



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

Control de la fijación de nitrógeno atmosférico en habas (*Vicia faba*)

MEMORIA DE TÍTULO

MARÍA ELENA CORNEJO MUÑOZ

TALCA, CHILE

2018

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Control de la fijación de nitrógeno atmosférico en habas (*Vicia faba*)

Por
MARÍA ELENA CORNEJO MUÑOZ
MEMORIA DE TÍTULO

**Presentada a la Universidad de Talca como parte de los requisitos para optar al
título de**

INGENIERO AGRÓNOMO

TALCA, 2018

AGRADECIMIENTOS

Durante estos seis años de mi carrera entregué un sinnúmero de informes, unos de mejor calidad que otros, si hoy comparo informes de primero de universidad, notaría la inmadurez con la que entré en aquellos años, con solo 18 años. Al escribir esta memoria sería el último informe que escribiré en la etapa de pregrado de la carrera, no cierro las puertas a seguir mejorando y estudiando, quien sabe poder seguir con un magister en unos años más.

Durante esta linda etapa de mi vida, me han acompañado grandes personas incondicionalmente, los pilares de mi vida: mi mamá Elvira Muñoz y mi papá Agustín Cornejo, gracias a todos los incentivos por querer que fuera alguien más y así a costa de todos sus esfuerzos pude ingresar a la universidad.

Agradecer a mi pololo Javier Molina quien me contuvo cada vez que mis ánimos estaban bajos, o cuando colapsaba en temporadas de pruebas o trabajos, por acompañarme cada día que necesité su compañía y por estar siempre presente.

A mis hermanas Mónica y María José que cada fin de semana me alegraban cuando estaba estudiando, siempre dándome ánimo que era capaz de eso y mucho más.

A mi profesor guía, Ricardo Cabeza, por el compromiso y la responsabilidad con que me atendió cada vez en su oficina, con la mejor disposición, y por todos los conocimientos que me brindó durante este semestre de escritura de la memoria de título.

A la profesora Ana María Méndez quien fue mi profesora informante, quien estuvo atenta y pendiente para lo que fuera necesario, siempre con la mejor disposición.

Y a todos los profesores que trabajan en la Escuela de Agronomía, que aprendí mucho, gracias por exigirnos de la forma que lo hacen que quizás en el momento uno no lo valora, pero, que con el tiempo se da cuenta que cada exigencia, reto, malas notas, reprobación de ramos, valen la pena, de cada experiencia se aprende algo, me voy muy agradecida de esta universidad y de esta carrera que tanto me enseñó. Si volviera a tener 17 años y tuviera que elegir una carrera, sin duda sería Ingeniería Agronómica en la Universidad de Talca.

Aprobación

Ing. Agrónomo Dr. Ricardo Cabeza Pérez

Profesor de Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca

Ing. Agrónoma Dr. Ana María Méndez

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca

Fecha de presentación de Memoria de Título: 9 de enero de 2019

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la dinámica de la fijación de N_2 en plantas de habas (*Vicia faba*) con alteraciones en la demanda de N. Para ello se realizaron dos ensayos en los cuales se manipuló la demanda de N de la planta. El primer ensayo se realizó durante los meses de noviembre a diciembre de 2017 y el otro en los meses de mayo a junio de 2018, en ambos casos con los mismos tratamientos: control, escisión de un tercio de los folíolos y oscurecimiento de un tercio de los folíolos de la planta. Las variables medidas fueron: concentración de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) en la planta, Materia Seca (MS) producida y la actividad de los nódulos mediante la evolución de la respiración desde las raíces y nódulos. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de los nódulos se ajusta a la demanda de N de la planta. Para ello, la planta controla la cantidad de N_2 fijado y mantiene una concentración relativamente constante de N en la parte aérea. La manipulación del follaje mostró que la alteración del requerimiento de N tiene un efecto rápido sobre la actividad de los nódulos y permite a la planta adaptarse a situaciones de estrés y cambio en el requerimiento de N.

ABSTRACT

The goal of the current work was to determine the N₂ fixation dynamics of broad beans (*Vicia faba*) with alterations of N demand. To reach this goal, two experiments were carried out in which we modified the plant N demand by changing the number of leaves or by darkening some leaves. The first experiment was conducted during the period November-December of 2017, and the second in May-June of 2018, in both years we used the same treatments: control plants (without any alteration), excision of a third of the leaflets or darkening a third of the plant leaflets. The variables measured were: Nitrogen (N) and Phosphorus (P) concentration of the plant, dry matter yield and the nodule activity by mean of measuring the CO₂ evolution from roots and nodules. The results showed that the nodule activity is adjusted to the N demand of the plant. For this, the plant controls the amount of N₂ fixed and maintains a relatively constant concentration of N in the leaves. The N requirement of the shoot has a rapid effect on the nodule activity, and it allows the plant to adapt fatly to situations of stress and N demand.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo general	3
1.3 Objetivos específicos	3
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Importancia del nitrógeno (N) en las plantas.	4
2.2 Disponibilidad del N en la atmósfera.....	4
2.3 Fijación abiótica de nitrógeno por el método Haber-Bosch.....	4
2.5 Ciclo del N.	5
2.4 Fijación biológica del N ₂	6
3. MATERIALES Y METODOS	9
3.1 Experimento 1.....	9
3.1.1 Descripción del ensayo.	9
3.1.2 Condiciones de crecimiento.....	9
3.1.3 Manipulación de la demanda de nitrógeno.....	9
3.1.4 Caracterización de la fijación de N ₂	10
3.2 Experimento 2.....	11
3.2.1 Descripción del ensayo.	11
3.2.2 Condiciones de crecimiento.....	11
3.2.3 Manipulación de la demanda de nitrógeno.....	12
3.2.4 Contenedor de la planta.	12
3.2.5 Medición de gases.	13

4. RESULTADOS	16
4.1 Efecto de la manipulación del follaje en habas sobre la concentración de N.	16
4.2 Evaluación de la respiración en plantas de habas.	20
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIÓN	26
7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE CUADROS

CAPITULO IV

Cuadro 1. Nitrógeno (N) total absorbido por las plantas de habas durante el experimento.....	19
Cuadro 2. Respiración (ppm CO ₂ h planta ⁻¹).....	22

ÌNCIDE DE FIGURAS

CAPITULO II

- Figura 1.** Esquema sistemático demostrando la biosíntesis de los nódulos de las leguminosas.....7

CAPITULO III

- Figura 2.** Recipiente contenedor de la planta: (a) entrada flujo de aire; (b) tapa recipiente; (c) tapón de goma; (d) sistema radical; (e) sustrato; (f) parte aérea de la planta; (g) salida de flujo de aire; (*) sellos de plasticina.....13

- Figura 3.** Esquema sistema de medición: (a) bomba de aire; (b) regulador de flujo manual; (c) eliminador de humedad de sulfato de calcio; (d) analizador de CO₂ (Qubit Systems, Modelo Q-S151); (e) regulador de flujo digital; (f) conjunto de plantas en sus recipientes; (g) sistema de iluminación; (h) ventiladores.....14

CAPITULO IV

- Figura 4.** Promedio (\pm EE) de la concentración de Nitrógeno en los folíolos producto de la defoliación y tapadas. **(a)** es el experimento 1 en el cual tapadas corresponde a los folíolos que se cubrieron con aluminio, y **(b)** al experimento 2 en el que tapadas corresponde a los folíolos que se cubrieron con aluminio y además se agregó etileno. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.01$) entre sitios, de acuerdo al test de LSD.....16

- Figura 5.** Folíolos analizadas en la Figura 3.....17

- Figura 6.** Promedio \pm error estándar para materia seca producida en: a) el experimento 1 y, b) en el experimento 2. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).....18

- Figura 7.** Promedio \pm error estándar para la concentración de nitrógeno (N) en; parte aérea, raíces y nódulos. (a) Corresponde al experimento 1 y, (b) al experimento 2. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD). Cont.: Control; Def.: Defoliadas; y, Tap.: Tapadas.....19
- Figura 8.** Promedio \pm error estándar de la concentración de fósforo (P) en; parte aérea (hojas y tallo), raíces y nódulos. a) Corresponde al experimento 1, y b) al experimento 2. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).....20
- Figura 9.** Evolución de la respiración de las plantas de Habas (*Vicia faba*) a través del tiempo. Valores corresponden a la media de las tres repeticiones por tratamiento.....21

1. INTRODUCCIÓN

La disminución de los terrenos potencialmente productivos se ha reducido debido a un alto crecimiento de las zonas urbanas, lo que implica a los agricultores producir más en superficies menores, con uso intensivo de fertilizantes nitrogenados, lo cual eleva los costos de producción (Urzúa, 2005). Chile cuenta con un porcentaje no menor de pequeños agricultores que se ven obligados a mejorar sus producciones para obtener un mayor ingreso por producto, sin embargo, estos pequeños agricultores poseen baja capacidad económica y el manejo en la fertilización suele ser deficiente. Por otra parte, en los sistemas de producción limpia u orgánica se debe tener mayor control de las labores junto a alternativas a los fertilizantes inorgánicos.

El uso de leguminosas en rotación es una alternativa para los pequeños agricultores y también para aquellos que se dedican a la agricultura orgánica, debido a que estas poseen la capacidad de realizar fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico (N_2) en cantidades que puede llegar a satisfacer las necesidades del cultivo, reduciendo además los efectos negativos que conlleva el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Newton, 2000).

El N_2 está presente en la atmósfera con una concentración de aproximadamente 78%, 21% de oxígeno, 1% otros, sin embargo, este es inerte y no puede ser utilizado directamente por las plantas, solo es incorporado en los sistemas terrestres mediante procesos de reducción, ya sean biológicos o industriales (Fernández-Pascual *et al.*, 2002). Del total de N_2 fijado en la naturaleza el 87% es fijado por microorganismos, ya sea de vida libre o en simbiosis con plantas y un 13% se fija por oxidación en presencia de alta energía, como en el caso de descargas eléctricas naturales (rayos) en donde, el N_2 se oxida a ácido nítrico en presencia de O_2 y vapor de agua (Aparicio-Tejo *et al.*, 2008).

La simbiosis entre bacterias del género *Rhizobium* y las leguminosas representa la mayor entrada de N_2 en los ecosistemas terrestres. La reducción del N_2 a amonio (NH_4^+) en las leguminosas, se lleva a cabo en unas estructuras radiculares denominadas nódulos.

Las plantas reciben NH_4^+ a cambio de fotoasimilados y de un ambiente bajo en oxígeno, el cual es ideal para la reducción del N_2 . Para que se genere esta asociación, existe un reconocimiento entre la planta y la bacteria, el cual es altamente específico, que comienza con un intercambio químico entre los simbioses, principalmente mediante la exudación de flavonoides e isoflavonoides por parte de la planta (Mus *et al.*, 2016). Una vez que los simbioses han hecho contacto, la infección comienza mediante la penetración de la célula de algún pelo radicular (Sprent and James, 2007). Una vez dentro de la célula, la bacteria experimenta una serie de cambios fisiológicos y morfológicos, asociados a la producción de un complejo enzimático, la nitrogenasa, la cual es capaz de reducir el N_2 a amonio (NH_4).

La regulación de la fijación de N_2 está controlada aparentemente por el macro simbiote, la planta, mediante algún tipo de señalización que involucra la condición o el estatus de N en la parte aérea de la planta. Estudios previos indican que existe un tránsito de moléculas que contienen N entre la parte aérea y el nódulo (Fischinger *et al.*, 2006). Debido al costo energético de la fijación de N_2 para la planta, esta debe ser capaz de controlarla, especialmente en momentos de variación de la demanda de N. Por ejemplo, cuando existe suministro de N momentáneo en el suelo, que queda disponible para ser absorbido por la planta. Así, entender el funcionamiento de los nódulos en plantas con diferentes demandas de N es fundamental para mejorar el rendimiento de la fijación de N_2 en leguminosas.

En base a lo planteado anteriormente, se postulan para este trabajo las siguientes hipótesis y objetivos:

1.1 Hipótesis

La fijación de N₂ en plantas de habas (*Vicia faba*) disminuye en respuesta a una menor demanda de N de la parte aérea de la planta.

1.2 Objetivo general

Estudiar la dinámica de la fijación de N₂ en plantas de habas con alteraciones en la demanda de N.

1.3 Objetivos específicos

- I. Analizar la concentración de N y P en plantas de habas defoliadas o con cubrimiento parcial de los folíolos.
- II. Determinar la materia seca producida en plantas de habas defoliadas o con cubrimiento parcial de los folíolos.
- III. Medir la actividad de los nódulos (mediante respiración del sistema radical) en plantas defoliadas o con cubrimiento parcial de los folíolos.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia del nitrógeno (N) en las plantas.

El nitrógeno (N) es un macronutriente esencial para el desarrollo de las plantas, el cual debe ser suministrado en grandes cantidades si el suelo presenta deficiencias. Los suelos pueden llegar a ser pobres o deficientes en nutrientes debido a las extracciones que realizan los cultivos a lo largo de los años, o cuando los requerimientos de rendimiento son muy elevados, lo que conlleva a una mayor extracción (FAO, 2002).

El N es absorbido desde la solución del suelo en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+). Se combina en la planta con componentes producidos por el metabolismo de carbohidratos para formar aminoácidos y proteínas. Es el constituyente básico de aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares aminadas y los polímeros que estas moléculas forman (Marchner, 2011). Está involucrado en todos los procesos principales de las plantas y relacionado directamente con el rendimiento de los cultivos (del Pozo et al., 2002).

2.2 Disponibilidad del N en la atmósfera.

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de este elemento accesible en la biosfera, presente prácticamente de manera ilimitada, representando un 78% de la composición atmosférica (Aparicio-Tejo, 2008). La fijación de N_2 global se estima en 275 millones de toneladas al año, de las cuales 30 millones de toneladas se fijan por causas naturales (descargas eléctricas, erupciones volcánicas), 70 millones de toneladas mediante el proceso industrial de Haber-Bosch, 35 millones de toneladas mediante fijación con organismos de vida libre y 140 millones de toneladas mediante fijación simbiótica (Fernández-Pascual *et al.*, 2002).

2.3 Fijación abiótica de nitrógeno por el método Haber-Bosch.

Este método consiste en la formación de amonio (NH_4^+) en condiciones de alta temperatura y presión (500°C y 200 atm, respectivamente). Como fuente de hidrógeno se

utiliza normalmente metano (CH_4) en presencia de un catalizador metálico, por ejemplo, níquel. En la reacción de Haber-Bosch, el amonio se oxida hasta ácido nítrico (HNO_3) para formar finalmente nitrato amónico, producto final que es utilizado como explosivo o fertilizante (Leigh, 2002).

2.5 Ciclo del N.

Como se mencionó anteriormente, la principal fuente de N se encuentra en la atmósfera, en forma de N_2 . Para que el N entre a los sistemas terrestres, el elemento debe ser reducido, ya sea por organismos de vida libre o en simbiosis. Una vez que el N ha sido incorporado en moléculas orgánicas, este puede ser mineralizado en el suelo, para luego ser transformado en iones de N que son disponibles para las plantas (Havlin *et al.*, 1993). El N presente en el suelo se encuentra principalmente almacenado en la materia orgánica del suelo (MOS) (Stanley, 1984). Es desde allí que el N orgánico se mineraliza, para ser transformado, principalmente en amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) (Havlin *et al.*, 1993). Tanto el NH_4^+ como el NO_3^- son disponibles para las plantas, ambos son asimilados para formar moléculas orgánicas que contienen N, y que son necesarias para el crecimiento. Por un lado, la asimilación del NO_3^- comienza con la absorción del ion por las raíces, proceso que es limitado por bajas T° . El NO_3^- es transportado al interior de la célula en contra del gradiente electro-químico ayudado por simportadores y acoplado al transporte de protones (H^+) (Russell *et al.*, 2013). Una vez que el NO_3^- ha sido absorbido por las raíces de las plantas, este es reducido a amonio, mediante una secuencia de reacciones enzimáticas con gasto de poder reductor y energía (Marschner *et al.*, 2011). Por otra parte, la absorción de NH_4^+ es realizada por canales, los cuales actúan en favor del gradiente electro-químico de la célula, es decir, ocurre como una difusión facilitada (Russell *et al.*, 2013). La asimilación del NH_4^+ ocurre principalmente en las raíces cuando los niveles de NH_4^+ son bajos, pero cuando hay un exceso del elemento, la planta no es capaz de asimilarlo todo en las raíces y comienza una asimilación, previo transporte, en la parte aérea (en el cloroplasto, en el estroma) (Maldonado, 2006). La reducción del NO_3^- , resulta en NH_4^+ , el cual es finalmente incorporado en moléculas de glutamina (Marschner *et al.*, 2011).

La fijación de N_2 es un componente esencial del ciclo del N, especialmente en sistemas agrícolas sustentables. La fijación simbiótica de N_2 será expuesta en el siguiente punto.

2.4 Fijación biológica del N_2 .

La fijación biológica del N_2 atmosférico es un proceso que ocurre a T° ambiente y presión parcial de 0,78 atm. El proceso es realizado por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales en simbiosis forman nódulos en las raíces de las leguminosas. La reducción del N_2 a amonio (NH_4^+) es realizada por la enzima *nitrogenasa* (Lehninger, 1970). Las *nitrogenasas* son enzimas *oxidoreductasas* que catalizan reacciones de óxido-reducción, y que en el caso específico del N_2 , este es reducido a amonio, el cual es fácilmente asimilable para las plantas (Ruiz *et al.*, 2007). La fijación biológica del N_2 es una alternativa económica y ecológicamente limpia.

La fijación del N_2 del aire es catalizado por la *nitrogenasa*, esta reacción requiere un donador de electrones y de una concentración muy baja de oxígeno (O_2) y la energía requerida para este proceso proviene de la fotosíntesis (Figura 1) (Marschner *et al.*, 2011). El compuesto carbonado más importante que proporciona la energía requerida para la fijación de N_2 , es la sacarosa, la cual es transportada desde la parte aérea, vía floema, a los nódulos. En las células nodulares, la sacarosa se hidroliza a monosacárido por la enzima *invertasa*, produciendo glucosa y fructosa. Por otro lado, la *sacarosa sintasa* cataliza la reacción reversible. Los monosacáridos son hidrolizados por la ruta glucolítica hasta obtener fosfoenolpiruvato, en donde la enzima *fosfoenolpiruvato carboxilasa* cataliza la incorporación del CO_2 respiratorio, para formar oxalacetato. Paralelamente, oxalacetato es reducido a malato por la enzima *malato deshidrogenasa*. Finalmente, el malato es utilizado como fuente de C y energía por los bacteroides. En la mitocondria el malato es utilizado para la obtención de energía o contribuir en la asimilación del amonio en el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (Marschner *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2013; Udvardi and Day, 1997). Una vez incorporados, los ácidos carboxílicos son oxidados durante la respiración del bacteroide, proporcionando ATP y poder reductor para el funcionamiento de la *nitrogenasa* (Udvardi and Day, 1997).

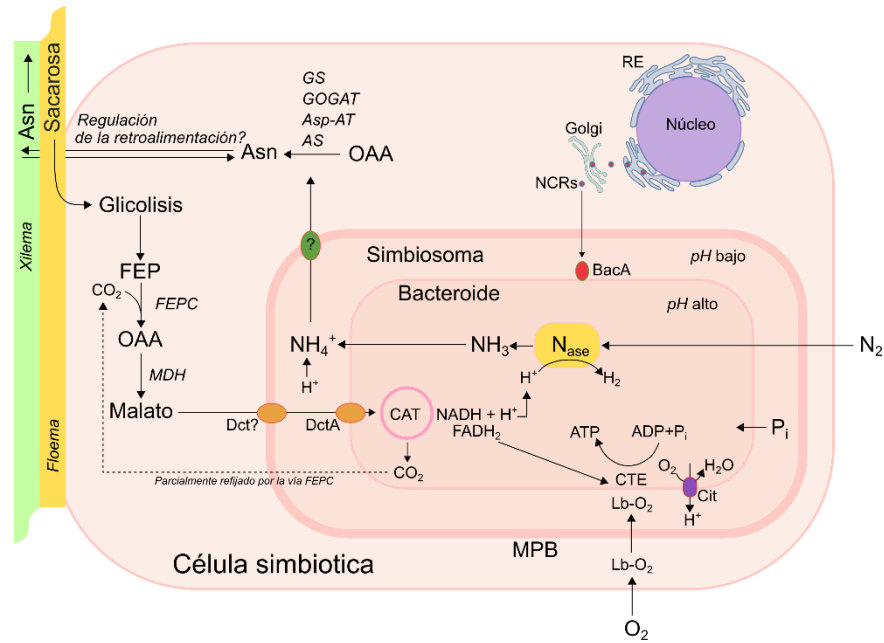


Figura 1. Biosíntesis de los nódulos de crecimiento indeterminado. RE: retículo endoplasmático, BPM: membrana del peribacterioide, AS: asparagina sintasa, OAA: oxalacetato, CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos, Nasa: nitrogenasa, GOGAT: glutamina 2-oxoglutarato amino transferasa, GS: glutamina sintasa, Lb: leghemoglobina, FEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa, CTE: cadena transportadora de electrones, NCRs: Nodule Cysteine-Rich Peptides.

2.5 Regulación en la fijación de N₂.

Fischinger *et al.* (2006), estudiaron la removilización del N y si este está involucrado en provocar la disminución de la fijación de N₂ durante el envainado en *Phaseolus vulgaris*, como también estudiar si el N removilizado es capaz de llegar a los nódulos. La metodología utilizada fue oscurecer y extirpar el 50% de las hojas inferiores, permitiendo una removilización de nutrientes desde las hojas oscurecidas. Además, en el periodo vegetativo se marcaron tres hojas inferiores por planta con ¹⁵NH₄NO₃, antes de oscurecerlas. En el estudio realizado por Fischinger *et al.* (2006), se concluyó que el oscurecimiento de hojas durante el período de crecimiento vegetativo induce la removilización de N, y reduce la tasa de fijación de N₂ y el crecimiento. Por otra parte, en las plantas con escisión de hojas en crecimiento reproductivo, la fijación de N₂ mejoró.

Pero, aun así, la concentración de N en toda la planta en ambos tratamientos, permaneció constante. Aparentemente, la planta es capaz de regular la cantidad de N que demanda, dependiendo de la concentración de N en la parte aérea. Existe evidencia que respalda esta idea. Por ejemplo, Schubert (1995) indica que las plantas, aunque se encuentren en ambientes estresantes, son capaces de mantener una concentración constante de N en las hojas, lo cual indica, que la planta regula la cantidad de N_2 fijado en los nódulos. Por esto, una modificación en el área foliar debería provocar una regulación de la fijación de N_2 por la disminución del área fotosintéticamente activa (Tang, 1986).

Por otra parte, la luz juega un rol importante en la fijación de N_2 , ya que esta aporta la energía necesaria para el funcionamiento del proceso de fijación, por lo que la disminución de la intensidad de la luz provoca una menor actividad fotosintética, afectando directamente el proceso de fijación. Sin embargo, ensayos indican que la actividad de los nódulos, no se encuentra limitada por la cantidad de sacarosa exportada (Murphy, 1986).

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la fijación de N_2 en habas dependiendo de la cantidad de N que la planta demanda. Para esto se ha diseñado un experimento de manipulación del follaje, el cual tiene como principal objetivo, alterar la cantidad de N que la planta requiere, ya sea por la movilización de nutrientes desde hojas senescente o debido a la alteración fuente/sumidero mediante la escisión de hojas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Experimento 1.

3.1.1 Descripción del ensayo.

Se realizó un experimento para evaluar el crecimiento de habas (*Vicia faba*) en condiciones de invernadero y el efecto que posee la manipulación de la relación fuente/sumidero sobre la fijación de nitrógeno (N₂). Para evaluar este efecto se realizó un ensayo en invernadero con plantas creciendo en macetas, en las cuales se manipulo el follaje para inducir un cambio en la necesidad de nitrógeno (N) en la planta. El efecto del cambio en la demanda de N en la parte aérea debería alterar la fijación de N₂.

El experimento se llevó a cabo durante la temporada 2017 en los invernaderos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca, ubicada en Avenida Lircay, Talca, VII Región.

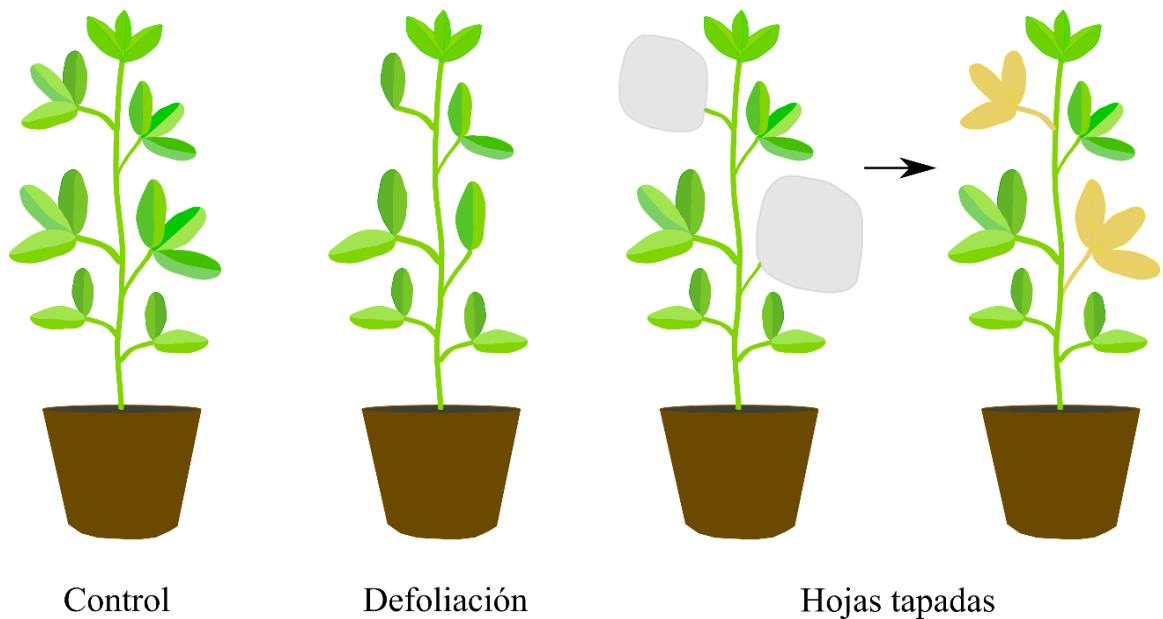
3.1.2 Condiciones de crecimiento.

Se sembraron 2 semillas de habas (variedad Luz de Otoño) por maceta (28 macetas en total de 3 L), en un sustrato de arena, perlita y turba a una relación de volumen de 1:1:1. Las plantas fueron regadas a capacidad de campo y fertilizadas con una solución “Hoagland” sin N para favorecer la fijación de N₂ en los nódulos de las plantas. Las macetas fueron mantenidas en un sombreadero (sin control de temperatura) sobre mesas metálicas durante los meses de noviembre (temperatura promedio 17°C) a diciembre (temperatura promedio 21°C) de 2017. Después de 11 días desde la siembra, con el 100% de germinación de las plantas y una altura promedio de 5 cm se procedió a inocular con 2 mL por planta con una suspensión de bacterias específicas para el desarrollo de nódulos en habas, *Rhizobium leguminosarum*.

3.1.3 Manipulación de la demanda de nitrógeno.

Para manipular la cantidad de N_2 que fijan los nódulos de las raíces, se alteró la cantidad de folíolos de las plantas. Esto último se hizo mediante la disminución del follaje o mediante el tapado total de algunos de los folíolos. La disminución del follaje se realizó mediante la eliminación de folíolos. Para ello se removieron 3 folíolos por planta durante el crecimiento activo. Los folíolos removidas se ubicaban en la parte media de la planta (tratamiento 1).

En un segundo tratamiento, los folíolos con crecimiento activo fueron tapadas con papel de aluminio disminuyendo el área fotosintética para evitar actividad fisiológica del folíolo (Tratamiento 2). Ambos tratamientos tuvieron por objetivo, disminuir la cantidad de N demandado por la planta. Los tratamientos fueron comparados en relación a plantas sin intervención, situación control. Cada tratamiento fue realizado con nueve repeticiones.



3.1.4 Caracterización de la fijación de N₂.

Para evaluar el efecto de la alteración de la cantidad del área fotosintética, se midió la materia seca (MS) producida por las plantas y se determinó la concentración de N y P en hojas, raíces y nódulos.

Para medir la MS se procedió a cosechar las plantas (luego de 43 días desde la siembra) y separarlas en sus distintos órganos, los cuales se guardaron en bolsas de papel. Las muestras fueron secadas a 65°C en un horno de aire forzado hasta alcanzar peso constante (24 h), y posteriormente fueron pesadas en una balanza para registrar la MS de cada órgano.

La determinación de la concentración de N total se realizó mediante el método Dumas. La concentración de P fue determinada mediante colorimetría con el uso de un espectrofotómetro en el rango visible, según el método descrito por Sadzawka *et al.* (2007).

Para evaluar el efecto de la manipulación de las fuentes/sumidero sobre la fijación de N se procedió a determinar mediante un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño completamente al azar con dos tratamientos y un control, cada uno con 9 repeticiones. Para separar las medias se utilizó la prueba de la menor diferencia significativa o prueba LSD.

3.2 Experimento 2.

3.2.1 Descripción del ensayo.

Se realizó un experimento para evaluar el crecimiento de habas (*Vicia faba*) en condiciones de invernadero y el efecto que posee la manipulación de la relación fuente/sumidero sobre la respiración de las raíces y los nódulos, bajo las mismas condiciones de crecimiento mencionadas en el experimento 1.

3.2.2 Condiciones de crecimiento.

Se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento del experimento 1 en cuanto a sustrato, riego y fertilización, pero en este caso se trabajó con 12 plantas, con una planta

en macetas de 3L, y 4 repeticiones por tratamiento. Las macetas fueron mantenidas en un invernadero sobre mesas metálicas durante los meses de mayo (temperatura promedio 11°C) a junio (temperatura promedio 13°C) de 2018.

Después de 11 días desde la siembra, con el 100% de germinación de las plantas y una altura promedio de 5 cm se procedió a inocular con 2 mL/planta con una suspensión de bacterias (*Rhizobium leguminosarum*) para producir la nodulación. Una vez que las plantas fueron inoculadas, estas se pusieron en un sistema que permite la medición de los gases producidos en la rizósfera. Para ello, las plantas se pasaron a través de un tapón de goma el cual permite separar la planta en parte aérea y raíz, y generar un sello para las mediciones de gases (ver Figura 2). Las plantas crecieron en este sistema hasta el momento de la medición de los gases producidos por la raíz y los nódulos.

3.2.3 Manipulación de la demanda de nitrógeno.

En cuanto a la manipulación de la demanda de nitrógeno, esta se realizó mediante el mismo método descrito para el experimento 1, manteniendo plantas intactas como control, plantas defoliadas y plantas a las cuales se les taparon 3 a 4 folíolos. A las plantas del tratamiento con folíolos tapadas, se les aplicaron 10 mL de una solución de Ethylen 48 SL®. Lo anterior, con el propósito de inducir la senescencia de los folíolos. Tanto el tratamiento de defoliación e inducción de la senescencia mediante el tapado de los folíolos y la adición de etileno tienen el objetivo de alterar la cantidad de N demandada por la planta.

3.2.4 Contenedor de la planta.

Con el fin de medir la actividad de los nódulos, se diseñó un contenedor especial que permite la medición continua y sin interrupciones de los gases emitidos por el conjunto raíz/nódulos. Para esto, fue necesaria la elaboración de un recipiente completamente cerrado, impermeable a los gases de la atmósfera, pero que permita a la planta respirar de manera controlada, con entrada y salida de un flujo de aire, el cual captura los gases desde el conjunto raíz/nódulos y permite la medición de la respiración (concentración de CO₂).

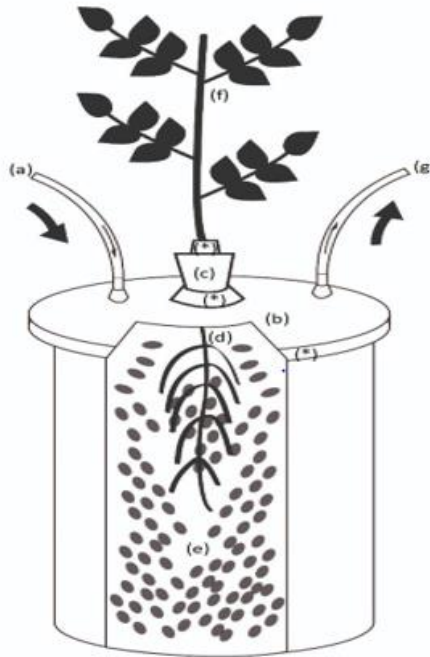


Figura 2. Recipiente contenedor de la planta: (a) entrada flujo de aire; (b) tapa recipiente; (c) tapón de goma; (d) sistema radical; (e) sustrato; (f) parte aérea de la planta; (g) salida de flujo de aire; (*) sellos de plasticina. Figura tomada de Amigo (2018).

3.2.5 Medición de gases.

Para la medición de los gases que se producen en el conjunto raíz/nódulos, el sistema tiene una bomba que abastece de aire a la rizósfera, esta cantidad es regulada por un controlador de flujo, el que entrega un caudal de aire de 200 mL por minuto. Este flujo de aire otorga una correcta aireación a la solución nutritiva, permitiendo la recolección de los gases producidos por las raíces y nódulos. Los gases exportados del recipiente (salida flujo de aire) son conducidos a un eliminador de humedad del aire, el que seca el aire con sulfato de calcio (CaSO) mediante la retención de las partículas de agua suspendidas. Finalmente, el aire seco pasa a un analizador de CO₂.

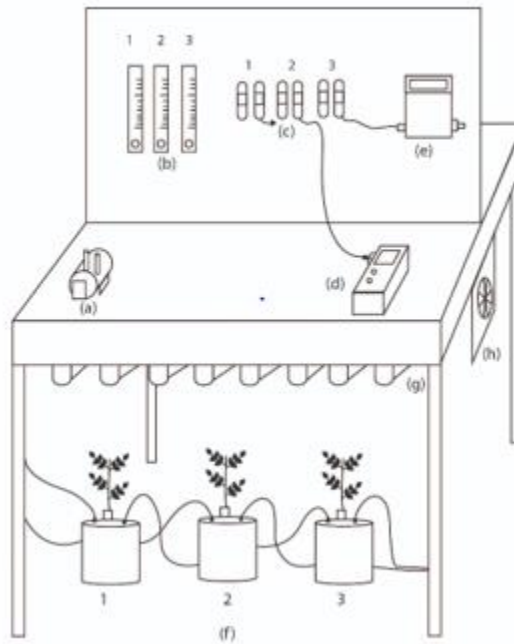


Figura 3. Esquema sistema de medición: (a) bomba de aire; (b) regulador de flujo manual; (c) eliminador de humedad de sulfato de calcio; (d) analizador de CO₂ (Qubit Systems, Modelo Q-S151); (e) regulador de flujo digital; (f) conjunto de plantas en sus recipientes; (g) sistema de iluminación; (h) ventiladores. Figura tomada de Amigo (2018).

El envase que contiene las plantas posee un orificio principal para el tapón y la planta, y dos orificios pequeños, uno para la entrada de aire y el otro para su salida. El flujo de aire entregado a la planta fue de $200 \text{ mL min}^{-1} \text{ planta}^{-1}$, el suministro de aire fue constante y la concentración del CO₂ de entrada corresponde a la concentración de aire 405 ppm (las mediciones fueron colectadas como ppm de CO₂). Las mediciones fueron realizadas cada 5 minutos durante 5 horas continuas, entre las 9 y las 14 horas. Las mediciones de CO₂ fueron realizadas con un analizador de CO₂ con sensor de luz infrarrojo no dispersivo, con un rango de medición de 0 a 2000 ppm. Los datos fueron recopilados durante 3 días, ya que la capacidad del sistema permite la medición paralela de solo 3 plantas, por lo

tanto, se midió en cada día, una repetición de cada tratamiento (control, defoliación, foliolos tapados).

La determinación de la concentración de N y P en las plantas se realizó de la misma forma que para el experimento 1. Para el análisis de la respiración del sistema raíz/nódulos se utilizó graficas descriptivas.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de la manipulación del follaje en habas sobre la concentración de N.

En los experimentos realizados se intentó manipular la concentración de N en la parte aérea de las plantas de habas. Para hacer esto, se procedió a cortar folíolos (defoliación) distintas posiciones, luego de transcurrir 26 días desde la siembra teniendo en cuenta que estas estuvieran con un crecimiento activo, hasta alcanzar un tercio de los folíolos que presentaban las plantas (3-4 folíolos por planta). Para tener un tratamiento con similares efectos, se procedió a tapar un tercio del follaje de plantas con igual edad. Para esto, se utilizó papel de aluminio. Además, para asegurar una removilización del N hacia el resto de la planta, se aplicó, en el segundo experimento, etileno para acelerar el proceso de senescencia.

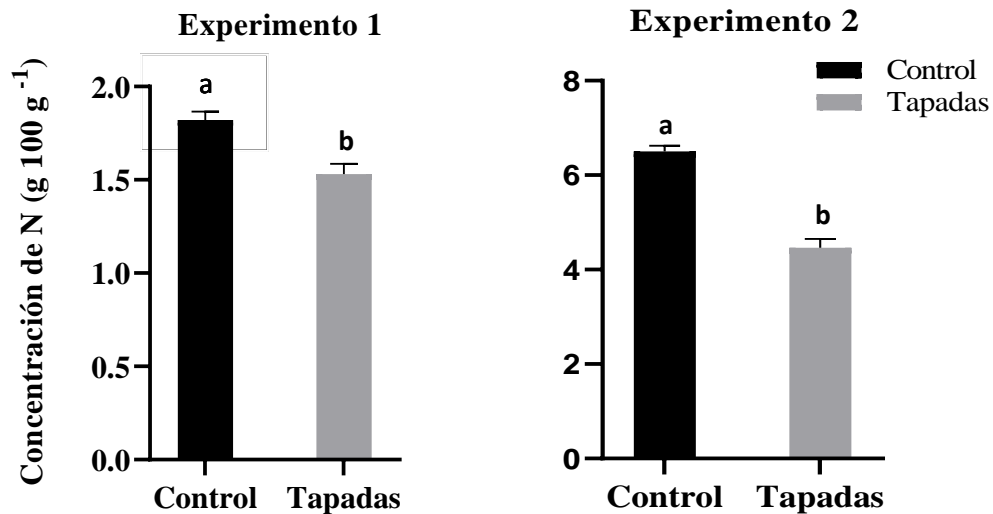


Figura 4. Promedio (\pm EE) de la concentración de Nitrógeno en los folíolos producto de la defoliación y tapadas. Experimento 1 el cual tapadas corresponde a los folíolos que se cubrieron con aluminio, y Experimento 2 en el que tapadas corresponde a los folíolos que se cubrieron con aluminio y además se agregó etileno. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.01$) entre sitios, de acuerdo al test de LSD.

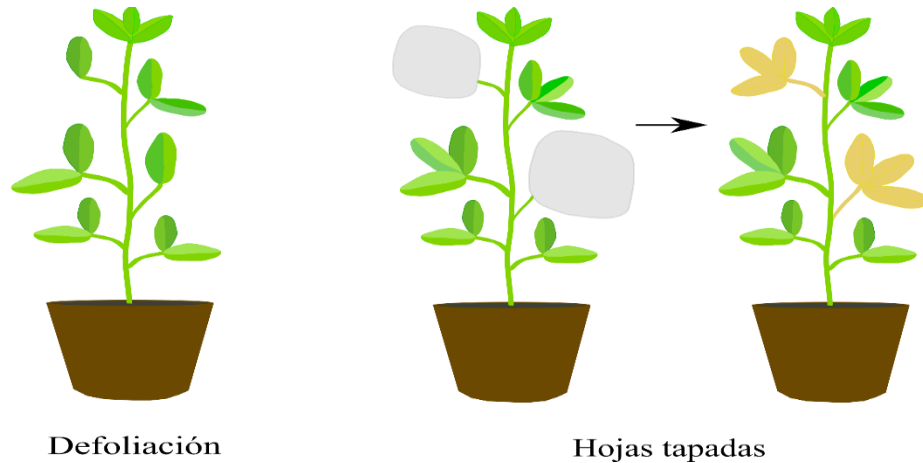


Figura 5. Foliolos analizados en la Figura 3.

En la Figura 4 se muestra la concentración de N en los foliolos, ya sean estas las que se cortaron y de aquellas que fueron tapadas (Figura 5). La concentración en los foliolos cortados refleja la concentración de N que tenían las plantas al momento de ser manipuladas, por lo tanto, representa la situación control o inicial respecto de la concentración de N en los foliolos tapados.

La concentración de N en los foliolos tapados disminuyó entre 16 a 31,6 % en relación a la concentración de N en los foliolos cortados. Es importante mencionar que las plantas en el primer ensayo, Figura 4a, no fueron fertilizadas con N y se colectaron los foliolos cerca de floración, mientras que las plantas en la Figura 4b, presentan una concentración de N más alta debido a que estas plantas eran más jóvenes.

Aun así, la manipulación del follaje permitió una removilización de N hacia el resto de la planta, cambiando su estado nutricional (Figura 4).

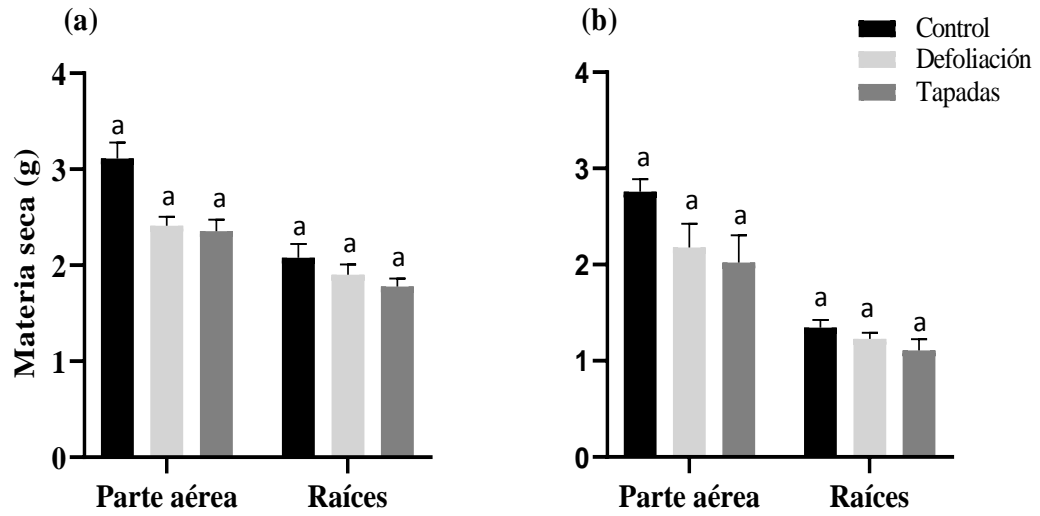


Figura 6. Promedio \pm error estándar para materia seca producida en: a) el experimento 1 y, b) en el experimento 2. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Los datos de materia seca de las plantas de habas fueron recopilados una vez, separando los órganos en parte aérea y raíz. Debido a la manipulación del follaje de las plantas, aquellas que fueron tratadas, tienden a tener una menor cantidad de materia seca (MS), lo cual se ve reflejado tanto en la producción de MS aérea y radicular.

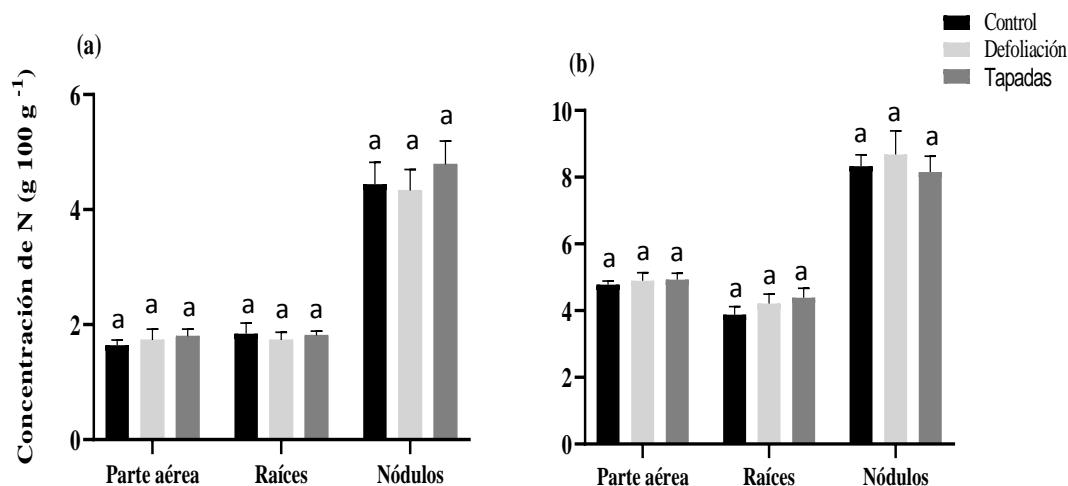


Figura 7. Promedio \pm error estándar para la concentración de nitrógeno (N) en; parte aérea, raíces y nódulos. (a) Corresponde al experimento 1 y, (b) al experimento 2. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Cuadro 1. Nitrógeno (N) total absorbido por las plantas de habas durante el experimento.

Tratamiento	Parte aérea ⁺	Parte aérea *	Raíces ⁺	Raíces *	Nódulos *
	-----g N planta ⁻¹ -----				
Control	5,06 a	13,20	3,78	5,19 a	0,12
Defoliación	4,20 b	10,61	3,28	5,12 ab	0,10
Tapadas	4,22 b	9,95	3,20	4,91 b	0,08

⁺Experimento 1, *experimento 2. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

En la Figura 7 se muestra la concentración de N en los órganos de las plantas defoliadas y aquellas plantas con folíolos tapados en comparación a las plantas control. Aunque la MS de los nódulos representa un bajo porcentaje del total de la planta, es el órgano que posee la mayor concentración de N, lo cual se debe a que en ellos se realiza la fijación de N₂.

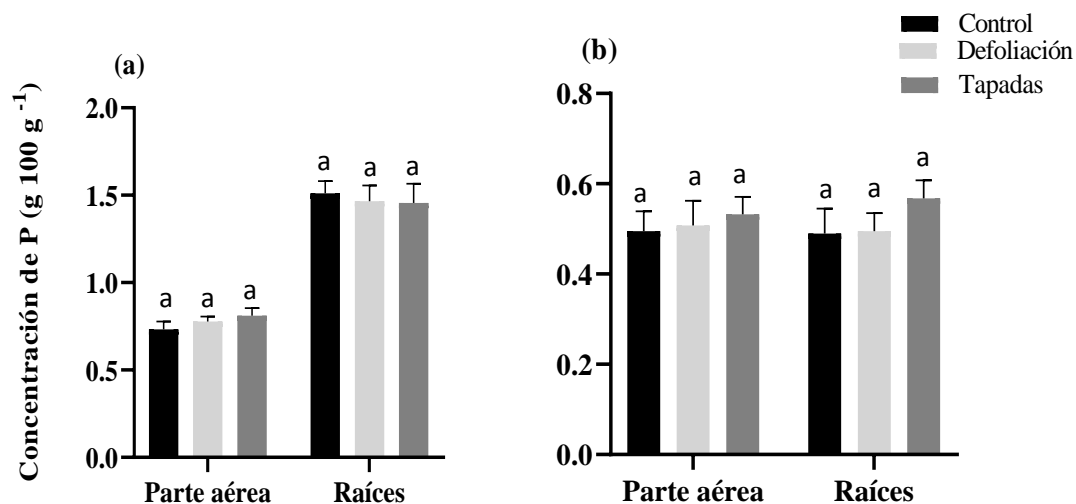


Figura 8. Promedio \pm error estándar de la concentración de fósforo (P) en; parte aérea (hojas y tallo), raíces y nódulos. a) Corresponde al experimento 1, y b) al experimento 2. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

4.2 Evaluación de la respiración en plantas de habas.

Durante el desarrollo del segundo experimento, como una medición alternativa de la actividad de la *nitrogenasa*, se procedió a evaluar la respiración de las raíces, la cual sigue la misma forma de la actividad de los nódulos. Para realizar lo anterior, después de dos semanas desde la implementación de los tratamientos (defoliación de un tercio de la planta, cubrimiento de un tercio de la planta), se procedió a medir la respiración de las raíces noduladas.

El sistema de medición de la respiración de las raíces de las plantas tiene una capacidad limitada para la medición paralela de tratamientos (control, hojas defoliadas y hojas tapadas), solo tres a la vez. Debido a lo anterior, se decidió medir la respiración de las raíces de los tres tratamientos en un mismo día durante 5 horas continuas, entre las 9:00 y las 14:00 horas. Las repeticiones se realizaron en los días siguientes, cambiando de plantas, pero manteniendo la medición sobre los tres tratamientos en forma paralela.

La medición de la respiración de las raíces consiste en rescatar el flujo de aire que ingresa al recipiente que contiene las raíces (el cual esta herméticamente sellado), para posteriormente medir la concentración de CO₂ con un analizador de gases. La concentración de CO₂ fue registrada continuamente a intervalos de 5 minutos.

Las plantas fueron aireadas permanentemente con una concentración de 350 ppm de CO₂. Para obtener la concentración respirada por la planta, se descontó la concentración de CO₂ del aire entrante al compartimento de las raíces. Los datos observados son el promedio de las tres repeticiones por tratamiento.

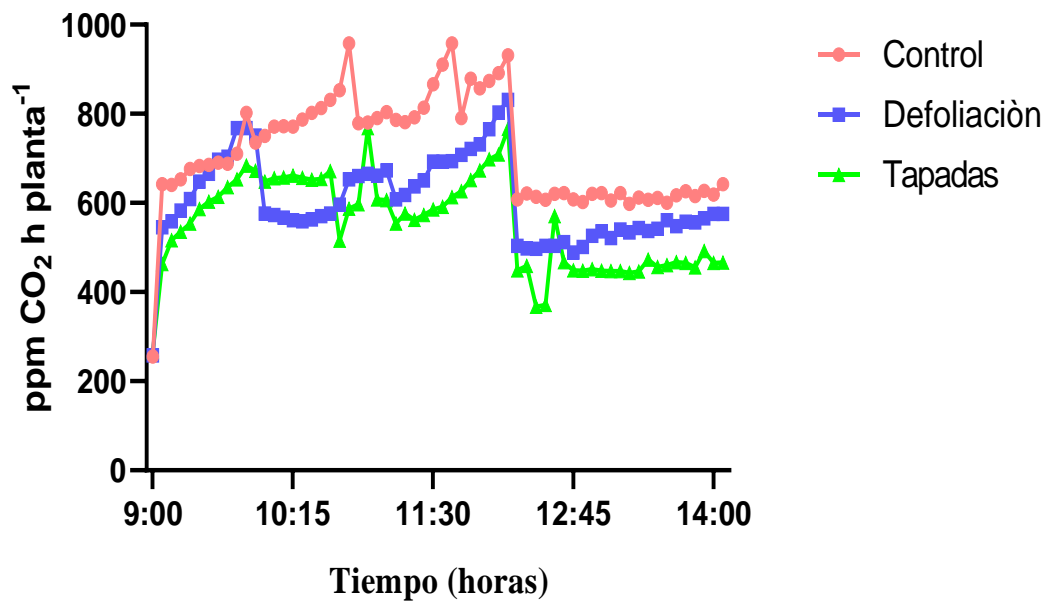


Figura 9: Evolución de la respiración de las plantas de Habas (*Vicia faba*) a través del tiempo. Valores corresponden a la media de las tres repeticiones por tratamiento.

Cuadro 2. Respiración (ppm CO₂ h planta⁻¹) total por las plantas de habas durante el experimento.

Tratamiento	ppm CO ₂ (h planta) ⁻¹
Control	44.392
Defoliación	37.387
Tapadas	34.351

La Figura 9 muestra el comportamiento de la respiración de las raíces de los diferentes tratamientos. Se observa una mayor actividad de la raíz en las plantas control, es decir, en aquellas plantas a las cuales no se les modificó el área foliar. La respiración de las plantas defoliadas se redujo un 16% respecto del control, mientras que este valor fue del 23% en el tratamiento con folíolos tapados respecto del control. La disminución de la respiración total de las plantas a las que se aplicó el tratamiento de los folíolos tapados fue menor en un 8% que las plantas que fueron defoliadas (ver Cuadro 2).

5. DISCUSIÓN

El estudio realizado tuvo la finalidad de demostrar cuantitativamente el efecto de la disminución del follaje sobre la fijación de nitrógeno en plantas. La disminución de la cantidad de folíolos, así como el cubrimiento de ellas, no tuvo un efecto directo sobre la concentración de N en el resto de la planta (Figura 7). Del mismo modo, la concentración de P en las plantas tampoco tuvo una alteración significativa. A pesar de ello en la Figura 4 al comparar la concentración de N de las hojas defoliadas respecto de las tapadas, estas últimas presentan una menor concentración, indicando que hubo una removilización del N en los folíolos, aun así, no se observa una mayor acumulación de nitrógeno en los otros órganos (nódulos, raíz o parte aérea), lo cual no permite identificar hacia que parte de la planta fue movilizado (Figura 7). Sin embargo, al calcular la cantidad de N absorbido en las plantas, se observa que esta disminuye en ambos tratamientos en comparación a las plantas control (ver Cuadro 1). Esto se debe a la disminución de la materia seca producida por ambos tratamientos. Los datos son consistentes con lo reportado por Fischinger *et al.* (2006), quienes no encontraron cambios en la concentración de N en poroto de soya, incluso después de haber manipulado fuertemente la cantidad de hojas, ya sea por defoliación o por tapado de algunas de ellas. De acuerdo a estos mismos autores, el proceso de defoliación es codificado por la planta como un estrés. Según Schubert (1995) las leguminosas al reaccionar al estrés, como por ejemplo por medio de la escisión de las hojas, no alteran la concentración de N, si no que altera el crecimiento de la planta. Aparentemente, la planta controla la cantidad de N demandado por la parte aérea, mediante una restricción de la actividad de los nódulos. Esta idea es consistente con lo observado en otros estudios, en donde un cambio en la demanda de N por parte de la planta resulta en una adaptación rápida de la fijación de N₂ (Liese et al., 2017; Cabeza et al., 2015).

La actividad de la raíz/nódulo, representada en la Figura 9, confirma el supuesto de que la planta controla la cantidad de N demandado por la parte aérea mediante una restricción de la actividad de los nódulos (específicamente con la producción de asparagina), debido a que la planta control (sin modificación en el área foliar) presenta una actividad mayor

respecto a las plantas defoliadas. En este caso, la planta control no tuvo que reaccionar frente a un estrés y fijó N_2 sin alteraciones, las variaciones observadas en la Figura 9 corresponden a los ciclos fisiológicos de la planta, asociados a los cambios de la T° diaria. Por otra parte, las plantas defoliadas reaccionaron frente al estrés producto de la defoliación, disminuyendo la actividad de los nódulos, debido a una menor demanda de N por la parte aérea. Sin embargo, el tratamiento que presentó la menor actividad de los nódulos fue el de los foliolos tapados. Esto se puede deber al tapado y removilización de N hacia el resto de los órganos de la planta, provocando un aumento momentáneo de la concentración N. Este aumento, aparentemente es la señal que la parte aérea entrega a los nódulos, los cuales disminuyen la cantidad de N_2 fijado.

Sulieman *et al.* (2010), usando ^{15}N , detectó que la disminución de la actividad de los nódulos fue debido a una acumulación de asparagina y que el nitrógeno de las hojas puede ser re-movilizado hacia los nódulos. Por otro lado, se sabe también que la asparagina actúa como un almacén temporal del amonio reducido y, por lo tanto, tiene una función reguladora de la cantidad de N_2 que los nódulos pueden fijar (Maldonado, 2006).

Los datos recopilados en este estudio demuestran que el N no se acumuló en ninguno de los órganos. En el caso del tratamiento con defoliación, la planta codifica la falta de hojas, como una disminución de la cantidad de órganos que demanda N. De esta forma, la actividad de los nódulos disminuye, adaptándose a las nuevas condiciones de demanda de la parte aérea. Al tapar cierta cantidad de hojas, el N en ellas disminuye, lo cual indica una removilización del N hacia el resto de la planta. Aparentemente, más que la cantidad de N en la parte aérea, parece ser que la concentración de N en las hojas controla la actividad de los nódulos. En ambos casos, tanto la defoliación como el tapado de foliolos, tienen un efecto directo sobre la actividad de los nódulos, aunque en las plantas no hubo un cambio de la concentración de N en relación a las plantas control. Lo anterior, por lo tanto, demuestra que la actividad de los nódulos se ajusta a la demanda, en forma rápida, lo cual permite a la planta adaptarse a situaciones de estrés y cambio en el requerimiento de N. Esto es consistente con varios reportes, los que indican una señalización entre la parte aérea y los nódulos. Por ejemplo, el trabajo de Sulieman *et al.* (2010), indica que el flujo de asparagina desde la parte aérea hacia los nódulos actúa como un mensaje del

estado del N, el cual regula la cantidad de N₂ fijado. Para reafirmar este concepto, los autores antes mencionados, también aplicaron asparagina de forma artificial en el floema (phloem-feeding), lo que entregó como resultado una reducción de la actividad de los nódulos, afectando específicamente la actividad de la *nitrogenasa*.

6. CONCLUSIÓN

La modificación del área foliar de la planta alteró la cantidad de N en la planta, sin embargo, no su concentración, la cual permaneció constante.

Tanto la escisión como la senescencia de hojas, alteró la fijación de N_2 , lo cual se reflejó, como una disminución de la respiración del sistema raíz/nódulo.

7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amigo, R., 2018. Diseño de un sistema de medición de la fijación de nitrógeno atmosférico en leguminosas con sensor de CO₂. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 35 p.
- Aparicio-Tejo, P., Arrese-Igor, C., Becana, M., 2008. Fijación biológica del nitrógeno, en: Azcón-Bieto, J., Talón, M. (Eds.), Fundamentos de fisiología vegetal., Madrid, pp. 305-321.
- Cabeza, R., Liese, R., Fischinger, S., Sulieman, S., Avenhaus, U., Lingner, A., Hein, H., Koester, B., Baumgarten, V., Dittert, K., Schulze, J., 2015. Long-term non-invasive and continuous measurements of legume nodule activity. *Plant Journal* 81: 637–648.
- del Pozo, P., Herrera, R., García, M., 2002. Dinámica de los contenidos de carbohidratos y proteína bruta en el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con aplicación de nitrógeno y sin ella. Recuperado en: <http://www.redalyc.org/html/1930/193018103001/>. Consultado el 25 de octubre del 2017.
- Fernández-Pascual., De María, N., Rosario, M., 2002. Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. *Ciencia y medio ambiente*. 195-202.
- Fischinger, S., Drevon, J., Claassen, N., Schulze, J., 2006. Nitrogen from senescing lower leaves of common bean is re-translocated to nodules and might be involved in a N-feedback regulation of nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology* 163: 987-995.
- Havlin, J., Tisdale, S., Nelson, W., Beaton, J., 1993. *Soil Fertility and Fertilizers*. New York. 634 p.
- Lehninger, N., 1970. *Principios de bioquímica*. 1040 p.
- Liese, R., Schulze, J., Cabeza, R., 2017. Nitrate application or P deficiency induce a decline in *Medicago truncatula* N₂-fixation by similar changes in the nodule transcriptome. *Scientific Reports* 7: 1–10.
- Maldonado, J., 2006. Asimilación del nitrógeno y del azufre, en: Azcón-Bieto, J., Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal.*, Madrid, pp. 287-303.

- Marschner, K., Kollman, K., Schweizer, M., Braulke, T., Pohl, S., 2011. A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. Pp 87-90.
- Murphy, P., 1986. Effect of light and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen fixation by herbage legumes. *Plant and Soil* 95: 399-409.
- Mus, F., Crook, M., Carcia, A., Geddes, B., Kouri, E., Paramasivan, P., Ryu, M., Oldroyd, G., Poole, P., Udvardi, M., Voigt, C., Ané, J., Peters, J., 2016. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl Environ Microbiol* 13;82(13):3698-3710.
- Newton, W., 2000. Nitrogen fixation in perspective, en: Pedrosa, F. (Ed), *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. New York, pp 3-8.
- Schubert, S., 1995. Nitrogen assimilation by legumens-processes and ecological limitations. *Fertilizer Res* 42: 99-107.
- Sprent, J., James, E., 2007. Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit. *Plant Physiology* 144: 575-581.
- Stanley, B., 1984. *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. New York. 398p.
- Suliman, S., Fischinger, S., Gresshoff, P., Schulze, J., 2010. Asparagine as a major factor in the N-feedback regulation of N₂ fixation in *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum* 140: 21-31.
- Organización de las naciones unidas (FAO). 2002. Los fertilizantes y su uso. Recuperado en <http://www.fao.org/3/a-x4781s.pdf> :Consultado el 24 de octubre del 2017.
- Ruiz, B., Campos, J., Barba, N., 2007. Cofactor FeMco (M=Mo, V, Fe) en nitrogenasa. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-893X2008000100006&script=sci_arttext. Consultado el 26 de octubre del 2017).
- Russell, J., Ougham, H., Howard, T., Waaland, S., 2013. *The Molecular Life of Plants*. 742 p.
- Urzúa, H., 2005. Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 18 p. Recuperado en: [file:///C:/Users/Mar%C3%ADaElena/Downloads/313-619-1-SM%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Mar%C3%ADaElena/Downloads/313-619-1-SM%20(2).pdf). Consultado el 14 de septiembre del 2017.

Udvardi, M., Day, d., 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 493-523.

Tang, M., 1986. Factores que afectan la simbiosis leguminosa-rhizobium. *Pastos y forrajes* Vol.9, N° .3.

