

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN GENOTIPOS DE SOJA CON
RESPUESTAS CONTRASTANTES A SEQUÍA

por

Mariana Lucía MEYER MUSSINI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2021

Tesis aprobada por:

Director:

Lic. en Bioquímica (Dra.) María Martha Sainz

Lic. en Bioquímica (MSc.) Esteban Casaretto

Ing. Agr. (Dr.) Matías Manzi

Lic. en Biología (Dr.) Gastón Quero

Fecha: 15 de abril de 2021

Autora:

Mariana Lucía Meyer Mussini

AGRADECIMIENTOS

Especial gracias a mis tutores Esteban Casaretto y Martha Sainz, por la orientación y el apoyo brindado para hacer posible este trabajo.

A mis padres Hugo y Milka por su incondicional apoyo a lo largo de la carrera.

Al laboratorio de Bioquímica por el servicio de todas las instalaciones para realizar los experimentos y análisis.

A la Facultad de Agronomía por formarme como profesional.

¡Muchas Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u>	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	3
2.1.1 <u>Inoculación</u>	4
2.1.2 <u>Interacción planta-rizobio</u>	4
2.2. MECANISMOS DE RESPUESTAS FRENTE AL ESTRÉS HIDRICO.....	6
2.3. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN SOJA	7
2.3.1 <u>Número y peso de nódulos</u>	7
2.3.2 <u>Reducción de sustancias carbonadas a los bacteroides</u>	8
2.3.3 <u>Limitación de oxígeno</u>	8
2.3.4 <u>Regulación por el metabolismo del nitrógeno fijado</u>	9
2.3.4.1 Ureidos	9
2.4 EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE VARIABLES MORFOFISIOLÓGICAS EN SOJA	10
2.4.1 <u>Potencial hídrico</u>	10
2.4.2 <u>Conductancia estomática</u>	11
2.4.3 <u>Temperatura foliar</u>	12
2.4.4 <u>Expansión del área foliar</u>	12
2.4.5 <u>Acumulación de osmolitos</u>	13

2.4.6 <u>Aminoácidos y proteínas</u>	13
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	15
3.1.1 <u>Plantas</u>	15
3.1.2 <u>Bacterias</u>	15
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL, CONDICIÓN DE DÉFICIT HÍDRICO Y TRATAMIENTOS	15
3.3 MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	16
3.3.1 <u>Medios y condiciones de crecimiento de plantas</u>	16
3.3.2 <u>Medios y condiciones de crecimiento de bacterias</u>	17
3.4 INOCULACIÓN	18
3.5 PARÁMETROS EVALUADOS.....	18
3.5.1 <u>Parámetros morfo-fisiológicos</u>	18
3.5.1.1 Número y peso de nódulos.....	18
3.5.1.2 Potencial hídrico de hoja.....	18
3.5.1.3 Temperatura foliar.....	19
3.5.1.4 Área foliar	19
3.5.2 <u>Parámetros bioquímicos</u>	19
3.5.2.1 Ureidos	19
3.5.2.2 Prolina	21
3.5.2.3 Aminoácidos totales.....	21
3.5.2.4 Proteína soluble.....	22
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	23
4.1 EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE PARÁMETROS RELACIONADOS A LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	23
4.1.1 <u>Número y peso de nódulos</u>	23
4.1.2 <u>Ureidos</u>	25
4.2 EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y MORFO-FISIOLÓGICOS	30

4.2.1 <u>Proteína soluble</u>	30
4.2.2 <u>Aminoácidos</u>	34
4.2.3 <u>Prolina</u>	38
4.2.4 <u>Potencial hídrico de hoja</u>	41
4.2.5 <u>Temperatura foliar</u>	43
4.2.6 <u>Área foliar</u>	45
5. <u>CONCLUSIONES</u>	48
6. <u>RESUMEN</u>	49
7. <u>SUMMARY</u>	50
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	51

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Composición de medio RP	17
2. Composición del medio YEM	18
3. Soluciones para la determinación de aminoácidos totales	21
4. Número y peso de nódulos en los genotipos evaluados en condición de inoculación y sometidos a las distintas condiciones de muestreo	24
5. Potencial hídrico foliar en los genotipos evaluados sometidos a las dos condiciones de inoculación y en las distintas condiciones de muestreo	42
6. Temperatura foliar en los genotipos evaluados sometidos a las dos condiciones de inoculación y en las distintas condiciones de muestreo	44
Figura No.	
1. Esquema del proceso de nodulación	6
2. Concentración de ureidos en plantas inoculadas (I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Genesis 5601 (GE)	26
3. Concentración de ureidos en hojas de plantas no inoculadas (S/I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Genesis 5601 (GE)	27
4. Concentración de ureidos en hojas de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S/I)	29
5. Concentración de proteína soluble en plantas inoculadas (I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)	31
6. Concentración de proteína soluble en hojas de plantas no inoculadas (S/I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)	32
7. Concentración de proteína soluble en hojas de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S/I)	33
8. Concentración de aminoácidos en plantas inoculadas (I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)	34
9. Concentración de aminoácidos en hojas de plantas no inoculadas (S/I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)	36
10. Concentración de aminoácidos en hojas de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S/I)	37
11. Concentración de prolina en hojas de plantas de los genotipos Don Mario 6.8 i (DM) y Génesis 5601 (GE)	38
12. Concentración de prolina en hojas de plantas inoculadas (I) y no-inoculadas (S/I)	40

13. Área foliar de plantas de los genotipos Don Mario 6.8 i (DM) y Génesis 5601 (GE)	45
14. Área foliar de plantas inoculadas (I) y no-inoculadas (S/I)	46

1. INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa originaria del Sudeste Asiático. Constituye el principal cultivo agrícola del Uruguay realizándose mayoritariamente en condiciones de secano. Es amplia la disponibilidad de variedades de soja que se ofrecen hoy en día, con variación en cuanto a ciclos de maduración (grupos de madurez) y ciclos de crecimiento (determinado e indeterminado). Asimismo, se han reportado cultivares que, por selección, mejoramiento y/o transformación genética, presentan características específicas como resistencia a herbicidas, a plagas, o con una respuesta diferencial al déficit hídrico.

En Uruguay la soja presenta una alta variabilidad interanual en el rendimiento asociada a períodos de déficit hídrico. Esto es debido a que los suelos agrícolas presentan una capacidad de almacenamiento de agua disponible menor a la requerida por el cultivo durante su ciclo, junto a una variable cantidad y distribución de las precipitaciones.

En las condiciones climáticas de Uruguay, la disponibilidad de agua en primer lugar, y la de nutrientes en segundo lugar, son los factores que más limitan el rendimiento de la soja. En particular, el nitrógeno, es un macronutriente que en muchos casos es deficiente en los suelos, y es un constituyente esencial de moléculas tales como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas; todas ellas imprescindibles para el crecimiento de los organismos vivos.

La forma más abundante de nitrógeno inorgánico en los suelos es el nitrato (NO_3^-). Éste, para ser asimilado, es decir, incorporado en moléculas orgánicas, primero debe ser reducido a amonio (NH_4^+). Las plantas leguminosas tienen la particularidad de que además de poder usar como fuente de nitrógeno al NO_3^- (u otros compuestos nitrogenados solubles) presentes en el suelo, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) gracias a una asociación simbiótica con rizobios.

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es un proceso reductor que consume gran cantidad de energía en forma de ATP (16 ATP por N_2 fijado) por lo que constituye una vía metabólica alternativa para las plantas; solo la realizan si no tienen disponibles otras fuentes de nitrógeno cuya reducción requiera un menor costo energético.

La totalidad de la soja cultivada en Uruguay se inocula con rizobios del género *Bradyrhizobium sp* con el fin de favorecer el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Esto redundaría en un menor uso de fertilizantes nitrogenados lo cual tiene un impacto positivo tanto a nivel económico como ambiental. La soja requiere 80 kg de nitrógeno por tonelada producida. Teniendo en cuenta los rendimientos promedio que se obtienen en Uruguay, 2500 kg/ha, se requieren 200 kg de nitrógeno que equivale a 500 kg de urea. Siendo la fertilización uno de los insumos que más influye en los costos de producción de los cultivos y el potencial impacto ambiental que genera, el proceso de FBN

se vuelve muy relevante en el sistema productivo.

La FBN es sumamente sensible al déficit hídrico, de hecho, es el proceso que primeramente se ve afectado en tales condiciones. Cuando esto ocurre, la capacidad de la planta de fijar y asimilar el nitrógeno y, por tanto, de acumular biomasa y producir granos se ve reducida.

Dada la variabilidad de las condiciones climáticas en Uruguay, fundamentalmente las precipitaciones, y la contribución del aporte de nitrógeno fijado por el proceso de FBN, resulta interesante conocer cómo la inoculación afectaría las respuestas al déficit hídrico en la soja. Teniendo esto en cuenta, se establecen los siguientes objetivos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Analizar el efecto de la nodulación en las respuestas al déficit hídrico en dos genotipos de soja con respuestas contrastantes a sequía.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar respuestas fisiológicas asociadas a la pérdida de agua foliar en condiciones de déficit hídrico y de nodulación/no-nodulación.

- Evaluar respuestas morfofisiológicas asociadas al desarrollo en condiciones de déficit hídrico y de nodulación/no-nodulación.

- Evaluar cómo la nodulación afecta el ajuste osmótico a través de la acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico.

- Analizar el contenido de ureidos en nódulos y hojas en condiciones de déficit hídrico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El N₂ constituye cerca del 80% de los gases presentes en la atmósfera. Debido a la estabilidad química que le aporta el triple enlace a esta molécula, la mayoría de los seres vivos no son capaces de usarla como fuente de nitrógeno. Sólo un pequeño grupo de microorganismos especializados, que incluye algas, bacterias y actinomicetes, tienen la capacidad de hacerlo. Estos microorganismos pueden existir en vida libre o en asociaciones simbióticas (Mayz-Figueroa, 2004).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), el proceso a través del cual los microorganismos pueden reducir enzimáticamente el N₂ a NH₄⁺, es catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa que está compuesto por dos metaloproteínas: una ferroproteína o dinitrogenasa reductasa y una ferromolibdoproteína o dinitrogenasa. Esta enzima lleva a cabo la reducción del N₂ a NH₄⁺ y de H⁺ a H₂ según la reacción:



La soja es capaz de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia de los rizobios, más precisamente del género *Bradyrhizobium sp* (Jones et al. 2007, Ito et al. 2008). Como en toda simbiosis existe un beneficio mutuo: las bacterias obtienen energía del metabolismo de compuestos carbonados que les suministra la planta, derivados de la fotosíntesis, y las plantas obtienen NH₄⁺ proveniente de la FBN que realizan las bacterias (Locoli y Gómez, 2013).

Para la planta, el desarrollo de nódulos y su posterior mantenimiento en una activa fijación de nitrógeno significa un alto costo energético (Lodeiro, 2015). Entre un 7 y 12 % de la producción fotosintética de la planta es destinada a los nódulos para mantener los rizobios fijando N₂ (Locoli y Gómez, 2013). Este proceso es regulado por la planta, quien determina el número de nódulos que se formarán dependiendo de la nutrición nitrogenada que la misma presente (Lodeiro, 2015).

Según Venturi y Amaducci, citados por Cicore et al. (2005), el rendimiento del cultivo de soja es atribuido directamente a la cantidad de nitrógeno acumulado en su biomasa aérea, en ausencia de otras limitaciones. Dependiendo de las condiciones edafoclimáticas donde se desarrolle el cultivo, la FBN puede aportar entre el 25 y 84% del nitrógeno necesario (Buttery et al., 1992).

2.1.1 Inoculación

La inoculación de la soja es imprescindible para una agricultura sustentable por su inocuidad, simplicidad de aplicación y bajo costo (Lodeiro, 2015). Dado que la soja no es una leguminosa nativa de Uruguay, es necesario introducir los rizobios capaces de establecer simbiosis para su nodulación (Locoli y Gómez, 2013). Por esto, es fundamental que los inoculantes contengan un alto número de células viables y con larga vida media. Estas dos características constituyen la base para lograr una nodulación exitosa y, como consecuencia, que ocurra fijación de nitrógeno. Posteriormente a la inoculación, el establecimiento de la simbiosis es un aspecto que está condicionado por varios factores tales como de manejo del cultivo, así como también por el ambiente biótico y abiótico al cual se enfrente (Lodeiro, 2015).

En aquellas zonas donde el cultivo de soja presenta historia agrícola, los suelos han adquirido rizobios naturalizados debido a la inoculación de la soja durante varios años. Este contenido de rizobios en el suelo, que constituyen una población autóctona, compiten con los rizobios inoculados en las semillas y pueden nodular a la soja, pero son menos eficientes en la FBN. Sin embargo, esta población de rizobios puede disminuir por factores ambientales estresantes tales como sequías, competencia con otros microorganismos del suelo, entre otros (Locoli y Gómez, 2013).

Resulta claro que no es valioso emplear inoculantes bien formulados con cepas seleccionadas y de larga vida media si posteriormente no se logra una buena nodulación con cepas del inoculante y se obtienen valores de hasta un 90% de nódulos formados por cepas de la población autóctona del suelo (Lodeiro, 2015). La inoculación no debe constar solo del recubrimiento de las semillas con un aceptable número de rizobios vivos, sino que debe contemplarse que esos rizobios vivos logren entrar en contacto con las raíces, las colonicen e infecten antes que los pelos radicales maduren, aún en presencia de las poblaciones autóctonas de rizobios (Lodeiro, 2015).

2.1.2 Interacción planta-rizobio

Luego de la inoculación, los rizobios quedan adheridos a las semillas, sobreviviendo por un periodo en las mismas. Cuando son sembradas, los rizobios se liberan de las semillas y sobreviven en el suelo hasta la germinación de éstas. Dicha sobrevivencia suele estar afectada por condiciones edáficas como el contenido hídrico del suelo y la presencia de otros microorganismos. Una vez que ocurre la germinación, los rizobios entran en contacto con las raíces en crecimiento y se inicia el proceso de colonización rizosférica. Este proceso es dependiente de factores ambientales y de la bacteria (Lodeiro, 2015).

El suelo es un medio poroso que presenta variabilidad en diámetro y cantidad de poros, además de contener un status hídrico distinto según las condiciones ambientales. En condiciones de déficit hídrico, los rizobios pueden encontrarse con un camino más o menos tortuoso dificultando su desplazamiento para la colonización rizosférica antes que el pelo radical madure para lograrse la infección (Lodeiro, 2015). Una vez que los rizobios se encuentran en contacto con una región acotada de la raíz, denominada región de los pelos emergentes, interactúan con estos pelos promoviendo una serie de respuestas en la planta que desencadenarán la formación de un órgano nuevo, el nódulo, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación (Figura 1).

El establecimiento de la interacción simbiótica entre la soja y los rizobios comienza con un complejo intercambio de señales moleculares (Costales et al., 2008). Las raíces de la planta exudan una serie de compuestos flavonoides e isoflavonoides (Morgan et al., 2005), los cuales atraen a los rizobios hacia los pelos radicales (Freixas et al., 2011), y adicionalmente, estos compuestos activan los genes de la nodulación en la bacteria promoviendo la producción de factores de la nodulación (factores Nod). Los factores Nod ejercen respuestas moleculares en la raíz de la planta para desencadenar la formación del nódulo radicular (Gage, 2004). Los rizobios, al alcanzar las células de la planta, se diferencian y se convierten en bacteroides, que conjuntamente con la membrana de la célula vegetal conforman los simbiosomas del nódulo (Limpens et al. 2005, Ito et al. 2008).

Los exudados radiculares flavonoides e isoflavonoides y los factores Nod son específicos de cada leguminosa y rizobio, por ello la simbiosis consta de una asociación específica en la cual la planta hospedera identifica el rizobio como su simbiote y lo diferencia de otras bacterias presentes que puedan resultar patógenas (Locoli y Gómez, 2013).

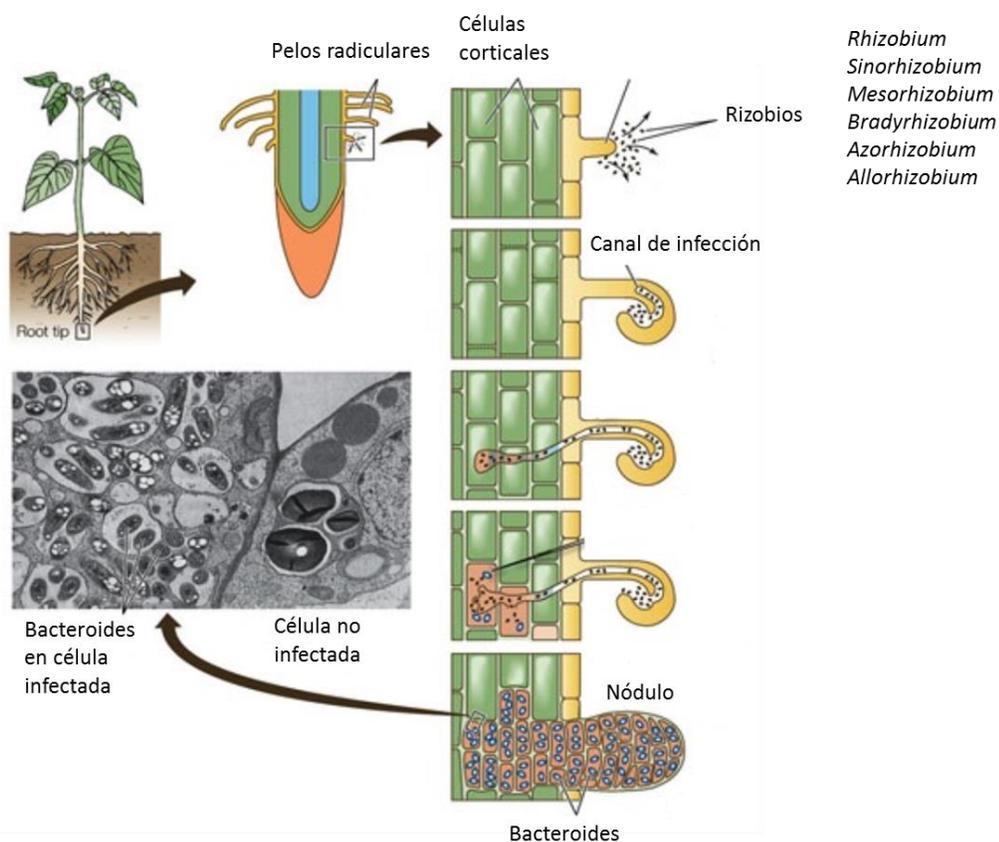


Figura 1. Esquema del proceso de nodulación. Se muestra además una micrografía electrónica donde pueden observarse células vegetales, simbiosomas y bacteroides

Fuente: adaptado de Input template for... (s.f.)

2.2 MECANISMOS DE RESPUESTAS FRENTE AL ESTRÉS HIDRICO

El agua es uno de los factores más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que participa en todos sus procesos fisiológicos, y su déficit es una de las principales fuentes de estrés abiótico (Moreno, 2009). En la producción agrícola, el agua es uno de los principales factores que limita el rendimiento de los cultivos. En Uruguay, dada la escasa capacidad de almacenaje de agua que presentan los suelos, sumada la variabilidad en volumen y distribución de precipitaciones, en conjunto con una acentuada demanda atmosférica en los meses de verano, es frecuente la ocurrencia de períodos de déficit hídrico (Capurro et al., 2017).

En condiciones de estrés hídrico, las plantas poseen mecanismos para hacer frente a tal situación. Los mismos pueden agruparse en tres categorías: de escape, de evitación y de tolerancia (Jarma-Orozco et al., 2012). Los mecanismos de escape implican que la planta complete su ciclo de vida antes que se presenten las condiciones de déficit hídrico. Esto conlleva un rápido desarrollo fenológico, plasticidad en el período de desarrollo y removilización de asimilados. Este mecanismo provoca una reducción en los rendimientos (Agbicodo et al., 2009). Los mecanismos de evitación llevan a que la planta mantenga la turgencia de sus hojas aún en condiciones de sequía. Para lograrlo, la planta desarrolla raíces más profundas o un sistema radicular más eficiente en absorber agua, cierre estomático, disminución de absorción de radiación o disminución de la evapotranspiración y reducción del área foliar; estos eventos repercuten en la asimilación de carbono y en el aumento de la temperatura foliar (Jarma-Orozco et al., 2012). Los mecanismos de tolerancia implican que la planta resista el déficit hídrico manteniendo la turgencia celular, lo cual puede lograrse mediante un ajuste osmótico que implica la acumulación de solutos en la célula. También, el aumento de la elasticidad de la pared celular y la reducción del tamaño de las mismas contribuyen a tal medida (Jarma-Orozco et al., 2012). Según Sinclair y Ludlow, citados por Fioreze et al. (2011), el cultivo de soja tiene características de evitación y tolerancia para la deshidratación.

2.3 EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN SOJA

La soja es una leguminosa sensible al estrés por sequía, por lo que las frecuentes situaciones de déficit hídrico que ocurren en Uruguay afectan significativamente su crecimiento y desarrollo. En particular, el proceso de FBN es altamente sensible al déficit hídrico (King y Purcell 2005, Freixas et al. 2010). Se ha reportado que cuando el contenido de humedad del suelo es menor al 50% del agua útil, comienza a disminuir la FBN (Serraj et al., 1998); esto se evidencia, de forma macroscópica, por la presencia de nódulos más pequeños y en menor cantidad. Por otro lado, es conocido que los principales factores que están involucrados en la disminución de la FBN por causa del déficit hídrico son la limitación de oxígeno, la reducción de sustancias carbonadas a los bacteroides y la regulación por el metabolismo del nitrógeno fijado (Ladrera et al., 2007).

2.3.1 Número y peso de nódulos

La magnitud del efecto del déficit hídrico y la tasa de inhibición de la simbiosis dependen generalmente de la etapa de crecimiento y desarrollo en la que se encuentre la planta, así como de la severidad del estrés (Williams y Sicardi de Mallorca, 1984). En soja, estos autores observaron que el estrés hídrico leve reducía el número de nódulos, mientras que el estrés hídrico moderado y severo reducía tanto el número como el tamaño de los nódulos.

Se han identificado genotipos de soja con una sensibilidad diferencial de la FBN al déficit hídrico (King y Purcell, 2006). En este trabajo, el genotipo considerado tolerante presentaba, en condiciones de déficit hídrico, menos nódulos, pero relativamente más grandes; en cambio, el genotipo considerado sensible presentaba muchos nódulos, pero relativamente más pequeños. Esta diferencia en cuanto al tamaño de nódulos es sustancial dado que, durante un período de sequía, el agua de la parte aérea de la planta es conducida preferentemente a los nódulos más grandes (Serraj et al., 1999). Junto con el agua son transportados los fotosintatos requeridos para la FBN, por lo que los nódulos de mayor tamaño que se observaron en el genotipo tolerante obtendrían mayor cantidad de estos (Purcell et al., 1997).

2.3.2 Reducción de sustancias carbonadas a los bacteroides

La sacarosa es el principal glúcido que se transporta desde las hojas hacia los nódulos, donde la glucosa y la fructosa, resultado de su hidrólisis mediada principalmente por la enzima sacarosa sintasa, se usan como fuente de carbono. En condiciones de déficit hídrico, se ha observado que la actividad de esta enzima disminuye (González et al., 1995) produciendo una acumulación de sacarosa y una reducción en la concentración de ácidos orgánicos, principalmente malato, provocando una escasez de sustratos para la respiración de los bacteroides (Gálvez et al., 2005). Como consecuencia, ocurre un enlentecimiento en la respiración de los bacteroides y ello conlleva a una acumulación transitoria de oxígeno alrededor de la corteza nodular. Este oxígeno al no ingresar al interior de los bacteroides podría proteger a la enzima nitrogenasa (la cual se desnaturaliza irreversiblemente y pierde actividad en presencia de exceso de oxígeno en el interior de los bacteroides), sin embargo esta enzima igual disminuye su actividad porque carece de cofactores enzimáticos, los cuales serían suministrados en una condición normal de respiración del bacteroide (Freixas et al., 2010).

2.3.3 Limitación de oxígeno

En el interior de la corteza nodular existe una barrera cuya función es permitir la difusión del oxígeno hacia el interior de las células infectadas. En condiciones déficit hídrico, la morfología de dicha barrera se modifica, y ello provoca un aumento en la resistencia a la difusión de oxígeno a los bacteroides lo que afecta directamente la actividad nodular al impedir un flujo continuo de oxígeno que soporte la respiración de dichos bacteroides (Durand et al., 1987).

2.3.4 Regulación por el metabolismo del nitrógeno fijado

El metabolismo del nitrógeno tiene un papel importante en la regulación de la FBN en condiciones de déficit hídrico mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, basado en la inhibición de la actividad de la enzima nitrogenasa debida a la acumulación de compuestos nitrogenados en nódulos y hojas (Freixas et al., 2010).

2.3.4.1 Ureidos

En los nódulos de soja, el amonio resultante de la FBN es transformado en ureidos. Estos compuestos nitrogenados constituyen la principal forma de transporte del amonio desde los nódulos hacia la parte aérea (King y Purcell, 2005). En las hojas, los ureidos son degradados para liberar el amonio, que puede de esta forma ser asimilado formando parte de aminoácidos y proteínas. El transporte de los ureidos hacia las hojas es de fundamental importancia ya que se evita la autoinhibición de la FBN debida a su acumulación en los nódulos. Para un normal funcionamiento y adecuado transporte de estos compuestos es imprescindible un flujo de agua desde las raíces a las hojas, llevando vía xilema los ureidos y en contrapartida vía floema transportar los fotosintatos producidos por las hojas para la nutrición y mantenimiento de los nódulos (Locoli y Gómez, 2013).

Como se mencionó previamente, la FBN en soja es muy sensible a la sequía disminuyendo progresivamente la capacidad de fijar N_2 a medida que avanza el estrés, y al mismo tiempo, incrementándose de forma significativa el contenido de ureidos en hojas y nódulos (Freixas et al., 2010). King y Purcell (2005) observaron un aumento en el contenido de ureidos y aminoácidos libres en distintos tejidos y una disminución en la FBN como consecuencia del estrés hídrico. En condiciones control, donde no ocurre la situación de déficit hídrico, los mismos autores observaron que los ureidos no incrementaron su concentración y tampoco resultó afectada la FBN, lo que sugieren que estas moléculas podrían ser las responsables de la inhibición por retroalimentación negativa de la fijación de nitrógeno.

En otro trabajo (Freixas et al., 2011), donde realizaron experimentos con plantas de soja noduladas y no-noduladas tanto en condiciones control como de déficit hídrico, se observó un incremento significativo en la concentración de ureidos en los nódulos a partir del octavo día de impuesto el déficit hídrico y a partir de los veinte días en las hojas. Estos autores también observaron, en ambas condiciones, mayores niveles de ureidos en hojas de plantas noduladas que en hojas de plantas no-noduladas. Asimismo, observaron en hojas de plantas no-noduladas en condición de déficit hídrico, un incremento en la concentración de ureidos en relación a las plantas en condición control.

En cuanto a la concentración de ureidos en distintos genotipos de soja con respuestas contrastantes a sequía, King y Purcell (2005), Ladrera et al. (2007), encontraron en condiciones de déficit hídrico, una menor concentración de ureidos en las hojas de

genotipos tolerantes que en genotipos sensibles. En este sentido, King y Purcell (2005) sugieren que bajos niveles de ureidos en hojas durante el déficit hídrico podría prolongar la FBN y ser indicativo de tolerancia a la sequía en soja. Por otro lado, Ladrera et al. (2007) en 6 días de déficit hídrico no observaron una acumulación de ureidos en hojas de genotipos tolerantes ni sensibles, lo que sugiere un rol importante de estos compuestos en sequías más prolongadas. En cambio, en los nódulos, Ladrera et al. (2007) constataron que la sequía provocó una mayor y más temprana acumulación de ureidos en el genotipo sensible que en el genotipo tolerante, siendo esta acumulación en las plantas estresadas respecto a las plantas control de 5 y 2.5 veces en el genotipo sensible y tolerante, respectivamente.

2.4 EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE VARIABLES MORFOFISIOLÓGICAS EN SOJA

En la soja, como en todas las plantas, durante una condición de déficit hídrico se desencadena una serie de respuestas morfofisiológicas. En primer lugar, ocurre un aumento de los niveles de la hormona ácido abscísico (ABA) en el xilema y las hojas, lo que induce el cierre estomático (Liu et al., 2003). Como resultado de ello, se reduce la transpiración y disminuye el flujo de agua desde las raíces hacia las hojas. Es así que, disminuye el suministro de nutrientes que se transportan junto con el agua vía xilema hacia las hojas (Gage, 2004). Adicionalmente, el cierre de estomas limita la entrada de dióxido de carbono (CO₂) a las células con la consecuente alteración de la fotosíntesis (Lobato et al., 2008). Todas estas alteraciones se traducen en un retardo del crecimiento y desarrollo de la planta de soja (Souleimanov et al., 2002).

2.4.1 Potencial hídrico

El potencial hídrico es utilizado para medir el estado hídrico de la planta (Klepper 1968, Goode y Higgs 1973). Desde el punto de vista energético, el potencial hídrico de una planta se define como el trabajo que habría que realizar a una unidad de masa de agua ligada a los tejidos para llevarla de ese estado al de agua pura (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Éste consta de cuatro componentes: potencial de presión, osmótico o de soluto, de matriz y gravitacional, siendo fundamentalmente los dos primeros los que determinan el potencial hídrico de las células vegetales (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El potencial de presión representa la presión que ejerce el protoplasto contra la pared celular. En la célula, al entrar agua, el volumen de la vacuola aumenta ejerciendo una presión sobre las paredes (presión de turgencia), al mismo tiempo desde las paredes hacia el interior celular se desarrolla una presión igual a la presión de turgencia. El potencial de presión es positivo siempre que la vacuola ejerza una presión sobre las paredes, pero en la medida que la célula pierde agua, la vacuola se contrae progresivamente disminuyéndose la turgencia celular y el potencial de presión (Azcón-

Bieto y Talón, 2008).

El potencial osmótico expresa el efecto de la concentración de solutos disueltos en la vacuola celular. Estos absorben la energía cinética del agua quitando la energía libre del agua y consecuentemente disminuye el potencial osmótico. En las células vegetales el potencial osmótico siempre es negativo, varía dependiendo del volumen celular y se aproxima a cero en células bien hidratadas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

James et al. (2008), reportaron que genotipos de soja adaptados al trópico presentaban un potencial osmótico más negativo en comparación con genotipos adaptados a regiones templadas. Esto lo llevó a sugerir que esta adaptación de los genotipos tropicales se podría deber a la necesidad de vivir en ambientes más desecantes, dado que el potencial osmótico afecta la capacidad de la planta para absorber agua de suelos con potenciales hídricos bajos.

2.4.2 Conductancia estomática

El pasaje de vapor de agua desde la hoja hacia la atmósfera es impedido por varias resistencias, entre ellas la resistencia foliar, constituida por la resistencia estomática y la resistencia cuticular, seguida de otra resistencia denominada capa límite. La resistencia de la capa límite depende del viento, mientras que la resistencia cuticular es dependiente de características de la cutícula de la hoja y del ambiente (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Existe un parámetro que expresa el inverso de la resistencia estomática ($1/r_e$) definido como conductancia estomática. Éste mide el flujo de agua desde la hoja hacia la atmósfera circundante por unidad de superficie foliar y de tiempo, y representa el grado de apertura de los estomas, relacionándose directamente con la disponibilidad de agua que tienen las plantas y la demanda atmosférica. El cierre estomático supone uno de los mecanismos más rápidos para evitar la pérdida de agua por la planta en caso de déficit hídrico, y representa el mecanismo más importante (aunque no es el único) para evitar la deshidratación de los tejidos de la planta (Medrano et al., 2007).

Los mecanismos utilizados por las plantas para el control de la apertura y cierre estomático bajo condiciones de déficit hídrico están asociados a la humedad relativa del aire, cerrándose los estomas debido a un aumento en la diferencia de presión de vapor entre la hoja y el aire, así como también a la síntesis de ABA en las raíces de las plantas que se encuentran en un suelo con bajo potencial hídrico. El ABA sintetizado se transporta vía xilema hacia las hojas donde su aumento en las células oclusivas reduce la turgencia de las mismas e induce el cierre estomático (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

La conductancia estomática depende de la densidad, tamaño y grado de apertura de los estomas; por lo tanto, al existir una mayor cantidad de estomas abiertos la conductancia será mayor, lo cual podría implicar, que las tasas de fotosíntesis y transpiración probablemente sean potencialmente más altas. Un cierre estomático rápido

en respuesta al déficit hídrico tiene ventajas y desventajas, que dependen de la duración del mismo. Plantas con cierres prematuros podrían ahorrar agua, aumentando sus posibilidades de sobrevivencia, sin embargo, en un estrés a corto plazo esto implicaría limitar una potencial asimilación de carbono (Hufstetler et al., 2007). Genotipos de soja adaptados a ambientes áridos tienden a tener baja conductancia estomática, lo cual les permite reducir la pérdida de agua foliar (Manavalan et al., 2009). Además, según Sinclair y Ludlow (1986) las variedades con baja conductancia estomática son a menudo las que sobreviven más tiempo bajo déficit hídrico severo.

2.4.3 Temperatura foliar

Las hojas son capaces de almacenar o perder calor, de modo que la temperatura foliar varía según las condiciones del ambiente y tipología de la propia hoja. Una determinada cantidad de calor almacenada en una hoja provocará un aumento distinto de temperatura dependiendo si se trata de una hoja delgada o suculenta. A igual cantidad de calor almacenado, las hojas delgadas presentan un mayor incremento de temperatura a diferencia de hojas suculentas (Squeo y León, 2007).

La temperatura foliar también está relacionada con factores fisiológicos de la planta tales como la conductancia estomática y tasa transpiratoria, la cual provoca el enfriamiento por efecto de la evaporación (Pietragalla, 2013). La razón de ello es que las moléculas de agua tienen la capacidad de permanecer unidas por puentes de hidrógeno; esta propiedad denominada cohesión del agua es responsable de la elevada cantidad de energía que se necesita para provocar la evaporación, disipando el calor (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

2.4.4 Expansión del área foliar

El crecimiento foliar es producto de la división y expansión celular. Estos procesos resultan afectados en condiciones de déficit hídrico ya que el suministro de agua no se mantiene al nivel de la transpiración y las hojas experimentan un descenso en la turgencia celular. Al no haber turgencia, las células no crecen impidiendo la expansión celular, y por tanto el aumento del área foliar (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Aunque la división celular resulte afectada por el estrés hídrico, la misma es menos sensible que la expansión celular (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Adicionalmente, Canfalone et al. (2002), establecen que la expansión de tejidos es mucho más sensible que la fotosíntesis al déficit hídrico. En un estudio en soja, Liu et al., citados por Manavalan et al. (2009), demostraron que el estrés por sequía disminuye la expansión foliar. En un experimento en el que se evaluó un cultivo de soja en condiciones con y sin riego, en el estadio de floración (R1) se logró un índice de área foliar de 7,2 para el tratamiento con riego, mientras que para el no regado fue de 4,9. Esta caída del índice de área foliar por efecto de la sequía puede deberse a un crecimiento foliar reducido y a la aceleración en la senescencia de las hojas (Canfalone et al., 2002).

2.4.5 Acumulación de osmolitos

Los osmolitos son compuestos de bajo peso molecular tales como las poliaminas, sacarosa, polioles, azúcares-alcoholes, prolina y otros aminoácidos, y tienen como función inducir el ajuste osmótico (Moreno, 2009). El ajuste osmótico consiste en una acumulación activa de solutos en los tejidos de la planta para el mantenimiento de la turgencia celular cuando el potencial hídrico del tejido disminuye (Manavalan et al., 2009). La acumulación de prolina es una respuesta metabólica común al déficit hídrico y a la salinidad (Jones et al., citados por Benavides-Mendoza, 2002). Esta molécula es un aminoácido altamente soluble y se acumula en las hojas de muchas especies que se encuentran sometidas a condiciones de estrés hídrico y salino.

La prolina, además de inducir el ajuste osmótico (Moreno, 2009), protege las membranas y las proteínas contra efectos adversos de la alta concentración de iones inorgánicos y de los extremos de temperatura (Santoro et al., citados por Benavides-Mendoza, 2002). También se ha observado que la prolina actúa como un captor de radicales libres (Smirnoff y Cumbes, 1989).

Cárdenas-Avila et al. (2006) reportaron una relación inversa entre el potencial hídrico y el contenido de prolina en distintas variedades de porotos. Este resultado es coincidente con los hallazgos de Sivaramakrishnan et al. (1988), quienes reportaron que un aumento en la concentración de prolina se relacionaba con una disminución en el potencial hídrico foliar. Estos mismos autores reportaron que una mayor concentración de prolina en variedades tolerantes de poroto (en comparación con las menos tolerantes) es indicativo de que este aminoácido estaría relacionado a un mecanismo de adaptación al déficit hídrico. Además, la acumulación de prolina puede ser considerada como un indicador para la selección de plantas tolerantes a distintos factores de estrés. Adicionalmente, según Manavalan et al. (2009), la prolina al inducir el ajuste osmótico, indirectamente mantiene la conductancia estomática y la fotosíntesis a potenciales hídricos más bajos, y retrasa la senescencia foliar.

2.4.6 Aminoácidos y proteínas

El amonio resultante de la FBN y/o absorbido por la raíz pasa a formar parte de moléculas orgánicas tales como aminoácidos y proteínas. Para la síntesis de dichos compuestos es necesario un suministro adecuado de nutrientes hacia las hojas, además de energía, poder reductor y agua. Según lo mencionado anteriormente, en condiciones de déficit hídrico se altera el normal funcionamiento de la planta disminuyendo el flujo de agua desde las raíces hacia las hojas, debido principalmente al cierre estomático (Chandrasekar et al., 2000). Consecuentemente, al disminuir el flujo de agua por el xilema hacia las hojas, se reduce también el suministro de nutrientes y por ende se limita la síntesis de aminoácidos y proteínas (Gage, 2004).

Adicionalmente, debido al cierre estomático como consecuencia del estrés se limita la entrada de CO₂ a las hojas afectando la fotosíntesis (Lobato et al., 2008), lo cual provoca una menor disponibilidad de fuentes carbonadas para el suministro de energía necesaria en la síntesis de aminoácidos y proteínas. Según Taiz y Zeiger (2006), la asimilación del nitrógeno requiere el 25% de la energía acumulada en las raíces y hojas para convertir compuestos inorgánicos de baja energía en compuestos orgánicos de alta energía tales como aminoácidos y proteínas.

Reynaldo et al. (2002), reportaron que en plantas sometidas a estrés ambiental se incrementan las reacciones degradativas en relación a las de síntesis, y sostienen que el déficit hídrico disminuye los niveles de proteínas. Ladrera et al. (2007), en un experimento en el cual evaluaron un cultivar de soja tolerante a la sequía y otro sensible, en condiciones control y de déficit hídrico, obtuvieron concentraciones similares de proteínas para ambos cultivares en los nódulos en ambas condiciones hídricas sugiriendo que el nivel de sequía no fue suficiente para provocar cambios a este nivel en los nódulos. En otro experimento realizado por King y Purcell (2005), en el que evaluaron un genotipo de soja tolerante y otro sensible al déficit hídrico, reportaron que la concentración de aminoácidos libres en los nódulos y las hojas aumentó en ambos genotipos en condición de déficit hídrico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Plantas

Se utilizaron dos genotipos de soja caracterizados en el laboratorio como de respuestas contrastantes al déficit hídrico: el genotipo Don Mario 6.8i (DM) de respuesta lenta o tolerante y el genotipo Génesis 5601 (GE) de respuesta rápida o sensible. DM presenta un grupo de madurez (GM) 6 largo, mientras que GE posee un GM 5.6, ambos son de ciclo medio y con hábito de crecimiento indeterminado.

Las semillas utilizadas eran certificadas y provenientes del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Las cuales son obtenidas del plan de mejoramiento de soja (Sergio Ceretta).

3.1.2 Bacterias

Las cepas de rizobios utilizadas para la inoculación de las plantas de soja fue la mezcla U1301:U1302 de *Bradyrhizobium elkanii* que es la recomendada por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) para la formulación de inoculantes de soja.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL, CONDICIÓN DE DÉFICIT HÍDRICO Y TRATAMIENTOS

El diseño experimental fue completamente al azar, conformado por unidades experimentales (UE) correspondientes a una planta de soja. Las UE se instalaron separadas a unos 15 - 20 cm.

La condición de déficit hídrico ensayada consistió en suspender el riego a plantas de 20 días post siembra (estadio V3), evaluándose los tratamientos en un estadio V3-V4. Los tiempos en los que se evaluaron los distintos parámetros (ver sección 3.5) fueron dos: tiempo 1, que corresponde a un déficit hídrico inicial o leve (E1), y tiempo 2, que corresponde a un déficit hídrico final o moderado-severo (E2). El tiempo 1 (o E1) se definió cuando las plantas alcanzaban una conductancia estomática de 50% respecto al control. El tiempo 2 (o E2) se definió cuando las plantas alcanzaban una conductancia estomática mínima estable. El tiempo 1 consistió de 1 a 2 días de estrés y el tiempo 2 consistió de 4 a 5 días de estrés.

La conductancia estomática se determinó con un porómetro modelo SC-1 (Decagon Device Inc) sobre la cara abaxial de la tercera hoja trifoliada luego de 6 h de encendida la luz de la cámara de crecimiento, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada medición se realizó por triplicado.

Los 16 tratamientos obtenidos fueron el resultado de combinar los dos genotipos de soja (DM y GE), en condiciones de inoculación (I) o de no-inoculación (S/I) y en los dos tiempos de análisis (E1 y E2) con sus respectivos controles (C1 y C2), plantas mantenidas con riego a tiempo 1 y tiempo 2, respectivamente. Cada tratamiento presentó 3 repeticiones. Al momento de instalar el ensayo se sembraron 5 repeticiones por cada tratamiento previendo alguna dificultad en la germinación de las semillas para finalmente disponer de 3 repeticiones por tratamiento.

A continuación, se presentan los 16 tratamientos en la forma a la que se hará referencia en toda la tesis:

Genotipo DM en condición de inoculación

DM I C1 DM I E1 DM I C2 DM I E2

Genotipo DM en condición de no-inoculación

DM S/I C1 DM S/I E1 DM S/I C2 DM S/I E2

Genotipo GE en condición de inoculación

GE I C1 GE I E1 GE I C2 GE I E2

Genotipo GE en condición de no-inoculación

GE S/I C1 GE S/I E1 GE S/I C2 GE S/I E2

3.3 MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.3.1 Medios y condiciones de crecimiento de plantas

Las plantas de soja se crecieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad), con 30°C/20°C (día/noche) y una radiación de 800 μmol de fotones·m⁻²·seg⁻¹, que se alcanzaron con el uso de lámparas de halogenuro metálico de 400 W.

Los dispositivos de crecimiento consistieron en botellas de 500 cm³ de volumen, forradas con nylon negro en su totalidad. Este dispositivo permitió el crecimiento y desarrollo de las plantas por 25 días, sin observarse interferencias en el desarrollo radicular.

Como sustrato se utilizó una mezcla de arena-vermiculita (1:1). Las plantas se regaron con medio RP (Rigaud y Puppo, 1975), suplementado con KNO_3 5 mM para las plantas no-inoculadas y 0.5 mM para las plantas inoculadas (Cuadro 1). El riego fue efectuado frecuentemente de forma que las plantas se mantuvieron en óptimas condiciones hídricas (sustrato a capacidad de campo). A los 20 días post-siembra, se indujo el estrés hídrico mediante la suspensión del riego para los tratamientos de estrés (E1 y E2), manteniendo el riego de las plantas correspondientes a los tratamientos control (C1 y C2).

Cuadro 1. Composición del medio RP

<u>Macronutrientes</u>	<u>mg/L</u>
KH_2PO_4	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
KCl	200
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	120
Na_2FeEDTA	25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4
KNO_3	500 ó 50*

*para plantas no-inoculadas e inoculadas, respectivamente.

<u>Micronutrientes</u>	<u>mg/L</u>
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.9
H_3BO_3	1.8

3.3.2 Medios y condiciones de crecimiento de bacterias

Los rizobios se encontraban almacenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en una mezcla 1:1 cultivo: glicerol. Se crecieron en medio YEM (Cuadro 2) a $28\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 días en agitación (150 rpm). Una vez alcanzada una densidad óptica a 600nm (DO_{600}) de 0.5-0.8 correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, el cultivo fue utilizado para inocular las plantas correspondientes a los tratamientos con inoculación.

Cuadro 2. Composición del medio YEM

<u>Nutrientes</u>	<u>g/L</u>
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄	0.2
NaCl	0.1
Manitol	5
Extracto de levadura	1
(pH 6.8 – 7.2)	

3.4 INOCULACIÓN

Las semillas se inocularon con 3 mL de inóculo (crecido según 3.3.2) al momento de la siembra. Posteriormente, 3 días post-siembra, se realizó una re-inoculación con 3 mL de inóculo.

3.5 PARÁMETROS EVALUADOS

Los distintos parámetros evaluados fueron analizados en plantas de los 16 tratamientos planteados (ver sección 3.2).

Los parámetros evaluados fueron: número y peso de nódulos, concentración de ureidos, potencial hídrico, temperatura foliar, área foliar, concentración de prolina, concentración de aminoácidos y proteína soluble, los cuales se detallan a continuación.

3.5.1 Parámetros morfo-fisiológicos

3.5.1.1 Número y peso de nódulos

Los nódulos se extrajeron de forma manual luego del lavado del sustrato adherido a la raíz. Se contabilizaron todos los nódulos presentes en la raíz de cada planta (nódulos ubicados en raíces primarias y secundarias). El peso de los mismos se determinó con una balanza de precisión OHAUS Adventurer AR1530.

3.5.1.2 Potencial hídrico de hoja

El potencial hídrico de hoja (Ψ_H) se determinó con una bomba de presión tipo Sholander, modelo 600 (PMS Instrument Company) en la tercera hoja trifoliada luego de determinada la conductancia estomática, según las instrucciones del fabricante.

3.5.1.3 Temperatura foliar

A cada planta se le tomó una imagen térmica con una cámara termográfica FLIR modelo E50, y mediante el programa FLIR Tools (FLIR, 2016) se determinó la temperatura de la tercera hoja trifoliada.

3.5.1.4 Área foliar

Para la determinación del área foliar se extrajeron todos los folíolos de cada planta y se colocaron extendidos sobre una superficie lisa. Se realizó un registro fotográfico del conjunto de folíolos junto con una escala de referencia, mediante la cámara de un teléfono celular Samsung J7. Luego, a partir de la fotografía y con el software Fiji Image J (Schindelin et al., 2012) se cuantificó el área foliar de cada planta.

3.5.2 Parámetros bioquímicos

3.5.2.1 Ureidos

Para la obtención del extracto inicial a partir del cual se extrajeron y cuantificaron los ureidos se procedió de la siguiente forma:

- Se maceró 0.25 g y 0.20 g de hojas y nódulos, respectivamente, con 1 ml de tampón Tris – HCl 50 mM pH 7.8 suplementado con 1 mM MnSO₄ y 0.1% (P/V) DOC.
- Se incubaron las muestras en hielo por 15 min y se centrifugaron a 12000 x g por 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se repitió el paso de centrifugación.
- El sobrenadante resultante (extracto) fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

La determinación de ureidos fue realizada mediante el método de Vogels y Van Der Drift (1970). Este método consta de 4 pasos mediante los cuales primero se obtienen los ureidos alantoato, alantoína y ureidoglicolato de forma diferencial (pasos 1, 2 y 3, respectivamente) y el último paso (paso 4) consiste en convertir estos ureidos a glioxilato, que es en última instancia la molécula que se cuantifica espectrofotométricamente. Se procedió según se indica a continuación:

Paso 1 (obtención de alantoato)

- Para las muestras correspondientes a hojas, se mezclaron en un microtubo 65 µL de extracto con 735 µL de agua destilada. Para las muestras correspondientes a nódulos, se mezclaron en un microtubo 50 µL de extracto con 750 µL de agua destilada.
- Se agregó 200 µL de HCl 0.15 N a cada muestra.
- Se incubaron las muestras a 100 °C por 10 min.
- Se enfriaron las muestras en baño a 4 °C.
- En este punto se continúa en el Paso 4.

Paso 2 (obtención de alantoína)

- Para las muestras correspondientes a hojas, se mezclaron en un microtubo 65 μL de extracto con 535 μL de agua destilada. Para las muestras correspondientes a nódulos, se mezclaron en un microtubo 50 μL de extracto con 550 μL de agua destilada.
- Se agregó 200 μL de NaOH 0.5 M a cada muestra.
- Se incubaron las muestras a 100 °C por 10 min.
- Se enfriaron las muestras en baño a 4 °C.
- Se agregó 200 μL de HCl 0.65 N a cada muestra.
- Se incubaron las muestras a 100 °C por 10 min.
- Se enfriaron las muestras en baño a 4 °C.
- En este punto se continúa en el Paso 4.

Paso 3 (obtención de ureidoglicolato)

- Para las muestras correspondientes a hojas, se mezclaron en un microtubo 65 μL de extracto con 935 μL de agua destilada. Para las muestras correspondientes a nódulos, se mezclaron en un microtubo 50 μL de extracto con 950 μL de agua destilada.
- Se agregó 200 μL de tampón fosfato 0.4 M pH 7.0 a cada muestra.
- Se incubaron las muestras a 100 °C por 10 min.
- Se enfriaron las muestras en baño a 4 °C.
- Se agregó 200 μL de fenilhidrazina-HCl (0.33 % (p/v)).
- En este punto se continúa en el Paso 4.

Paso 4 (obtención y cuantificación de glioxilato)

- Se empleó 1 ml de cada muestra obtenida anteriormente (muestra paso 1, muestra paso 2, muestra paso 3) colocando cada una en tubo de ensayo.
- Se agregó 200 μL de tampón fosfato sódico 0.4 M pH 7.0 y 200 μL de fenilhidrazina-HCl (0.33 % (p/v)) a cada muestra.
- Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min.
- Se colocaron los tubos en hielo.
- Se agregó 1 ml de HCl 12 N a 4 °C y 200 μL de ferricianuro de potasio 48.6 mM.
- Se incubó a temperatura ambiente 15 min.
- Se midió la absorbancia a 520 nm ($\epsilon = 42.36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), realizando un blanco con 1 ml de agua más todos los reactivos del Paso 4.

Los ureidos totales se obtuvieron como la suma del glioxilato obtenido a partir de las muestras obtenidas en los Pasos 1, 2 y 3.

3.5.2.2 Prolina

La extracción de prolina se realizó según Charest y Phan (1990) con algunas modificaciones. Se maceró 0.1 g de muestra en 0.8 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (MCA, 12:5:1) en microtubo. El homogenado se centrifugó a 5000 x g por 2 min a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante en otro microtubo. A continuación, se adicionó 200 µL de cloroformo y 300 µL de agua y se centrifugó a 5000 x g por 1 min. La fase superior (acuosa) se utilizó para la determinación de prolina.

La prolina se cuantificó según Troll y Lindsley (1955). La fase acuosa que contenía la prolina se colocó en tubo con tapa rosca y se le agregó 0.7 mL de ácido acético glacial y 0.7 mL de reactivo de ninhidrina ácida [H₃PO₄ 6 M, ácido acético glacial 12.6 M, ninhidrina 0.14 M]. Los tubos tapados se calentaron en baño de agua a 90 °C durante 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego, se adicionó a cada tubo 1 mL de tolueno, se agitó vigorosamente durante 5 min y se dejó decantar hasta la formación de dos fases (aproximadamente 12 h). Para cuantificar la prolina se tomaron muestras de la fase superior y se leyó la absorbancia a 515 nm. Como estándar se usó L-prolina.

3.5.2.3 Aminoácidos totales

La obtención del extracto utilizado para la cuantificación de los aminoácidos totales se realizó de la misma forma que para los ureidos (ver 3.5.2.1).

Cuadro 3. Soluciones para la determinación de aminoácidos totales

<u>Solución A</u>	<u>g/100 ml</u>
Ácido cítrico	16.8
NaOH	6.4
H ₂ O	100 ml
<u>Solución B</u>	<u>g/100 ml</u>
Ninhidrina	0.960
Ácido ascórbico	0.033
Cellosolve	100 ml
<u>Etanol al 60%</u>	

La cuantificación de los aminoácidos se realizó a partir de 0.1 mL de extracto de hoja y 0.05 mL de extracto de nódulos. A cada muestra se le agregó 0.5 mL de solución A y posteriormente 0.5 mL de solución B (Cuadro 3). Luego, se hirvió durante 25 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 3 mL de etanol 60%, se mezcló por inversión varias veces y se leyó la absorbancia a 570 nm. Se realizó un blanco en el cual se sustituyó el volumen de extracto vegetal por agua destilada.

3.5.2.4 Proteína soluble

La obtención del extracto utilizado para la cuantificación de la proteína soluble se realizó de la misma forma que para los ureidos (ver 3.5.2.1). La cuantificación se realizó según Bradford (1976). A 20 μ L de muestra (5 μ L de extracto + 15 μ L de agua destilada) se le agregó 1 mL de reactivo consistente en Azul de Coomassie G250 0.1 mM, etanol 0.8 M y ácido fosfórico 1.5 M. Se agitó vigorosamente y se leyó la absorbancia a 595 nm en un tiempo menor de 1 h. Como estándar se usó seroalbúmina bovina.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico InfoStat® versión 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La comparación de medias entre tratamientos se realizó a través de la prueba de comparación de medias LSD-Fisher.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el efecto del déficit hídrico (leve y moderado-severo) sobre distintos parámetros morfofisiológicos, bioquímicos y relacionados a la FBN en plantas de soja. Se prestó particular atención a la variación de la concentración de los ureidos como consecuencia de dicho estrés, así como al potencial hídrico, área foliar y acumulación de prolina, entre otros, con el fin de analizar de forma global cómo las plantas inoculadas y no-inoculadas responden al déficit hídrico.

4.1 EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE PARÁMETROS RELACIONADOS A LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

4.1.1 Número y peso de nódulos

El número y peso de los nódulos simbióticos son parámetros relacionados al proceso de FBN y pueden resultar alterados por la imposición de un déficit hídrico. En este experimento, estos parámetros no presentaron diferencias significativas entre los genotipos evaluados, así como tampoco entre ninguna de las condiciones de muestreo ensayadas (C1, E1, C2, E2, Cuadro 4). Sin embargo, se observa una tendencia a un mayor número y peso de nódulos en el tratamiento E2 del genotipo DM, mientras que para el genotipo GE en este mismo tratamiento se observa una tendencia, únicamente, a un mayor peso de nódulos.

El resultado obtenido no fue el esperado y no es coincidente con los resultados reportados por otros autores como Williams y Sicardi de Mallorca (1984) quienes observaron que un estrés hídrico leve reducía el número de nódulos y un estrés moderado-severo reducía el número y tamaño de nódulos. Tampoco es coincidente con los hallazgos encontrados por King y Purcell (2006) quienes observaron diferencias en cuanto al número y tamaño de nódulos entre un genotipo tolerante y un genotipo sensible al déficit hídrico. En este experimento, si bien las diferencias entre los genotipos DM y GE no son estadísticamente significativas, se observa en GE una tendencia a un menor número y peso de nódulos que en DM.

Cuadro 4. Número y peso de nódulos en los genotipos evaluados en condición de inoculación y sometidos a las distintas condiciones de muestreo

Tratamiento	Número de nódulos	Peso de nódulos (g)
DM I C1	26,3 a	0,19 a
DM I E1	27,3 a	0,32 a
DM I C2	30,7 a	0,42 a
DM I E2	35,7 a	0,46 a
GE I C1	24,7 a	0,23 a
GE I E1	23,3 a	0,20 a
GE I C2	23,3 a	0,28 a
GE I E2	23,0 a	0,39 a

Genotipo Don Mario 6.8i (DM). Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. I= tratamiento con inoculación. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

El hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas en estos parámetros en las distintas condiciones de muestreo ensayadas podría explicarse por la duración y momento en que se impuso el déficit hídrico. En las plantas de soja inoculadas, los nódulos comienzan a formarse a partir del estadio fenológico VE (emergencia) comenzando a visualizarse a los 3-5 días de emergencia (Peticari, 2018). En este experimento el déficit hídrico se impuso a los 20 días post siembra (V3), sometiendo a las plantas hasta 5 días de estrés. Por tanto, la mayor parte del tiempo (20 días) en que se dio la interacción planta-rizobio y formación de los nódulos, las plantas no se encontraban en condición de déficit hídrico, y la duración del estrés (5 días) parece no ser suficiente para provocar alteraciones en cuanto al número y peso de nódulos.

Si bien el déficit hídrico no tuvo lugar al inicio, ni durante la mayor parte de la etapa de formación de nódulos, llama la atención el incremento (aunque no significativo) del número y peso de nódulos en la condición E2 para el genotipo DM. Este aumento no era de esperarse ya que, como se mencionó previamente, el estrés hídrico tiende a reducir el número y peso de nódulos (Williams y Sicardi de Mallorca, 1984).

En base a los resultados obtenidos podría decirse que una duración de hasta 5 días de estrés en el estadio fenológico V3, no provoca alteraciones en cuanto al número y peso de los nódulos. Se podría hipotetizar que, si el estrés se hubiese impuesto desde el inicio de la emergencia de las plántulas, podría haber sido más probable que ocurriera una

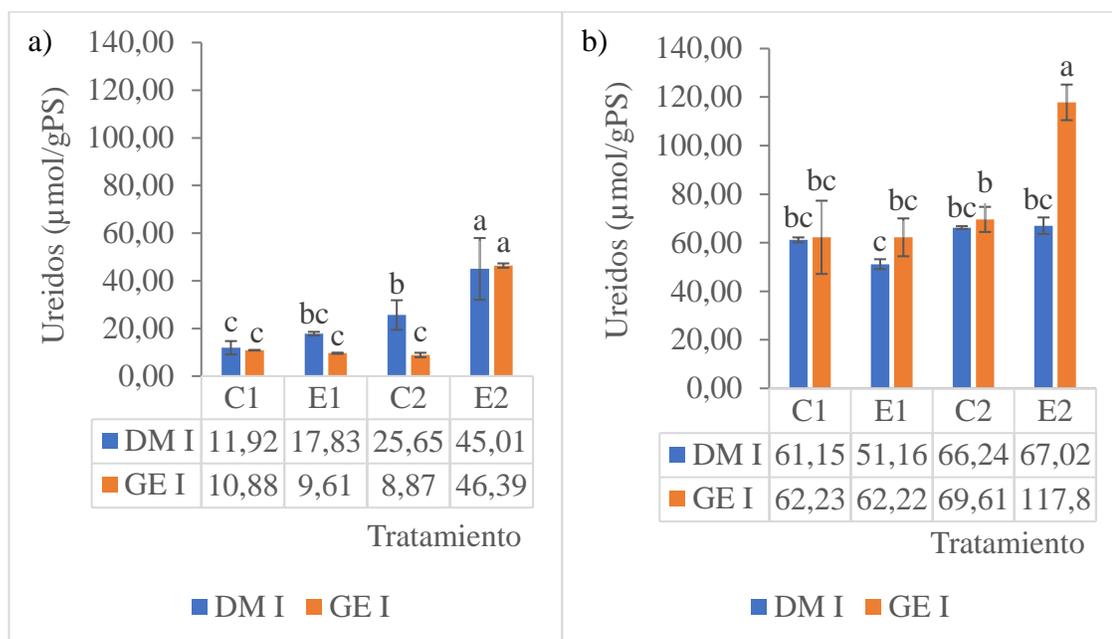
alteración del proceso de nodulación ya que el déficit hídrico afecta la sobrevivencia de los rizobios (Lodeiro, 2015) y sin ellos se compromete la nodulación.

4.1.2 Ureidos

Los ureidos son compuestos que transportan el nitrógeno fijado durante la FBN desde los nódulos hacia la parte aérea de las plantas de soja (King y Purcell, 2005). La FBN comienza a los 10-15 días de emergencia (Perticari, 2018), por lo que en este experimento el proceso de FBN transcurrió unos 7 días aproximadamente. En los genotipos ensayados en este experimento, se observó que la concentración de ureidos es mayor en los nódulos respecto a las hojas en todos los tratamientos de plantas inoculadas (Figura 2).

En cuanto a la concentración de ureidos en las hojas de plantas inoculadas (Figura 2a), no hubo diferencias estadísticas significativas entre ambos genotipos en los tratamientos C1, E1 y E2. Sin embargo, en el tratamiento C2 se observa una mayor concentración de ureidos en el genotipo DM respecto al genotipo GE, y un aumento en dicha concentración respecto al tratamiento C1 del mismo genotipo. Asimismo, se observa una acumulación significativa de ureidos en el tratamiento E2 en ambos genotipos respecto a los restantes tratamientos.

En el caso de los nódulos (Figura 2b), el único tratamiento donde hubo diferencias significativas al comparar los genotipos fue en la situación de déficit hídrico moderado-severo (E2), donde el genotipo GE presentó una concentración de ureidos en el entorno de un 50% mayor respecto a los restantes tratamientos. Para el genotipo DM no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.



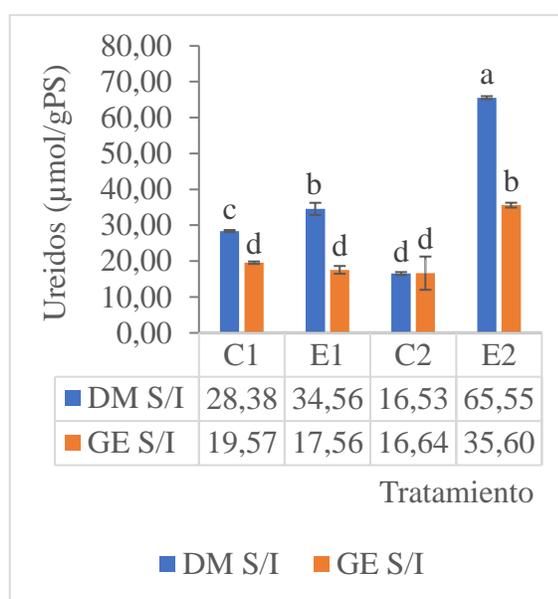
a) hojas. b) nódulos. E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 2. Concentración de ureidos en plantas inoculadas (I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)

El resultado antes descrito, es decir, la acumulación de ureidos en hojas de plantas inoculadas únicamente en el tratamiento E2, no es coincidente con los hallazgos de Ladrera et al. (2007) quienes no observaron acumulación de ureidos en hojas de genotipos de soja tolerantes y sensibles al déficit hídrico en una condición de 6 días de estrés. Además, el hecho de que en este experimento no se hayan observado diferencias significativas entre los genotipos en la concentración de ureidos en hojas en el tratamiento E2, tampoco es coincidente con lo observado por King y Purcell (2005), Ladrera et al. (2007) quienes reportaron una menor concentración de ureidos en el genotipo tolerante respecto al sensible en condición de déficit hídrico. Esta discrepancia entre los resultados obtenidos por estos autores y los de este experimento podría deberse a que las plantas de soja no se evaluaron en el mismo estadio fenológico, ya que la duración del estrés fue muy similar a este experimento. Sin embargo, si la condición de estrés en este ensayo se hubiese prolongado por más días, quizás se podrían haber observado diferencias entre los genotipos en la concentración de ureidos en hojas.

El incremento significativo de la concentración de ureidos en nódulos del genotipo GE (sensible) en E2 coincide con los hallazgos de Ladrera et al. (2007) quienes reportaron que los nódulos del genotipo sensible presentaron una mayor acumulación de ureidos respecto a los nódulos del genotipo tolerante en una condición de 6 días de déficit hídrico. A partir de este resultado, y junto con el hecho de que en el genotipo DM (tolerante) no haya ocurrido un aumento significativo de la concentración de ureidos, se podría deducir que el genotipo GE presenta el proceso de FBN inhibido dado que la acumulación de ureidos en nódulos ocurre en condiciones de autoinhibición de dicho proceso (King y Purcell, 2005). Sin embargo, en esa misma condición, el genotipo tolerante (DM) continuaría realizando el proceso de FBN.

Cuando se compara la concentración de ureidos en hojas de plantas de ambos genotipos sin inocular (DM S/I, GE S/I, Figura 3), se observan diferencias significativas en las condiciones de muestreo (C1, E1 y E2), siendo el genotipo DM (tolerante) el que presenta mayor concentración de ureidos en todos los casos, con un aumento y diferencia más acentuada en la condición E2. También resulta evidente para ambos genotipos que la concentración de ureidos aumentó en la condición de estrés hídrico moderado-severo (E2).



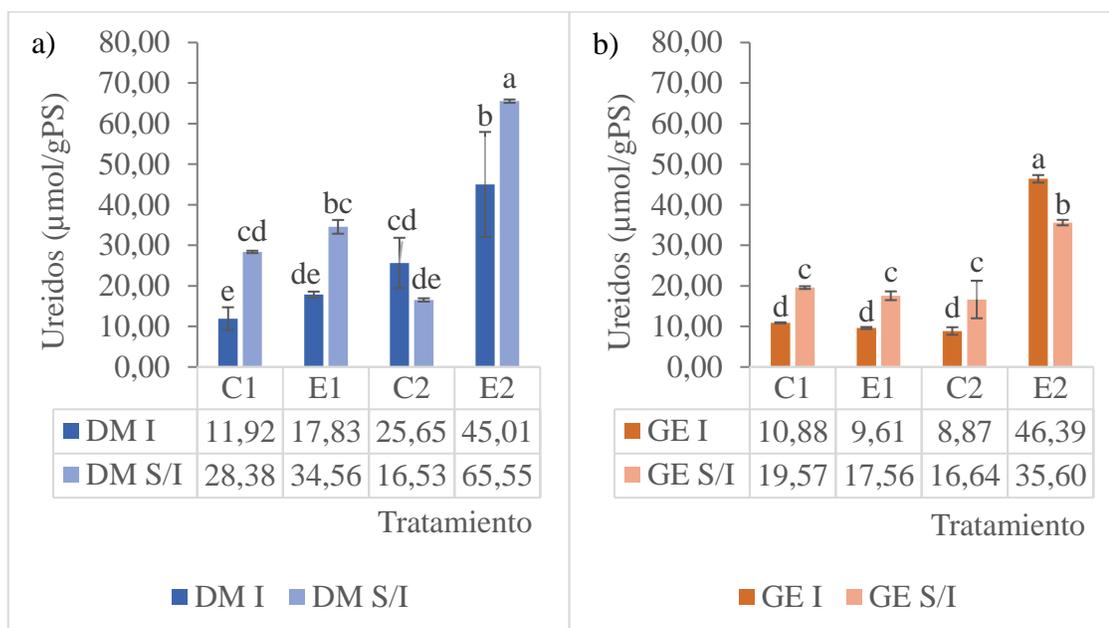
E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 3. Concentración de ureidos en hojas de plantas no inoculadas (S/I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)

A diferencia de los ureidos en plantas I que son producto del amonio simbiótico, los ureidos en plantas S/I no provienen del amonio simbiótico. Por esto, se deduce que los ureidos en hojas no provienen únicamente del amonio producto de la FBN, sino que también pueden resultar del catabolismo de las bases purínicas (Ohyama et al., 2004).

El incremento de la concentración de ureidos en la condición E2 de ambos genotipos concuerda con lo obtenido por Freixas et al. (2011) quienes sostienen que en hojas de plantas S/I la concentración de ureidos aumenta en condición de déficit hídrico en relación a la condición control (sin déficit hídrico), sugiriendo que las rutas de degradación de ureidos también pueden bloquearse por la sequía en plantas de soja no noduladas. Por otro lado, es interesante notar que como consecuencia del estrés (condiciones E1 y E2) las hojas de plantas S/I del genotipo tolerante presenten una mayor concentración de ureidos que las del genotipo sensible no concuerda con lo observado en hojas de plantas I, en las cuales la concentración de ureidos era igual en ambos genotipos. Esto podría explicarse en base a que el período de tiempo, aproximado, durante el cual ocurrió la FBN (7 días) fue menor al período de tiempo durante el cual no tuvo lugar la FBN (13-14 días), y que, por tanto, este tiempo no haya alcanzado para que se evidenciaran diferencias significativas entre los genotipos en condiciones I.

En la Figura 4 se presentan los valores de concentración de ureidos en hojas de los genotipos evaluados en condiciones I y S/I para valorar el efecto de la nodulación sobre dicho parámetro en las distintas condiciones de muestreo (C1, E1, C2, E2). El genotipo DM presentó una mayor concentración de ureidos en hojas de plantas S/I en las condiciones C1, E1 y E2 (Figura 4a); mientras que el genotipo GE mostró una mayor concentración de ureidos en las hojas de plantas S/I en todas las condiciones excepto en E2, donde ocurre lo contrario observándose una mayor concentración de ureidos en hojas de plantas I (Figura 4b).



a) Genotipo Don Mario 6.8i (DM). b) Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 4. Concentración de ureidos en hojas de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S/I)

En base a las diferencias en la concentración de ureidos entre plantas I y S/I (Figura 4) se deduce la existencia de un efecto de la inoculación sobre los niveles de ureidos. El resultado obtenido en este experimento, en que las hojas de plantas S/I presentaron una mayor concentración de ureidos que en las plantas I (excepto en C2 de DM y E2 de GE), no concuerda con lo reportado por Freixas et al. (2011). Estos autores reportan una mayor concentración de ureidos en hojas de plantas I en comparación con plantas S/I tanto en condición de déficit hídrico como control. Este es el resultado esperado ya que los ureidos, que se forman en los nódulos a partir de amonio proveniente de la FBN, transportan dicho nitrógeno hacia la parte aérea de la planta. Una posible explicación del resultado obtenido estaría relacionada a una menor incorporación de manganeso (Mn) en plantas no-inoculadas (S/I) ya que hay evidencia que sugiere que el aumento en los niveles de Mn en distintos genotipos de soja puede disminuir los niveles de ureidos en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico (Purcell et al., 2004). Además, se ha reportado que los factores Nod podrían estimular la absorción de Mn (Freixas et al., 2011). Entonces, las plantas S/I al no estar en presencia de factores Nod (por no estar noduladas) podrían haber absorbido menor cantidad de Mn y esto traducirse en mayor concentración de ureidos, ya que la enzima alantoato amidohidrolasa, responsable de la

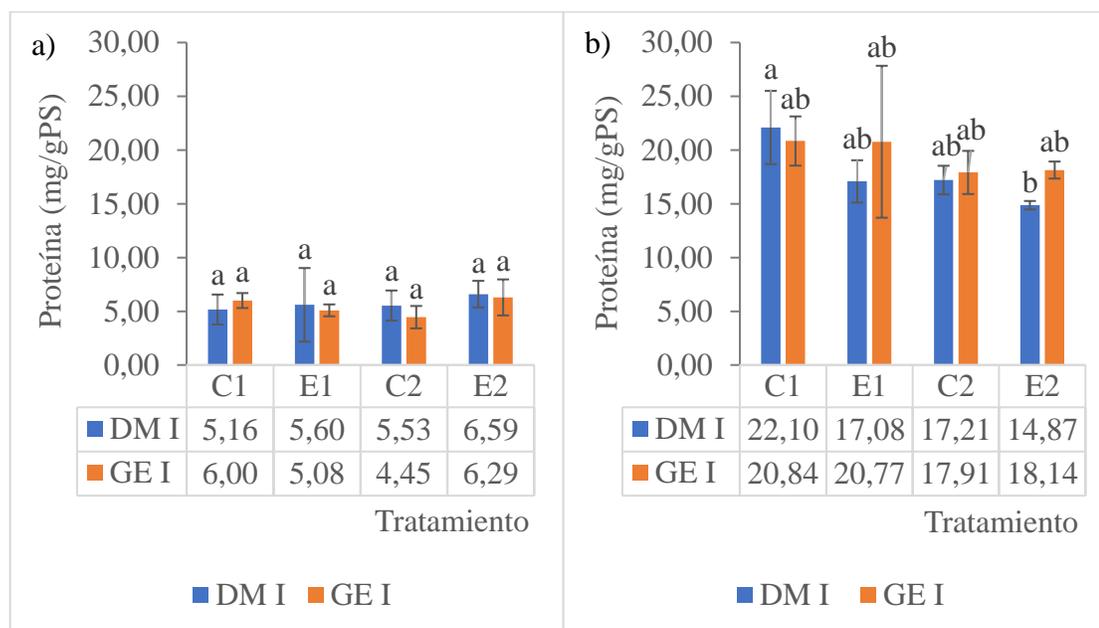
degradación de los ureidos, requiere Mn como cofactor (Lukaszewski et al., 1992). Si esta enzima presentara una actividad disminuida por un déficit de su cofactor, también disminuiría la degradación de los ureidos y podría observarse una acumulación de los mismos.

Otra posible explicación a la mayor concentración de ureidos en hojas de plantas S/I que en hojas de plantas I, podría ser en parte a que los ureidos en plantas I producto del amonio simbiótico solo se sintetizaron durante unos 7 días aproximadamente, y a que al inicio del crecimiento de la soja la FBN es baja ya que inicialmente la planta es chica y demanda menos nitrógeno. Entonces, dada la baja FBN en solo 7 días, no produjo mucha cantidad de amonio para que se transforme en ureidos. En un estadio fenológico donde la planta tiene un alto requerimiento de nitrógeno y por tanto una alta fijación de amonio simbiótico, sería más probable un mayor aumento de ureidos en plantas I que S/I.

4.2 EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y MORFO-FISIOLÓGICOS

4.2.1 Proteína soluble

La concentración de proteína soluble es un parámetro asociado a reacciones de síntesis, por lo que es imprescindible un suministro de nutrientes, energía, poder reductor y agua (Gage, 2004). En la Figura 5 se observa que la concentración de proteína soluble fue mayor en los nódulos (Figura 5b) que en las hojas (Figura 5a) de plantas inoculadas de ambos genotipos en todas las condiciones de muestreo ensayadas (C1, E1, C2, E2). Así mismo, en ambos tejidos no hubo diferencias significativas entre los genotipos en ninguna de las condiciones de muestreo.

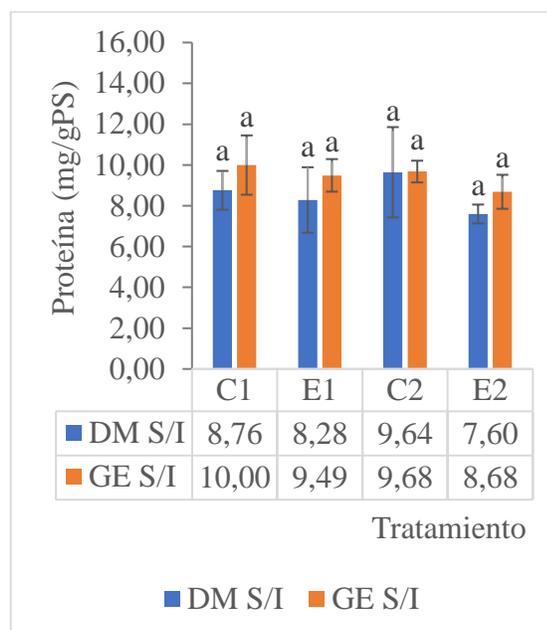


a) hojas. b) nódulos. E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 5. Concentración de proteína soluble en plantas inoculadas (I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)

En hojas, era de esperar una disminución de la concentración de proteínas en condición de déficit hídrico, principalmente en E2, ya que existe evidencia que indica que una situación de estrés ambiental aumenta las reacciones de degradación en relación a las de síntesis que podría traducirse en una disminución de los niveles de proteínas (Reynaldo et al., 2002). Además, al igual que en hojas de plantas I, en hojas de plantas no inoculadas (S/I), no se observaron diferencias significativas en ningún caso, es decir, ni entre los genotipos, ni entre las distintas condiciones de muestreo ensayadas (Figura 6). Estos resultados, que indican que el déficit hídrico al cual fueron sometidas las plantas no alteró la concentración de proteína soluble en plantas S/I (Figura 6) así como tampoco en plantas I (Figura 5a), podría deberse a que la intensidad o duración del estrés no fue suficiente para que se inicien las reacciones catabólicas responsables de la degradación de proteínas.

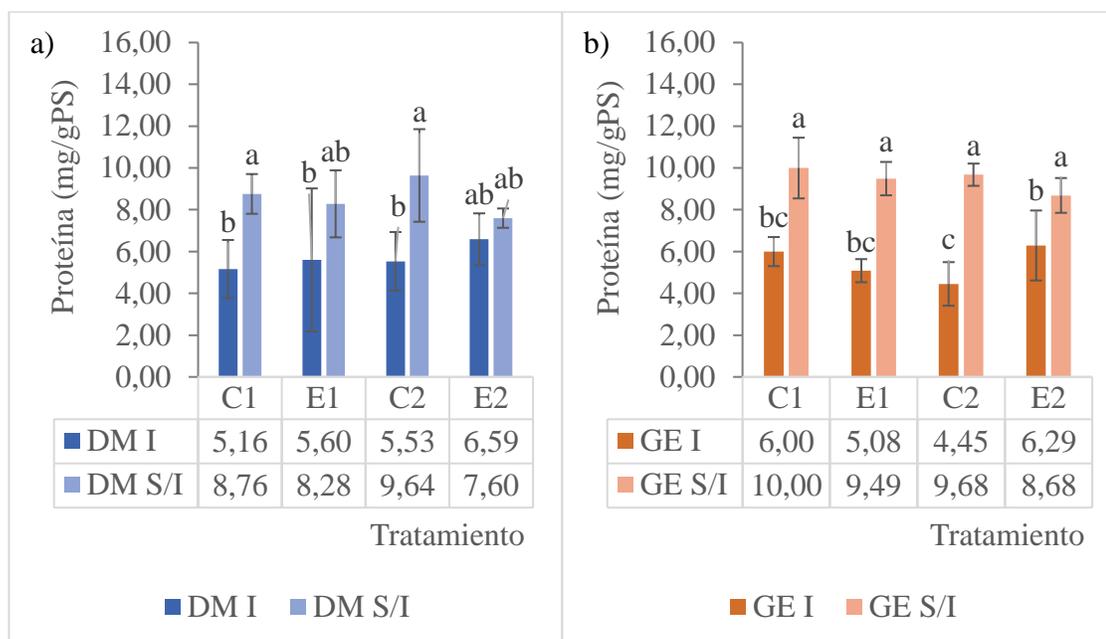
Por otro lado, en los nódulos, los resultados obtenidos en este experimento son coincidentes con lo reportado por Ladrera et al. (2007), quienes observaron concentraciones de proteínas similares en nódulos de plantas de genotipos tolerante y sensible en condición de déficit hídrico y control.



E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD-Fisher $P < 0.05$).

Figura 6. Concentración de proteína soluble en hojas de plantas no inoculadas (S/I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)

Al comparar la concentración de proteína soluble en hojas de plantas I y S/I para cada genotipo (Figura 7), se observa en el genotipo DM (Figura 7a) que las plantas S/I presentaron mayores valores en las condiciones control (C1 y C2), mientras que en ambas condiciones de estrés (E1 y E2) no se encontraron diferencias significativas en este parámetro si bien hay una tendencia a una mayor concentración de proteína soluble en las hojas de plantas S/I. En cuanto a los resultados obtenidos para el genotipo GE (Figura 7b), se observa una mayor concentración de proteína soluble en plantas S/I que en plantas I, resultando estadísticamente significativa en todas las condiciones de muestreo ensayadas (C1, E1, C2, E2).



a) Genotipo Don Mario 6.8i (DM). b) Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 7. Concentración de proteína soluble en hojas de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S/I)

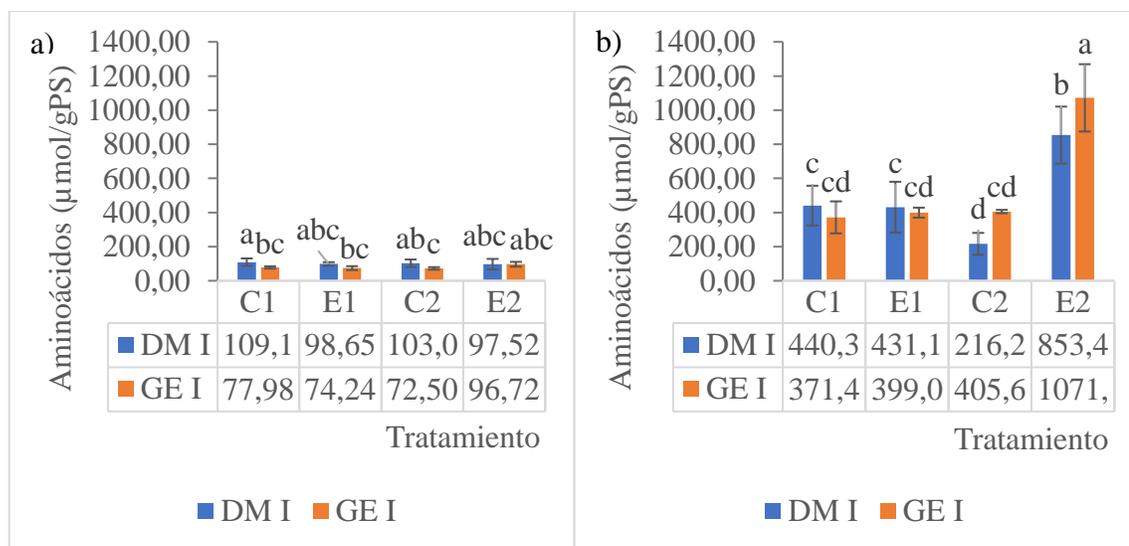
Según lo observado en la Figura 7, podría decirse que hubo un efecto de la inoculación sobre la concentración de proteína soluble en ambos genotipos. Una posible explicación a la diferencia encontrada en dicho parámetro entre plantas I y S/I, que se observa principalmente en el genotipo GE (Figura 7b), sería que las plantas inoculadas tienen un mayor costo energético dado que fijan el nitrógeno atmosférico (Lodeiro, 2015) y, por tanto, dispondrían de menor energía para la síntesis proteica; en cambio, las plantas no-inoculadas al disponer de una fuente de nitrógeno soluble (KNO_3 5 mM) cuya reducción es menos costosa energéticamente que el proceso de FBN, tendrían un estado energético más favorable y por tanto dispondrían de más energía para las reacciones de síntesis.

Otra razón por la cual se podría explicar la mayor concentración de proteína en plantas S/I, es el hecho de que las plantas I contaron inicialmente (hasta tener una FBN activa) con una menor concentración de nitrógeno en la solución de riego (0.5 mM KNO_3 ; concentración permisiva para la nodulación) respecto a las plantas S/I que fueron regadas durante todo el ensayo con una solución de riego complementada con 5 mM KNO_3 . Si el

proceso de FBN en las plantas I se hubiese extendido por más días, tal vez la concentración de proteína soluble en ellas podría haber sido similar al de las plantas S/I.

4.2.2 Aminoácidos

El amonio pasa a formar parte de moléculas orgánicas a través de un proceso conocido como asimilación, dando lugar a la formación de aminoácidos (Díaz et al., s.f.). Analizando los resultados presentados en la Figura 8, resulta claro que la concentración de aminoácidos es muy superior en los nódulos con respecto a las hojas de plantas inoculadas de los dos genotipos evaluados. En particular, en la condición E2 en los nódulos (Figura 8b) se observan valores significativamente superiores en ambos genotipos respecto a las restantes condiciones de muestreo (C1, E1 y C2). En esta misma condición de déficit moderado-severo (E2) se observa que el genotipo GE (sensible) presenta mayor concentración de aminoácidos que el genotipo DM. En las restantes condiciones (C1, E1 y C2) no hubo diferencias significativas entre ninguno de los genotipos. En el caso de las hojas (Figura 8a), no se encontraron diferencias significativas en la concentración de aminoácidos como consecuencia de la imposición del estrés en ambos genotipos. Si se comparan los valores obtenidos entre genotipos, se observan diferencias significativas en las condiciones control (C1 y C2).



a) hojas. b) nódulos. E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

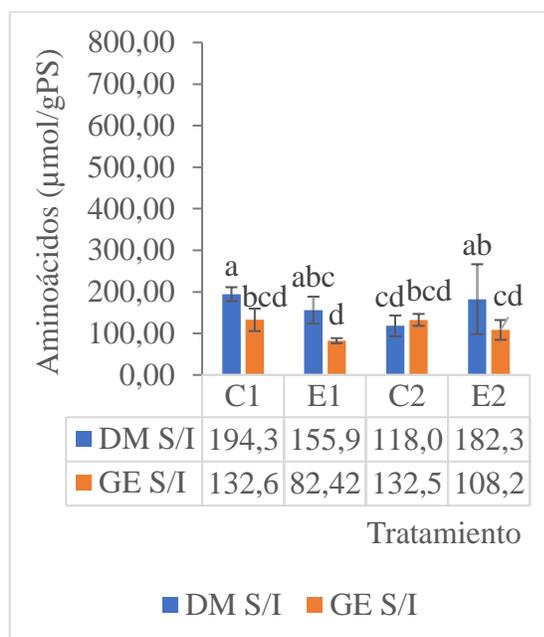
Figura 8. Concentración de aminoácidos en plantas inoculadas (I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)

Los resultados obtenidos en hojas de plantas I (Figura 8a) no son coincidentes con lo reportado por King y Purcell (2005), quienes observaron en hojas de plantas de genotipos sensibles y tolerantes que la concentración de aminoácidos libres aumentaba como consecuencia del déficit hídrico. Sin embargo, los resultados obtenidos en los nódulos son coincidentes con sus hallazgos ya que en los genotipos la concentración de aminoácidos aumentó como consecuencia del estrés hídrico moderado-severo (E2). La discrepancia de los resultados de las hojas podría deberse a que las plantas no se estresaron en el mismo estadio fenológico, pues en el trabajo de King y Purcell (2005) las plantas se comenzaron a estresar 34 días post siembra, mientras que en este experimento el estrés hídrico se impuso 20 días post siembra. Por otro lado, la duración del estrés al que fueron sometidas las plantas podría ser otro factor que explique el resultado obtenido.

Cuando las plantas se enfrentan a un estrés hídrico, se ha demostrado que las proteínas disminuyen y los aminoácidos aumentan (Reynaldo et al., 2002). Es decir que ambos parámetros parecen estar relacionados. En este experimento, en las hojas no se observó tal relación (ver Figura 8a y Figura 5a), sin embargo, en nódulos se aprecia una leve disminución de la concentración de proteína soluble (variación no significativa) y un considerable aumento significativo de aminoácidos en condición E2 (ver Figura 8b y Figura 5b). De ello se deduce que los nódulos parecen ser órganos más sensibles al déficit hídrico y/o que responden primero ante un estrés hídrico.

En nódulos, asimismo, podría deducirse que debido a que las proteínas no disminuyeron significativamente en condición E2, el notable incremento en la concentración de aminoácidos en esta misma condición puede deberse a un incremento en la concentración del aminoácido prolina, que estaría contemplada en el total de aminoácidos cuantificados, pero no pudo ser corroborado ya que no se cuantificó prolina en nódulos.

En la Figura 9, en la cual se presentan los datos de concentración de aminoácidos en hojas de plantas no-inoculadas (S/I) de ambos genotipos, se observa que en las condiciones C1, E1 y E2 existen diferencias significativas entre los genotipos, siendo el genotipo DM (tolerante) el que presenta los mayores valores. Sin embargo, al igual que lo observado en hojas de plantas I (Figura 8a), no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones de déficit hídrico y control.

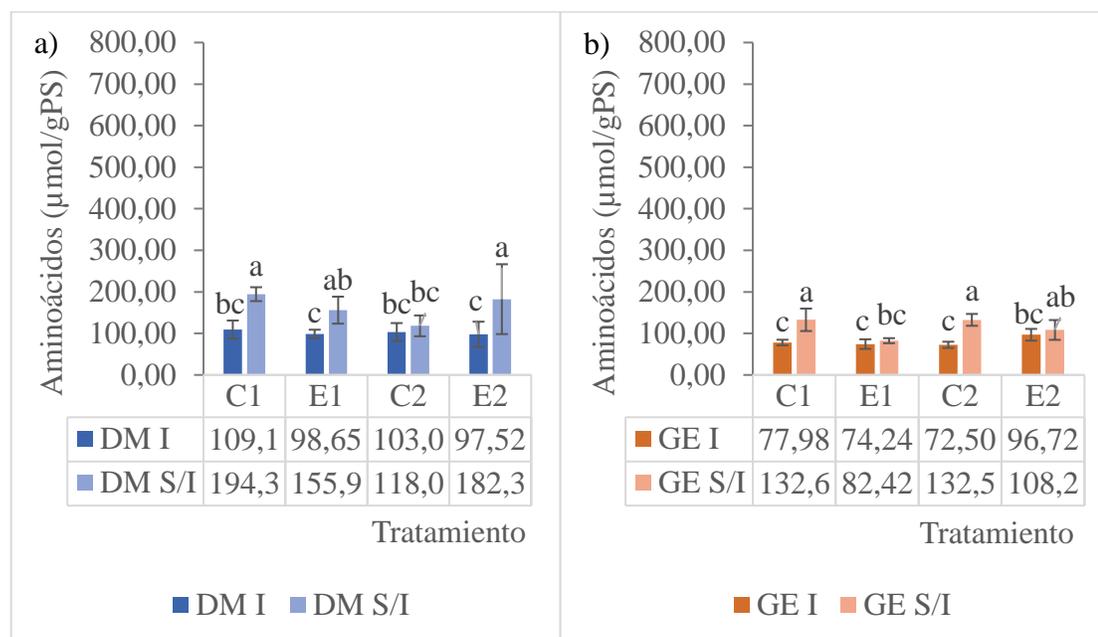


E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 9. Concentración de aminoácidos en hojas de plantas no inoculadas (S/I) de los genotipos Don Mario 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE)

Este hecho, es decir, que la concentración de aminoácidos no se haya incrementado en las condiciones de estrés, se correlaciona con que la concentración de proteína soluble no disminuyó en dichas condiciones (Figura 6). Se podría concluir que los aminoácidos fueron utilizados para la síntesis de proteínas y, por otro lado, que la duración del estrés hídrico al que fueron sometidas las plantas no provocó la degradación de las proteínas en plantas S/I.

En la Figura 10 se presentan los datos de concentración de aminoácidos en hojas de plantas I y S/I de cada genotipo para valorar el efecto de la inoculación. Para el genotipo DM (Figura 10a) se observa que las plantas S/I presentaron mayor concentración de aminoácidos que las plantas I en todas las condiciones de muestreo ensayadas, salvo en C2. En el caso del genotipo GE (Figura 10b), las diferencias significativas se encontraron únicamente en las condiciones control (C1 y C2).



a) Genotipo Don Mario 6.8i (DM). b) Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

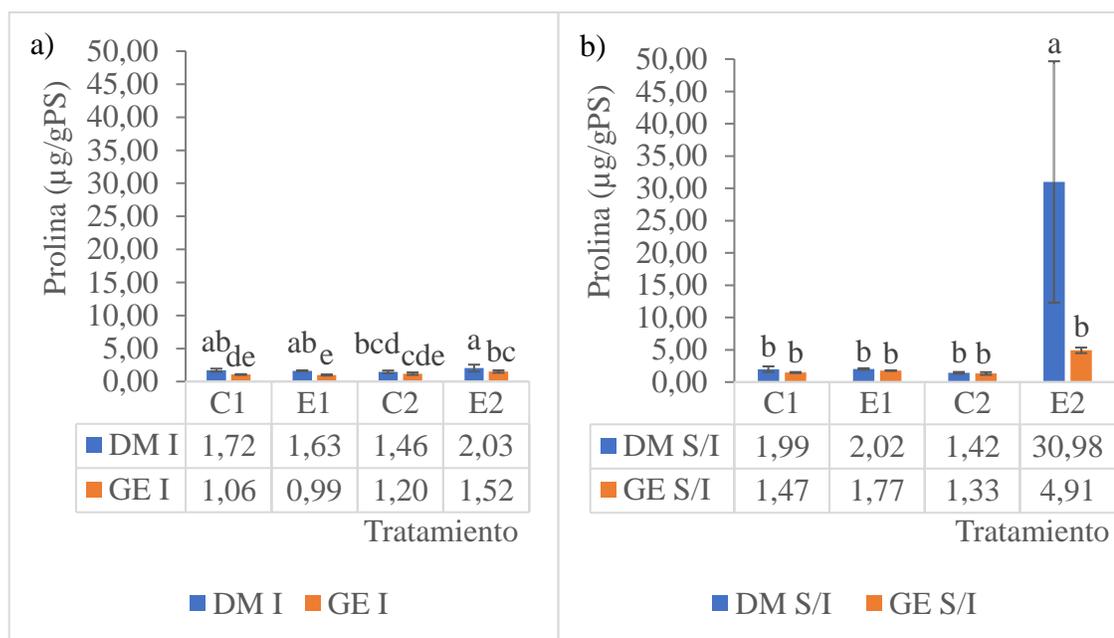
Figura 10. Concentración de aminoácidos en hojas de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S/I)

Este resultado, en que las hojas de plantas S/I contienen una mayor concentración de aminoácidos que los tratamientos con inoculación (I) en la mayoría de las condiciones de muestreo ensayadas, es similar al encontrado para el parámetro proteína soluble (Figura 7). Nuevamente en este caso se puede deducir que hay un efecto de la inoculación sobre la concentración de aminoácidos que podría explicarse del mismo modo que en las proteínas, es decir, las plantas I que realizan FBN tienen un costo energético extra (Lodeiro, 2015) y por tanto tendrían de menos energía para la síntesis de aminoácidos; pero en el caso de las plantas S/I que se les suministro una fuente de nitrógeno soluble (KNO_3 5 mM) cuya reducción es menos costosa energéticamente que la FBN, contarían con más energía para las reacciones de síntesis. También una menor disponibilidad de nitrógeno en las plantas I podría ser el otro factor que explique este resultado, dado que las plantas I recibieron inicialmente (hasta tener una FBN activa) una menor concentración de nitrógeno en la solución de riego (0.5 mM KNO_3 ; concentración permisiva para la nodulación) respecto a las plantas S/I que recibieron una solución de riego complementada con 5 mM KNO_3 en todo el ensayo. Pero quizás la concentración de aminoácidos podría

haber sido similar entre plantas I y S/I si el proceso de FBN se hubiese extendido por más días.

4.2.3 Prolina

La prolina es un aminoácido que se acumula en los tejidos vegetales para mantener la turgencia celular cuando el potencial hídrico disminuye (Manavalan et al., 2009). Según se muestra en la Figura 11a, no hubo acumulación de prolina en hojas de plantas I de ambos genotipos en ninguna de las condiciones de muestreo, ni siquiera en déficit hídrico moderado-severo (E2). Sin embargo, sí existieron diferencias significativas entre ambos genotipos en las condiciones C1, E1 y E2, siendo DM el genotipo que presentó mayores valores. Cuando se comparan los valores de concentración de prolina en hojas de plantas S/I de ambos genotipos (Figura 11b), resulta claro que el genotipo DM acumuló prolina en la condición de déficit hídrico moderado-severo (E2). No ocurrió lo mismo para el genotipo GE, en el cual no se observa acumulación del aminoácido en ninguna de las condiciones de muestreo ensayadas.

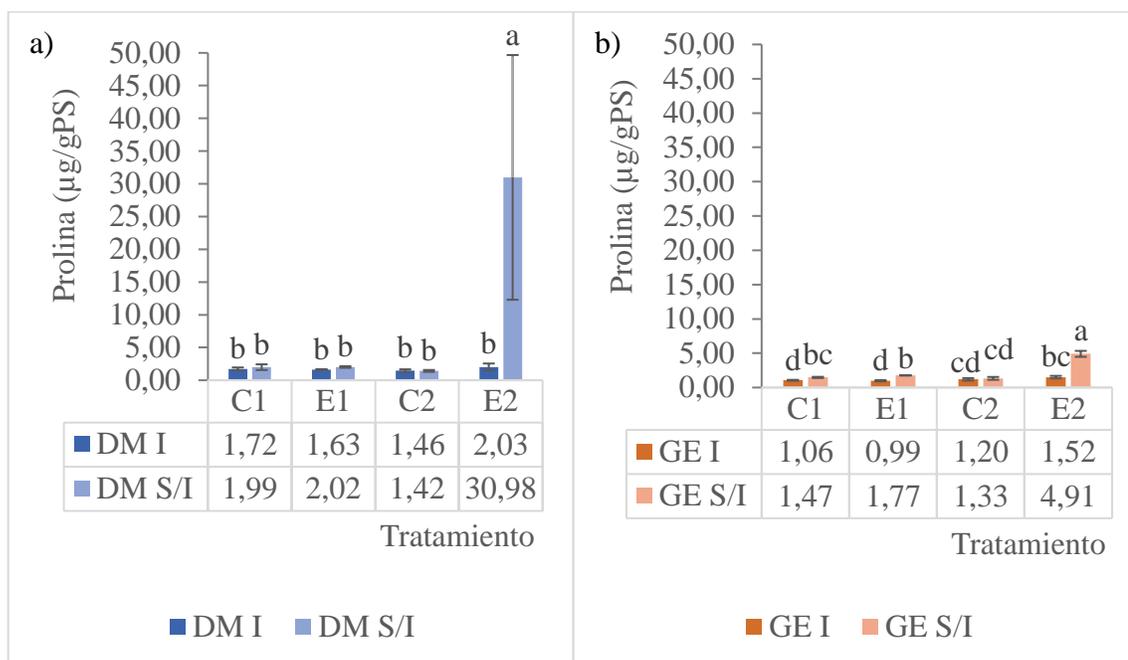


a) plantas inoculadas (I). b) plantas no-inoculadas (S/I). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2=tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 11. Concentración de prolina en hojas de plantas de los genotipos Don Mario 6.8 i (DM) y Génesis 5601 (GE)

El hecho de no haber una acumulación de prolina en los dos tratamientos de déficit hídrico (E1 y E2) para ambos genotipos en condición de inoculación, no es coincidente con lo mencionado por Cárdenas-Avila et al. (2006) quienes reportaron en plantas de poroto acumulación de prolina en condiciones de déficit hídrico. Sin embargo, al comparar plantas I de los dos genotipos (Figura 11a) se observa una mayor concentración de prolina estadísticamente significativa en el genotipo DM respecto a GE, que es coincidente con lo reportado por esos autores. La discrepancia encontrada podría explicarse considerando que las plantas de porotos y de soja no responden de forma similar ante el déficit hídrico, y que en el caso de soja la magnitud de dicho déficit no fue suficiente para provocar la acumulación de prolina. Sin embargo, como se mencionó previamente, en las plantas S/I el genotipo DM presentó un incremento considerable del aminoácido, por lo que se aprecia una interacción entre la inoculación y el estrés hídrico.

El análisis de lo que ocurre con los valores de concentración de prolina cuando la comparación se realiza en cada genotipo entre plantas I y S/I, con el fin de evaluar el efecto de la inoculación sobre la acumulación de prolina, se presenta en la Figura 12. Analizando el genotipo DM (Figura 12a) se observa que en el único tratamiento donde hubo diferencias significativas entre plantas I y S/I fue en E2. En esta condición se destaca un aumento muy significativo de prolina en plantas S/I, siendo aproximadamente 15 veces superior respecto a los valores obtenidos en las restantes condiciones tanto para plantas I como S/I. En cuanto al genotipo GE (Figura 12b), las plantas S/I acumularon más prolina que las plantas I en las dos condiciones de déficit hídrico (E1 y E2), siendo más grande dicha acumulación en la condición E2.



a) Genotipo Don Mario 6.8i (DM). b) Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 12. Concentración de prolina en hojas de plantas inoculadas (I) y no-inoculadas (S/I)

Al compararse cada genotipo en condición de inoculación y no-inoculación, resulta claro que existe una interacción entre la inoculación y el déficit hídrico que influye sobre la síntesis y acumulación de prolina. Según Sivaramakrishnan et al. (1988), Cárdenas-Avila et al. (2006) los aumentos en la concentración de prolina se correlacionan con una disminución del potencial hídrico foliar. En este experimento, los menores potenciales hídricos hallados en plantas S/I respecto a plantas I en el tratamiento E2 (aunque sin variación significativa, Cuadro 5), se correlacionan con los mayores niveles de prolina en plantas S/I para tal condición de estrés (E2).

El incremento de la concentración de prolina en plantas S/I en condición E2 podría fundamentarse por los menores potenciales hídricos que presentaron las plantas en dicha condición. Sin embargo, en el tratamiento E1 también se observaron bajos potenciales hídricos, pero la concentración de prolina no aumentó. Esto indica que la prolina es un parámetro de respuesta más lenta que el potencial hídrico frente al déficit hídrico en soja. Adicionalmente, en las plantas I en E2 ambos genotipos también presentaron bajos potenciales hídricos (aunque no tan bajos como en plantas S/I a igual

tratamiento) y la prolina no aumentó, por lo cual se deduce que existen otros factores que estarían afectados por la inoculación que influyen en los niveles de prolina.

4.2.4 Potencial hídrico de hoja

El potencial hídrico es un parámetro que representa el estado hídrico en que se encuentra una planta (Klepper 1968, Goode y Higgs 1973). En el Cuadro 5 se presentan los datos de potencial hídrico foliar comparándose de forma independiente (subgrupos A, B, C y D) los resultados de los dos genotipos evaluados (DM y GE) en condiciones I y S/I y en las distintas condiciones de muestreo (C1, E1, C2, E2). En los subgrupos A y B se presenta la comparación entre los genotipos en la condición I y S/I, respectivamente. En los subgrupos C y D se presenta la comparación para los genotipos DM y GE, respectivamente, en las dos condiciones de inoculación.

Los resultados indican que en ninguno de los subgrupos hubo diferencias significativas entre las condiciones control (C1 y C2) ni entre las condiciones de estrés (E1 y E2). A su vez, tampoco se encontraron diferencias significativas entre genotipos, excepto en la condición E1 de plantas S/I (subgrupo B). Al comparar los datos de las condiciones de muestreo ensayadas, se observa que hubo diferencias significativas entre tratamientos control y estrés en el genotipo DM en condición S/I (subgrupo B). En el caso de los genotipos en condición I (subgrupo A), no se encontraron diferencias significativas entre condiciones control y estrés.

En el caso de los subgrupos C y D, donde se compara cada genotipo en condiciones I y S/I, no se observaron diferencias significativas entre plantas I y S/I en ninguna de las condiciones de muestreo ensayadas (C1, E1, C2, E2).

Cuadro 5. Potencial hídrico foliar en los genotipos evaluados sometidos a las dos condiciones de inoculación y en las distintas condiciones de muestreo

		$\Psi.H$ (Mpa)			
A		C1	E1	C2	E2
DM I		0,78 bc	1,43 ab	0,60 c	1,27 ab
GE I		0,80 bc	1,50 a	0,60 c	1,17 abc
B		C1	E1	C2	E2
DM S/I		0,82 cd	1,77 a	0,53 d	1,90 a
GE S/I		0,70 cd	1,17 bc	0,53 d	1,57 ab
C		C1	E1	C2	E2
DM I		0,78 bc	1,43 ab	0,60 c	1,27 abc
DM S/I		0,82 bc	1,77 a	0,53 c	1,90 a
D		C1	E1	C2	E2
GE I		0,80 bc	1,50 a	0,60 c	1,17 ab
GE S/I		0,70 bc	1,17 ab	0,53 c	1,57 a

Genotipo Don Mario 6.8i (DM). Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. I y S/I= tratamientos de inoculación y no-inoculación, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$) en cada subgrupo (A, B, C y D).

Es interesante notar que existió una mayor diferencia de potencial hídrico (aunque no significativa) entre plantas I y S/I dentro de cada genotipo que entre los genotipos, y esta diferencia fue más acentuada en la condición E2 en la cual las plantas S/I presentaron un menor potencial hídrico. Otra observación es que las plantas I de ambos genotipos, en la condición E1 tienen un menor potencial hídrico que en E2 (aunque no resultó estadísticamente significativo), mientras que las plantas S/I presentaron menor potencial hídrico en E2 que en E1 (variación no significativa). Los valores de potencial en las plantas S/I en condiciones de E1 y E2 son lógicos dado que a medida que son sometidas a un mayor estrés (E2) los potenciales disminuyen, pero los valores de potencial hallados en plantas I en tales condiciones de E1 y E2 no son lógicos pues se encontró mayor potencial en un mayor grado de estrés (E2) que en un estrés leve (E1), entonces probablemente hubo alguna falla en las mediciones que podría deberse a un detalle de funcionamiento del equipo.

4.2.5 Temperatura foliar

La temperatura foliar se relaciona con otros factores fisiológicos de la planta asociados a la pérdida de agua y enfriamiento de las hojas, como la conductancia estomática y tasa transpiratoria (Pietragalla, 2013). En el Cuadro 6 se presentan los datos de temperatura foliar comparándose de forma independiente (subgrupos A, B, C y D) los resultados de los dos genotipos evaluados (DM y GE) en condiciones I y S/I y en las distintas condiciones de muestreo (C1, E1, C2, E2). En los subgrupos A y B se presenta la comparación entre los genotipos en la condición I y S/I, respectivamente. En los subgrupos C y D se presenta la comparación para los genotipos DM y GE, respectivamente, en las dos condiciones de inoculación.

Cuando se comparan los dos genotipos en condición I (subgrupo A), se observa que únicamente para DM en la condición de estrés moderado-severo (E2) la temperatura foliar fue significativamente mayor. En cambio, para los genotipos en condición S/I (subgrupo B) se observa que no hubo diferencias significativas en ninguna de las condiciones de muestreo.

Al comparar el genotipo DM en las condiciones I y S/I (subgrupo C), existe una tendencia en las plantas S/I a presentar mayor temperatura foliar en las condiciones C1, E1, C2, si bien no fueron diferencias significativas. Sin embargo, en la condición E2 dicha tendencia se invierte y fueron las plantas I quienes presentaron mayor temperatura foliar. En el genotipo GE también se encontró una tendencia (no variación significativa) a presentar mayores valores de temperatura foliar en plantas S/I respecto a las I, en todas las condiciones de muestreo ensayadas (subgrupo D).

Cuadro 6. Temperatura foliar en los genotipos evaluados sometidos a las dos condiciones de inoculación y en las distintas condiciones de muestreo

A	TF (°C)			
	C1	E1	C2	E2
DMI	23,5 c	27,6 ab	25,1 bc	31,5 a
GE I	24,7 bc	24,6 bc	27,0 bc	25,7 bc
B	C1	E1	C2	E2
DM S/I	26,0 bc	29,9 ab	26,8 abc	28,2 abc
GE S/I	25,2 c	28,6 abc	27,4 abc	30,4 a
C	C1	E1	C2	E2
DMI	23,5 e	27,6 bcd	25,1 de	31,5 a
DM S/I	26,0 cde	29,9 ab	26,8 cd	28,2 bc
D	C1	E1	C2	E2
GE I	24,7 b	24,6 b	27,0 ab	25,7 ab
GE S/I	25,2 b	28,6 ab	27,4 ab	30,4 a

Genotipo Don Mario 6.8i (DM). Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. I y S/I= tratamientos de inoculación y no-inoculación, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$) en cada subgrupo (A, B, C y D).

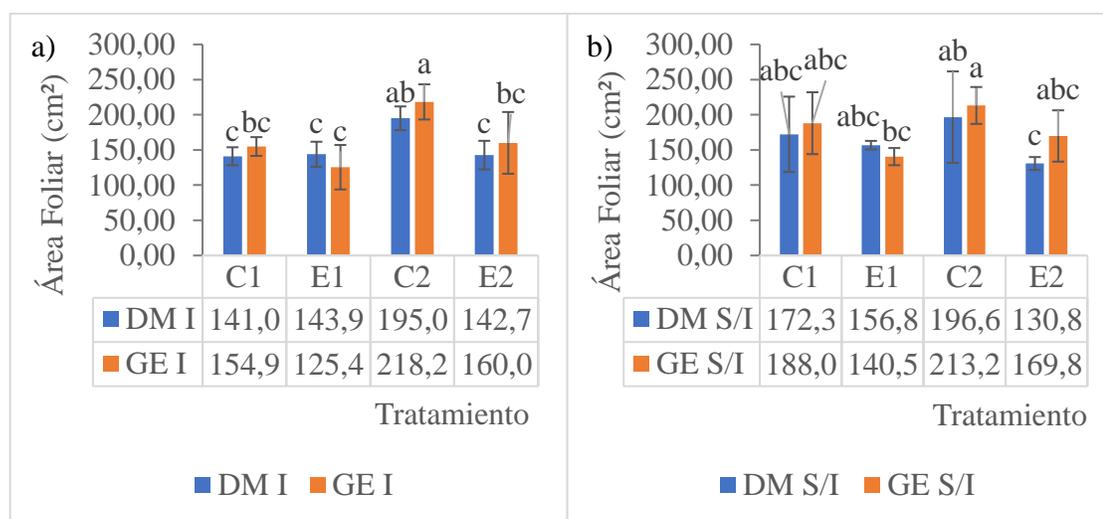
Uno de los parámetros fisiológicos que influye sobre la temperatura foliar es la conductancia estomática, dado que permite que las hojas disipen el calor mediante la evaporación del agua. A su vez, el potencial hídrico foliar indica cuan abiertos o cerrados pueden estar los estomas, ya que los cambios de turgencia pueden deberse a una modificación del potencial hídrico (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En este experimento, el potencial hídrico en plantas I del genotipo DM no presentó diferencias significativas en condición de E2 (Cuadro 5, subgrupo A), sin embargo, la temperatura foliar de las plantas I del genotipo DM se incrementó significativamente en la condición E2. Por tanto, estos resultados no se explicarían únicamente por el potencial hídrico y se deduce que existieron otros factores involucrados en la respuesta de la temperatura foliar al estrés hídrico.

El hecho de que el genotipo DM presente una mayor temperatura foliar en plantas I respecto a las plantas S/I en condición E2 indica que la inoculación provocó un efecto en la temperatura foliar cuando las plantas experimentaron la condición de estrés hídrico moderado-severo. En cambio, el genotipo GE al no presentar diferencias significativas en

la temperatura foliar entre plantas I y S/I en todas las condiciones de muestreo, no mostró un efecto de la inoculación. Al observar el potencial hídrico cuando se compara cada genotipo en condiciones de inoculación y no-inoculación (Cuadro 5, subgrupo C y D) se muestra que no hubo un efecto de la inoculación en ninguno de los genotipos. Dado que en la temperatura foliar el genotipo DM en condición de E2 si presentó efecto de la inoculación, nuevamente se informa que además de la inoculación, hubo otros factores involucrados que influyeron en la temperatura foliar.

4.2.6 Área foliar

El área foliar es producto de la división y expansión celular. Esta última es más sensible a un déficit hídrico y para que sea óptima es fundamental que las células estén turgentes (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Los resultados obtenidos respecto a este parámetro indican que no hubo variaciones significativas entre los genotipos en ninguna de las condiciones de muestreo ensayadas (C1, E1, C2, E2), tanto en plantas I (Figura 13a) como en plantas S/I (Figura 13b). Se observa también que ambos genotipos en condición I presentaron un área foliar significativamente mayor en C2 respecto a las restantes condiciones (Figura 13a). En la condición S/I (Figura 13b) el genotipo DM presentó un área foliar significativamente menor en E2 respecto a C2 y el genotipo GE solo presentó diferencia significativa en el área foliar entre la condición C2 y E1, siendo mayor en C2.

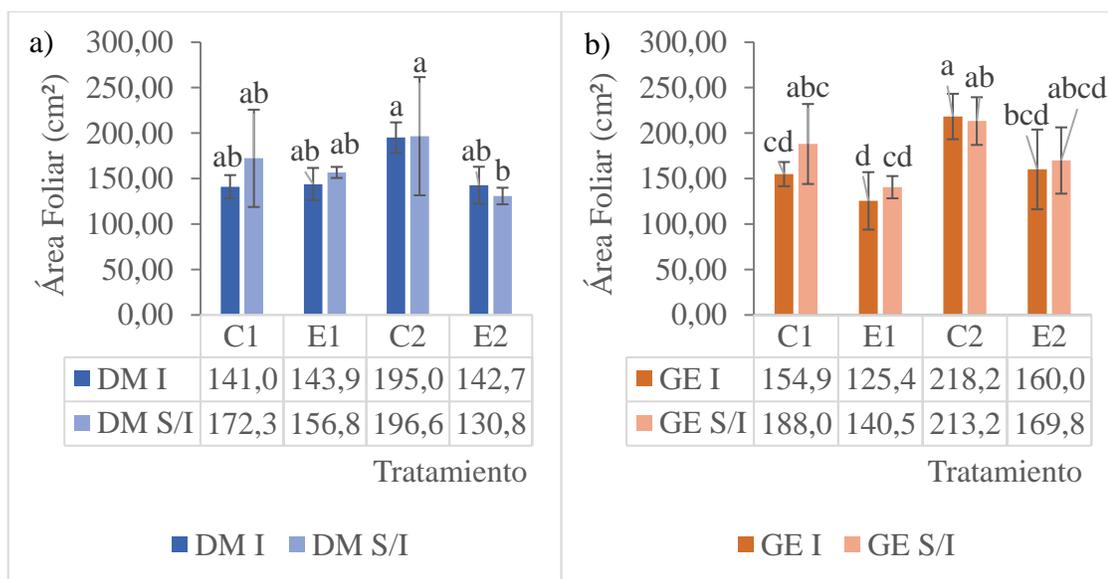


a) plantas inoculadas (I). b) plantas no-inoculadas (S/I). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 13. Área foliar de plantas de los genotipos Don Mario 6.8 i (DM) y Génesis 5601 (GE)

Estos resultados indican que el área foliar no es un parámetro en el cual los genotipos se diferencien en las condiciones de muestreo ensayadas en este trabajo. Por otro lado, el hecho de que ambos genotipos en condiciones I y S/I hayan presentado un área foliar mayor en C2, respecto a las restantes condiciones de muestreo en el caso de las plantas inoculadas, y respecto a las condiciones de déficit hídrico (E1 en genotipo GE y E2 en genotipo DM) en el caso de las plantas no-inoculadas, se explica considerando que las plantas en C2 continuaron creciendo sin ningún tipo de restricción y durante más tiempo que las plantas en C1, y a que es conocido que el estrés por déficit hídrico disminuye la expansión foliar (Liu et al., citados por Manavalan et al., 2009).

En la Figura 14 se presenta la comparación dentro de cada genotipo en condiciones I y S/I con el fin de evaluar el efecto de la inoculación en las distintas condiciones de muestreo ensayadas. Se observa que para el genotipo DM (Figura 14a) así como también para el genotipo GE (Figura 14b), el área foliar no presentó variaciones significativas entre plantas I y S/I en ninguna de las condiciones de muestreo (C1, E1, C2, E2).



a) Genotipo Don Mario 6.8i (DM). b) Genotipo Génesis 5601 (GE). E1 y E2: tratamientos de déficit hídrico a tiempo 1 (50% de la conductancia estomática respecto al control) y a tiempo 2 (conductancia estomática mínima estable), respectivamente; C1 y C2= tratamientos control a tiempo 1 y 2, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$).

Figura 14. Área foliar de plantas inoculadas (I) y no-inoculadas (S/I)

De estos resultados se deduce que no hubo un efecto de la inoculación sobre el área foliar. Este parámetro si bien depende de la cantidad de proteínas, carbohidratos y minerales para formar la hoja, el área foliar está también influenciada por el estado hídrico de la planta, dado que, si las células no están turgentes, no crecen (Azcón-Bieto y Talón, 2008), y no aumenta el área foliar. Las plantas S/I presentaron una mayor concentración de proteínas que las plantas I (Figura 7), pero no alcanzó para generar un aumento significativo del área foliar en ellas (Figura 14). El potencial hídrico no mostró diferencias significativas entre plantas I y S/I (Cuadro 5) y lo mismo ocurrió en el área foliar entre dichas plantas; si bien en E2 existió una tendencia a presentar menor potencial hídrico en las plantas S/I, los días de estrés experimentados no marcaron diferencias en área foliar entre plantas I y S/I. Si la condición de déficit hídrico moderado-severo se hubiese prolongado por más días manteniendo esa diferencia de potencial entre plantas I y S/I, quizás se podría haber notado diferencia significativa entre tratamientos de inoculación.

5. CONCLUSIONES

Existe una respuesta diferencial en condición de déficit hídrico moderado-severo (E2) entre el genotipo tolerante DM y el genotipo sensible GE en la concentración de ureidos y aminoácidos en el tejido nodular.

La concentración de ureidos es el parámetro que resulta más afectado por el déficit hídrico, tanto en hojas como en nódulos.

En los nódulos, el genotipo GE presenta un incremento significativo de la concentración de ureidos en condición de déficit hídrico moderado-severo, que implicaría una autoinhibición de la FBN.

La inoculación afecta el ajuste osmótico en ambos genotipos impidiendo la acumulación de prolina en las hojas en respuesta al déficit hídrico.

La concentración de proteínas y aminoácidos presenta mayor variación como consecuencia de la inoculación que como consecuencia del déficit hídrico.

El área foliar presenta variaciones como consecuencia de la imposición del déficit hídrico, pero no como consecuencia del efecto de la inoculación.

El genotipo GE responde al efecto de la inoculación en una etapa más temprana de estrés (E1), mientras que el genotipo DM responde en mayor grado en una etapa más avanzada de estrés (E2). Esto se evidencia analizando en su conjunto los distintos parámetros evaluados, ya que DM presentó diferencias significativas por efecto de la inoculación en los parámetros concentración de ureidos y aminoácidos de hojas en E1, pero en E2 la prolina y temperatura foliar también mostraron diferencias significativas, en cambio GE en E2 mantuvo el mismo número de parámetros con diferencia significativas que en E1 (concentración ureidos, proteínas y prolina).

6. RESUMEN

La soja constituye el principal cultivo agrícola del Uruguay. Su rendimiento presenta una alta variabilidad asociado a periodos de déficit hídrico. La disponibilidad de agua en primer lugar y de nutrientes en segundo lugar son los factores que más limitan su rendimiento. La soja, como todas las leguminosas, tiene la capacidad de fijar N_2 gracias a una asociación simbiótica con rizobios pertenecientes al género *Bradyrhizobium sp.*, mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). Este proceso es muy sensible al déficit hídrico y a su vez existen otras variables morfofisiológicas que resultan afectadas como consecuencia del estrés. El objetivo de este trabajo consistió en analizar el efecto de la nodulación en las respuestas al déficit hídrico en dos genotipos de soja con respuestas contrastantes a sequía. Para ello se utilizaron los genotipos DM 6.8i (DM) y Génesis 5601 (GE) caracterizados como de respuesta lenta y rápida respectivamente. Se ensayaron 16 tratamientos como resultado de combinar los dos genotipos de soja y las condiciones de inoculación (I) y no inoculación (S/I) en los tiempos E1 (plantas con 50% de la conductancia estomática respecto al control) y E2 (conductancia estomática mínima estable), con sus respectivos controles C1 y C2 mantenidas con riego. El déficit hídrico se impuso en el estadio fenológico V3 y las evaluaciones de los tratamientos se realizaron en el estadio fenológico V3-V4. Los parámetros evaluados fueron el número y peso de nódulos, concentración de ureidos, concentración de proteínas, concentración de aminoácidos, concentración de prolina, potencial hídrico, temperatura foliar y área foliar. Los resultados obtenidos indican que el número y peso de nódulos de ambos genotipos no se afectaron por la imposición del déficit hídrico. El estrés hídrico moderado-severo (E2) incremento la concentración de ureidos en hojas de ambos genotipos, mientras que en los nódulos la concentración de ureidos solo se incrementó en el genotipo GE. También la concentración de aminoácidos en nódulos y el área foliar en plantas inoculadas de ambos genotipos, la concentración de prolina y el potencial hídrico en plantas S/I en el genotipo DM, y la temperatura foliar en plantas inoculadas en el genotipo DM se afectaron en un estrés hídrico moderado-severo. La inoculación provoco efecto en la concentración de ureidos, proteínas, y aminoácidos de ambos genotipos, pero la temperatura foliar solo resultó afectada en el genotipo DM. En cuanto al efecto de la inoculación en las respuestas al déficit hídrico, la concentración de prolina en ambos genotipos y la temperatura foliar en el genotipo DM fueron los parámetros que evidenciaron un efecto de la inoculación en la condición de estrés moderado-severo.

Palabras clave: Soja; Inoculación; Nódulos; Hojas; Déficit hídrico.

7. SUMMARY

Soybean is the main agricultural crop in Uruguay. Its performance presents a high variability associated with periods of water deficit. The availability of water and nutrients are the factors that most limit its yield. Like all legumes, soybean can fix atmospheric N₂ thanks to a symbiotic association with rhizobia belonging to the genus *Bradyrhizobium sp.*, through the process of biological nitrogen fixation (BNF). This process is susceptible to water deficit, and in turn, other morphophysiological variables are affected as a result of stress. The aim of this work was to analyze the effect of nodulation on water deficit responses in two soybean genotypes with contrasting responses to drought. For this, the genotypes DM 6.8i (DM) and Génesis 5601 (GE) characterized as slow and fast responding, respectively, were used. Sixteen treatments were tested as a result of combining the two soybean genotypes and the inoculation (I) and no-inoculation (S/I) conditions at times E1 (plants with 50% of stomatal conductance compared to control) and E2 (minimum stable stomatal conductance), with their respective controls C1 and C2 maintained with irrigation. Irrigation was withdrawn in the phenological stage V3, and the evaluations of the treatments were carried out in the phenological stage V3-V4. The parameters evaluated were the number and weight of nodules, ureide concentration, protein concentration, amino acid concentration, proline concentration, water potential, leaf temperature, and leaf area. The data obtained indicate that the number and weight of both genotypes' nodules were not affected by the imposition of the water deficit. Moderate-severe water stress (E2) increased the ureide concentration in both genotypes' leaves, while in the nodules, the ureide concentration only increased in the GE genotype. Also, the concentration of amino acids in nodules and the leaf area in inoculated plants of both genotypes, the concentration of proline and the water potential in S/I plants in the DM genotype, and the leaf temperature in inoculated plants in the DM genotype was affected in moderate-severe water stress. Inoculation affected the concentration of ureides, proteins, and amino acids of both genotypes, but leaf temperature was only affected in the DM genotype. Regarding the effect of inoculation on the responses to water deficit, the proline concentration in both genotypes and the leaf temperature in the DM genotype were the parameters that evidenced an effect of inoculation on moderate-severe stress conditions.

Keywords: Soybean; Inoculation; Nodules; Leaves; Water deficit.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agbicodo, E. M.; Fatokun, C. A.; Muranaka, S.; Visser, R. G. F.; Linder Van Der, C. G. 2009. Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. (en línea). *Euphytica*. 167:353-370. Consultado 5 nov. 2019. Disponible en <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10681-009-9893-8.pdf>
2. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª.ed. Barcelona, Universidad de Barcelona. 651 p.
3. Benavides-Mendoza, A. 2002. Estrés por factores abióticos. (en línea). In: Benavides Mendoza, A. ed. *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. México, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista. pp. 52-54. Consultado 8 oct.2019. Disponible en <https://es.scribd.com/document/82511460/Ecofisiologia-y-Bioquimica-Del-Estres-de-Las-Plantas>
4. Buttery, B. R.; Park, S. J.; Hume, D. J. 1992. Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes. (en línea). *Canadian Journal of Plant Science*. 72:323-349. Consultado 15 nov. 2019. Disponible en <https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.4141/cjps92-038>
5. Canfalone, A.; Villacampa, Y.; Cortés, M.; Navarro, M. 2002. Crecimiento de soja en función de la temperatura del aire y de la radiación fotosintéticamente activa. (en línea). *Agrociência*. 8(3):185-189. Consultado 19 oct. 2019. Disponible en <http://www2.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v8n3/artigo02.pdf>
6. Capurro, M. C.; Beretta, A.; García, C.; Sawchik, J.; Puppo, L. 2017. Rendimiento de la soja en respuesta a distintas dosis y momentos de riego. (en línea). *Agrociencia (Uruguay)*. 21(2):65-76. Consultado 17 oct. 2019. Disponible en <http://www.scielo.edu.uy/pdf/agro/v21n2/2301-1548-agro-21-02-00065.pdf>

7. Cárdenas-Avila, M. L.; Verde-Star, J.; Maiti, R. K.; Foroughbakhch-P, R.; Gámez-González, H.; Martínez-Lozano, S.; Núñez-González, M. A.; García Díaz, G.; Hernández-Piñeiro, J. L.; Morales-Vallarta, M. R. 2006. Variability in accumulation of free proline on in vitro calli of four bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties exposed to salinity and induced moisture stress. (en línea). *Phyton*. 75:103-108. Consultado 8 oct. 2019. Disponible en http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol75/Cardenas_Avila.pdf
8. Chandrasekar, V.; Sairam, R. K.; Srivastava, G. C. 2000. Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. (en línea). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 185(4):219-227. Consultado 2 set. 2019. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-037x.2000.00430.x>
9. Cicore, P.; Sainz-Rozas, H.; Echeverría, H.; Barbieri, P. 2005. Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en el cultivo de soja en función de la disponibilidad de agua y azufre, y del sistema de labranza. (en línea). *Nota Científica*. 23(2):205-210. Consultado 2 set. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/242163018_Materia_seca_nodular_y_nitrogeno_acumulado_en_el_cultivo_de_soja_en_funcion_de_la_disponibilidad_de_agua_y_azufre_y_del_sistema_de_labranza
10. Costales, D.; Nápoles, M. C.; Falcón, A.; Núñez, M. 2008. Influencia de un análogo de Brasinoesteroide sobre la nodulación de plántulas de soja. (en línea). *Cultivos Tropicales*. 29(2):65-69. Consultado 11 nov. 2019. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v29n2/ctr110208.pdf>
11. Díaz, P.; Gonnet, S.; Irisarri, P.; Milnitsky, F.; Monza, J. s.f. Consideraciones sobre el metabolismo de nitrógeno en plantas. (en línea). Montevideo, Facultad de Agronomía. 9 p. Consultado 4 set. 2020. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Consideraciones%20sobre%20el%20metabolismo%20del%20nitrogeno%20en%20plantas.pdf>
12. Durand, J. L.; Sheehy, J. E.; Minchin, F. R. 1987. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soyabean plants experiencing water deprivation. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 38(187):311-321. Consultado 29 ago. 2019. Disponible en <https://sci-hub.tw/10.1093/jxb/38.2.311>

13. Fioreze, S. L.; Pivetta, L. G.; Fano, A.; Ribeiro-Machado, F.; Guimarães, V. F. 2011. Comportamento de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico intenso em casa de vegetação. (en línea). *Ceres*. 58(3):342-349. Consultado 15 ago. 2019. Disponible en <https://www.scielo.br/pdf/rceres/v58n3/a15v58n3.pdf>
14. FLIR Systems (Forward Looking Infra Red, US). 2016. User's manual FLIR Tools/Tools+. (en línea). Wilsonville, Oregon. 158 p. Consultado 10 set. 2018. Disponible en http://www.nbn.at/fileadmin/user_upload/Vertretungen/FLIR/Software/FlirTools/FLIR_Tools-Tools-Plus_6.0_Manual_t810209-en-us_a4-1702-nbn-mobile.pdf
15. Freixas, J. A.; Reynaldo, I. M.; Nápoles, M. C. 2010. Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *Bradyrhizobium*-soya. (en línea). *Cultivos Tropicales*. 31(2):66-73. Consultado 1 set. 2019. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n2/ctr09210.pdf>
16. _____; Torres de la Noval, W.; Reynaldo-Escobar, I. M.; Nápoles-García, M. C. 2011. Niveles de ureidos en plantas de soya con diferentes inoculantes y sometidas a déficit hídrico. (en línea). *Cultivos Tropicales*. 32(2):35-43. Consultado 10 set. 2019. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362011000200003&script=sci_abstract
17. Gage, D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. (en línea). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(2):280-300. Consultado 15 oct. 2019. Disponible en <https://sci-hub.tw/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
18. Gálvez, L.; González, E. M.; Arrese-Igor, C. 2005. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 56(419):2551–2561. Consultado 9 set. 2019. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16061503/>

19. González, E. M.; Gordon, A. J.; James, C. L.; Arrese-Igor, C. 1995. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 46(10):1515-1523. Consultado 9 set. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/jxb/article-abstract/46/10/1515/476996>
20. Goode, J. E.; Higgs, K. 1973. Water, osmotic and pressure potential relationships in apple leaves. (en línea). *Journal of Horticultural Science*. 48(2):203-215. Consultado 14 nov. 2019. Disponible en <https://sci-hub.tw/10.1080/00221589.1973.11514522>
21. Hufstetler, E. V.; Boerma, H. R.; Carter, T. E.; Earl, H. J. 2007. Genotypic variation for three physiological traits affecting drought tolerance in soybean. (en línea). *Crop Science Society of America*. 47:25-35. Consultado 26 nov. 2019. Disponible en <https://naldc.nal.usda.gov/download/16132/PDF>
22. Input template for content writers. s.f. (en línea). Infflibnet. s.p. Consultado 15 set. 2019. Disponible en http://epgp.infflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S000004BY/P000180/M005852/ET/1513057601N,P_etext.pdf
23. Ito, S.; Kato, T.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Ohyama, T. 2008. The autoregulation of nodulation mechanism is related to leaf development. (en línea). *Plant and Cell Physiology*. 49(1):121-125. Consultado 20 set. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/pcp/article/49/1/121/1903134?view=extract>
24. James, A. T.; Lawn, R. J.; Cooper, M. 2008. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. I. Variation in soybean and wild *Glycine spp.* for epidermal conductance, osmotic potential, and relative water content. (en línea). *Australian Journal of Agricultural Research*. 59:656-669. Consultado 19 oct. 2019. Disponible en <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.934.7774&rep=rep1&type=pdf>

25. Jarma-Orozco, A.; Cardona-Ayala, C.; Araméndiz-Tatis, H. 2012. Efecto del cambio climático sobre la fisiología de las plantas cultivadas: una revisión. (en línea). Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. 15(1):63-76. Consultado 17 oct. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v15n1/v15n1a08.pdf>
26. Jones, K. M.; Kobayashi, K.; Davies, B. W.; Taga, M. E.; Walker, G. C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. (en línea). Nature Reviews Microbiology. 5:619-633. Consultado 9 oct. 2019. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2766523/>
27. King, C. A.; Purcell, L. C. 2005. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. (en línea). Plant Physiology. 137:1389-1396. Consultado 9 set. 2019. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/137/4/1389.full.pdf>
28. _____.; _____. 2006. Genotypic variation for shoot N concentration and response to water deficits in soybean. (en línea). Crop Science Society of America. 46:2396-2402. Consultado 5 nov. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Andy_King8/publication/255642049_Genotypic_Variation_for_Shoot_N_Concentration_and_Response_to_Water_Deficits_in_Soybean/links/5524203b0cf2b123c517353c.pdf
29. Klepper, B. 1968. Diurnal pattern of water potential in woody plants. (en línea). Plant Physiology. 43:1931-1934. Consultado 25 nov. 2019. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/43/12/1931.full.pdf>
30. Ladrera, R.; Marino, D.; Larrainzar, E.; González, E. M.; Arrese-Igor, C. 2007. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. (en línea). Plant Physiology. 145:539-546. Consultado 5 set. 2019. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/145/2/539>

31. Limpens, E.; Mirabella, R.; Fedorova, E.; Franken, C.; Franssen, H.; Bisseling, T.; Geurts, R. 2005. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume roots is controlled by DMI2. (en línea). *Plant Biology*. 102(29): 10375-10380. Consultado 4 set. 2019. Disponible en <https://www.pnas.org/content/pnas/102/29/10375.full.pdf>
32. Liu, F.; Andersen, M. N.; Jensen, C. R. 2003. Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. (en línea). *Functional Plant Biology*. 30:271-280. Consultado 23 oct. 2019. Disponible en <https://scihub.tw/10.1071/FP02185>
33. Lobato, A. K. S.; Santos-Filho, B. G.; Costa, R. C. L.; Oliveira-Neto, C. F.; Meirelles, A. C. S.; Cruz, F. J. R.; Alves, G. A. R.; Neves, H. K. B.; Pita, J. D.; Lopes, M. J. S.; Freitas, J. M. N.; Monteiro, B. S.; Ferreira-Ramos, R. 2008. Physiological and biochemical changes in soybean (*Glycine max*) plants under progressive water deficit during the vegetative phase. (en línea). *Agricultural Journal*. 3(5):327-333. Consultado 5 set. 2019. Disponible en <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/aj/2008/327-333.pdf>
34. Locoli, G. A.; Gómez, M. A. 2013. Nodulación y fertilización en soja. (en línea). *Revista de la Asociación de Ganaderos y Agricultores*. jul. 2014:83-86. Consultado 26 set. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/263927310_Nodulacion_y_fertilizacion_en_soja
35. Lodeiro, A. R. 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium spp.* (en línea). *Revista Argentina de Microbiología*. 47(3):261-273. Consultado 15 set. 2019. Disponible en <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0325754115000899?token=942A852FB19408CC10C35BFC5F944E18BA84461BFE51D4D916B0B84D3508997CBCDD4F62BA10F5242A9B56C999D59050>
36. Lukaszewski, K. M.; Blevins, D. G.; Randall, D. D. 1992. Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese dependent allantoate amidohydrolase. (en línea). *Plant Physiology*. 99:1670-1676. Consultado 10 may. 2020. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/99/4/1670.full.pdf>

37. Manavalan, L. P.; Guttikonda, S. K.; Phan-Tran, L. S.; Nguyen, H. T. 2009. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. (en línea). *Plant and Cell Physiology*. 50(7):1260-1276. Consultado 17 oct. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/pcp/article/50/7/1260/1889305>
38. Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. (en línea). *Revista UDO Agrícola*. 4(1):1-20. Consultado 18 abr. 2018. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221548>
39. Medrano, H.; Bota, J.; Cifre, J.; Flexas, J.; Ribas-Carbó, M.; Gulías, J. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. (en línea). *Investigaciones Geográficas*. no. 43:63-84. Consultado 20 nov. 2019. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=17604304>
40. Moreno, L. P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. (en línea). *Agronomía Colombiana*. 27(2):179-191. Consultado 27 ago. 2019. Disponible en <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11131/11799>
41. Morgan, J. A. W.; Bending, G. D.; White, P. J. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 56(417):1729-1739. Consultado 18 ago. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/jxb/article/56/417/1729/484470>
42. Ohshima, T.; Tewari, K.; Abdel-Latif, S.; Ruamrungsri, S.; Komiyama, S.; Ito, S.; Yamazaki, A.; Sueyoshi, K.; Ohtake, N. 2004. Direct analysis of ¹⁵N abundance of kjeldahl digested solution by emission spectrometry. (en línea). *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Niigata University*. 57(1):33-40. Consultado 2 oct. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Takuji_Ohshima/publication/37359571_Direct_Analysis_of_15N_Abundance_of_Kjeldahl_Digested_Solution_by_Emission_Spectrometry/links/0912f4fb1e42e24f6a000000.pdf

43. Peticari, A. 2018. ¿La inoculación de soja aún mantiene vigencia? (en línea). Revista Técnica Soja 2018. set. 2018:84-89. Consultado 10 set. 2020. Disponible en <http://aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2018/10/Revista-Tecnica-SOJA-2018.pdf>
44. Pietragalla, J. 2013. Características de la temperatura del dosel, conductancia estomática y relaciones hídricas. (en línea). In: Pask, A.; Pietragalla, J.; Mullan, D.; Chávez, P.; Reynolds, M. eds. Fitomejoramiento fisiológico II: una guía de campo para la caracterización fenotípica de trigo. México, D. F., Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. pp. 10-14. Consultado 26 set. 2019. Disponible en <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/3390/97924.pdf?sequence=7&isAllowed=y>
45. Purcell, L. C.; de Silva, M.; King, C. A.; Kim, W. H. 1997. Biomass accumulation and allocation in soybean associated with genotypic differences in tolerance of nitrogen fixation to water deficits. (en línea). Plant and Soil. 196:101-113. Consultado 5 nov. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Andy_King8/publication/227012750_Biomass_accumulation_and_allocation_in_soybean_associated_with_genotypic_differences_in_tolerance_of_nitrogen_fixation_to_water_deficits/links/5674356d08ae502c99c7812d/Biomass-accumulation-and-allocation-in-soybean-associated-with-genotypic-differences-in-tolerance-of-nitrogen-fixation-to-water-deficits.pdf
46. _____; Serraj, R.; Sinclair, T. R.; De, A. 2004. Soybean N₂ fixation estimates, ureide concentration and yield responses to drought. (en línea). Crop Science Society of America. 44:484-492. Consultado 10 may. 2020. Disponible en <https://core.ac.uk/download/pdf/211013231.pdf>
47. Reynaldo, I. M.; Pérez, I.; Jerez, E.; Dell'Amico, J. M. 2002. Efectos del estrés hídrico en la asimilación del nitrógeno en plantas de tomate cv INCA 9-1. (en línea). Cultivos Tropicales. 23(2):47-50. Consultado 21 oct. 2019. Disponible en https://pdfs.semanticscholar.org/eb99/2f4a807de958146b69dae63241bff6d1959e.pdf?_ga=2.20412984.1432749771.1590795580-1606474185.1569526158

48. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Yves-Tinevez, J.; James-White, D.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. 2012. Fiji: an open - source platform for biological - image analysis. (en línea). *Nature Methods*. 9(7):676-682. Consultado 20 ago. 2018. Disponible en DOI: 10.1038/nmeth.2019
49. Serraj, R.; Sinclair, T. R.; Allen, L. H. 1998. Soybean nodulation and N₂ fixation response to drought under carbon dioxide enrichment. (en línea). *Plant, Cell and Environment*. 21:491-500. Consultado 20 nov. 2019. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-3040.1998.00298.x>
50. _____.; _____.; Purcell, L. C. 1999. Symbiotic N₂ fixation response to drought. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 50(331):143-155. Consultado 20 nov. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/240590170_Symbiotic_N2_fixation_response_to_drought
51. Sinclair, T. R.; Ludlow, M. M. 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. (en línea). *Australian Journal of Plant Physiology*. 13:329-341. Consultado 22 ago. 2019. Disponible en <https://sci-hub.tw/10.1071/PP9860329>
52. Sivaramakrishnan, S.; Patell, V. Z.; Flower, D. J.; Peacock, J. M. 1988. Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress. (en línea). *Physiologia Plantarum*. 74:418-426. Consultado 8 oct. 2019. Disponible en http://oar.icrisat.org/7129/1/Physiologia%20Plantarum_74_3_418-426_1988.pdf
53. Smirnoff, N.; Cumbes, Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. (en línea). *Phytochemistry*. 28(4):1057-1060. Consultado 8 oct. 2019. Disponible en [https://sci-hub.tw/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://sci-hub.tw/10.1016/0031-9422(89)80182-7)

54. Souleimanov, A.; Prithiviraj, B.; Smith, D. L. 2002. The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. (en línea). Journal of Experimental Botany. 53(376):1929-1934. Consultado 23 set. 2019. Disponible en https://pdfs.semanticscholar.org/2b23/499a07a0969c5f73658cdccdaecc31e1c67a.pdf?_ga=2.133134283.455668185.1590889697-1606474185.1569526158
55. Squeo, F. A.; León, M. F. 2007. Transpiración. (en línea). In: Squeo, F. A.; Cardemil, L. eds. Fisiología vegetal. La Serena, Chile, Universidad de La Serena. pp. 67-84. Consultado 25 set. 2019. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Transpiracion.pdf>
56. Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. (en línea). 3^a. ed. Castelló de la Plana, Universidad Jaume I. 320 p. Consultado 22 oct. 2019. Disponible en <https://fisiologiavegetalundec.files.wordpress.com/2018/04/fv-taiz-zeiger-vol-i.pdf>
57. Williams, P.; Sicardi de Mallorca, M. 1984. Effect of osmotically induced leaf moisture stress on nodulation and nitrogenase activity of *Glycine max*. (en línea). Plant and Soil. 80:267-283. Consultado 5 nov. 2019. Disponible en <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02161183.pdf>