

APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS DEL INIA A LAS **TRAYECTORIAS AGROECOLÓGICAS**

Editores: Georgina Paula García-Inza, José Paruelo y Roberto Zoppolo



Capítulo 7

Tecnología de inoculantes rizobianos y aporte de nitrógeno proveniente de la atmósfera a los sistemas de producción

Elena Beyhaut, Eduardo Abreo, Claudia Barlocco,
Valeria Larnaudie y Nora Altier

1. Introducción

El nitrógeno (N) es el nutriente de mayor demanda a nivel mundial y su condición de limitante es manejada en la agricultura moderna mediante el uso de fertilizantes nitrogenados producidos por síntesis química. Si bien el uso de fertilizantes nitrogenados incrementa la productividad, tiene impactos negativos en el ambiente. Como alternativa al uso de fertilizantes, la fijación biológica de nitrógeno (FBN), mediada por la asociación de mutuo beneficio entre leguminosas y rizobios, es capaz de aportar 175 millones de toneladas de N por año (Paul, 1988), aproximadamente el 50% de todo el nitrógeno usado en la agricultura a nivel global. Los rizobios son bacterias edáficas pertenecientes al *phylum* Proteobacterias, capaces de promover el desarrollo de nódulos en las raíces de las leguminosas. Mediante esta asociación simbiótica específica, ambos socios, leguminosas y rizobios, interactúan de manera finamente coordinada para que el nitrógeno gas (N_2), constituyente mayoritario de la atmósfera, sea transformado en formas químicas que las plantas pueden absorber. La FBN no solamente evita la contaminación de las aguas, sino que también reduce las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y contribuye a la conservación de la biodiversidad. En Uruguay, el uso agropecuario de la FBN está enmarcado en una política de Estado desde la década de 1960.

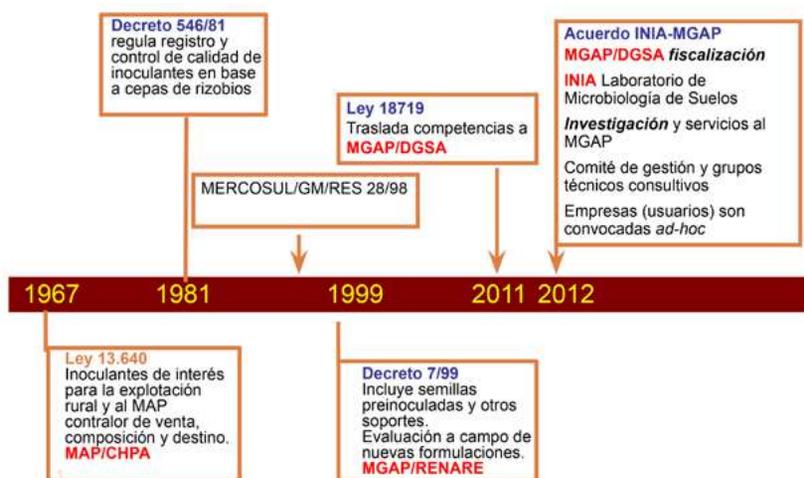
El nitrógeno que ingresa a los sistemas de producción por la vía de la FBN en Uruguay puede valuarse en torno de 400 millones de dólares cada año. Esta estimación se basa en que, por un lado, en nuestras condicio-

nes las leguminosas forrajeras derivan más del 80% de su N de la atmósfera y fijan aproximadamente 30 kilos de nitrógeno por tonelada de materia seca producida (Danso *et al.*, 1988; Danso y Curbelo, 1991). Por otro lado, el cultivo de soja requiere 80 kilos de nitrógeno por cada tonelada de grano producido y no menos del 50% es provisto por la FBN (Salvagiotti *et al.*, 2008). Por último, es razonable estimar que, del fertilizante nitrogenado que se aplica a los sistemas de producción, el 50% acaba fuera de estos y no es absorbido por los cultivos (Dobermann y Cassman, 2005). Combinando estas cifras, y sobre la base de algunos supuestos relativos a los precios, se llega a la estimación del orden mencionado. Son divisas que el país ahorra, pero, además, por ser una tecnología amigable para el ambiente, la FBN es una pieza clave para la producción sostenible (Peoples y Craswell, 1992; Hungría *et al.*, 2006) y para la transición hacia producciones agroecológicas.

2. Fijación biológica de nitrógeno a escala país: una política de Estado

En 1967 se estipuló por ley que los inoculantes eran de interés para la explotación rural (Figura 1), otorgando al Ministerio de Agricultura y Pesca (así denominado en la época) potestades de contralor de la venta, composición y destino de estos. Más adelante se implementó el Sistema Nacional de Registro y Control de Calidad de Inoculantes, marcando el inicio de un trabajo coordinado entre el Sector Público y el Sector Privado que continúa hasta nuestros días, dando el contexto para el desarrollo y la producción nacional de inoculantes de alta calidad (Altier *et al.*, 2013). Desde entonces, los inoculantes han tenido amplia adopción por parte del sector productivo, y el éxito de esta biotecnología ha traído aparejados importantes beneficios económicos y ambientales para el país por más de cinco décadas. Los inoculantes formulados en base a rizobios para leguminosas cumplen con exigencias legales, entre ellas la identidad de la/s cepa/s, la concentración de células vivas y la ausencia total de contaminantes. Junto con los inoculantes tradicionales basados en turba estéril finamente molida y las formulaciones líquidas, la legislación incluye a las semillas preinoculadas. En estas, las exigencias para el registro enfatizan el recuento de rizobios vivos sobre la semilla y su capacidad para producir una nodulación satisfactoria en función del tiempo.

FIGURA 1. CRONOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DEL SISTEMA NACIONAL DE REGISTRO Y CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES



Fuente: Elaboración propia.

A partir del convenio firmado en el año 2012, el INIA y el MGAP acordaron combinar capacidades para dar continuidad al Sistema Nacional de Registro y Control de Calidad de Inoculantes (Figura 2). Mediante este acuerdo, el MGAP continúa con la recomendación oficial de cepas, la fiscalización de la elaboración y la comercialización de los inoculantes, y el INIA proporciona los servicios de análisis de los mismos y realiza la curaduría de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios –ingresada en la base de datos de la World Federation for Culture Collections (WFCC)–, destacándose que es la primera colección de Uruguay en ser indexada. El INIA, a su vez, suministra cada año las cepas a las empresas fabricantes de inoculantes (Barlocco *et al.*, 2014; Barlocco *et al.*, 2015) y cumple con el cometido de valorizar y ampliar la colección, así como contribuir a la identificación de cepas eficientes para nuevas leguminosas de interés agronómico y llevar adelante investigación científica sobre FBN. Mediante una plataforma web compartida por ambas instituciones y las empresas registradas, los resultados de los análisis quedan rápidamente disponibles para las partes interesadas. Asimismo, allí se accede al listado de bioinsumos registrados y de los lotes autorizados para la venta, así como

a protocolos, formularios y comunicados oficiales. En la Tabla 1 se listan las cepas recomendadas oficialmente para la formulación de inoculantes comerciales de las leguminosas de interés agronómico.

FIGURA 2. ESQUEMA DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL INIA-MGAP (INICIALMENTE MAP)



Fuente: Elaboración propia.

TABLA 1. CEPAS DE RIZOBIOS RECOMENDADAS OFICIALMENTE POR EL MGAP PARA LA FORMULACIÓN DE INOCULANTES

Huésped	Código	Especie de rizobio	Otras designaciones
<i>Medicago sativa</i>	U-143	<i>Sinorhizobium melliloti</i>	MCH3
<i>Trifolium pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. subterraneum</i> , <i>T. incarnatum</i>	U-204	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	U-28
<i>Trifolium alexandrinum</i>	U-206	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	NA 120
<i>Trifolium vesiculosum</i>	U-276	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	TAC 8
<i>Trifolium fragiferum</i>	U-262	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	SEMIA 235
<i>Trifolium balansae</i>	U-2082	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	TBal
<i>Ornithopus compressus</i> , <i>O. sativus</i>	U-612 + U-620	<i>Bradyrhizobium</i> <i>sp.</i>	OR 1 + CAL 22
<i>Vicia sativa</i> , <i>V. villosa</i>	U-344	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viceae</i>	WSM 1131
<i>Lotononis bainesii</i>	U-1205	<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i>	XCT 16
<i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. glaber</i>	U-510	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	U-226
<i>Lotus subbiflorus</i>	U-531	<i>Mesorhizobium loti</i>	NC3
<i>Lotus uliginosus</i>	U-1401	<i>Bradyrhizobium loti</i>	NZP 2309
<i>Pisum sativum</i>	U-315	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viceae</i>	SEMIA 335
<i>Phaseolus vulgaris</i>	U-808 + U-809	<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA 4077 + SEMIA 4080
<i>Glycine max</i>	U-1301 + U-1302	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	SEMIA 587 + SEMIA 5019
<i>Trifolium resupinatum</i>	U-223	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	NA 146

Fuente: Elaboración propia.

3. Tecnologías de inoculación, fijación de nitrógeno y estrategia de investigación

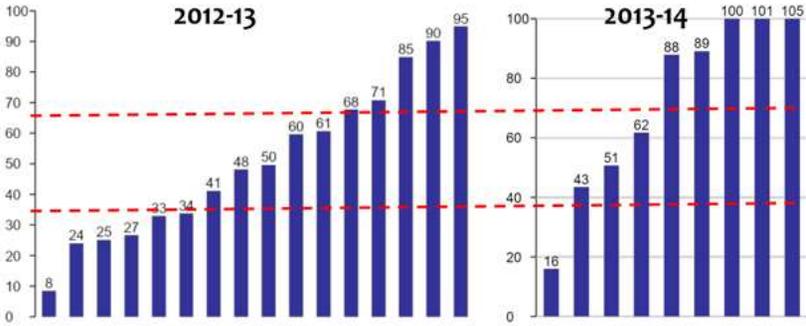
La plataforma de bioinsumos del INIA lleva adelante una línea de investigación que tiene como objetivo la maximización de la FBN en el cultivo de soja. Las preguntas de investigación son:

1. ¿La expresión agronómica de la FBN en chacras comerciales es la máxima alcanzable?
2. ¿Es posible seleccionar cepas más eficientes, competitivas y persistentes que las que se recomiendan actualmente?
3. ¿Los agroquímicos aplicados sobre las semillas (curasemillas) son compatibles con los rizobios o tienen efectos deletéreos significativos sobre estos?
4. ¿Existe variabilidad genética respecto de la habilidad para la FBN en las líneas avanzadas del programa de mejoramiento de soja del INIA, y es posible encontrar marcadores moleculares para esta característica?

Respondiendo a la primera pregunta sobre la expresión agronómica de la simbiosis en predios comerciales, la Figura 3 muestra que la propor-

ción de N que el cultivo de soja obtiene de la atmósfera –una estimación de la eficiencia de la simbiosis– se distribuye en un amplio rango en los distintos sitios estudiados durante los años 2012-2014 (Beyhaut *et al.*, 2015). Se observó una asociación negativa entre la proporción de N derivado de la atmósfera y el N potencialmente mineralizable de los suelos, y se puso en evidencia la necesidad de estudios en mayor profundidad –los promedios no son suficientemente informativos– para generar nuevas hipótesis en relación con las tecnologías de aplicación de los inoculantes, incluidas preinoculación e inoculación por encargo (o a pedido).

FIGURA 3. ESTIMACIONES DE NITRÓGENO DERIVADO DE LA ATMÓSFERA (%) EN SITIOS COMERCIALES INOCULADOS CON *BRADYRHIZOBIUM ELKANII* CEPAS U1301 Y U1302



Nota: Izquierda = 25 sitios en la zafra 2012-2013; derecha = 9 sitios comerciales en la zafra 2013-2014.

Fuente: Elaboración propia.

Con relación a la eficiencia y competitividad de las cepas para soja y la posibilidad de obtener cepas con mejor desempeño, la evaluación en condiciones estériles de parámetros de nodulación –número de nódulos (NN) y peso seco de nódulos (PSN)– mostró que el PSN de plantas inoculadas con la recomendación oficial de las cepas U1301 y U1302 fue estadísticamente igual al PSN de plantas inoculadas con cada una de las cinco cepas naturalizadas CL2, SO1, CA1, CA2 y CL1. En el mismo experimento se evaluaron parámetros de biomasa de planta, entre ellos el peso seco de la parte aérea (PSPA). De manera similar a lo ocurrido con los parámetros de nodulación, el PSPA del tratamiento inoculado con la

mezcla de U1301 y U1302 estuvo entre los más altos, y fue estadísticamente igual al PSPA de las plantas inoculadas con cada una de las cuatro cepas naturalizadas de *B. elkanii* CA1, SO1, CL1 y CL2 (Lagurara, 2018, Rodríguez, 2020). A partir de esa evaluación en condiciones estériles, se corroboró el buen desempeño de la actual recomendación de cepas y se seleccionaron preliminarmente cepas altamente eficientes que habían sido aisladas de suelos de Uruguay. Con posterioridad, con las cepas promisorias se realizó un experimento similar en macetas con suelo con alta carga de rizobios capaces de nodular soja, para estudiar la capacidad de competir de las cepas y su adaptación a condiciones más parecidas al ambiente edáfico natural. La Tabla 2 presenta los valores indicativos de la eficiencia simbiótica de las cepas mediante la diferencia de contenido del isótopo ^{15}N en la planta respecto del contenido de ^{15}N en la atmósfera ($\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$). Los $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ de mayor valor absoluto y signo negativo indican mayor eficiencia simbiótica. Los tratamientos inoculados que mostraron mayor proporción de N proveniente de la atmósfera en relación con los controles sin inocular (con y sin N agregado, CN y SN) fueron: U1301 + U1302, las cepas naturalizadas CL1, CA1 y CL2 de *B. elkanii*, la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2 y la cepa *B. japonicum* SJ1.

TABLA 2. DIFERENCIA DE ^{15}N RESPECTO DEL AIRE ($\delta^{15}\text{N}_{\text{AIRE}}$) Y NITRÓGENO TOTAL EN PARTE AÉREA (NTPA), DE PLANTAS DE SOJA CRECIDAS EN INVERNÁCULO CON SUELO: ARENA (1:2) INOCULADAS CON CEPAS DE RIZOBIOS NATURALIZADAS Y DE REFERENCIA Y CONTROL SIN INOCULAR, COSECHADAS A LOS 40 DÍAS

TRATAMIENTO	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIRE}}$ (‰)	NTPA (MG)
SN	-1,46 ^{de}	2.863 ^{abc}
CN	-1,37 ^e	3.193 ^{bcd}
<i>B. elkanii</i> U1301+U1302	-1,60 ^{abc}	3.226 ^{cd}
<i>B. elkanii</i> SO1*	-1,57 ^{abcd}	2.900 ^{abc}
<i>B. elkanii</i> CL1*	-1,59 ^{abc}	2.833 ^{ab}
<i>B. elkanii</i> CA1*	-1,58 ^{abc}	2.830 ^{ab}
<i>B. elkanii</i> CO1*	-1,51 ^{bcd}	2.895 ^{abc}
<i>B. elkanii</i> CL2*	-1,60 ^{ab}	2.971 ^{abcd}
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2*	-1,63 ^a	2.666 ^a
<i>B. japonicum</i> E109	-1,48 ^{cd}	3.335 ^d

(Continúa en página siguiente)

<i>B. japonicum</i> CL3*	-1,50 ^{bcd}	2.899 ^{abc}
<i>B. japonicum</i> CO2*	-1,51 ^{bcd}	3.121 ^{bcd}
<i>B. japonicum</i> SJ1*	-1,59 ^{abc}	3.103 ^{bcd}
<i>B. japonicum</i> SO2*	-1,52 ^{abcd}	3.183 ^{bcd}
<i>B. diazoefficiens</i> SEMIA5080	-1,52 ^{abcd}	2.971 ^{abcd}

Nota: Los valores representan la media ($n = 5$). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$). Los tratamientos incluyen: control sin inocular y sin nitrógeno (SN); control con nitrógeno (CN); cepas de referencia: *B. elkanii* U1301 + U1302, *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y cepas naturalizadas (*).

Fuente: Rodríguez (2020).

La información disponible permite afirmar que la eficiencia simbiótica y la competitividad de la mezcla recomendada oficialmente de *B. elkanii* U1301 y U1302 son altas, al mismo tiempo que se confirma la existencia en suelos de Uruguay de cepas naturalizadas para soja con desempeño similar para estas características. Estas cepas naturalizadas representan recursos genéticos microbianos valiosos adaptados a las condiciones locales con importante potencial de uso a futuro.

Los ensayos para investigar si la aplicación de curasemillas puede causar efectos negativos sobre la viabilidad de los rizobios del inoculante mostraron efectos de intensidad variable, según la molécula en cuestión y la formulación (Olivera, 2014; Olivera *et al.*, 2016). Estos resultados promovieron una estrategia de manejo del riesgo, considerando la inoculación y el uso de curasemillas como prácticas agronómicas centrales en la implantación del cultivo (Figura 4). Por un lado, la inoculación con rizobios debe garantizar la nutrición nitrogenada del cultivo. Por otro, el uso de curasemillas es una herramienta muy generalizada para el manejo de enfermedades, insectos o aves plaga que afectan la implantación. En el momento de decidir las intervenciones agronómicas, es necesario tener información referente a: la calidad de la semilla (germinación, vigor, sanidad), el potencial de patogenicidad de la chacra, el pronóstico de tiempo para el período siembra-implantación, los patógenos e insectos presentes y la compatibilidad de los curasemillas con el inoculante (Beyhaut *et al.*, 2020).

FIGURA 4. GUÍA PARA EL MANEJO DEL RIESGO EN LA TOMA DE DECISIONES DE USO DE CURASEMILLAS EN SOJA (FAVORABLE/ADVERSO RESPECTO DE LA IMPLANTACIÓN EXITOSA DEL CULTIVO)

Calidad de semilla	Índice de patogenicidad del suelo	Época de siembra/Pronóstico climático ⁽¹⁾	Riesgo de fallas de implantación
Alta	Bajo	Favorable	
		Adverso	
	Alto	Favorable	
		Adverso	
Media	Bajo	Favorable	
		Adverso	
	Alto	Favorable	
		Adverso	
Baja	Bajo	Favorable	
		Adverso	
	Alto	Favorable	
		Adverso	

* Favorable/adverso para el desarrollo del cultivo.

Fuente: Elaboración propia.

Para responder a la cuarta pregunta de investigación, se está realizando un mapeo asociativo –*genome-wide association mapping* (GWAS)– para FBN en las líneas de germoplasma avanzado del programa de mejoramiento genético de soja del INIA, con el objetivo de determinar si existen QTL (*Quantitative Trait Locus*, o locus de rasgo cuantitativo) asociados a alta eficiencia de FBN y qué porcentaje de la varianza fenotípica es explicada a través de estos QTL. La selección de genotipos de la planta huésped se presenta como una estrategia más para aumentar la eficiencia de la FBN y mejorar la nutrición nitrogenada del cultivo (Sinclair y Nogueira, 2018).

4. Contribuciones de la fijación biológica de nitrógeno a las transiciones agroecológicas: consideraciones finales

Después de la fotosíntesis, la FBN es el segundo proceso bioquímico de mayor importancia en el planeta Tierra. En Uruguay, la decisión de establecer la FBN como política de Estado en la década de 1960 permitió desarrollar la tecnología de los inoculantes rizobianos para leguminosas y, mediante el trabajo conjunto de los sectores público y privado, hizo posible una producción nacional de alta calidad. El convenio INIA-MGAP firmado en 2012 reforzó el compromiso interinstitucional, fortaleciendo las funciones del Sistema Nacional de Inoculantes.

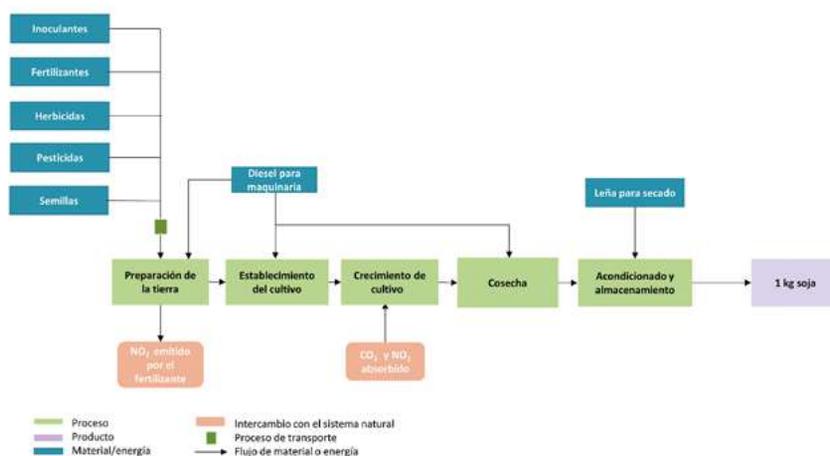
El uso de inoculantes ha sido ampliamente adoptado por el sector productivo uruguayo, con significativos beneficios económicos, ambientales y sociales para el país. Considerando su aplicación en el cultivo de soja y en las leguminosas forrajeras, el aporte de nitrógeno obtenido por la FBN se ha valorizado cercano a los 400 millones de dólares anuales en equivalente urea, por lo que aporta un elemento central a la bioeconomía del país.

Además del beneficio económico antes mencionado, la FBN evita la contaminación de las aguas, reduce las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y contribuye a la conservación de la biodiversidad. Por tanto, el uso de la tecnología de inoculantes en la producción de leguminosas cultivadas contribuye a una reducción relevante en el impacto ambiental de los agroecosistemas. Araujo *et al.* (2020) demostraron que la sustitución del fertilizante nitrogenado por el inoculante rizobiano en cultivos de leguminosas de grano (*Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan*) resultó en una reducción del impacto ambiental en cinco categorías de impacto, incluido el calentamiento global (emisiones de GEI).

Recientemente, para cuantificar la reducción en el impacto ambiental asociada a los cultivos de soja y leguminosas forrajeras producidos con inoculantes rizobianos, el INIA y la Facultad de Ingeniería (UDELAR) comenzaron a trabajar con la metodología de análisis de ciclo de vida (ACV). El ACV es una herramienta para cuantificar el efecto ambiental del uso de recursos naturales y de las emisiones generadas, reuniendo información asociada a las entradas y salidas de materia y energía de todos los procesos involucrados en el ciclo de vida de un producto. Es la herramienta más utilizada para la evaluación ambiental de procesos y productos, por estar estandarizada en las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés, International Organization

for Standardization [ISO-14040], 2006a; International Organization for Standardization [ISO-14044], 2006b). De acuerdo con estas normas, el ACV es definido como una técnica para evaluar aspectos ambientales e impactos potenciales asociados a un producto, mediante la recopilación de un inventario de entradas y salidas del sistema de estudio. En la Figura 5 se muestra como ejemplo el sistema a estudiar para el cultivo de soja.

FIGURA 5. SISTEMA PLANTEADO PARA EL ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA (ACV) EN EL CULTIVO DE SOJA



Fuente: Elaboración propia.

Conocer y entender la ecología de la simbiosis leguminosas-rizobios es una herramienta clave para mantener la FBN como principal fuente de nitrógeno en los sistemas de producción. En la Plataforma de Bioinsumos del INIA se han desarrollado capacidades de infraestructura y recursos humanos calificados para profundizar en esta línea de investigación, la cual es tema de agenda en el plan estratégico institucional y está dando respuestas a las preguntas de investigación planteadas. El antecedente histórico de la tecnología de inoculantes rizobianos para leguminosas sostenida en la FBN y el modelo de gestión interinstitucional para el re-

gistro y control de calidad sientan fundamentos sólidos para el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en el uso de microorganismos para la agricultura que promuevan las transiciones agroecológicas.

Bibliografía

Altier, N., Beyhaut, E. y Pérez, C.

(2013), “Root nodule and rhizosphere bacteria for forage legume growth promotion and disease management”, en Maheshwari, D. K., Saraf, M. y Aeron, A. (eds.), *Bacteria in agrobiolgy: crop productivity*, Springer, Dordrecht (Países Bajos), pp.167-184.

Araujo, J., Urbano, B. y González-Andrés, F.

(2020), “Comparative environmental life cycle and agronomic performance assessments of nitrogen fixing rhizobia and mineral nitrogen fertiliser applications for pulses in the Caribbean region”, *Journal of Cleaner Production*, 267, p. 122065.

Barlocco, C., Cerecetto, V., Mattos, N., Mortalena, M., Mayans, M., Beyhaut, E. y Altier, N.

(2015), *Caracterización de la colección nacional de cepas de rizobios: multifuncionalidad*, Serie Actividades de Difusión 755, INIA, Montevideo, pp. 4 -7.

Barlocco, C., Mayans, M., Mattos, N., Altier, N. y Beyhaut, E.

(2014), “Colección nacional de cepas de rizobios en Uruguay: caracterización y puesta en valor”, en *Boletín FELACC*, 14, pp. 6-12. Disponible en: <<http://felacc.cinvestav.mx/boletin/14.pdf>>.

Beyhaut, E.

(2015), “Both rhizobial inoculation technologies and soil properties affect N₂-fixation efficiency of commercial soybeans in Uruguay”, 23rd North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Ixtapa, México.

Beyhaut, E., Abreo, E., Vaz, P., Pérez, C. y Altier, N.

(2020), “Prácticas agronómicas centrales en la implantación de soja: inoculación y uso de curasemillas”, en *Revista INIA Uruguay*, 62, pp. 101-102.

Danso, S. A. y Curbelo, S.

(1991), “Herbage yield and nitrogen-fixation in a triple-species mixed sward of white clover, lotus and fescue”, en *Soil Biology and Biochemistry*, 23(1), pp. 65-70.

Danso, S. A., Labandera, C., Pastorini, D. y Curbelo, S.

(1988), “Nitrogen fixation in a two-year old white clover-fescue pasture: influence of nitrogen fertilization”, en *Soil Biology and Biochemistry*, 20(2), pp. 261-262.

Dobermann, A. y Cassman, K. G.

(2005), “Cereal area and nitrogen use efficiency are drivers of future nitrogen fertilizer consumption”, en *Science in China Series C: Life Sciences*, 48(2), pp. 745-758.

Hungria, M., Franchini, J. C., Campo, R. J., Crispino, C. C., Moraes, J. Z., Sibaldelli, R. N., Mendes, I. C. y Arihara, J.

(2006), "Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield", en *Canadian Journal of Plant Science*, 86(4), pp. 927-939.

International Organization for Standardization

(2006a), *Environmental management-Life cycle assessment-principles and framework* (ISO/DIS Standard No. 14040)

International Organization for Standardization

(2006b), *Environmental management-Life cycle assessment-Requirements and guidelines* (ISO/DIS Standard No. 14044).

Lagurara, P. F.

(2018), *Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo*, Tesis Mag. Cs. Agr., Facultad de Agronomía, Montevideo, 117 pp.

Olivera, L. M.

(2014), *Repelentes de aves aplicados a la semilla para plántulas de soja: penetración hacia los cotiledones, efectos sobre la germinación y compatibilidad con inoculantes*, Tesis Mag. Cs. Agr., Facultad de Agronomía, Montevideo, 69 pp.

Olivera, L., Rodríguez, E., Ceretta, S. y Beyhaut, E.

(2016), "Repelentes de aves aplicados a la semilla de soja: compatibilidad con el inoculante y residualidad en cotiledones", en *Agrociencia Uruguay*, 20(2), pp. 51-60.

Paul, E. A.

(1988), "Towards the year 2000: directions for future nitrogen research", en Wilson, J. R. (ed.), *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*, C A B International, Wallingford (Reino Unido), pp. 417-425.

Peoples, M. B. y Craswell, E. T.

(1992), "Biological nitrogen fixation: investments, expectations, and actual contributions to agriculture", en *Plant and Soil*, 141, pp. 13-39.

Rodríguez, N. E.

(2020), *Diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios naturalizados que nodulan soja en Uruguay*, Tesis Mag. Cs. Agr., Facultad de Agronomía, Montevideo, 111 pp.

Salvagiotti, F., Cassman, K. G., Specht, J. E., Walters, D. T., Weiss, A. y Dobermann, A.

(2008), "Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review", en *Field Crops Research*, 108(1), pp. 1-13. doi: 10.1016/j.fcr.2008.03.001.

Sinclair, T. R. y Nogueira, M. A.

(2018), "The next step to increase grain legume N₂ fixation activity: selection of host-plant genotype", en *Journal of Experimental Botany*.

Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadish, G., Boddey, B., Giller, K., Alves, B. y Chalk, P.

(2008), *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems*, ACIAR (Australian Center for International Agricultural Research), Canberra.