



Inducción de señales en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y su actividad biológica en arveja (*Pisum sativum* L.)

Induction of signals in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its biological activity in pea (*Pisum sativum* L.)

¹María Caridad Nápoles-García^{1*}, ²Juan Carlos Cabrera-Pino², ³Guillaume Wegria³,
⁴Rob Onderwater⁴, ⁵Ruddy Wattiez⁵, ⁶Daimy Costales-Menéndez¹, ⁷Ionel Hernández-Forte¹,
⁸Belkis Morales-Mena¹, ⁹Alejandro Rossi⁵, ¹⁰Gustavo González-Anta⁶

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700.

²Fytek, Allée de la Recherche 4, 1070 Anderlecht, Belgium.

³Unité Biotechnologie-Materia Nova A.S.B.L., Rue des Foudriers 1, 7822 Ghislenghien, Belgium.

⁴Institute Biosciences, University of Mons, Belgium.

⁵Empresa Rizobacter S.A., Ruta N° 32, Km. 1,5 Parque Industrial de Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

⁶Empresa Indrasa Biotecnología S.A., Av. Lt. Gral. San Matín 2241, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

RESUMEN: La arveja es una planta versátil, utilizada de diferentes formas y para distintos propósitos, por su elevado valor nutritivo. Su interacción simbiótica con bacterias de la familia de los rizobios garantiza importantes cantidades de nitrógeno, a partir de la fijación biológica, lo que le permite crecer en ambientes carentes de este elemento. La importancia agronómica y ambiental de esta simbiosis ha exigido el perfeccionamiento de las tecnologías de producción y aplicación de inoculantes, por lo que este trabajo se propuso evaluar el efecto de la inducción de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en la generación de señales en el inoculante y su actividad biológica sobre plantas de arveja. Se utilizó como inductor la daidzeína a una concentración final de 5 µM. La fracción lipídica en los inóculos fue extraída con n-butanol y analizada por cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas. La actividad biológica se evaluó en un experimento en condiciones controladas, dos experimentos en campo y un ensayo extensivo. Los resultados mostraron que en los inóculos inducidos con el flavonoide se detectó una cantidad y diversidad superior de moléculas relacionadas con la interacción simbiótica. De manera similar, los inóculos inducidos mostraron un efecto positivo superior en la nodulación (14,8 vs 8,7) y el rendimiento de plantas de arveja, con 468 y 125 kg ha⁻¹ de semillas por encima del tratamiento inoculado sin inducir en los experimentos en parcelas y 746 kg ha⁻¹ en el ensayo extensivo.

Palabras clave: fijación biológica, nodulación, comunicación, legumbres.

ABSTRACT: Pea is a versatile plant, used in different ways and for different purposes, due to its high nutritional value. Its symbiotic interaction with bacteria of the rhizobia family guarantees significant amounts of nitrogen, from biological fixation, which allows it to grow in environments lacking this element. The agronomic and environmental importance of this symbiosis has required technology improvement for the production and inoculant application, so this work set out to evaluate the induction effect of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain in the generation of signals in the inoculant and its biological activity on pea plants. Daidzein was used as an inducer at a final concentration of 5 µM. The lipidic fraction in the inocula was extracted with n-butanol and analyzed by high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to a mass spectrometer. Biological activity was evaluated in one experiment under controlled conditions, two field experiments, and one extensive trial. The results showed that in the inoculant induced with the flavonoid, a higher quantity and diversity of molecules related to the symbiotic interaction was detected. Similarly, the induced inocula showed a higher positive effect on nodulation (14.8 vs 8.7) and the yield of pea plants, with 468 and 125 kg ha⁻¹ of seeds above the inoculated treatment without inducing in the experiments in plots and 746 kg ha⁻¹ in the extensive trial.

Key words: biological fixation, nodulation, communication, legumes.

*Autor para correspondencia: tere@inca.edu.cu

Recibido: 13/12/2019

Aceptado: 17/03/2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

La arveja (*Pisum sativum* L.) es una leguminosa de grano, caracterizada por su alto valor nutricional y su uso en la nutrición humana y animal. Sus semillas contienen entre 18 y 20 % de materia seca, de las cuales, del 10 al 12 % son carbohidratos y entre cinco y ocho % son proteínas (1). Los granos de arveja pueden usarse para consumo inmediato o enlatados para almacenamiento a largo plazo (2). Este cultivo también se puede utilizar como forraje verde, heno, ensilaje o harina y como abono verde (3).

Como leguminosa, la arveja tiene otra característica importante, relacionada con la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con bacterias de la familia de los rizobios (4), específicamente con la especie *R. leguminosarum* bv. *viciae* (5). Esta simbiosis proporciona cantidades significativas de N al suelo para los cultivos sucesores y se plantea que la inoculación con estas bacterias puede producir rendimientos similares a la aplicación de 200 kg de N ha⁻¹ (2).

La aplicación de grandes cantidades de fertilizantes inorgánicos en sistemas de producción intensiva (6,7) representa una carga contaminante para el medio ambiente y altos costos que muchos países no pueden pagar. Lograr rendimientos similares o más altos con bajos insumos y productos orgánicos, significa un desafío para la agricultura sostenible. La fijación simbiótica de N constituye una alternativa prometedora al respecto (8,9).

Las tecnologías de inoculación de diversos microorganismos beneficiosos en las semillas constituyen una práctica agronómica económica, recomendada en la agricultura. La inoculación exitosa dependerá de varios factores, incluida la capacidad de la cepa introducida para competir con la población nativa existente y lograr una mayor infección, nodulación y contribución de N (10).

La simbiosis que se establece entre las plantas leguminosas y los rizobios responde a un intenso intercambio de señales desde el comienzo de la interacción, lo que permite la comunicación entre ambos simbioses: el macro y el microorganismo (11). Las semillas liberan diversos compuestos, incluidos los flavonoides, que causan la expresión de genes *nod* en las bacterias, lo que induce la síntesis de factores Nod, moléculas esenciales en el éxito de la interacción (12). Estos compuestos también se han relacionado con la quimioatracción que ejercen las leguminosas sobre los rizobios y con la expresión de otros genes en estas bacterias que regulan la síntesis de exopolisacáridos y del sistema de secreción de tipo III, relacionados con las respuestas defensivas en el huésped y la exportación de proteínas en la nodulación, respectivamente (13).

Los ácidos grasos de alto peso molecular son componentes estructurales de los lipoquitoligosacáridos asociados con la nodulación. Los factores Nod consisten en un esqueleto de tres a cinco moléculas de N-acetilglucosamina, que en el grupo amino del extremo no reducido se acila con un ácido graso de 16-20 átomos de C de largo (C16-C20) (14).

El uso de inoculantes inducidos en la síntesis de estas señales que gobiernan la comunicación, ha permitido obtener no solo una mejor nodulación y rendimiento de las plantas (15), sino también tolerancia a las condiciones de estrés en el medio ambiente (16). Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inducción de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en la generación de señales en el inoculante y su actividad biológica en plantas de arveja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo bacteriano. Inducción con daidzeína

Se utilizó una cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, conocida por su simbiosis con la arveja. Se produjo un preinóculo en 50 mL de medio extracto de levadura manitol (17) a pH 6,8; para inocular 600 mL del mismo medio sin y con daidzeína (Sigma), la que se añadió a una concentración final de 5 µM. Los inóculos se obtuvieron después de mantener los frascos a 150 rpm durante 48 h, en un agitador orbital a 28 ± 2 °C de temperatura. Para cada caso, el procedimiento se repitió tres veces e incluyó tres muestras de cada tratamiento (sin inducir e inducido con daidzeína).

Extracción de la fracción lipídica

Teniendo en cuenta que la mayoría de las señales reconocidas por su actividad biológica en la interacción rizobios-leguminosas son lípidos, se realizó una extracción selectiva de estas moléculas del inóculo tratado con daidzeína (Inducido) o no (Control), utilizando 180 mL de n-butanol en cada muestra. Se colocaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 15 min y se mantuvieron en reposo durante la noche en condiciones de oscuridad a una temperatura ambiente de 25±2 °C. Luego se extrajo la fase orgánica en cada muestra, se centrifugó a 12000 g, 10 °C, durante 10 minutos. Todas las muestras se concentraron por rotoevaporación a 50-80 °C hasta que se obtuvieron 2 mL de cada una, que se utilizaron para la detección de señales producidas por la bacteria.

Detección de señales. Caracterización estructural de componentes principales en la fracción lipídica

Análisis de cromatografía líquida de alta resolución, fase inversa

Para evaluar la presencia de factores de nodulación entre los metabolitos, se analizaron 10 µL de todos los extractos lipídicos por HPLC, utilizando una columna de fase inversa Waters Symmetry C-18 (46 x 250 mm) de 5 µ de tamaño de partículas, instalada en un Sistema HPLC Waters Alliance. La velocidad de flujo fue de 1 mL min⁻¹ y como solventes se usaron agua (A) y acetonitrilo (B), con un gradiente: 0-10 min 18 % B, 10-30 min 60 % B, 30-35 min 95 % B, 35-45 min 18 % B. Se usó un detector espectrofotométrico UV-Waters a una longitud de onda de 214 nm.

Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas

Los derivados volátiles de ácidos grasos se prepararon por siliación, utilizando BSTFA (N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) como reactivo en combinación con trimetilclorosilano (TMCS) (Kit BSTFA + TMCS, Supelco). Para el análisis por GC-MS, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu GC-MS QP-2010; sistema equipado con autoinyector AOC-20i, inyector automático AOC- 20s y un sistema de inserción directa controlado por el software "Solución GC-MS". Se utilizó una columna Optima 5 MS (30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm de espesor de película). Las condiciones de los análisis cromatográficos fueron: temperatura del inyector 310 °C, temperatura del horno 100 °C durante seis minutos. Posteriormente se aumentó a 320 °C a una velocidad de 20 °C min⁻¹ y se mantuvo durante 5 minutos. El volumen de inyección fue de 1 µL y el flujo en la columna de 0,75 mL min⁻¹, utilizando helio como gas de arrastre.

Efecto sobre la nodulación de plantas de arveja, en condiciones controladas

A partir de los biopreparados obtenidos, se inocularon dos mL por cada 500 g de semillas de la variedad Facon, que se sembraron en una mezcla de suelo/vermiculita estéril (1:1), sin aplicación de otros nutrientes. Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento, con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 28 °C y con un 60 % de humedad relativa, durante 35 días. El riego se realizó por capilaridad con agua desionizada, manteniendo el régimen de agua en aproximadamente el 90 % de la capacidad del campo. Se utilizaron nueve plantas por tratamiento para evaluar el número y la masa seca de nódulos (mg) por planta.

Efecto sobre el rendimiento de las plantas, en condiciones de campo

Este estudio se realizó en los campos experimentales de las localidades de Ferré (34°09'S, 61°09'W, altitud 93 m, suelo típico Mollisol negro, que corresponde a un suelo Feozem (18)) y Pergamino (33 ° 53'S, 60 ° 34'W, altitud 56 m, suelo Argiudol típico, franco-limoso (Feozem árgico), provincia de Buenos Aires, Argentina), durante los meses julio-octubre de 2015. Dos de los ensayos se llevaron a cabo en parcelas (en ambas localidades) y uno extensivo en Ferré.

Los datos del análisis de suelo en Pergamino fueron: pH (1:2,5)= 5,6; N-NO₃ (ppm)= 4; P Bray I (ppm)= 19,2; M. Org. (%)= 2,2; N total (%)= 0,111; Carbono (%)= 1,3. Las temperaturas (°C) entre julio-octubre: 16,4-20,1-20,4-25,0 y las precipitaciones (mm): 33,0-8,0-60,0-111,0.

Para la localidad de Ferré, los datos del análisis de suelo fueron: pH (1:2,5)= 5,6; N-NO₃ (ppm)=13,7; P Bray I (ppm)= 23,6; M. Org. (%)= 2,7; N total (%)= 0,134; Carbono (%)=1,6. Las temperaturas entre julio-octubre: 16,3-21,0-20,7-24,8 °C y las precipitaciones: 3,0-4,0-68,0-105,0 mm, respectivamente.

Se inocularon semillas de la variedad Facon a una dosis de cuatro mL por 1000 g de semillas, con una densidad de siembra de 25 semillas m⁻¹ y un sistema de siembra directa (sin laboreo) en Ferré y siembra convencional (laboreo previo del suelo) en Pergamino. Como cultivo antecesor en Ferré se cultivó soja, mientras que en Pergamino fue pastizales. En todos los experimentos se empleó como fertilización: 80 kg ha⁻¹ de Mezcla (8-38-0-8 S). En el momento de la cosecha, se determinó el rendimiento (kg ha⁻¹).

Diseño experimental y procesamiento estadístico

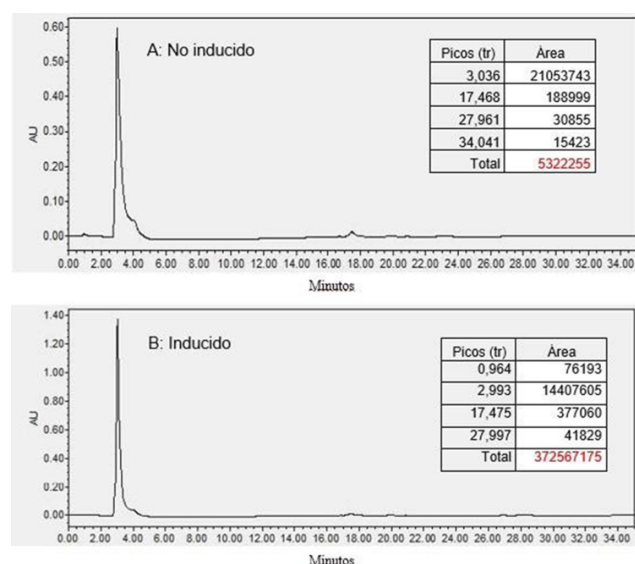
El experimento de la cámara de crecimiento se repitió tres veces. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y se comprobó la normalidad y la homogeneidad de la varianza en los datos, los cuales se analizaron de acuerdo con Tukey p<0,05.

En los experimentos de parcela se utilizó un análisis bifactorial, teniendo en cuenta los factores inoculantes y localidades, con tres y dos niveles, respectivamente. Para discriminar las diferencias entre las medias, los resultados se compararon utilizando el Test de Rangos Múltiples de Duncan p<0,05. Se utilizó el programa Statgraphics Plus, versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

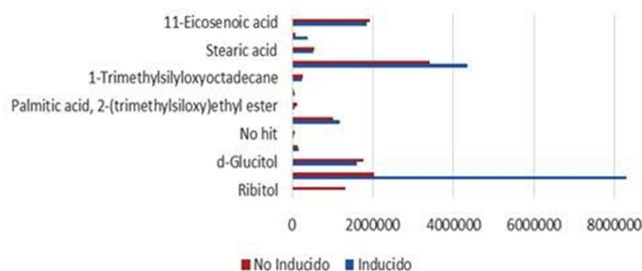
Detección de señales. Caracterización estructural de componentes principales en la fracción lipídica

El análisis de la composición de los extractos en n-butanol, correspondiente a tres réplicas biológicas independientes para cada tratamiento, realizado por HPLC y GC-MS se presenta en las Figuras 1 y 2, respectivamente.



Los datos representan el promedio de tres réplicas

Figura 1. Cromatogramas obtenidos por HPLC, tiempo de retención (tr) y área de los picos separados, al analizar las muestras del inoculante no inducido (A) y el inoculante inducido con daidzeína (B).



Los datos representan el promedio de tres réplicas

Figura 2. Área de los picos correspondientes a los cromatogramas obtenidos por GC-MS en el inoculante no inducido e inducido con daidzeína y que representan ácidos grasos y otras moléculas.

Se observan diferencias entre los tratamientos inducidos y no inducidos en los picos obtenidos y el área (concentración), que fue superior cuando el biopreparado se indujo con daidzeína (Figura 1 A y B), cuya área total fue de 372 567 175, con respecto al tratamiento no inducido que fue de 5 322 255.

Cuando las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (Figura 2), se identificaron varios picos, correspondientes a ácidos grasos de alto peso molecular como el ácido ecosenoico y esteárico y otras moléculas sintetizadas por el microorganismo.

Los resultados muestran un aumento en el área de estos picos con el tratamiento inducido. Esto significa que la daidzeína promueve no solo la producción de factores de nodulación en las bacterias, sino también otros componentes de naturaleza lipídica, como los ácidos grasos y otros compuestos.

En trabajos anteriores, otros autores también encontraron un aumento de estos ácidos grasos de alto peso molecular en los factores Nod producidos por cepas simbiotes de frijol y garbanzo, en presencia de inductores de los genes *nod* (15,19). La función biológica de los factores de nodulación está bien documentada. Sin embargo, se desconoce una posible función del resto de los compuestos detectados en el proceso de nodulación. De hecho, se ha descrito que los ácidos grasos de alto peso molecular exhiben actividad antimicrobiana y juegan un papel en el crecimiento de *Rhizobium* y la adaptación al estrés

(20). Estas estructuras de ácidos grasos también son componentes de las membranas celulares de las plantas y se ha demostrado su acumulación en las raíces de plantas de soja colonizadas por *Bradyrhizobium japonicum*

(21). Algunos ácidos grasos de alto peso molecular son precursores de la síntesis del ácido jasmónico, que resulta esencial en las respuestas de la planta al estrés biótico y abiótico (22).

Mediante los métodos utilizados para caracterizar los compuestos lipídicos y detectar la presencia de factores Nod en las muestras de inoculantes, estas estructuras se identificaron en mayor medida en el inoculante inducido con daidzeína.

Efecto sobre la nodulación en condiciones controladas

Las plantas no inoculadas no formaron nódulos, pero con respecto al efecto de los tratamientos inducidos y no inducidos sobre la nodulación, se observó un efecto superior del tratamiento inoculado con el inoculante inducido sobre el número de nódulos formados en las raíces principales y totales y también en su masa (Tabla 1).

Estos resultados indican que la presencia de una mayor cantidad y diversidad de señales en el inoculante inducido (Figuras 1 y 2), estimuló la formación de nódulos en las plantas. Se ha planteado que la percepción de señales, tales como los factores Nod, activan las vías biosintéticas requeridas para la nodulación (23) y que un mayor número de estas estructuras significa una mayor fijación biológica, así como una mayor masa nodular podría indicar más tejido nodular, más bacteroides y más fijación; por lo tanto, mayor suministro de N a la planta (24).

Efecto de los inoculantes sobre el rendimiento de la arveja, en condiciones de campo

El análisis en parcelas mostró interacción entre los factores: inoculantes (control, no inducido e inducido) y localidades (Ferré y Pergamino). Se obtuvieron rendimientos superiores en los tratamientos biofertilizados (Figura 3), lo que demuestra el papel de estas bacterias en la nutrición nitrogenada del cultivo. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (25).

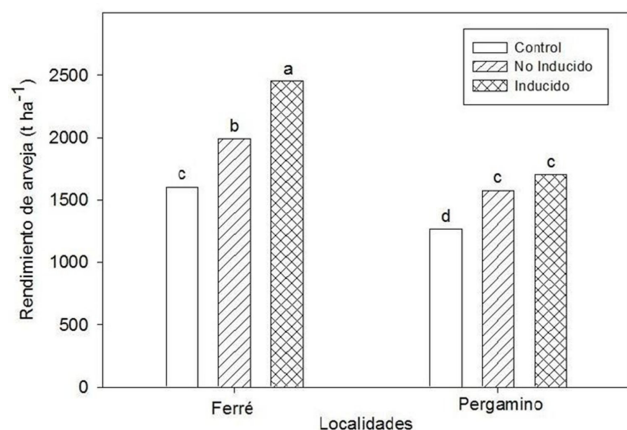
Los rendimientos fueron superiores en Ferré, con alrededor de 1000 t ha⁻¹ más, con respecto a Pergamino. Teniendo en cuenta que se utilizó en ambos experimentos la misma variedad, tratamientos y atenciones culturales y que las características del suelo y el clima no fueron significativamente diferentes, la diferencia en el rendimiento obtenida para ambas localidades, podría estar relacionada con el cultivo anterior y con el tipo de siembra utilizada.

Tabla 1. Número de nódulos y masa seca de nódulos (mg) en plantas control no inoculadas (Control) y plantas inoculadas con el biopreparado inducido o no inducido, 35 días después de la siembra.

Tratamiento	Número nódulos Raíz Principal pl ⁻¹	Masa seca nódulos Raíz Principal pl ⁻¹	Número nódulos Total pl ⁻¹	Masa seca nódulos Total pl ⁻¹
Inducido	3,56 a	7,67 a	14,89 a	19,56 a
No Inducido	0,36 b	0,73 b	8,79 b	13,21 b
Control	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c
SEx	0,35	0,89	1,24	1,02

Los datos representan el promedio de tres repeticiones

Letras similares indican que no hay diferencias entre los tratamientos, según Tukey p<0,05; n=9



Medias con letras similares indican diferencias no significativas Duncan $p < 0.05$. ES X = 54,67

Figura 3. Efecto de los tratamientos no-inoculado, inducido y no inducido sobre el rendimiento de arveja en dos localidades.

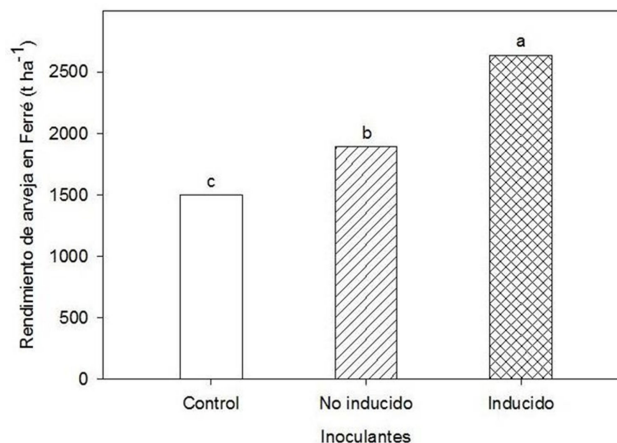
Es conocido el efecto positivo de las leguminosas en la rotación de cultivos (26,27), por las poblaciones de rizobios residuales con atributos positivos en la promoción del crecimiento vegetal y su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (28), por facilitar la circulación de los nutrientes en el suelo y la retención de agua (29) y por reducir la escorrentía de nutrientes y las emisiones de gases de efecto invernadero (30).

Con respecto a las ventajas de la siembra directa sobre los métodos convencionales de preparación del suelo se refieren incrementos en el número de plántulas establecidas (31), ahorro de agua (32) e incrementos en los rendimientos y calidad de los cultivos (33).

Cuando se compararon los tratamientos inoculados, se observó un rendimiento superior de la leguminosa en ambos lugares cuando se usó el inoculante inducido, con 468 y 125 kg ha⁻¹ de semillas, por encima del tratamiento inoculado sin inducir, para Ferré y Pergamino, respectivamente. Sin embargo, diferencias significativas entre estos tratamientos inoculados solo se observaron en Ferré.

En el ensayo extensivo, se encontraron resultados similares a los experimentos en parcelas, con mayor rendimiento en el tratamiento inoculado con la bacteria inducida (2637 kg ha⁻¹), seguido del tratamiento no inducido, pero inoculado (1891 kg ha⁻¹). El control mostró el valor de rendimiento más bajo (1501 kg ha⁻¹) (Figura 4).

El efecto positivo encontrado en las variables de nodulación (Tabla 1) se tradujo en mayores rendimientos del cultivo en diferentes condiciones. Resultados similares se obtuvieron por otros autores para la interacción *Bradyrhizobium elkanii*-soya, *Rhizobium leguminosarum*-frijol y *Mesorhizobium ciceri*-garbanzo, cuando los inóculos también fueron inducidos. El análisis de los perfiles cromatográficos obtenidos en esas investigaciones, mostró también diferencias positivas en el número de picos y su área; resultados que se correspondieron con el número de nódulos y más tarde con el rendimiento de estos cultivos (15,19,34).



Medias con letras similares indican diferencias no significativas, según Duncan $p < 0.05$. ES X = 22,16

Figura 4. Efecto de los tratamientos no inoculado (control), inducido y no inducido, sobre el rendimiento de arveja, bajo condiciones extensivas de campo en Ferré.

La importancia de los factores Nod en la interacción con las leguminosas no solo está relacionada con la nodulación y la eficiencia en la fijación biológica de N en condiciones normales y de estrés abiótico. La similitud de su estructura con los quitooligosacáridos derivados de la pared celular de hongos y activadores de defensa (35), así como evidencias directas de su papel en la reducción de enfermedades (36) y otras evidencias indirectas en la activación de enzimas de defensa (37), representan una participación de estas moléculas en ciertas respuestas de inmunidad a la invasión por patógenos (38).

CONCLUSIONES

- La inducción de los genes de nodulación en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, como parte de la mejora en los inoculantes y su diálogo con las plantas, provoca la síntesis y excreción de diferentes compuestos por la bacteria, lo que repercute en una mayor nodulación y rendimiento en el cultivo de arveja.
- El desarrollo de inoculantes y formulaciones más complejas como los aquí tratados, permiten mejorar la simbiosis y garantizar niveles más altos de fijación de N.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maiza B, Siles M, Ríos R, Gabriel J. Comportamiento de catorce líneas mejoradas de arveja (*Pisum sativum* L.) en la zona de Challapata, Oruro. Journal of the Selva Andina Research Society. 2015;6(1):10-22.
2. Muniz AW, COSTA M, de Sá ELS, Fiuza AB, Brose E. Symbiotic efficiency of pea (*Pisum sativum*) rhizobia association under field conditions. Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE). 2017;
3. Jaiswal NK, Gupta AK, Dewangan H, Lavanya GR. Genetic variability analysis in field pea (*Pisum sativum* L.). Int. J. Sci. Res. 2015;4(1):2006-7.

4. Beiranvand JP, Pourbabaee AA, Shirmardi SP, Alikhani HA, Abbasi AR, Moteszarehadeh B. Symbiotic nitrogen fixation, phosphorus and potassium uptake capacity of a number of soybean mutant lines in a calcareous soil. *Journal of Agricultural Science & Technology* (1008-0864). 2018;20(7):1555-64.
5. Leppyanen IV, Kirienko AN, Dolgikh EA. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Pisum sativum* L. roots as a tool for studying the mycorrhizal and root nodule symbioses. *PeerJ*. 2019;7:6552.
6. Malhi SS, Johnson EN, Hall LM, May WE, Phelps S, Nybo B. Effect of nitrogen fertilizer application on seed yield, N uptake, and seed quality of *Camelina sativa*. *Canadian Journal of Soil Science*. 2014;94(1):35-47.
7. Wile A, Burton DL, Sharifi M, Lynch D, Main M, Papadopoulos YA. Effect of nitrogen fertilizer application rate on yield, methane and nitrous oxide emissions from switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.). *Canadian Journal of Soil Science*. 2014;94(2):129-37.
8. Granda Mora KI. Inoculante a base de una cepa nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae col6 para la producción de *Phaseolus Vulgaris* L. en loja, Ecuador . : Universidad Central'' Marta Abreu''; 2017. 143 p.
9. Geurts R, Lillo A, Bisseling T. Exploiting an ancient signalling machinery to enjoy a nitrogen fixing symbiosis. *Current opinion in plant biology*. 2012;15(4):438-43.
10. Lodeiro AR. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista argentina de microbiología*. 2015;47(3):261-73.
11. D. Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(4):252-63.
12. Liu C-W, Murray JD. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants*. 2016;5(3):33.
13. Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in plant science*. 2015;20(3):186-94.
14. Poinso V, Crook MB, Erdn S, Maillat F, Bascaules A, Ané J-M. New insights into Nod factor biosynthesis: Analyses of chitooligomers and lipo-chitooligomers of *Rhizobium* sp. IRBG74 mutants. *Carbohydrate research*. 2016;434:83-93.
15. Nápoles García MC, Cabrera Pino JC, Onderwater R, Wattiez R, Hernández Forte I, Martínez González L, et al. Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*. 2016;37(2):37-44.
16. Duzan HM, Zhou X, Souleimanov A, Smith DL. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean root hairs under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(408):2641-6.
17. Vincent JM. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. 1970;
18. IUSS Working Group WRB. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014;181.
19. Nápoles MC, Cabrera JC, Wegria G, Onderwater R, Wattiez R, Hernández I, et al. Inducción de señales en la interacción *Mesorhizobium cicerii*-*Cicer arietinum* L. *Cultivos Tropicales*. 2018;39(2):101-7.
20. Bourassa DV, Kannenberg EL, Sherrier DJ, Buhr RJ, Carlson RW. The lipopolysaccharide lipid a long-chain fatty acid is important for *Rhizobium leguminosarum* growth and stress adaptation in free-living and nodule environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2017;30(2):161-75.
21. Brechenmacher L, Lei Z, Libault M, Findley S, Sugawara M, Sadowsky MJ, et al. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*. 2010;153(4):1808-22.
22. Kachroo A, Kachroo P. Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual review of phytopathology*. 2009;47:153-76.
23. Estévez J, Soria-Díaz ME, De Córdoba FF, Morón B, Manyani H, Gil A, et al. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. *FEMS microbiology letters*. 2009;293(2):220-31.
24. Subramanian S, Smith DL. A proteomics approach to study soybean and its symbiont *Bradyrhizobium japonicum*-a review. In: A comprehensive survey of international soybean research—genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships. Londres, Reino Unido: InTechOpen; 2013. p. 978-953.
25. Mabrouk Y, Hemissi I, Salem IB, Mejri S, Saidi M, Belhadj O. Potential of rhizobia in improving nitrogen fixation and yields of legumes. *Symbiosis*. 2018;107:73495.
26. Franke AC, Van den Brand GJ, Vanlauwe B, Giller KE. Sustainable intensification through rotations with grain legumes in Sub-Saharan Africa: A review. *Agriculture, ecosystems & environment*. 2018;261(1):172-85.
27. Li J, Liu K, Zhang J, Huang L, Coulter JA, Woodburn T, et al. Soil-plant indices help explain legume response to crop rotation in a semiarid environment. *Frontiers in plant science*. 2018;9:1488.
28. Rahman MM, Islam AM, Azirun SM, Boyce AN. Tropical legume crop rotation and nitrogen fertilizer effects on agronomic and nitrogen efficiency of rice. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:11.
29. Stagnari F, Maggio A, Galieni A, Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2017;4(1):1-13.
30. Lötjönen S, Ollikainen M. Does crop rotation with legumes provide an efficient means to reduce nutrient loads and GHG emissions? Review of agricultural, food and environmental studies. 2017;98(4):283-312.
31. Waiboonya P, Elliott S. Sowing time and direct seeding success of native tree species for restoring tropical forest ecosystems in northern Thailand. *New Forests*. 2020;51(1):81-99.
32. Ali A, Erenstein O, Rahut DB. Impact of direct rice-sowing technology on rice producers' earnings: Empirical evidence from Pakistan. *Development Studies Research. An Open Access Journal*. 2014;1(1):244-54.

33. Ileri O, CARPICI EB, Erbeyi B, Suleyman A, Ali KOC. Effect of sowing methods on silage yield and quality of some corn cultivars grown in second crop season under irrigated condition of Central Anatolia, Turkey. Turkish Journal of Field Crops. 2018;23(1):72-9.
34. Nápoles G, Cabrera JC, Luyten E, Dombrecht B, Vanderleyden J, Hormaza J, et al. Nod factor detection in *B. elkanii* ICA 8001. Culture medium influence. Cultivos Tropicales. 2014;35(1):92-9.
35. Costales D, Nápoles MC, Falcón-Rodríguez A, González-Anta G, Petit C, Sola S, et al. Effect of chitosan polymer and inoculated with *B. japonicum* on soybean germination survival of seedling, nodulation and bacteria viability on seeds. Legume Research-An International Journal. 2019;42(2):265-9.
36. Duzan HM, Mabood F, Zhou X, Souleimanov A, Smith DL. Nod factor induces soybean resistance to powdery mildew. Plant Physiology and Biochemistry. 2005;43(10-11):1022-30.
37. Ganesan S, Vadivel K, Jayaraman J. Sustainable crop disease management using natural products. Boston, MA: CABI; 2015. 424 p.
38. Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, et al. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis. The Plant Journal. 2011;65(2):169-80.