

¿Cómo afectan el fósforo, el potasio y el azufre al crecimiento de las leguminosas y la fijación biológica de nitrógeno? Un meta-análisis*

Gillermo A. Divito^{1,2} y Víctor O. Sadras³

Introducción

Las leguminosas se cultivan en aproximadamente 250 M ha en el mundo, con el fin principal de obtener granos y forrajes. En este marco, las mismas metabolizan unos 90 Tg (1 Tg = 10¹² g) de N₂ por año mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Kinzig y Socolow, 1994), el cual les ofrece una serie de ventajas que incluyen la disponibilidad de nitrógeno (N) en condiciones donde el suelo no es capaz de satisfacer la demanda y una alta eficiencia en el uso del nutriente. Además, la FBN ofrece ventajas al sistema, puesto que el N presente en los residuos de los cultivos, ingresa al suelo y puede ser aprovechado por los organismos que en él habitan (Graham y Vance, 2000). Sin embargo, este proceso es muy sensible a distintos tipos de estreses ambientales, como la deficiencia de otros nutrientes.

El fósforo (P) es, luego del N, el nutriente que en mayor medida limita el crecimiento de los cultivos (Vance et al., 2000). Aproximadamente un 40% de las tierras cultivables presentan deficiencias del nutriente, por lo que el estudio de la respuesta de las leguminosas y rizobios a su oferta ha sido muy estudiado (Almeida et al., 2000; Høgh-Jensen et al., 2002; Olivera et al., 2004; Schulze et al., 2006). En menor medida, se han realizado investigaciones de la respuesta de leguminosas ante distinta disponibilidad de potasio (K), que también presenta deficiencias en numerosos ambientes (Römheld y Kirkby, 2010). Finalmente, el efecto de la disponibilidad de azufre (S) sobre la FBN ha sido menos estudiado, debido a que la deficiencia han adquirido importancia reciente a nivel mundial (Scherer, 2001).

Las leguminosas que obtienen parte del N a partir de la FBN presentan mayores requerimientos de P, K y S, respecto de plantas que sólo lo absorben de la solución del suelo (Israel, 1987; Sulieman et al., 2013). Estos nutrientes pueden afectar la FBN directamente, modulando la formación, el crecimiento y la actividad de los nódulos, (Duke et al., 1980; Pacyna et al., 2006) o indirectamente, afectando el crecimiento de la planta huésped (Duke et al., 1980; Almeida et al., 2000; Varin et al., 2010). Entre los efectos directos, puede mencionarse que la disponibilidad de P es crítica para la actividad de los nódulos debido al elevado requerimiento de ATP para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa (Ribet y Drevon, 1995). También tiene un rol importante en la biosíntesis de membranas, transmisión de señales y el desarrollo general del nódulo (Al-Niemi et al., 1997). De manera similar, Duke et al. (1980) demostraron un efecto directo del K en la FBN, dado que incrementa el crecimiento de los nódulos, la actividad enzimática, el suministro de C y la transducción energética.

En el caso de S, Varin et al. (2010) mostraron una estrecha relación entre la disponibilidad de S y el contenido de las enzimas nitrogenasa y leghemoglobina en nódulos. En este sentido, Scherer et al. (2008) determinaron que la deficiencia de S redujo la FBN en arveja (*Pisum sativum* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.), como consecuencia de una disminución en la concentración de ferredoxina y leghemoglobina en nódulos, sumado a una reducción del aporte de ATP.

A pesar del efecto directo del P, K y S sobre la FBN, varios autores coinciden que estos nutrientes condicionan principalmente el crecimiento de la planta huésped y ésta regula en consecuencia el proceso de FBN (Almeida et al., 2000; Høgh-Jensen, 2003; Varin et al., 2010). Así, cuando la deficiencia de un nutriente reduce el crecimiento de la planta, se desencadena un mecanismo de *feedback* negativo que deprime el desarrollo y la actividad de los nódulos. Este mecanismo sería similar al que opera también con otros tipos de estrés, como sequía, salinidad, metales tóxicos o patógenos (Lea et al., 2007).

El estudio del efecto de la disponibilidad de P, K y S en el crecimiento de las leguminosas y en la FBN es entonces relevante desde una óptica biológica y agronómica, y se han identificado diversos efectos directos e indirectos. Sin embargo, varios procesos permanecen aún sin comprender o no se han hecho intentos por compilar la información fragmentada de la que se dispone. Así, se compiló un conjunto de datos del efecto de la deficiencia de estos nutrientes en el crecimiento de la biomasa aérea, masa y número de nódulos, actividad de la enzima nitrogenasa, y la concentración de N, P, K y S en tallos y nódulos. Los objetivos del presente trabajo fueron: i) comparar la sensibilidad relativa de estas variables a la deficiencia de los nutrientes, y ii) determinar si existen patrones específicos para cada nutriente en la respuesta de las variables estudiadas.

Materiales y métodos

Fuente de datos

Se compilaron datos buscando trabajos en *Web of Knowledge*SM (Thomson Reuters, 2013) con las palabras "nitrogen fixation + phosphorus / potassium / sulphur" y formatos alternativos. Se incluyeron experiencias de campo y en condiciones controladas. Se excluyeron estudios con especies no cultivadas, donde las leguminosas no fueron inoculadas con rizobios específicos, donde el efecto de los nutrientes se confundió con otra fuente de variación experimental, donde el aporte de N pudo haber distorsionado la interpretación de los resultados,

¹ Facultad de Ciencia Agrarias UNMdP. Argentina. Correo electrónico: guillermodivito@yahoo.com.ar

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ South Australian Research & Development Institute and The University of Adelaide, Australia.

* Adaptado del artículo originalmente publicado en *Field Crops Research*, 156:161-171.

o donde la dosis de P, K o S se reportó como tóxica para las plantas o la FBN. Se examinaron 124 trabajos y la base de datos que satisfizo los criterios de inclusión consistió en 36 experimentos en P, 15 experimentos en K y 12 experimentos en S (ver tabla con los trabajos en Divito y Sadras, 2014). Se evaluó el efecto de los nutrientes en variables relevantes para el crecimiento y desarrollo de la planta, los rizobios y la FBN, que incluyeron biomasa aérea de la leguminosa, biomasa y número de nódulos, actividad de la enzima nitrogenasa (determinada por la metodología de la reducción de acetileno, ARA) y la concentración de N, P, K y S en biomasa aérea, raíces y nódulos.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron normalizadas como el cociente entre el valor que adquirió dicha variable para una dosis de nutriente determinada y el valor que adquirió cuando recibió la dosis máxima para el experimento. Si existieron fuentes de variación secundarias (ejemplo, humedad del suelo), dicho cociente se calculó para cada nivel de la variable secundaria. Los cocientes fueron transformados al logaritmo natural antes del análisis, aunque en las figuras se presenta la información sin transformar para una mejor interpretación de los resultados.

Se realizaron comparaciones apareadas entre dos variables para determinar su sensibilidad relativa ante la deficiencia de los nutrientes. La hipótesis nula fue que ambas variables del par (por ejemplo: masa de nódulos versus número de nódulos) responden en la misma magnitud a la deficiencia nutricional. Gráficamente, la hipótesis nula se representa con los datos alineados sobre la recta $y = x$. Se calcularon los desvíos de dichos datos de la recta $y = x$ y se realizó una prueba t ($P < 0.05$) para determinar si éstos se apartan de la recta $y = x$. Cuando los desvíos se apartan significativamente de dicha recta y presentan signo positivo indican que la variable graficada en el eje "y" responde en menor magnitud que la variable del eje "x". Contrariamente desvíos negativos indican que la variable del eje "y" es más sensible a la deficiencia que la variable del eje "x". Para probar si existen patrones específicos en la respuesta de las variables a P, K y S se realizaron pruebas F comparando los desvíos determinados para cada nutriente. Cuando las pruebas F fueron significativas se realizó una comparación de medias (DSM; $P < 0.05$). Ver más información referida a métodos empleados en la publicación original (Divito y Sadras, 2014).

Resultados y discusión

Crecimiento de la biomasa aérea y nódulos

La masa de nódulos resultó mas sensible a la deficiencia de P, K y S que la biomasa aérea,

dado que los puntos de la **Figura 1** se disponen, en su mayoría, debajo de la recta $y = x$. El patrón resultó similar para los tres nutrientes. Para P y S hipotetizamos que la mayor sensibilidad se debe a la mayor concentración de los nutrientes en nódulos respecto de la biomasa aérea (**Tabla 1**), que podría dar indicios de un mayor requerimiento para mantener la tasa de crecimiento. Qiao et al. (2007) aportan evidencia para esta hipótesis, dado que determinaron que la concentración crítica de P para el crecimiento de nódulos fue $5 \text{ mg P g}^{-1} \text{ MS}$ comparado con $1.5 \text{ mg P g}^{-1} \text{ MS}$ para el máximo crecimiento de la biomasa aérea de soja (*Glycine max* L. Merr.). Umbrales similares fueron propuestos por Schulze et al. (2006) para lupino (*Lupinus albus*), quienes determinaron valores entre 1.1 y $3.1 \text{ mg P g}^{-1} \text{ MS}$ para biomasa aérea, y entre 3.3 y $6.5 \text{ mg P g}^{-1} \text{ MS}$ para nódulos. Contrariamente, no han sido propuestos valores críticos para K y S. Un aspecto de interés es que la concentración de K es menor en los nódulos que en la biomasa aérea (**Tabla 1**), por lo que la mayor sensibilidad que presenta el crecimiento de los nódulos podría estar relacionada a causas diferentes que las propuestas para P y S.

Tabla 1. Resumen de la concentración de nutrientes (%) en biomasa aérea, raíces y nódulos ante distintas ofertas de P, K y S.

Variable	n	Percentil				
		5	25	50	75	95
Fósforo						
N en biomasa aérea	165	1.19	1.85	2.87	2.87	4.64
N en raíces	92	0.90	1.40	1.70	2.42	3.14
N en nódulos	74	4.11	5.20	6.20	7.32	9.58
P en biomasa aérea	233	0.07	0.13	0.22	0.32	0.49
P en raíces	85	0.06	0.12	0.17	1.00	1.61
P en nódulos	133	0.21	0.34	0.40	0.48	1.81
Potasio						
N en biomasa aérea	171	2.90	3.50	3.89	4.33	7.09
N en raíces	5	c	2.42	3.78	4.02	-
N en nódulos	3	-	6.11	6.38	6.40	-
K en biomasa aérea	164	0.46	0.84	1.71	2.21	3.26
K en raíces	9	-	0.78	1.96	3.80	-
K en nódulos	3	-	0.49	1.12	1.48	-
Azufre						
N en biomasa aérea	314	1.97	2.55	3.01	3.40	4.00
N en raíces	11	-	1.95	2.31	2.80	-
N en nódulos	9	-	3.63	5.03	5.67	-
S en biomasa aérea	309	0.08	0.11	0.16	0.22	0.29
S en raíces	31	0.03	0.05	0.14	0.35	1.06
S en nódulos	19	0.09	0.21	0.25	0.37	0.60

c no calculado debido al bajo número de datos.

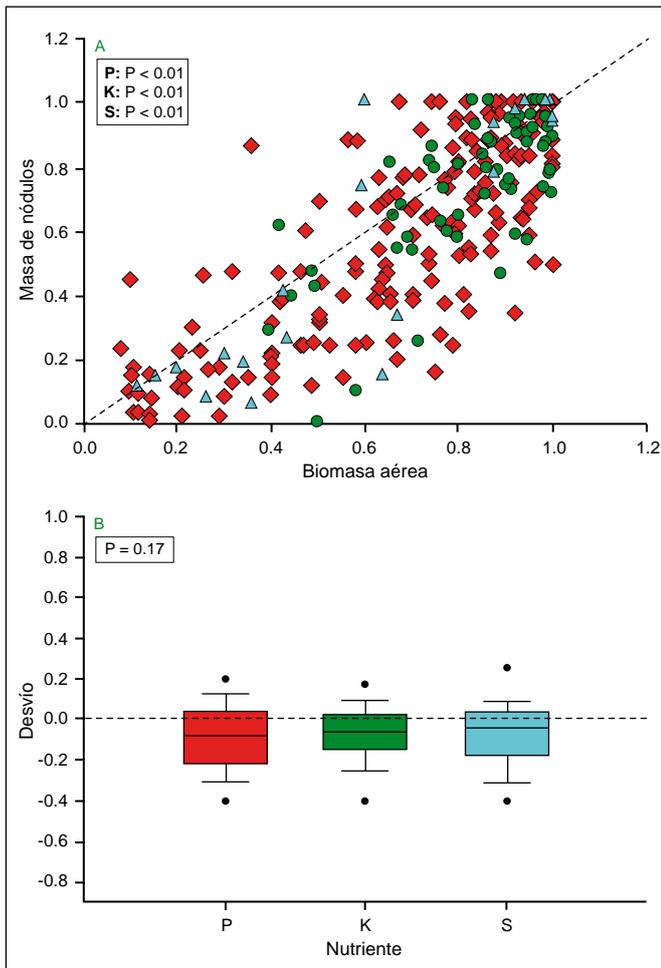


Figura 1. (A) Comparación de la masa relativa de nódulos con la biomasa aérea relativa para leguminosas creciendo con distinta oferta de P (diamantes; $n = 264$), K (círculos; $n = 86$) y S (triángulos; $n = 38$). La línea punteada representa $y = x$. **(B)** Frecuencia de distribución de los desvíos de $y = x$ en respuesta a la deficiencia de P, K y S. Las líneas de las cajas son los percentiles 0.25; 0.50 y 0.75; los bigotes son los percentiles 0.10 y 0.90, y los puntos son los percentiles 0.05 y 0.95. P indica: en A, la significancia de la desviación de las observaciones de la recta $y = x$ para cada nutriente; y en B la significancia de las diferencias de los desvíos entre P, K y S.

Nuestro análisis de información proveniente de varios estudios indica que la masa de nódulos es más sensible que la biomasa aérea a la deficiencia de P, K y S (**Figura 1**), pero los reportes del efecto de los nutrientes sobre el número de nódulos son variados, especialmente para P. Así, se ha determinado que la deficiencia de dicho nutriente incrementa (Schulze et al., 2006), disminuye (Pereira y Bliss, 1989), o no tiene efecto (Drevon y Hartwig, 1997) sobre el número de nódulos relativo a la biomasa aérea. Sin embargo, se acepta que las plantas deficientes en P tienden a desarrollar nódulos de menor tamaño. Ribet y Drevon (1995) propusieron que esta estrategia incrementa la relación superficie/volumen, facilitando así la difusión de O_2 hacia el nódulo, crítica para la FBN (Layzell et al., 1990). La **Figura 2** apoya esta hipótesis, dado que el número de nódulos decrece en menor proporción que la masa total de nódulos bajo deficiencia de P. En contraste, el número y la masa de

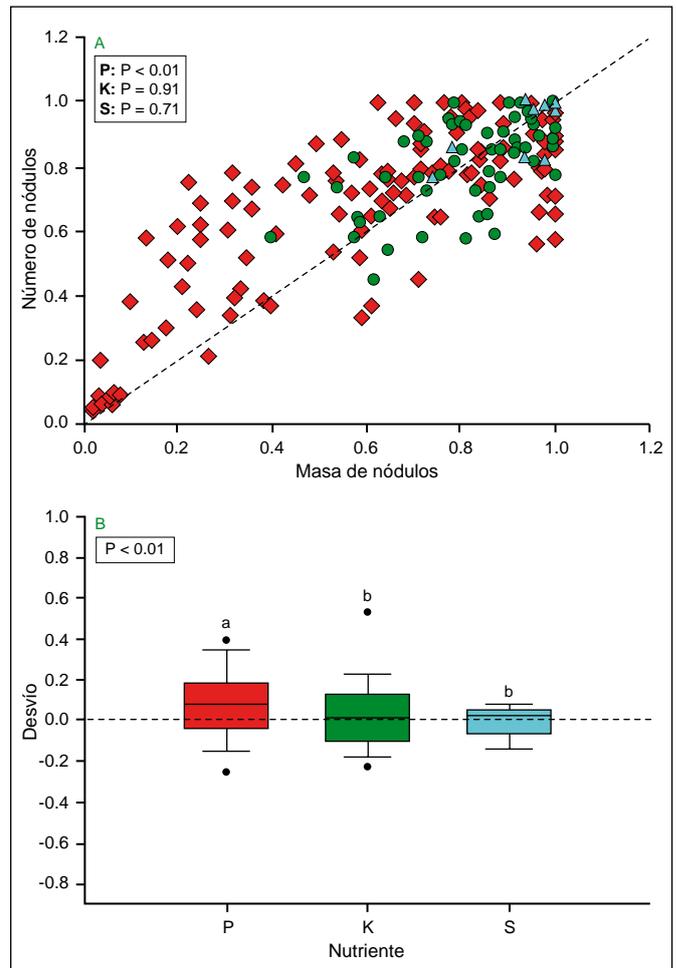


Figura 2. (A) Comparación del número con la masa relativa de nódulos para leguminosas creciendo con distinta oferta de P (diamantes; $n = 163$), K (círculos; $n = 82$) y S (triángulos; $n = 12$). La línea punteada representa $y = x$. **(B)** Frecuencia de distribución de los desvíos de $y = x$ en respuesta a la deficiencia de P, K y S. Las líneas de las cajas son los percentiles 0.25; 0.50 y 0.75; los bigotes son los percentiles 0.10 y 0.90, y los puntos son los percentiles 0.05 y 0.95. P indica: en A, la significancia de la desviación de las observaciones de la recta $y = x$ para cada nutriente; y en B, la significancia de las diferencias de los desvíos entre P, K y S.

nódulos presentan igual sensibilidad a la deficiencia de K y S (**Figura 2**). La conclusión para K es robusta, puesto que se basa en un gran número de observaciones ($n = 82$), pero para S debe ser considerada con precaución dado que se basa en pocas determinaciones ($n = 12$).

Fijación biológica de nitrógeno

La FBN se mostró más sensible a la deficiencia de P y K que la biomasa aérea (**Figuras 3A y 3B**) y que la masa de nódulos (**Figuras 3C y 3D**) dado que la mayoría de los puntos de las gráficas se dispusieron debajo de la recta $y = x$. El reducido número de observaciones ($n = 3$) impidió el mismo análisis para S. Las reducciones en la FBN en respuesta a la deficiencia de P y K pueden obedecer a una menor nodulación, una menor productividad de los nódulos (moles de N_2 fijados por unidad de tiempo por unidad de masa de nódulos) o ambas (Duke y Collins, 1985). Pocos estudios se han centrado en los procesos

metabólicos y fisiológicos involucrados. Sa e Israel (1991) realizaron un análisis detallado del estado energético de los nódulos de soja expuestos a distintas ofertas de P y concluyeron que la reducción en la actividad de la enzima nitrogenasa en condiciones de deficiencia de P se relacionó con la inhibición de reacciones dependientes del ATP en las células vegetales, aunque no en las células de los nódulos. Estos autores reportaron también que no existió relación entre los cambios en el ARA producto de la oferta de P y la masa de bacteroides por unidad de biomasa de nódulos.

Por su parte, algunos autores han demostrado un efecto directo del K en la activación de la enzima nitrogenasa (Duke et al., 1980; Lynd et al., 1981). Duke et al. (1980) determinaron que es necesario un adecuado nivel de K para mantener altas tasas de ARA y la productividad de los nódulos ya que dicho nutriente incide directamente sobre la actividad de enzimas de asimilación de N, suministro de C al nódulo y transducción energética.

Adicionalmente, estudios bioquímicos e inmunológicos muestran una estrecha relación entre el aporte de S y el contenido de proteínas en nódulos, particularmente de nitrogenasa y leghemoglobina (Varin et al., 2010),

ambas de fundamental rol en la FBN. Además, Scherer et al. (2008) determinaron que, bajo condiciones de deficiencia de S, la FBN se redujo en arveja y alfalfa como consecuencia de una disminución en la concentración de ferredoxina, leghemoglobina, y en el aporte de ATP.

Por otra parte, la disminución de la proporción de N derivado de la FBN en respuesta a la deficiencia de P (Cadish et al., 1993; Almeida et al., 2000), K (Fajri., 2006) y S (Scherer y Lange, 1996), podría reflejar un efecto directo de la deficiencia de estos nutrientes sobre la FBN, indicando que el proceso es más sensible que la demanda de N por parte de la planta.

En conjunto, el análisis de la **Figura 3** sirve para resolver algunas controversias planteadas en la literatura respecto de la productividad de los nódulos, definida como la FBN en relación a la masa total de nódulos. Almeida et al. (2000) reportaron incrementos en la FBN específica (g N_2 fijados g nódulo^{-1}) en trébol blanco (*Trifolium repens* L.) bajo deficiencias de P. Para la misma especie, Høgh-Jensen et al. (2002) reportaron que la actividad específica de la nitrogenasa disminuyó bajo deficiencia de P cuando ésta se expresó como N_2 fijado por unidad de peso fresco de raíz, pero aumentó cuando se expresó

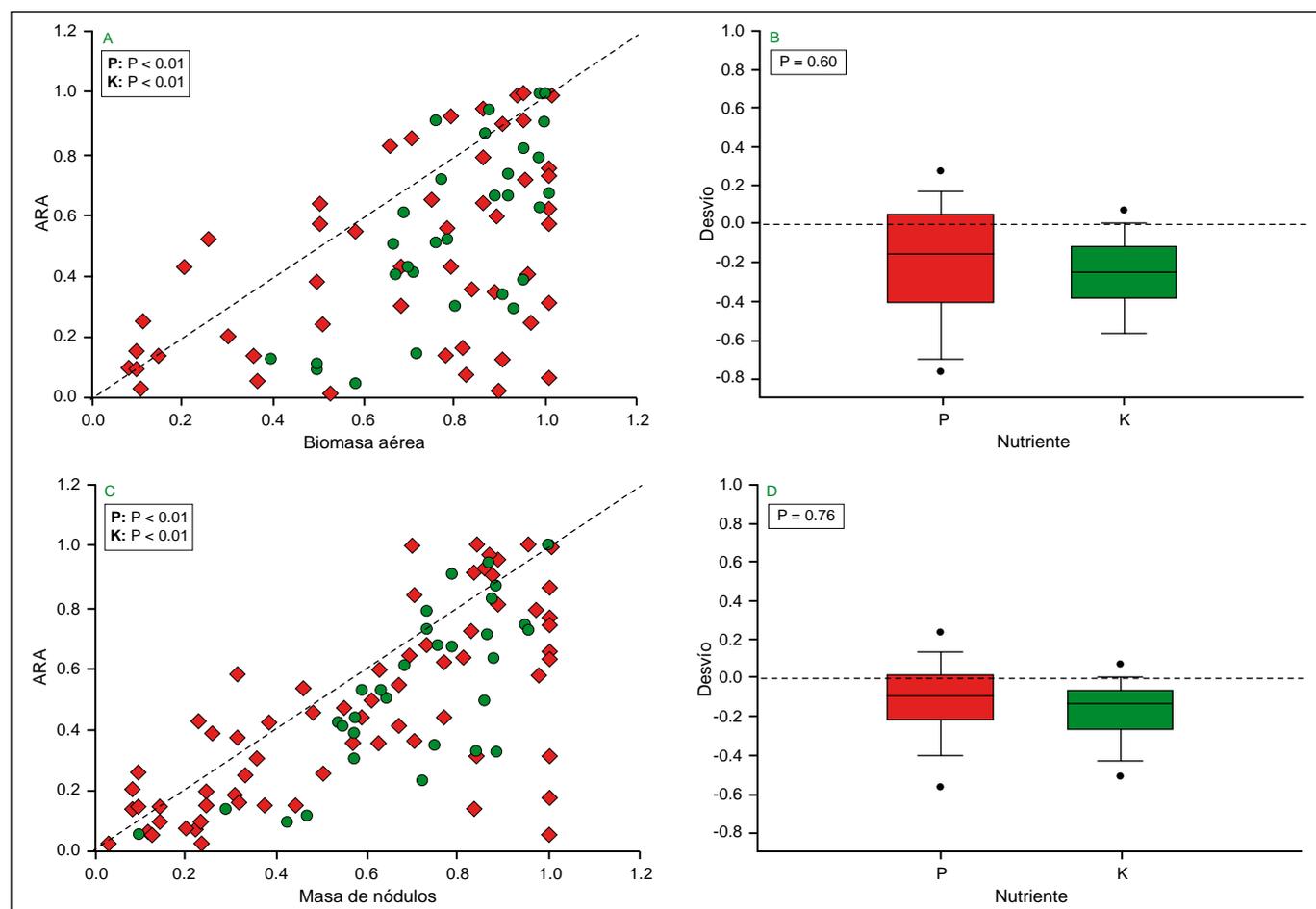


Figura 3. (A) Comparación de la reducción de acetileno (ARA) relativa con (A) la biomasa aérea y (C) la masa total de nódulos relativa para leguminosas creciendo con distinta oferta de P [diamantes; n = 65 (A) y 91 (C)] y K [círculos; n = 37 (A) y 43 (C)]. La línea punteada representa $y = x$. (B) Frecuencia de distribución de los desvíos de $y = x$ en respuesta a la deficiencia de P y K. Las líneas de las cajas son los percentiles 0.25; 0.50 y 0.75; los bigotes son los percentiles 0.10 y 0.90, y los puntos son los percentiles 0.05 y 0.95. P indica: en A y C, la significancia de la desviación de las observaciones de la recta $y = x$ para cada nutriente; y en B y D, la significancia de las diferencias de los desvíos entre P y K.

por unidad de peso de nódulos. Por su parte, Sangakkara et al. (1996) determinaron que *Vicia faba* y *Phaseolus vulgaris* mantuvieron la FBN específica cuando las plantas crecieron bajo distinta oferta de K y concluyeron que el nutriente afecta en mayor medida la nodulación que la actividad de los nódulos. Varin et al. (2010) reportaron una reducción del 81% en el N fijado por plantas de trébol blanco en soluciones sin S en comparación con aquellas que crecieron en condiciones de suficiencia del nutriente. En este experimento en particular, la deficiencia de S inhibió la nodulación en una magnitud superior a la FBN, lo que indica que se produjeron incrementos en la FBN específica. Nuestro análisis confirma que la deficiencia de P, K y S disminuye la productividad de los nódulos. Sin embargo, sería posible determinar efectos neutrales o positivos en experiencias particulares dependiendo de la interacción entre el tipo de planta, la severidad del estrés nutricional y la relación entre la demanda de N y la masa de nódulos.

Concentración de nutrientes en nódulos

La concentración de P y S en la biomasa aérea es más sensible que la concentración en nódulos [ver Divito y Sadras (2014)]. El patrón fue diferente para ambos nutrientes, aunque esta conclusión podría estar afectada por la poca cantidad de datos disponibles para S (n = 7). Solo un trabajo presentó información referida a la concentración de K en nódulos y biomasa aérea (Høgh-Jensen et al., 2003) lo que impidió incluir a dicho nutriente en el análisis (n = 3).

Almeida et al. (2000) reportaron que la concentración de P en nódulos fue mucho menos sensible a la deficiencia de P que la concentración del nutriente en la biomasa aérea. Si estas diferencias se deben a una partición diferencial del P hacia los nódulos o a la absorción directa del nutriente por los nódulos no está aún resuelto, pero Al-Niemi et al. (1998) sugieren que los nódulos lo absorben directamente desde la solución del suelo. Israel (1993) reportó que luego de aliviar una condición de estrés de P, las plantas importaron el nutriente preferentemente hacia los nódulos, apoyando el concepto de que éstos actúan como destinos prioritarios de P. Este mecanismo explica que los nódulos mantengan una alta concentración de P aun cuando la concentración externa del nutriente se modifique. En este sentido, Almeida et al. (2000) concluyeron que resulta poco probable que la concentración de P en el nódulo limite directamente el crecimiento y funcionamiento debido a la estabilidad que se observa en la concentración del nutriente.

¿Las plantas deficientes en P, K y S presentan deficiencias de N?

Una de las cuestiones principales respecto del efecto de la deficiencia de P, K y S es si la menor nodulación y FBN se relaciona con procesos de *feedback* debidos al menor crecimiento de la planta y la consecuente acumulación de N. Para responder a ello, es importante determinar el estatus nitrogenado de las plantas ante deficiencias

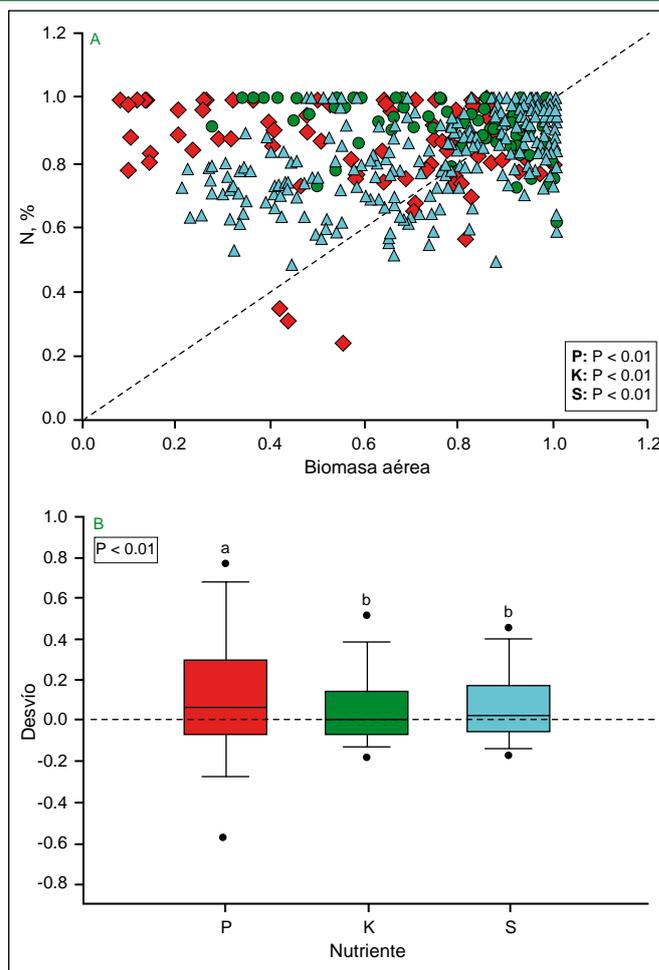


Figura 4. (A) Comparación de la concentración relativa de N en la biomasa aérea con la biomasa aérea relativa para leguminosas creciendo con distinta oferta de P (diamantes; n = 145), K (círculos; n = 156) y S (triángulos; n = 314). La línea punteada es $y = x$. (B) Frecuencia de distribución de los desvíos de $y = x$ en respuesta a la deficiencia de P, K y S. Las líneas de las cajas son los percentiles 0.25; 0.50 y 0.75; los bigotes son los percentiles 0.10 y 0.90, y los puntos son los percentiles 0.05 y 0.95. P indica: en A, la significancia de la desviación de las observaciones de la recta $y = x$ para cada nutriente; y en B la significancia de las diferencias de los desvíos entre P, K y S.

de dichos nutrientes. La **Figura 4** muestra que la concentración de N en la biomasa aérea se mantiene relativamente elevada en la medida que el crecimiento se ve restringido por la deficiencia nutricional, dado que la mayor parte de los puntos se disponen por encima de la línea $y = x$. Este patrón resulta más pronunciado para P que para K y S (**Figura 4B**). Al analizar que sucede con la concentración de N respecto de la de los otros nutrientes se observa un patrón similar al anterior [ver Divito y Sadras (2014)], donde el N disminuye en una menor proporción que P, K y S. Como consecuencia, las relaciones N/K, N/P y N/S aumentaron en la medida que la deficiencia nutricional fue más marcada.

Estos resultados son coincidentes con varios trabajos que reportan acumulación de distintos compuestos nitrogenados, entre ellos amonio, urea, aminoácidos y

amidas bajo condiciones de estrés nutricional (DeBoer y Duke, 1982). Almeida et al. (2000) y Høgh-Jensen et al. (2002) reportaron una mayor concentración de asparagina en plantas de trébol deficientes. Varin et al. (2010) propusieron un mecanismo similar para la respuesta a la deficiencia de S, postulando que la menor FBN de plantas bajo estrés podría ser el resultado de un *feedback* negativo desencadenado por el incremento en la concentración de N y asparagina en hojas y estolones, que reprime el desarrollo de los nódulos y la producción de las enzimas nitrogenasa y leghemoglobina. Así, la asparagina se menciona como uno de los principales candidatos que regulan los procesos de asimilación de N, aunque otros compuestos pueden estar involucrados (Parson, 1997; Schulze, 2004).

Efecto de la deficiencia nutricional sobre el aporte de C a los nódulos

Schulze (2004) propuso tres mecanismos que regulan la FBN en leguminosas: 1) la regulación a través de la provisión de carbono (C), donde la FBN está regulada por el aporte de asimilados hacia los nódulos o por la metabolización de compuestos carbonados para que puedan ser usados por los bacteroides; 2) la regulación a través de la provisión de O₂, que supone que la difusión de dicha molécula hacia el interior de los nódulos actúa como un factor regulador; y 3) el mecanismo de *feedback* negativo donde interviene el N, al que se hizo referencia anteriormente.

En este sentido, algunos autores sugieren que la disminución en la actividad fotosintética de la planta en respuesta a la deficiencia de P, K y S puede ocasionar descensos en el aporte de carbohidratos a los nódulos (Mengel et al., 1974; Sa e Israel, 1991 y 1998; Sherer et al., 2006). Evidencias a favor de estas hipótesis fueron aportadas por Jakobsen (1985) y Sa e Israel (1991); mientras que Almeida et al. (2000) concluyeron que esta teoría no explicaría la respuesta de las leguminosas a la deficiencia de P. Así, dichos autores reportaron que la deficiencia de P disminuyó la actividad de la enzima Rubisco y la fotosíntesis, pero que la concentración de almidón en hojas aumentó, lo que indica que la fotosíntesis estuvo limitada por destinos.

Por otra parte, varios estudios sustentan la teoría de que el aporte de C regularía la FBN bajo distintas ofertas de K (Mengel et al., 1974; Premaratne y Oertli, 1994). Sin embargo, trabajos recientes realizados por Høgh-Jensen (2003) informaron que la relación entre la fijación de CO₂ por la planta y la de N₂ por las bacterias aumentó bajo deficiencia de K. Esto llevó al autor a concluir que la fotosíntesis no sería limitante para el proceso de FBN. Por otra parte, Scherer et al. (2006) determinaron que el nivel de glucosa y sacarosa en plantas de soja sin deficiencias de S fue hasta cinco veces mayor que en plantas deficientes. Esto sugiere que los fotosintatos podrían limitar la FBN por una menor disponibilidad energética o esqueletos carbonados para la asimilación de amonio.

Consideraciones finales

Esta revisión permitió identificar patrones generales y específicos de la respuesta de leguminosas y rizobios a deficiencias de P, K y S. También se destacaron cuáles son los tópicos donde aún es necesario continuar con las investigaciones. Con el objetivo de encontrar patrones generales, algunas respuestas específicas pueden haberse obviado, como las referidas a distintas especies, con distinto tipo de nódulos (determinados o indeterminados), edad de la planta al momento de muestreo o condiciones de crecimiento.

Dada la relevancia para la nutrición de las plantas y su deficiencia en muchos ambientes, varios investigadores han puesto mucho esfuerzo en investigar el rol de la disponibilidad de P sobre las leguminosas y la FBN. Sin embargo, se ha puesto menos atención sobre K y S. La escasez de información referida a la concentración de N, K y S en nódulos impidió un análisis comprensivo del efecto directo de la deficiencia de estos nutrientes en el crecimiento y funcionamiento de los nódulos. Excepto por algunos reportes sobre P, la falta de información respecto de umbrales para la concentración de nutrientes en planta y nódulos impidió el desarrollo de relaciones cuantitativas entre nutrición, crecimiento de las plantas y actividad de los rizobios.

Numerosos estudios coinciden en que el mecanismo de *feedback* desencadenado por la disminución en el crecimiento de la biomasa aérea y la acumulación de compuestos nitrogenados es responsable de la reducción de la FBN ante deficiencias de P, K y S (Almeida et al. 2000; Vadez et al., 2000; Høgh-Jensen et al., 2002; Varin et al., 2010; Sulieman et al., 2013). Sin embargo, también existe evidencia de un efecto directo de estos nutrientes en el crecimiento y actividad de los nódulos. Pocos trabajos han procurado integrar ambos efectos, directos e indirectos, en la fisiología del sistema leguminosas-rizobios. La **Figura 5** pretende hacer dicha integración, basada en las conclusiones del presente trabajo y en fuentes bibliográficas.

Asimismo, luego del análisis de la información relevada, se proponen algunas cuestiones para futuras investigaciones:

- 1) Si los nutrientes controlan la FBN a partir de la demanda de N de las plantas: ¿Por qué la FBN se reduce en mayor proporción que la demanda ante deficiencias nutricionales? ¿Es esto un indicador del efecto directo de los nutrientes?
- 2) Si las concentraciones de P, K y S permanecen más estables en nódulos que en la biomasa aérea ante deficiencias nutricionales: ¿Por qué la productividad de los nódulos es más sensible que el crecimiento de la biomasa aérea?

En conclusión, el análisis permite confirmar que la deficiencia de P, K y S reduce el crecimiento y número de nódulos en mayor medida que el crecimiento

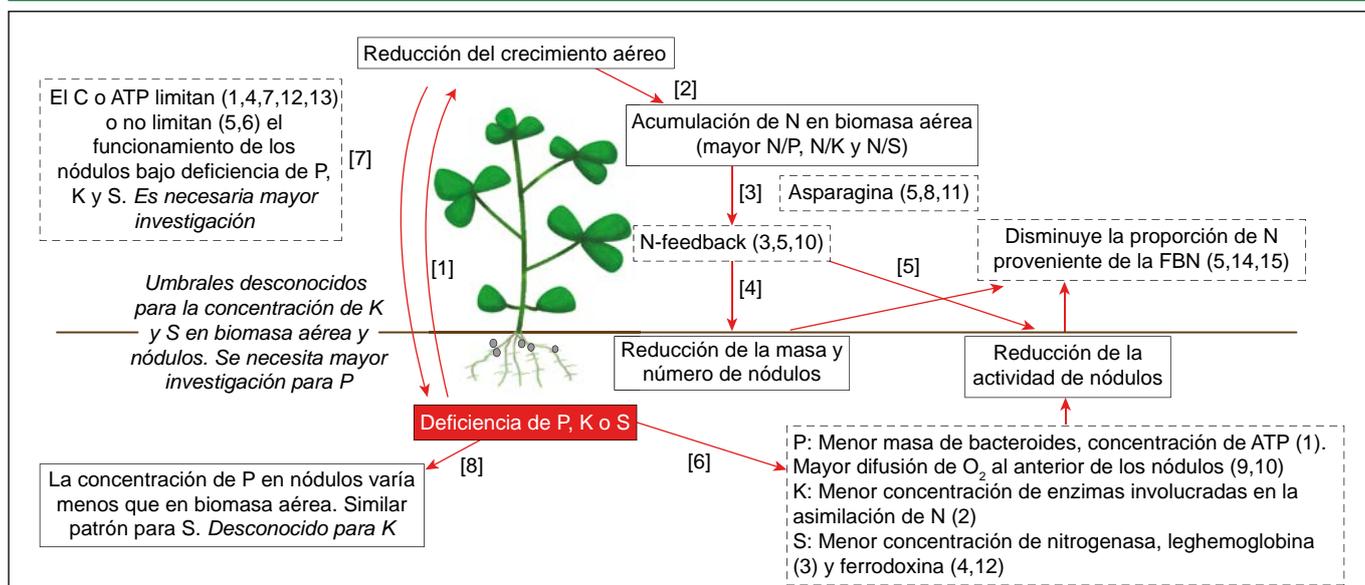


Figura 5. Mecanismos fisiológicos de la respuesta de las leguminosas y rizobios a la deficiencia de P, K y S. Paso [1] involucra la reducción en el crecimiento de la biomasa aérea en respuesta a la deficiencia de nutrientes. Paso [2] involucra la acumulación relativa de N en biomasa aérea. Paso [3] involucra mecanismos de feedback que deprimen la fijación biológica de N (FBN). Se propone a la asparagina como regulador principal. Paso [4] involucra la reducción en la masa total y número de nódulos. Paso [5] la reducción en la productividad de los nódulos. Paso [6] involucra un efecto directo de los nutrientes en el crecimiento y actividad de los nódulos. Paso [7] involucra el efecto de la limitación por C en el funcionamiento de los nódulos. Paso [8] involucra el mantenimiento de la concentración de P, K y S en nódulos ante variaciones en la oferta del nutriente. Este modelo conceptual está basado en el análisis original de Divito y Sadras (2014) (cajas con líneas llenas) y apoyado por fuentes bibliográficas (cajas con líneas punteadas) que se detallan: (1) Sa e Israel (1991); (2) Duke et al. (1980); (3) Varin et al. (2010); (4) Scherer et al. (2008); (5) Almeida et al. (2000); (6) Høgh-Jensen (2003); (7) Premaratne y Oertli (1994); (8) Sulieman et al. (2013); (9) Ribet y Drevon (1995); (10) Vadez et al. (2000); (11) Høgh-Jensen et al. (2002); (12) Pacyna et al. (2006); (13) Scherer et al. (2006); (14) Fajri (2006); (15) Scherer y Lange (1996). *El texto en itálica indica cuestiones donde es necesaria mayor investigación.*

de la biomasa aérea, permitiendo clarificar algunas controversias referidas al efecto del P sobre el número de nódulos. Además, fue posible determinar que la actividad de los nódulos disminuye en mayor medida que la biomasa aérea y la masa de nódulos, lo que indica que se producen descensos en la productividad de los nódulos. Esta conclusión es una de las principales contribuciones del presente análisis, dadas las discrepancias que existen en la literatura. Esta respuesta puede estar relacionada con el efecto directo del P, K y S sobre distintos procesos metabólicos que se llevan adelante en los nódulos.

Finalmente, el aumento en las relaciones N:P, N:K y N:S ante deficiencias de los nutrientes abordados en este trabajo apoya la hipótesis del mecanismo de *feedback* que reprime la FBN. A pesar de que se determinaron algunos patrones específicos para cada nutriente en la respuesta del sistema leguminosa-rizobio, los patrones de crecimiento, actividad de los nódulos y concentración de nutriente fueron similares para P, K y S. Esto remarca el rol central en la regulación de la FBN que podría tener el *feedback* disparado por el aumento en la concentración de compuestos nitrogenados, en conjunto con efectos individuales directos de cada nutriente.

Agradecimientos

Agradecemos a *The Crawford Fund* por permitir la estadía de Guillermo A. Divito en Australia, y a SARDI y *University*

of Adelaide por facilitar las instalaciones y acceso a la biblioteca. Las investigaciones de Víctor O. Sadras en leguminosas cuentan con el apoyo del *Australian Grains Research and Development Corporation* y *Australia-India Strategic Research Fund*.

Bibliografía

- Almeida, J.P.F., U.A. Hartwig, M. Frehner, J. Nösberger, y A. Lüscher. 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* 51:1289-1297.
- Al-Niemi, T.S., M.L. Kahn, y T.R. McDermott. 1997. P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiol.* 113:1233-1242.
- Al-Niemi, T.S., M.L. Kahn, y T.R. McDermott. 1998. Phosphorus uptake by bean nodules. *Plant Soil* 198:71-78.
- Cadisch, G., R. Sylvester-Bradley, B.C. Boller, J. Nösberger. 1993. Effect of phosphorus and potassium on N₂ fixation (¹⁵N-dilution) of field-grown *Centrosema acutifolium* and *C. macrocarpum*. *Field Crop Res.* 31:329-340.
- DeBoer, D.L., y S.H. Duke. 1982. Effects of sulphur nutrition on nitrogen and carbon metabolism in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Physiol. Plant* 54:343-350.
- Divito, G.A., V.O. Sadras. 2014. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crops Research*, 156:161-171. d.o.i. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2013.11.004>

- Drevon, J.J., y U.A. Hartwig. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta* 201:463-469.
- Duke, S.H., M. Collins, y R.M. Soberalske. 1980. Effects of potassium fertilization on nitrogen fixation and nodule enzymes of nitrogen metabolism in alfalfa. *Crop Sci.* 20:213-219.
- Duke, S.H., y M. Collins. 1985. Role of potassium in Legume dinitrogen fixation, in: Potassium in Agriculture. Proceedings of an International Symposium. July 7 to July 10 1985. ASA-CSSA-SSSA, pp. 444-465.
- Fajri, A. 2006. Effects of different rates of potassium on nitrogen fixation and agronomic traits of three *Medicago sativa* varieties. *Pak. J. Biol. Sci.* 9:2881-2886.
- Graham, P.H., y C.P. Vance. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crop Res.* 65:93-106.
- Høgh-Jensen, H. 2003. The effect of potassium deficiency on growth and N₂-fixation in *Trifolium repens*. *Physiol. Plant.* 119:440-449.
- Høgh-Jensen, H., J.K. Schjoerring, y J.F. Soussana. 2002. The influence of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of white clover plants. *Ann. Bot. - London.* 90:745-753.
- Israel, D.W. 1993. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency. *Physiol. Plant.* 88:294-300.
- Israel, D.W. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 84:835-840.
- Jakobsen, I. 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant.* 64:190-196.
- Kinzig, A.P., y R.H. Socolow. 1994. Human impacts on the nitrogen cycle. *Phys. Today* 47:24-31.
- Layzell, D.B., S. Hunt, y G.R. Palmer. 1990. Mechanisms of nitrogenase inhibition in soybean nodules. Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂. *Plant Physiol.* 92:1101-1107.
- Lea, P.J., L. Sodek, M.A.J. Parry, P.R. Shewry, y N.G. Halford. 2007. Asparagine in plants. *Ann. Appl. Biol.* 150:1-26.
- Lynd, J.Q., G.V. Odell Jr., y R.W. McNew. 1981. Soil potassium effects on nitrogenase activity with associated nodule components of hairy vetch at anthesis. *J. Plant Nutr.* 4:303-318.
- Mengel, K., M.R. Haghpara, y K. Koch. 1974. Effect of potassium on fixation of molecular nitrogen by root nodules of vicia-faba. *Plant Physiol.* 54:535-538.
- Olivera, M., N. Tejera, C. Iribarne, A. Ocaña, y C. Lluch. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol. Plant.* 121:498-505.
- Pacyna, S., M. Schulz, y H.W. Scherer. 2006. Influence of sulphur supply on glucose and ATP concentrations of inoculated broad beans (*Vicia faba minor* L.). *Biol. Fert. Soils* 42:324-329.
- Parson, R. 1997. Contrasting C supply, N assimilation and N transport across a range of symbiotic plants, in: Legocki, A., Bothe, H., Pühler, A., (Eds). Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 231-234.
- Pereira, P.A.A., y F.A. Bliss. 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. *Plant Soil* 115:75-82.
- Premaratne, K.P., y J.J. Oertli. 1994. The influence of potassium supply on nodulation, nitrogenase activity and nitrogen accumulation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in nutrient solution. *Fert. Res.* 38:95-99.
- Qiao, Y., C. Tang, X. Han, y S. Miao. 2007. Phosphorus deficiency delays the onset of nodule function in soybean. *J. Plant Nutr.* 30:1341-1353.
- Ribet, J., y J.J. Drevon. 1995. Increase in permeability to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiol. Plant* 94:298-304.
- Römheld, V., y E. Kirkby. 2010. Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant Soil* 335:155-180.
- Sa, T.M.I., y D.W. Israel. 1991. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. *Plant Physiol.* 97:928-935.
- Sangakkara, R., U.A. Hartwig, y J. Nosberger. 1996. Growth and symbiotic nitrogen fixation of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* as affected by fertiliser potassium and temperature. *J. Sci. Food Agric.* 70:315-320.
- Scherer, H.W. 2001. Sulphur in crop production – invited paper. *Eur. J. Agron.*, 14:81-111.
- Scherer, H.W., y A. Lange. 1996. N₂ fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biol. Fert. Soils* 23:449-453.
- Scherer, H.W., S. Pacyna, N. Manthey, y M. Schulz. 2006. Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influences symbiotic N₂ fixation. *Plant Soil Environ.* 52:72-77.
- Scherer, H.W., S. Pacyna, K. Spoth, y M. Schulz. 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biol. Fert. Soils* 44:909-916.
- Schulze, J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes?. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167:125-137.
- Schulze, J., G. Temple, S.J. Temple, H. Beschow, y C.P. Vance. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Ann. Bot. London.* 98:731-740.
- Suliaman, S., C.V. Ha, J. Schulze, y L.S.P. Tran. 2013. Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *J. Exp. Bot.* 64:2701-2712.
- ThomsonReuters. 2013. (WebofKnowledgeSM: New York, USA) <http://apps.webofknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=Q24GfEGFc9@OdMkAM6k&preferencesSaved=> [accessed September 2013].
- Vadez, V., T.R. Sinclair, y R. Serraj. 2000. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. *Physiol. Plant.* 110:215-223.
- Vance, C.P., P.H. Graham, y D.L. Allan. 2000. Biological nitrogen fixation: phosphorus a critical future need? in: Pederosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G., Newton, W.E., (Eds.). Nitrogen Fixation from Molecules to Crop Productivity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 509-518.
- Varin, S., J.B. Cliquet, E. Personeni, J.C. Avice, y S. Lemauiel-Lavenant. 2010. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)? *J. Exp. Bot.* 61:225-234. 🌱