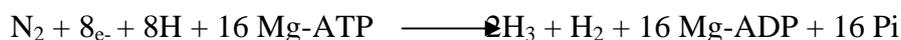
Como se ha visto en puntos anteriores, *Azospirillum brasilense* tiene la capacidad de producir fitohormonas y fijar nitrógeno. El aporte del nitrógeno a la planta, sólo representa un 30% del N fijado.

La fijación biológica de N se realiza a través de la enzima nitrogenasa, la cual es sensible a la presencia de oxígeno. La reducción del nitrógeno a amonio ocurre en tres pasos:

1. Reducción de la Fe-proteína por transportadores de electrones
2. Transferencia de un único electrón a partir de la Fe-proteína hacia MoFe-proteína a través de un proceso dependiente de Mg-ATP

3. Transferencia del electrón para el sustrato ligado al sitio activo de la MoFe-proteína.

El proceso se da según la siguiente ecuación estequiométrica:



Existen tres tipos de nitrogenasa; los microorganismos diazotróficos, como *Azospirillum*, sólo poseen nitrogenasa tipo 1 dependiente del molibdeno (Mo). Éste tipo de nitrogenasa es codificada por genes nif y sólo es posible que se exprese cuando en el medio existe molibdeno.

Algunos factores que afectan a la interacción planta-*Azospirillum*

Cuando las bacterias se siembran en un medio de cultivo óptimo y bajo condiciones adecuadas de incubación, ocurre un incremento en el número de células en períodos muy cortos. Existen algunos factores que afectan a la proliferación de las bacterias y su crecimiento como:

- pH: *Azospirillum sp.*, tiene un crecimiento óptimo en un rango de pH de 6,0 -7,8. Si el microorganismo no cuenta con el pH correspondiente, esto provoca la inhibición de su crecimiento y desarrollo.
- Temperatura: *Azospirillum sp.* requiere una temperatura óptima de crecimiento cercana a los 30 °C. La temperatura puede modificar los requerimientos nutritivos del microorganismos.
- Aireación: Cuando los niveles de oxígeno son bajos, las células de esta bacteria crecen y se multiplican satisfactoriamente, siendo afectadas cuando se presentan altas concentraciones de oxígeno impidiendo que se lleve a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Para mantener una adecuada multiplicación de este microorganismo se debe tener en cuenta la relación de oxígeno en el medio de cultivo, siendo más favorable la relación 1/5.

Inoculantes

Como se explicó en el punto de inoculación de la sección “Fijación Biológica de Nitrógeno en Leguminosas”, un inoculante es un concentrado de bacterias específicas, que aplicado convenientemente a la semilla poco antes de su sembrado, mejora el desarrollo del cultivo.

La inoculación de semillas con *Azospirillum brasilense*, produce cambios en la morfología de las plantas, manifestándose ésta de diferentes maneras: mayor desarrollo radicular, mayor producción de materia vegetal y mayor producción de granos.

Tipos de Inoculantes

Las principales características deseables para un buen inoculante son las siguientes:

- Características físicas y químicas: los inoculantes se deben poder esterilizar fácilmente y en lo posible deben ser uniformes en cuanto a sus características químicas y físicas. Deben tener una calidad constante y alta capacidad de retención de agua (para el caso de inoculantes en soportes húmedos).

- Cualidades de fabricación: debe ser fácilmente fabricado por la industria existente, permitiendo la adición de nutrientes, y poder calibrar su pH fácilmente. La materia sobre la cual están hechos debe tener precio razonable y oferta adecuada.
- Manejabilidad a campo: un buen inoculante es fácilmente manejable, proporcionando una rápida y controlada liberación de las bacterias al suelo, además de poder ser aplicado con maquinaria estándar.
- Características ambientales: debe ser biodegradable, no tóxico, no contaminante, reduciendo así el daño al medio ambiente.
- Calidad en el almacenamiento: debe tener suficiente periodo de vida (uno o dos años a temperatura ambiente).

La forma más simple de emplear/agregar la bacteria *Azospirillum* es, tal cual sale del fermentador, dónde se realiza la multiplicación bacteriana (el método de elaboración se ha explicado en el punto “Selección y preparación de un soporte para inoculante” de la sección “Fijación Biológica de Nitrógeno en Leguminosas”), pero implica un gran obstáculo que es la remoción de grandes volúmenes de líquido con peligro de contaminación en el transporte y almacenamiento. Por otro lado, si la inoculación se realiza de éste modo, el microorganismo llega al suelo desprovisto de protección, expuesto al calor, humedad, microflora, etc. disminuyendo las posibilidades de supervivencia. La aplicación del inoculante en forma líquida puede ser, sin embargo, deseable cuando no es posible tratar la semilla y es necesario aplicar el biofertilizante directamente al suelo.

El licor de *Azospirillum* obtenido en el fermentador pierde rápidamente viabilidad y, en ocasiones, luego de 30 días de almacenamiento, ya no existen células viables de esta bacteria en el líquido, apareciendo frecuentemente grandes contaminaciones de otros microorganismos.

La comercialización del inoculante requiere su formulación y presentación, como un producto fácil de aplicar y con posibilidades de ser almacenado, sin que se pierdan sus propiedades.

Los inoculantes se presentan en variadas formas como:

- Forma sólida

El soporte sólido generalmente empleado es la turba, aunque se ha ensayado e investigado la aplicación de otros como carbón mineral, suelo mineral, cachaza, arcillas, bentonita, vermiculita, soportes sintéticos, lignito, bagazo, compost de suelos, zeolita, cáscaras de maní, tuzas de maíz, aserrín, cáscaras de arroz y cáscara de café entre otros. Se utiliza la turba, gracias a sus favorables características tales como alta capacidad de absorción y retención de agua, contenido natural de nutrientes, no formación de grumos, facilidad de molienda y su naturaleza biodegradable, no tóxica ni contaminante.

- Forma seca

Los formulados secos se preparan mediante la deshidratación de las bacterias. Esto suprime su actividad metabólica, lo que mejora su resistencia al estrés externo y disminuye su sensibilidad a la contaminación. Estos inoculantes pueden ser preparados a partir de un sustrato liofilizado de bacterias, por separación de los microorganismos del medio de cultivo y posterior secado del inoculante, encapsulamiento de las bacterias

en alginato y posterior deshidratación. Muchos de estos formulados se presentan en forma de polvos humedecibles, que luego de ser suspendidos en agua se pueden emplear en el tratamiento de semillas o ser asperjadas en el campo. Para su preparación se emplean además otros ingredientes como dispersantes, adhesivos, protectores celulares e inertes.

Existen polvos húmedos para impregnación de las semillas. La semilla se recubre con una capa de inoculante que debe contener entre 103 y 107 ufc/semilla en dependencia del tamaño de la semilla. En este caso, la dosis de inoculante adecuada es de alrededor de 0.5 kg/ha-1.

Otra opción es el polvo humedecible para la aspersión al suelo. Se utiliza en cultivos en los que no se puede emplear la impregnación de la semilla. La dosis depende del tipo de cultivo y puede fluctuar entre 107 Y 1015 ufc/ha-1 para aplicación en surcos y entre 104 y 109 ufc/ha-1 de suelo para semilleros.

- Forma granulada

Se preparan también inoculantes granulados para su uso directo en el campo. Los formulados granulados se preparan a partir de turba con tamaño de partícula entre 40 y 60 mesh. Las dosis de este tipo de inoculante, dependiendo del cultivo y tipo de suelo, pueden estar entre 5 y 60 kg/ha-1.

Selección y preparación de cultivos y soportes

La mayoría de las bacterias producidas en la industria agroalimentaria se obtienen por fermentación sumergida en biorreactores de diversas escalas con la aireación-agitación adecuada a los requerimientos del microorganismo cultivado y con los accesorios y la automatización necesaria que garanticen las condiciones de fermentación (pH, temperatura, etc.).

Debido a sus requerimientos nutricionales las bacterias del género *Azospirillum* pueden producirse económicamente por el método de fermentación en templeas o discontinuo (batch). Para la producción por el método de fermentación batch que es el más convencional, el primer paso es la optimización del medio y condiciones de cultivo. Esto es también extensivo a la fermentación incrementada (fed-batch) y continua. Pocos estudios se han dedicado a la fisiología de *Azospirillum* propagado en fermentadores para la producción de biomasa.

Para la producción de biomasa, el crecimiento no debe estar limitado por nitrógeno, lo que implica una adición de sales de nitrógeno al medio de cultivo. También se requiere un control estricto de la esterilidad puesto que el pH y la temperatura óptimos de *Azospirillum* permiten el desarrollo de todo tipo de contaminantes potenciales. Los parámetros claves que deben controlarse son:

- La composición del medio de cultivo
- La temperatura
- El suministro de oxígeno
- El contenido intracelular de polibetahidroxibutirato (PBH) (material de reserva)
- El estado fisiológico de la bacteria al detener la fermentación

El desarrollo de estrategias de fermentación optimizadas conllevará a un mejoramiento de la producción de biomasa. El método de fermentación incrementado (fed-batch) en el que los nutrientes se añaden en el medio durante el transcurso de la fermentación, puede

ayudar a alcanzar el estado fisiológico deseado en el medio, incrementando también la productividad de biomasa.

El soporte debe tener una composición uniforme, no debe ser tóxico para la bacteria, ser fácilmente esterilizado y permitir corregir su pH a valores de 6,5 a 7,3. El mismo debe favorecer el crecimiento inicial de la bacteria y mantener un alto número de células vivas hasta su uso.

Como se explicó en el punto anterior, el soporte más utilizado y con buenas características y rendimiento es la turba. A pesar de ser el soporte más difundido, tiene algunas desventajas como: baja disponibilidad del producto, método de almacenamiento (refrigeración) lo que hace costosa su conservación y su composición no es constante (lo que afecta su calidad). Por algunas de estas desventajas, se busca mejorar la utilización de otros soportes como encapsulamiento en perlas de alginato y liofilización. Estos dos últimos soportes tienen la ventaja de la conservación del número de microorganismos hasta la aplicación del inoculante, permitiendo la liberación gradual de las bacterias. Su desventaja es el costo y la necesidad de alta tecnología para su fabricación.

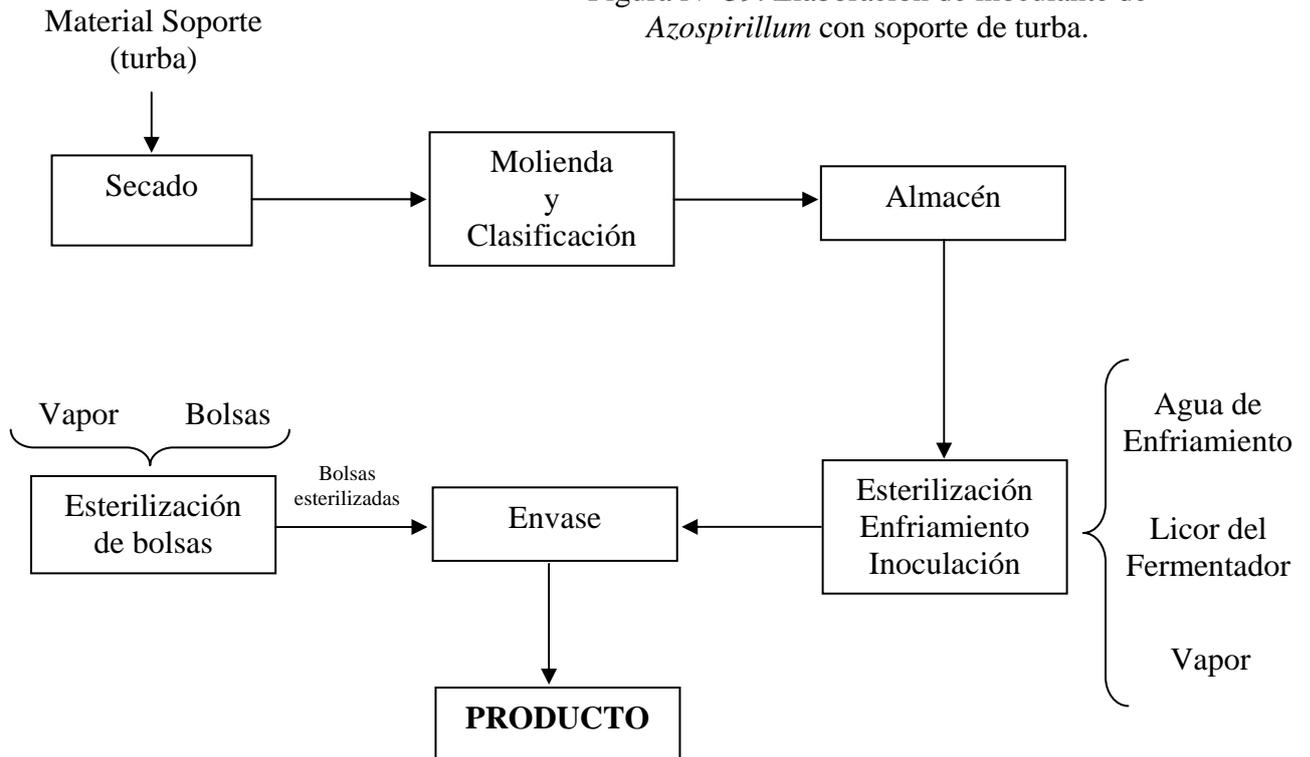
Para la comercialización de un inoculante es vital que el número de células vivas aplicadas a la planta. Se debe tener cuidado de no exceder la cantidad recomendada de bacterias al momento de inocular, ya que esto puede ser perjudicial para la germinación y el crecimiento de las semillas.

La tecnología más utilizada para la elaboración de inoculantes en base a *Azospirillum* se emplea en base al empleo de soportes turba. La metodología más utilizada se describe en el gráfico a continuación. Con este esquema tecnológico se pueden obtener dos productos: polvo húmedo para impregnación de semillas y polvo humedecible para aspersión en campo.

Las operaciones involucradas en el proceso de producción son las siguientes:

1. Secado: los materiales que se emplean como soporte se secan con energía solar hasta alcanzar la humedad de equilibrio con el medio (15-17 % para la turba y 10-12 % para la cachaza).
2. Molido y clasificación: el material se muele y tamiza en cernidor vibratorio para obtener la granulometría deseada (<200 mesh para polvo humedecible y <140 mesh para impregnación de semillas). En el caso de producirse polvo humedecible durante esta operación, se adiciona el dispersante.
3. Esterilización: se realiza en un aparato hermético provisto de dispositivo revolovedor-transportador con sistemas de calentamiento con vapor y enfriamiento por agua. El material se esteriliza a 121°C durante dos horas, dos veces con intervalos de 24 horas.
4. Inoculación: el material previamente esterilizado y enfriado hasta 30°C se inocula con licor de *Azospirillum* procedente del fermentador ($>3 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹) y se homogeniza mecánicamente en el propio equipo.
5. Envase: el producto se empaca en bolsas de polipropileno previamente esterilizadas en autoclave; posteriormente se le coloca una etiqueta con las instrucciones para su uso.

Figura N° 39: Elaboración de inoculante de *Azospirillum* con soporte de turba.



El producto final posee las siguientes características en el momento de su fabricación:

- Viabilidad: mayor de 109 ufc.g-1
- Humedad: 55-60 %
- pH: 6.5-7
- El producto se conserva por un mínimo de tres meses sin que su viabilidad disminuya por debajo de 108ufc.g-1.

Esta tecnología fue diseñada y comprobada en todas sus operaciones, aunque sustituyendo de forma manual la operación de inoculación mecánica propuesta.

Se calcularon los costos de inversión y producción estimados para los dos tipos de productos obtenidos, según la tecnología anterior, con el empleo de turba y cachaza en calidad de soportes y se determinó la factibilidad económica de la aplicación de estos inoculantes en los cultivos de caña de azúcar y arroz.

Métodos de inoculación

El sistema que se utiliza para la inoculación de semillas de gramíneas no difiere del utilizado para la inoculación de semillas de leguminosas (por ejemplo el descrito en inoculación de *Bradyrhizobium* soja). Este sistema contempla la aplicación del inoculante mediante diferentes equipamientos (tolva con aspersor, inoculadoras específicas, mezcladora de cemento, etc.), todas ellas de una aceptable calidad de tratamiento, aunque los equipos especializados hacen un trabajo más cuidadoso y práctico.

Lo importante es lograr una homogénea cobertura de todas las semillas, para lo cual la cantidad de agua utilizada es de suma importancia. Si bien no se aconseja la utilización de fungicidas junto a la aplicación de las bacterias.

Actualidad y perspectivas en Argentina

Biofertilizantes en Maíz-*Azospirillum* - Actualidad

Se conoce que el maíz juega un papel fundamental en la conservación de los suelos por el volumen de residuos producidos y por su composición que asegura una gran provisión de energía a la microbiomasa que los metaboliza.

Parte del rastrojo, rico en Carbono, puede ingresar a fracciones precursoras de Materia Orgánica Estable del Suelo si guarda una adecuada relación con el Nitrógeno disponible para la flora microbiana.

El maíz tiene una alta capacidad de transformar asimilados en producción, removilizando desde la planta una gran proporción de los nutrientes absorbidos hacia el grano. Así los residuos, después de la cosecha, son relativamente pobres en Nitrógeno.

Es ese bajo contenido de Nitrógeno, y no el voluminoso residuo carbonado, el que determina la magnitud del aporte del cultivo a la Materia Orgánica del Suelo. Su disponibilidad no sólo determina en gran medida el nivel de rendimiento, sino que también gobierna la dinámica del rastrojo a través de la relación C:N.

Con las mejoras introducidas al paquete tecnológico en la última década, el maíz ha incrementado considerablemente su potencial de rendimiento y también aumentó en esa proporción la demanda nutricional del cultivo. Con los niveles productivos actuales es uno de los más exigentes entre los cultivos de nuestra región.

Sin embargo la siembra directa, el mejoramiento genético con el uso de híbridos simples de alto potencial, los materiales transgénicos tolerantes a Barrenador del Tallo (maíces BT) y la fertilización balanceada, aseguran la factibilidad económica de competir contra otras alternativas de producción generalmente más difundidas.

La fertilización necesaria para cubrir las demandas de la planta, suficientes para un alto rendimiento y para dejar un residuo con adecuada relación C:N para el suelo, representa un muy alto porcentaje del costo del cultivo. Por este motivo, todas las técnicas que permitan disminuir el aporte externo de nutrientes o que beneficien su balance en el maíz harán más factible su inclusión en la secuencia agrícola.

Los inoculantes basados en bacterias del género *Azospirillum sp.* son considerados biofertilizantes y permiten al productor disponer de otra herramienta para complementar la nutrición del sistema Suelo-Planta, y disminuir así los actuales balances negativos de la agricultura.

En las últimas campañas se observa que está incrementándose la utilización de la inoculación en cultivos donde aún es bajo el índice de aplicación. En la actualidad son dos factores bien fuertes los que impulsan el uso de la inoculación: por un lado, la característica de producto natural y segundo, el bajo costo por hectárea, que hace muy sencillo recuperar la inversión. El uso de inoculantes no sólo tiene un buen resultado para cuidar naturalmente los suelos, sino también tiene un valor agregado para el cultivo y mejora la rentabilidad. Con el correr de las campañas, esta tecnología irá imponiéndose en todos los cultivos con el mismo nivel de adhesión que hoy tiene la soja.

La utilización de biofertilizantes en las gramíneas como el maíz, es mucho más reducida que en el caso de las leguminosas, representando un 4-5% del total de área de siembra. En el resto de los cultivos como arroz, especies hortícolas, etc. los biofertilizantes se utilizan en forma muy puntual. De todas maneras se aprecia un interés creciente por estos insumos desde diversos componentes del sector agropecuario argentino.

Los beneficios de incorporar la inoculación dentro de las prácticas de siembra son innumerables. Gran cantidad de ensayos realizados a lo largo de muchos años muestran que la probabilidad de utilización de los fertilizantes químicos agregados sean realmente utilizados por el cultivo es del 50%. La utilización de bacterias PGPR muestra una mejora de ese índice, que puede alcanzar un 70 u 80% (Mazilli 2007).

Rendimientos de maíces con y sin inoculación con *Azospirillum*

La utilización de fertilizantes biológicos aplicados como tratamientos de semilla es una práctica que está siendo cada vez más estudiada y puesta en práctica por los productores.

Las bacterias del género *Azospirillum*, son organismos fijadores de N de vida libre, que habitan la rizósfera del suelo. Como se describió anteriormente, éstas bacterias promueven el crecimiento de raíces, que aumentan su longitud, densidad y velocidad de crecimiento. También promueve la producción de auxinas y otras fitohormonas, las cuales incrementan la tasa de crecimiento aéreo y radicular. Esto se vería reflejado en una mayor absorción de agua y nutrientes. Los efectos sobre las plantas, como resultado de la inoculación con *Azospirillum* se producen en los estadios iniciales de crecimiento en las primeras semanas después de la colonización radicular.

De una amplia revisión realizada por Okon y Labandera-González (1994) se pueden citar un 60 a 70 % de experiencias con resultados favorables en cuanto al éxito de la inoculación e incrementos de rendimientos que oscilan en un 5 a un 30 % (Bashan, 1999). A su vez, existen muchos reportes en donde las ventajas resultan de la posibilidad del ahorro de fertilizantes (40 a 50%) (Caballero, 2002).

Tal como se comentó en capítulos anteriores, una de las ventajas reportada en relación a la inoculación con *Azospirillum* es el aumento en la biomasa de raíces y el aporte de N al cultivo.

El proceso de acumulación de materia seca de raíces y parte aérea al estadio V7 (59 días pos-siembra) se describe a continuación. Si bien las diferencias observadas no son de gran magnitud, marcan una tendencia leve en la parte aérea y no en raíces. Las condiciones de humedad y muy adecuada temperatura de suelo (durante el período evaluado) y por tanto elevado crecimiento entre siembra y V6 hacen que estas diferencias se hayan hecho evidentes como consecuencia de las tasas de crecimiento diferenciales entre siembra y el estadio de V6-7 (39.5 vs. 34.6 Kg MS.ha-1.día-1, para con y sin *Azospirillum*, respectivamente) (Mazilli, 2007).

En la figura siguiente se presenta la evolución de la producción de materia seca promedio para todo el ciclo de cultivo, para los tratamientos con y sin *Azospirillum*.

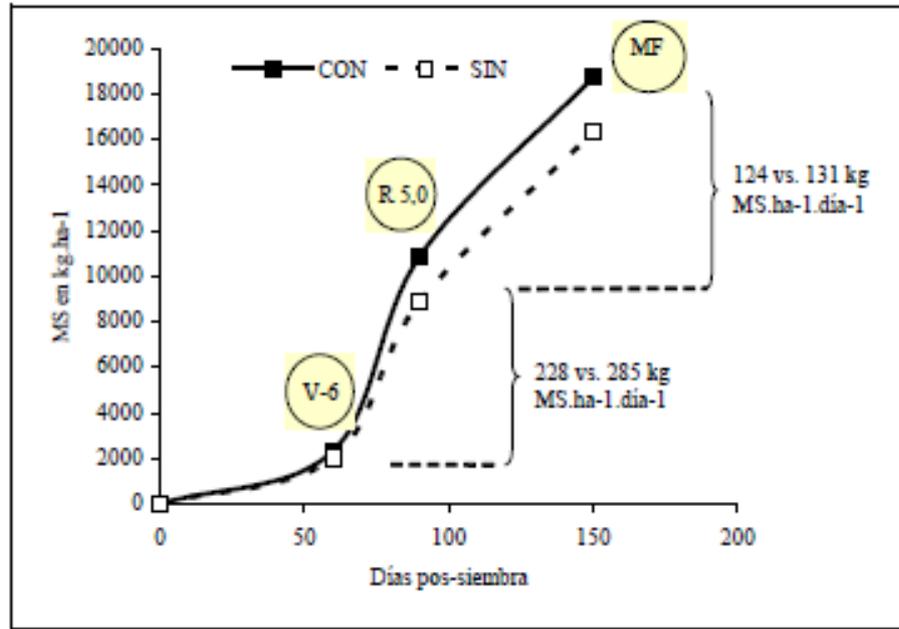


Figura N° 40: Producción de materia seca promedio (MS) a través del ciclo fenológico del cultivo de maíz para maíces con y sin inoculación con *Azospirillum*.

Se observa un aumento en la materia seca aérea acumulada para los tratamientos inoculados en relación a los sin inocular, a partir de inicio del estadio V6. A madurez fisiológica, el cultivo alcanzó niveles medios de MS muy elevados (17.5 ton.ha-1), con diferencias relevante entre tratamientos (18756 y 16326 kg MS.ha-1 para los tratamientos con y sin *Azospirillum* respectivamente). El cultivo inoculado con *Azospirillum*, a MF, produjo un 15% más de biomasa promedio.

Para el cultivo inoculado siempre se observa un mayor nivel de acumulación de biomasa respecto al sin inocular. Esto nos lleva a la conclusión que la inoculación con *Azospirillum* es beneficiosa, no sólo para las condiciones físico químicas del suelo y la sustentabilidad del sistema, sino también para el aumento de los rendimientos en Kg de materia cosechable. La inoculación de especies vegetales, con *Azospirillum brasilense*, produce mayor volumen de raíces, mayor número de plantas por m2, mayor desarrollo de materia verde y mayor producción. Las plantas inoculadas absorben mayor cantidad de nutrientes por unidad de peso.

Capítulo IV: Conclusión

El desgaste del suelo es una de las debilidades que tiene la producción hoy por su uso excesivo, la falta de rotación de cultivos o el factor climático llevan a la utilización de los biofertilizantes. El productor dispone de herramientas producidas por la naturaleza para optimizar el rendimiento de las cosechas y conservar la calidad del suelo, por ejemplo la inoculación, una práctica relativamente nueva para el sector, al menos en nuestro país, que aún no llegó a su techo y que se aplica mayormente en las leguminosas, aunque está creciendo en el resto de los cultivos.

De manera sintética, se puede decir que los biofertilizantes son productos con base a microorganismos benéficos (bacterias y hongos), que viven asociados o en simbiosis con las plantas y ayudan a su proceso natural de nutrición, además de ser regeneradores de suelo. Estos microorganismos se encuentran de forma natural en suelos que no han sido afectados por el uso excesivo de fertilizantes químicos u otros agroquímicos, que disminuyen o eliminan dicha población. Obviamente, se trata de productos que no contaminan ni degradan la capacidad productiva del suelo, por el contrario, son regeneradores de la población microbiana; asimismo, estos productos tienen una función protectora del sistema radicular de la planta contra microorganismos patógenos.

Con el uso de biofertilizantes se incrementa la presencia de microorganismos benéficos que se asocian a las raíces de las plantas, son excelentes mejoradores de suelo y contribuyen al combate de microorganismos patógenos.

Las principales funciones de los biofertilizantes son:

1. Fijadores de nitrógeno del medio ambiente para la alimentación de la planta.
2. Protectores de la planta ante microorganismos patógenos del suelo.
3. Estimulan el crecimiento del sistema radicular de la planta.
4. Mejoradores y regeneradores del suelo.
5. Incrementan la solubilización y absorción de nutrientes, como el fósforo, que de otra forma no son de fácil asimilación natural por la planta.
6. Incrementan la tolerancia de la planta a la sequía y la salinidad.

A continuación se comparan los fertilizantes químicos contra los biofertilizantes:

Fertilizante QUIMICO vs. BIOFERTILIZANTE	
Alto costo y disponibilidad decreciente (por incremento de precios)	Bajo costo y fácil reproducción (menos del 10 % del costo)
Alto desperdicio, sólo 30 – 40% es utilizado por la planta	No hay desperdicio, mejor aprovechamiento que el fertilizante químico
Contaminación del aire, suelo y agua	No contamina
Elimina microorganismos del suelo	Estimula el desarrollo de microorganismos en el suelo
Esteriliza el suelo	Regenera el suelo
Costo de almacenamiento y transporte (flete)	Fácil almacenamiento y transporte

Tabla N° 15: Comparación entre fertilizantes químicos y fertilizantes biológicos.

La utilización de biofertilizantes, es la forma de nutrición más eficiente y económica de la alimentación vegetal, ya que permite el aprovechamiento del nitrógeno atmosférico, el nutriente más caro, además de aprovechar de manera más intensiva los nutrientes disponibles en el suelo, ya que estimulan el desarrollo del sistema radicular y permiten mayor solubilidad y conductividad de nutrientes.

Por otro lado, hay que enfatizar que los efectos de los biofertilizantes en el desarrollo radicular, mayor solubilidad y conductividad de nutrientes, se traducen en un mayor aprovechamiento de la humedad del suelo y, por lo tanto, en el uso más racional del agua y una mayor resistencia a la sequía.

Otra parte importante en el uso del biofertilizante es el poco volumen que representa su aplicación; mientras que en el caso del químico se está haciendo referencia a cientos de kilos por hectárea, aquí se aplica apenas 1.5 kilos por hectárea, con el consecuente ahorro en fletes, maniobras y aplicación.

Sin embargo, estos biofertilizantes no son incompatibles con los fertilizantes químicos, se pueden combinar para lograr un uso más racional del químico, mejorando significativamente el aprovechamiento de éste por la planta, disminuyendo los niveles de desperdicio y contaminación.

El término “biofertilizantes” está automáticamente asociado a los inoculantes en base a rhizobios para leguminosas. Esto se debe a que el mayor desarrollo tecnológico se ha dado en estos productos utilizados para ser aplicados en las semillas de leguminosas forrajeras y fundamentalmente en las últimas décadas acompañando el crecimiento de las áreas cultivadas con soja.

Una mirada retrospectiva sobre lo acontecido en las últimas 4 décadas en algunos mercados de inoculantes nos permitirá detectar qué factores impactaron sobre la evolución de este sector industrial en Argentina.

- Entre los años 1960 a 1970, prácticamente el 100% de la soja sembrada estaba inoculada con cepas de rhizobios.
- A medida que el área sembrada por soja fue aumentando, el uso de los inoculantes fue sufriendo una sensible y progresiva disminución alcanzando un mínimo de 25/30% de consumo de inoculantes en 1985.
- Entre 1960 y 1985 se presentó un escenario complejo y caótico donde faltaba claridad en cuanto a difusión de los beneficios de la práctica de inoculación y una efectiva implementación de normas para el control de la calidad de los productos. Esta situación permitió la coexistencia de todo tipo de productos, muchos de los cuales no cumplían con los estándares de calidad mínimos lo cual determinó que los consumidores dejaran de adquirir los productos por la incertidumbre de los resultados.
- A partir de 1985 comienza una fuerte recuperación del mercado de los biofertilizantes cubriéndose en la actualidad al 70% del área sembrada de soja.

Luego del análisis de la situación se puede concluir que dos factores estratégicos fueron los determinantes de la recuperación del mercado de inoculantes:

1. Las empresas privadas existentes en esos años habían realizado importantes inversiones apostando a un mercado potencial en desarrollo. Esas mismas empresas, preocupadas por su futuro frente a la involución del mercado, decidieron realizar un diagnóstico de la situación que permitiera la toma de las medidas correctivas necesarias. En función del análisis realizado un grupo de empresas acordaron trabajar en dos aspectos esenciales: a) la calidad de los biofertilizantes y b) la claridad en la difusión de los beneficios de la práctica de inoculación. Fue en este aspecto de la producción y

comercialización en donde jugaron un rol fundamental los profesionales y técnicos de las áreas especializadas de fiscalización e investigación del estado para trabajar en forma coordinada realizando los registros de productos y empresas, controles de calidad y ensayos de eficacia.

2. La apertura de los mercados y el intercambio con países del MERCOSUR obligó a las empresas a mejorar la calidad de los biofertilizantes y a actualizar sus normativas a aquellos países donde existía capacidad industrial instalada. La amenaza de la competencia y el atorgamiento e internalización de las normas homologadas por los países miembros fue un aporte importantísimo para potenciar el aumento en la calidad de los inoculantes. Esto se puso en evidencia sobre todo en Brasil que articuló eficientemente una serie de mecanismos internos motorizado por los investigadores, funcionarios e industriales para adecuar su legislación a la realidad del momento. En la actualidad Uruguay, Argentina y Brasil cuentan con normas de fiscalización adecuadas a los desarrollos tecnológicos de los inoculantes para leguminosas con sus respectivos protocolos de control de calidad.

La recuperación del mercado de los biofertilizantes a partir del año 1985, el aumento de las áreas sembradas por leguminosas especialmente soja, el incremento del número de laboratorios que investigan en el área de los microorganismos beneficiosos para la agricultura y los grandes avances biotecnológicos no aseguran, sin embargo, el futuro de las empresas. Actualmente existe un alto riesgo de desvalorización de la práctica de inoculación con productos microbianos si no se tiene en cuenta la experiencia vivida. Esto vale sobre todo para aquellos países de Ibero América que aún no han actualizado u homologado sistemas de registro y control de calidad como los que ya están funcionando bien, y para todos en general cuando nos referimos al tratamiento de productos microbianos formulados diferentes de los inoculantes para leguminosas. El avance y la demanda creciente de productos biotecnológicos también nos obliga a modernizar y actualizar las normativas existentes sobre la producción y comercialización de biofertilizantes en la región.

Como se ha explicado anteriormente, hoy en día se observa que la tasa de aplicación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* es muy baja, más aún en cultivos a nivel de producción masiva. Las empresas elaboradoras de fertilizantes y biofertilizantes de encuentran en etapas experimentales y de propaganda de los productos probados, para que los productores tengan la posibilidad de incorporar ésta técnica a nivel masivo.

Es de suma importancia la transferencia a las empresas de los resultados de investigaciones básicas llevadas a cabo en laboratorios, sobre todo en los aspectos relacionados con el conocimiento de las funciones de los microorganismos utilizados o a utilizar como principios activos en biofertilizantes. Son las empresas los entes por excelencia en donde los resultados de las investigaciones básicas pueden ser adaptados a procesos industriales con la generación de biofertilizantes con aptitud de uso para resolver las demandas crecientes de las prácticas amigables con el medio ambiente.

Para el desarrollo y evolución de cualquier actividad industrial se requiere inversión y esta se paga con ingresos por ventas de los productos obtenidos. La industria biotecnológica no es la excepción, y es la existencia o ausencia de normas lo que condiciona el éxito o el fracaso de la evolución industrial. Cuando existe un marco regulatorio que permite diferenciar calidades de los productos ofrecidos en el mercado se dispara un proceso de competencia sana con la intervención de empresas apostando a la generación de nuevas tecnologías de superación para cautivar consumidores que aprenden a demandar productos de máxima calidad. Por el contrario, la ausencia de registros protocolizados de productos y la falta de controles de calidad de los mismos determinan un escenario de competencia desigual entre insumos de dudosa procedencia

y performance versus productos bien concebidos. La dificultad de evaluar la calidad de productos microbianos por los consumidores que no son especialistas en el tema complica más el panorama.

Bibliografía

Fijación Biológica de Nitrógeno

- Olivares, J. P., Fijación Biológica de Nitrógeno (Última actualización: 08/02/2008), Paper, Estación Experimental del Zaidín, SCIC, Granada, España. Febrero 2008.
- Baca B. E., L. Sotto Urzúa, M. P. A. Pardo Ruíz, Fijación Biológica de Nitrógeno, Paper. Puebla, México, Julio/Agosto 2000.
- Zeiger, E., T. Lincoln – *Fisiología Vegetal. Volumen I.* Universitat Jaume-I, 2007, 1338 págs.
- Fassbender, H. W., E. Bornemisza – *Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2ª Edición, 1987, 420 págs.
- Fassbender, H. W. – *Bases Edafológicas de los sistemas de producción agroforestales.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1984, 191 págs.
- Mayz Figueroa J. – Fijación Biológica de Nitrógeno. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Laboratorio de Rizobiología, Juanico, México. Paper. 20 págs.
- Rodríguez Barrueco C., Sevillano García F., Subramaniam P. – La fijación de nitrógeno atmosférico: una biotecnología en la producción agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Temas de divulgación, 1º Edición, 1984. 65 págs.

Leguminosas - Soja

- Nadal Moyano S., M. T. Moreno Yaguela, J. I. Cubero Salmeron – *Las leguminosas de grano en la agricultura moderna.* Grupo Mundi Prensa. España. 2004. 318 págs.
- Vega de los Reyes, R. M. – Análisis funcional de DsbA, una tiol oxirreductasa periplásmica, de *Rhizobium leguminosarum*. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Biotecnología. 2009. 70 págs.
- Ferraris, G. N., G. Gonzalez Anta, Díaz Zorita M. - Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el cono sur. Paper, EEA INTA Pergamino, Argentina. 2006. 4 págs.
- Reca, L. G. – Aspectos del desarrollo agropecuario argentino 1875-2005. Publicación informativa. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Argentina. 2006. 48 págs.
- Izaguirre Mayoral, M.L., C. Labandera, J. Sanjuán – Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial. Informe de Lage y Cía. S.A. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Oriental del Uruguay. Uruguay. 2006. 101 págs.

- Fernández Luqueño, F., D. Espinosa Victoria – Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: Una revisión crítica. Paper. Argentina. 2008. 12 págs.
- Benintende, S. – Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: Concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Paper. Argentina. 2010. 8 págs.
- http://agro.uncor.edu/~ceryol/documentos/soja/feno_soja.pdf. Clasificación de etapas fenológicas del cultivo de soja. Marzo 2011.
- Micucci, F. G., M. Díaz Zorita – Complementariedad en la nutrición químico-biológica de cultivos. Paper. Argentina. 2007. 4 págs.
- Ferraris, G., F. Mousegne – Comportamiento de grupos de maduración y estrategias de fertilización en soja según ambiente productivo, Campaña 2008/2009. Paper. Argentina. 2010. 11 págs.
- Bodrero, S., M. Enrico - Comportamiento de inoculantes para soja en la zona sur de la provincia de Santa Fe, Argentina. Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe. Paper. Argentina. 2005. 13 págs.
- Fontanetto, H., O. Keller – Consideraciones sobre el manejo de la fertilización de la soja. INTA Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información Técnica Cultivos de Verano, Campaña 2006, Publicación miscelánea N° 106. Argentina. 37 págs.
- García, O. – Soja: Criterios para la fertilización del cultivo. INPOFOS/PPI/PPIC Cono Sur. Paper. Argentina. 2004. 13 págs.
- Olivares, P. – Cuatro décadas en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Discurso leído en la recepción como académico numerario. Academia de Ciencias Matemáticas, físico-químicas y naturales de Granada. España. 2003. 31 págs.
- <http://infosudoeste.com.ar/2011/04/27/cultivos-en-la-region-en-cosecha-todo-es-soja> - Cultivos en la región: en cosecha, todo es soja. Septiembre 2010.
- Becquer, C. J. (2004) – Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. Artículos de revisión. Revista Biología, Vol. 18, N° 1. 29 págs (9-29).
- http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_24.pdf - Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. Noviembre 2010.
- http://www.engormix.com/efecto_inoculacion_con_bradyrhizobium_s_articulos_835_AGR.htm - Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en el cultivo de maíz. Enero 2011.

- Pietrarelli, L., J. L. Zamar, H. L. Leguía, E. E. Alessandria, J. Sanchez, M. Aborno, S. M. Luque (2008) – Efectos de diferentes prácticas de manejo en la nodulación y en el rendimiento del cultivo de soja. *Revista Agriscientia*, Vol. XXV. (81-87).
- Paytas, M. J., M. C. Iglesias, V. Chamorro, A. Cripín – Efectos de las concentraciones de nitratos sobre cepas naturalizadas de *Rhizobium-Bradyrhizobium* en distintos suelos del Nordeste de Santa Fe en el cultivo de la soja. Cátedra de Microbiología Agrícola, Cátedra de Conservación y Manejo de suelos, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Paper. 2003. 3 págs.
- Becquer C. J., D. Prévost, J. Cloutier, G. Laguerre (2002) – Enfoque taxonómico de rizobios aislados en las leguminosas forrajeras colectadas en Sancti-Spiritus, Cuba. *Revista Biológica*, Vol. 16, N° 2. (137-146).
- Oehrle, N. W., D. B. Karr, R. J. Kremer, D. W. Emerich – Enhanced attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean through reduced root colonization of internally seedborne microorganism. Paper. 2000. 7 págs.
- http://notiagro.blogspot.com/2011/04/estado-de-cultivos-en-argentina_21.html - Estados de cultivo en la Argentina: Soja. Mayo 2011.
- Ferraris, G, Couretot L. – Estrategias de inoculación en soja de primera. Proyecto Regional Agrícola – CEBRAN. Área de Desarrollo Rural INTA EEA Pergamino. Paper. 2007/2008. 7 págs.
- Toresani S., A. Peticari, M. E. Sánchez, G. Giubileo – Evaluación de cepas de Rizobios para inocular soja en Zavalla, Santa Fe. Cátedras de Microbiología Agrícola y Estadística, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. Paper. 1999. 5 págs.
- Fernández L. A., M. A. Gómez, Sagardoy M. A. – Evaluación de la capacidad infectiva de un inoculante y de métodos de inoculación. Dto. de Agronomía, Altos del Palihue, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Paper. 2004. 4 págs.
- Ferraris G. N., Couretot L. – Evaluación de nuevos desarrollos en inoculación de soja. Campaña 2005/2006. Proyecto Regional Agrícola, Desarrollo Rural INTA Pergamino. Paper. 2006. 5 págs.
- Evaluación Regional del impacto en la sostenibilidad de la cadena productiva de la Soja: Argentina, Paraguay, Uruguay. Organización de los Estados Americanos. Departamento de Desarrollo Sostenible. Secretaría General. 2009. 310 pág.
- Lloret, L., Martínez Romero E. (2005) – Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Asociación Mexicana de Microbiología. Volúmen 47. N° 1-2. (págs. 43-60).
- <http://culltivodesoja.blogspot.com/2011/02/evolucion-de-la-produccion-de-soja-en.html> - Evolución de la producción de Soja en Argentina. Febrero 2011.

- Santos, D. J. – Evolución de la superficie sembrada y del rendimiento de soja en las últimas décadas. INTA AER La Paz y Postgrado en Producción Vegetal. INTA EEA Paraná. Paper. 2000. 6 págs.
- Ghida Daza C. – Evolución del cultivo de soja en Argentina según zonas en el período 1990/1 – 2004/5. EEA INTA Marcos Juárez. Paper. 2005. 4 págs.
- Castillo, P. R. - Expansión regional del cultivo de soja en Argentina. Centro Interdisciplinario de Estudios Agrarios, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Buenos Aires. Paper. 2009. 14 págs.
- Oliveros Bastidas A., F. A. Macías, C. Carrera Fernández, D. Marín, J. M. G. Molinillo – Exudados de la raíz y su relevancia en las interacciones alelopáticas. Departamento de Química-Grupo Química Ecológica, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Puerto Real, España. Paper. 2008. 16 págs.
- Ferraris G. N., F. Mousegne – Inoculación en el Norte, Centro y Oeste de Buenos Aires. Desarrollo Rural INTA EEA Pergamino. Paper. 2009. 9 págs.
- Gacetilla Nitragin Optimize. Nuevas tecnologías para el cultivo de soja. 2009.
- <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/53-rhizobium%201.htm> – Genética Molecular de la infección de las leguminosas por Rhizobium. Marzo 2011.
- Encarnación Guevara S. – Genómica y genómica funcional en microbiología. Revista Latinoamericana de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología. Volumen 48. N° 2. (págs. 131-145).
- Gonzalez, N. S., M. G. Picón, E. Andreoli, R. M. Zablutowicz, C. A. Navarro, R. Martínez Lalis – Identificación serológica de razas de *Bradyrhizobium japonicum* naturalizadas en la región pampeana norte. INTA Balcarce y FCA UN Mar del Plata, Balcarce, Argentina. Paper. 1994. 5 págs.
- Zablutowicz R. M., K. N. Reddy – Impact of Glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with Glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. Paper. 2004. 7 págs.
- <http://www.fertilizando.com/articulos/Impacto%20Fijacion%20Biologica%20Nitrogeno%20en%20Produccion%20de%20Soja.asp> – Impacto de la Fijación Biológica de Nitrógeno en la Producción de Soja. Febrero 2011.
- Abela Gisbert E. – Importancia y función de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de la soja.
- Nápoles M. C., G. González Anta, J. C. Cabrera, M. Varela, E. Guevara, S. Meira, F. Nogueras, J. Cricco – Influencia de inoculantes y factores edáficos en el rendimiento de la soja. Revista Cultivos Tropicales, Vol. 30. 2009. 18-22 págs.

- Nápoles M. C., D. Costales, J. Cabrera, B. Morales, J. C. Cabrera, I. Reynaldo, O. Cartaya, M. Varela, G. Hernández, E. Bordallo, R. Hernández, J. Hormanda, A. Rodríguez - Influencia del medio de cultivo y los rizobios en la nodulación de la soya y el frijol. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Instituto de Suelos, Unión de Investigación-Producción, Instituto Cubano de Investigación del Azúcar, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba. Paper. 2004. 3 págs.
- Ventimiglia, L. A., H. G. Carta – Inoculación en soja: un nuevo sistema que permite mejorar la captura de nitrógeno. INTA EEA 9 de Julio, Buenos Aires, Argentina. Paper. 2005. 11 págs.
- Peticari A., C. F. Piccinetti – Inoculación: participe necesario en el cultivo de soja. IMYZA INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. Paper. 2007. 3 págs.
- Corvalán D. – Inoculantes para leguminosas: desarrollo, dinámica actual y articulación público/privada. CONICET. Paper. 2005. 28 págs.
- Ferraris G., L. Couretot – Evaluación de tecnología para la producción de soja bajo condiciones de estrés hídrico. Campaña 2008/2009. Proyecto Regional Agrícola CRBAN, Área de Desarrollo Rural INTA EEA Pergamino. Paper. 2009. 7 págs.
- De Veiga A. – La soja y la expansión de la frontera agrícola argentina. Paper. 2001. 17 págs.
- Oliva García, J. J. – Mutualismo y patogénesis: importancia de genes implicados en virulencia para el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-Leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, España. 2008. 290 págs.
- Adjei M. B., K. H. Quesenberry, C. G. Chambliss – Nitrogen fixation and inoculation of forage legumes. University of Florida, IFAS Extension. Paper. 2002. 5 págs.
- Ferraris G., Couretot L. – Nuevas estrategias de inoculación en soja: efectos sobre la nodulación, el rendimiento y su interacción con prácticas de manejo. Proyecto Regional Agrícola, Campaña 2008/09. Paper. 2009. 7 págs.
- González N. – Fijación de nitrógeno en soja: inoculantes, situación actual y perspectivas en la Argentina. Laboratorio de Microbiología de Suelos, INTA EEA Balcarce. Paper. 2007. 13 págs.
- Barraco M. – Nutrición y fertilización de soja. INTA EEA Gral. Villegas. Paper. 2008. 5 págs.
- http://www.fyo.com/granos/ampliar.aspx?Idnoticia=109834&IdAutor=99761&idtipoinformacion=22&ruta1=344&ruta2=344&Pagina=/granos/produccion/Produccion_Articulos.aspx - Panorama Agrícola Semanal. Relevamiento al 28 de Abril de 2011. Mayo 2011

- Robles Cortés, F. E. – Regulación por óxidos de nitrógeno de los genes de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*: caracterización de la proteína NnrR. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias. 2006. 198 págs.
- http://www.agrositio.com/vertext/vertext_print.asp?id=56495&se=1000 – Respuesta de la soja a la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en lotes con antecedentes de soja previa. Enero 2011.
- <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8> - Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Enero 2011.
- García F. O. – Soja: criterios para el manejo de la fertilización del cultivo. Revista Informaciones Agronómicas del Cono Sur, INPOFOS, N°27. 2005. 24 págs.
- <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/futuro2/index.html> - ¿Tiene futuro la fijación biológica de nitrógeno? Enero 2001.
- <http://www.gritoperonista.com.ar/2011/04/ya-se-cosecho-mas-de-la-mitad-del-area-de-soja-con-un-rinde-promedio-de-287-qqha/> - Ya se cosechó más de la mitad del área de soja con un rinde promedio de 28,7 qq/ha. Mayo 2011.

Gramíneas – Maíz

- Carrillo L. – Actividad Microbiana. En Carrillo L., Microbiología Agrícola. Capítulo 3. Universidad Nacional de Salta, 2003. Págs. 1 -28.
- Delgado R., M. C. Núñez, Velasquez L. - Acumulación de materia seca, absorción de nitrógeno, fósforo y potasio por el maíz en diferentes condiciones de manejo de la fertilización nitrogenada. Paper. 2004. 17 págs.
- Torrens Baudrix L., L. A. Ventimiglia, J. Camarasa – Azospirillum spp y Bacillus spp en Maíz. Paper. 2007. 3 págs.
- http://www.controlbiologico.com/ep_azotobacter_azospirillum.htm - Bacteria *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter choccum* promotoras del crecimiento vegetal. Junio 2011.
- Cruzate G. A., R. Casas (2003) – Balance de Nutrientes. Revista Fertilizar INTA, Año 8, N° Especial “Sostenibilidad”. Págs. 7-13
- Ferlini H., S. C. Díaz, C. O. Traut – Beneficios del uso de inoculantes sobre la base de *Azospirillum brasilense* en cultivos extensivos de granos y forrajes. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Paper. 3 págs.
- Díaz Franco A. – La biofertilización como tecnología sostenible. Plaza y Valdés S.A. 1° Edición. 2008. 208 págs.
- Izaguirre Mayoral M. L., C. Labandera, J. Sanjuán – Biofertilización en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. CYTED, BIOFAG, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. 2006. 101 págs.

- Estrada Bonilla G. A. – Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Trabajo de grado. Ponticia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Saropédica, México. 2008. 63 págs.
- Pazos M., A. Hernández, M. Paneque, J. L. Santander (2000) – Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari, Cuba. Revista Cultivos Tropicales, Vol. 21, N° 3, Cuba. Págs. 19-23.
- <http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=105628&se=16> – Crece el uso de inoculación en maíz y los resultados son positivos. Junio 2011.
- García F. O. (2000) – Criterios para el manejo y la fertilización del cultivo de maíz. Actas Jornadas de Actualización Técnica “Fertilidad 2000”, Rosario, Abril 2000. 21 págs.
- Torres de los Santos, R. – Determinación preliminar de las señales químicas presentes en exudados radiculares implicadas en la asociación *Azospirillum*-Maíz. Tesis de grado. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, México. 2008. 83 págs.
- http://www.revistaelproductor.net/index.php?option=com_content&view=article&id=276:efecto-de-la-inoculacion-de-azospirillum-brasilense-en-el-cultivo-de-maiz&catid=71:agricultura&Itemid=118 – Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz. Junio 2011.
- Swedrzynska D., A. Sawicka (2000) – Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on the development and yielding of maize (*Zea mays ssp. Saccharata* L.) under different cultivation conditions. Polish Journal of Environmental Studies, Vol. 9, N° 6. Págs. 505-509
- <http://canales.hoy.es/canalagro/datos/herbaceos/cereales/maiz2.htm> - El cultivo de maíz. Enero 2011.
- <http://irriagrotec.com/ModelosdeCresimientodelMaiz.aspx> - Etapas Vegetativas y Productivas del Maíz. Enero 2011.
- Cirilo A. (2001) – Fecha de Siembra y Rendimiento en Maíz. Revista de Tecnología Agropecuaria, INTA Pergamino, Vol. VI, N° 18. Págs. 42-48.
- <http://www.engormix.com/MA-agricultura/maiz/articulos/fertilizacion-biologica-bacterias-promotoras-t1305/p0.htm> - Fertilización Biológica. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Febrero 2011.
- Puente M. L., J. E. García, A. Peticari (2009) – Effect of the bacterial concentration of *Azospirillum brasilense* in the inoculums and its Plant Growth Regulators Compounds on Crop Yield of Corn (*Zea mays*) in the field. World Journal of Agriculture Sciences 5. Págs. 604-608.

- INTA – Guía práctica para el cultivo de maíz. Argentina. INTA, 1° Edición, 1997. 221 págs.
- Frioni L. – Procesos microbianos. Editorial de la Fundación Nacional de Río Cuarto, 1° Edición, 1999. 332 págs.
- Aguilar Piedras J. J., M. L. Xiqui Vásquez, S. García García, B. E. Baca (2008) – Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 50, N° 1 y 2. Págs 29-37.
- Perotti E. B. R., Pidello A. – Evolución del nitrógeno mineral del suelo en presencia de *Azospirillum*. Laboratorio de Química Biológica I. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe. Paper. 1990. 6 págs.
- Driutti A., M. Iglesias, C. O. Traut, N. Mansilla – Ensayo de inoculación con *Azospirillum brasilense* en maíz cultivado en suelos de corrientes. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Paper. 3 págs.
- Faggioli V., C. R. Cazorla, A. Vigna, M. F. Berti – Fertilizantes biológicos en maíz, ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*.
- <http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/libre.html> - Fijación del nitrógeno por microorganismos libres. Enero 2011.
- Salazar Genovez S., M. Ferrufino, J. C. Hidalgo (2003) – Fijador de Nitrogeno: *Azospirillum sp.* Revista FIAGRO, San Salvador, El Salvador. 20 págs.
- García F. O. – Fósforo y azufre en el cultivo de maíz. INPOFOS Cono Sur. Paper. 1999. 5 págs.
- Satorre E. H. – Generación del rendimiento en el cultivo de maíz: efectos de la nutrición nitrogenada. Cátedra de Cereales, Facultad de Agronomía, UBA, Argentina. Paper. 2002. 5 págs.
- Ferlini Micheli H. A., S. Díaz – Incidencia de la coinoculación de soja (*Glycine max*) con *Azospirillum brasilense* y *Bradyrhizobium japonicum* en la eficiencia de implantación. Santa Fe, Argentina. Paper. 4 págs.
- Rodríguez J., R. Suárez, J. Caballero, G. Iturriaga (2004) – Incremento de la biomasa y la tolerancia a sequía en maíz inoculado con *Azospirillum brasilense* que sintetiza trehalosa. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. México. 1 págs.
- <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/incrementos-fijacion-biologica-nitrogeno-t1106/p0.htm> - Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno mediante la inoculación combinada de bacterias fijadoras de Nitrógeno atmosférico. Enero 2011.

- <http://www.engormix.com/MA-agricultura/maiz/articulos/incremento-materia-organica-radicular-t1161/417-p0.htm> - Incremento de la materia orgánica radicular en los cultivos de Maíz (*Zea mays*) y Sorgo Granífero (*Sorghum bicolor*) inoculados con *Azospirillum brasilense*. Febrero 2011.
- <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/incrementos-fijacion-biologica-nitrogeno-t1106/p0.htm> - Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno mediante la inoculación combinada de bacterias fijadoras de Nitrógeno atmosférico. Febrero 2011.
- <http://www.engormix.com/MA-agricultura/maiz/articulos/inoculacion-con-azospirillum-brasilense-t1159/417-p0.htm> - Inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de Maíz (*Zea mays*) Ensayo 2005/2006. Febrero 2011.
- Abril A., C. Biasutti, R. Maich, L. Dubbini, L. Noe – Inoculación con *Azospirillum spp.* en la Región Semiárida-Central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. Paper. 2006. 9 págs.
- Ferlini Micheli H., S. Díaz – Inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz (*Zea mays*) Ensayo 2004/2005. Paper. 2005. 6 págs.
- Ferraris G. N., L. Couretot, R. Pontoni, R. Solá – Inoculación con promotores de crecimiento en maíz. Proyecto Regional Agrícola, Desarrollo Rural INTA Pergamino. Paper. 2007. 4 págs.
- Ferlini Micheli H. – Inoculación de semillas, una técnica también para gramíneas. Argentina. Paper. 2008. 3 págs.
- <http://www.agrofederal.com/secciones/granos/detalle.asp?nota=992> – Inoculación en maíz en suelos con baja disponibilidad de fósforo. Febrero 2011.
- Zarazúa Arvizu E., A. Tiessen Favier, D. Padilla Chacón, C. Martínez Molina – La bacteria *Azospirillum brasilense* inoculada en plantas de maíz sometidas a estrés hídrico, propicia el aumento de tamaño del tallo, pero del fruto e induce cambios en el metabolismo de azúcares. México. Paper. 2010. 5 págs.
- http://www.agrositio.com/vertext/vertext_print.asp?id=120896&se=1000 – Maíces con refuerzos desde la raíz. Mayo 2011.
- Díaz Zorita M., F. G. Micucci, R. M. Baliña, M. V. Fernández Canigia – Productividad de cultivos de maíz con tratamientos de semillas con *Azospirillum brasilense*. Argentina. Paper. 2008. 4 págs.
- González Huerta A., D. Jesús Pérez López, O. Franco Mora, A. Balbuena Melgarejo, F. Gutiérrez Rodríguez, H. Romero Salas – Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. México. Paper. 2010. 8 págs.

- <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=193216156004> - Tecnología de producción de inoculantes de *Azospirillum* y factibilidad económica de su aplicación agrícola en cultivos seleccionados. Junio 2011.
- <http://www.engormix.com/MA-agricultura/maiz/articulos/uso-bacterias-promotoras-crecimiento-t2575/417-p0.htm> - Uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, inoculantes en el cultivo de maíz (Rizofos liq.). Mayo 2011.
- Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz de temporal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Universidad de Biología. Guanajuato, México. 2008. 58 págs.
- Cassan F., V. Sgroy, D. Perrig, S. Masciarelli, V. Luna – Producción de fitorhomonas por *Azospirillum sp.* Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento.
- Holguín Zehfuss G. - La comunicación entre bacterias y plantas. 2008. 7 págs.