



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) en arroz (*Oryza sativa* L.) en suelos del Piedemonte llanero

Ashly Lisset Arévalo Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia
2016

Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) en arroz (*Oryza sativa* L.) en suelos del Piedemonte llanero

Ashly Lisset Arévalo Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Jacobo Arango, Ph.D

Codirector:

Eyder Daniel Gómez, Ph.D

Línea de Investigación:

Suelos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2016

*A Dios, a mis padres, a mi hermanita, y a todos
los que me alientan a continuar
explorando la fascinante expresión
del metabolismo del suelo.*

Agradecimientos

Al Doctor Jacobo Arango por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, de aprender gracias a su dirección científica, y por esta experiencia profesional y de vida.

A los Doctores Eyder Daniel Gómez López y Marina Sánchez de Prager por su confianza y acompañamiento desde el inicio de esta aventura académica.

A los docentes y estudiantes de la Universidad Nacional Sede Palmira, que tuve el honor de compartir aulas de clase, en especial al Doctor Juan Carlos Menjivar por dar el primer Sí para iniciar la Maestría en Ciencias Agrarias y los conocimientos impartidos en el área de Suelos.

A todas las personas del Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT, a todo el personal de los Programas de Forrajes, de Arroz y de Suelos, en especial a los Doctores Idupulapati Rao, Cecile Grenier, Camila Rebolledo, Ngonidzashe Chirinda, John Miles, Manabu Ishitani, Michael Gómez Selvaraj por la reflexión científica; y por su amistad, orientación y colaboración a Jonathan Nuñez, Alba Lucía Chávez, María Recio, Yolima Ospina, Neuza Asakawa, Gonzalo Borrero, Jaumer Ricaurte, Jenny Burbano, Jairo Barona, Jaime Borrero, James Carabalí, Satochi Ogawa, Milton Valencia, Hannes Karwat, Danilo Moreta, Aracely Vidal, Edwin Palma, Luis Alberto López, Patricia Higueta, Blanca García, Hernán Mina, Martha Peláez, Paula Sepúlveda, José Luis Cabrera, Eliel Petro, Yamileth Chaguezá, Carolina Quintero, Paola Mosquera, Laura Arenas, Catalina Trujillo, Paula Chaparro, César Botero, Jhon Botina, Juan Guillermo Pérez, Juan de la Cruz Jiménez, Diego Medina, Alexander Silva, Oscar Castañeda, Ingrid Alejandra Briñez, Alexander Aguirre, Eliana Macea, Ericson Aranzales, Carlos Home, Gonzalo Ríos, Johanna Mazabel, Orlando Trujillo, Alex Hincapié, Stiven Quintero y Miller Escobar.

Mil gracias también a mi familia por su amor y apoyo desde la distancia, a todos mis amigos y a sus familias por tanto cariño y atención. Cada uno de ustedes y los que no alcanzo a nombrar en este espacio, me ayudaron a empezar, me alentaron a continuar y a alcanzar esta meta. Muchas gracias.

Resumen

Dentro del ciclo del nitrógeno, la nitrificación es la oxidación de amonio (NH_4^+) hasta nitrato (NO_3^-) mediada por microorganismos. El NO_3^- es una forma inorgánica de nitrógeno (N), susceptible de perderse por lixiviación y por desnitrificación, lo que resulta en pérdidas de fertilizantes de N (alrededor del 70%). Estas pérdidas de los fertilizantes de N aplicados, tienen impactos negativos a nivel socioeconómico y ambiental. Una estrategia para evitar la pérdida de N en los sistemas agrícolas, es la inhibición de la nitrificación. Ciertas plantas son capaces de liberar compuestos químicos de sus raíces que inhiben la nitrificación mediada por microorganismos en la rizosfera, este proceso se denomina inhibición biológica de la nitrificación (IBN). La función de IBN ha sido caracterizada en la pastura tropical *Brachiaria humidicola* (Bh), y ha sido identificada como la especie con mayor potencial IBN. Este estudio en suelos contrastantes del Piedemonte llanero, evaluó el efecto residual de IBN de Bh en una simulación de rotación Bh-arroz seco para suelos de La Libertad. En suelo de Santa Rosa, se exploró el potencial IBN de diferentes genotipos de arroz de riego y de seco, con las comparaciones realizadas entre variedades, líneas de mejoramiento y cultivares comerciales. Las metodologías utilizadas fueron las desarrolladas para la determinación de IBN en Bh y Sorgo, como el ensayo de bioluminiscencia (bioensayo), con la cepa recombinante de la bacteria amonio-oxidante (AOB) *Nitrosomonas europaea*, y la incubación de suelo rizosférico para la determinación de tasas de nitrificación. Se encontró diferencias en rendimiento entre las líneas de arroz, con mayores rendimientos obtenidos de las plantas que crecieron en el suelo donde previamente se sembró Bh. En la actividad IBN (determinada por bioensayo) de los exudados de raíz, se identificó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre genotipos de arroz, expresados como unidades de alitiourea por gramo de peso seco de raíz (ATU g^{-1}) en un rango de 3.27 a 31.75. Además, se encontró diferentes tasas de nitrificación expresadas como $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de suelo día^{-1} desde 3.06 to 7.63. Para los genotipos de arroz de riego se encontró un 50% de relación ($r^2=0.52$) entre las tasas de nitrificación y exudados de raíz. Estos resultados indican que algunos genotipos de arroz tienen capacidad IBN, y el sistema de rotación de Bh-arroz se debe evaluar y aplicarse en campo para aumentar la producción de arroz y el uso eficiente de N.

Palabras clave: nitrógeno, nitrificación, rendimiento, ensayo de bioluminiscencia.

Abstract

Within the nitrogen cycle, nitrification is the oxidation of ammonium (NH_4^+) to nitrate (NO_3^-) and is mediated by microorganisms. Nitrate is an inorganic form of nitrogen (N), susceptible to being lost by leaching and denitrification resulting in the loss of N fertilizer (around 70%). These losses of applied N fertilizer have negative socio-economic and environmental impacts. One strategy to prevent the loss of N in agricultural systems, is the inhibition of nitrification. Certain plants are able to release chemicals from their roots that inhibit microbially mediated nitrification in the rhizosphere, this process is called biological nitrification inhibition (BNI). BNI function has been characterized in *Brachiaria humidicola* (Bh) tropical grass, has been identified as the species with the greatest BNI activity. This study in contrasting Piedmont Llanos soils evaluated the residual BNI effect of Bh in a simulation of a Bh-upland rice rotation system for from La Libertad. In soils from Santa Rosa the BNI potential of different lowland and upland rice genotypes was explored, with comparisons made between varieties, breeding lines and commercial cultivars. The methodologies used were those developed for the determination of BNI in Bh and Sorghum, including bioluminescence assay (bioassay) with the recombinant ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *Nitrosomonas europaea* strain, and the incubation of rhizosphere soil for the determination of nitrification rates. Yield differences were found among the rice lines with greater yields obtained from those that grew in the soil where Bh was previously planted. In terms of BNI activity (determined for bioassay) of root exudates, significant differences ($P \leq 0,05$) were identified between rice genotypes expressed as allylthiourea units per gram of dry root (ATU g^{-1}) in a range of 3.27 to 31.75. Also, different nitrification rates expressed as $\text{mg NO}_3^- \text{-N kg}^{-1} \text{ soil day}^{-1}$ were observed, ranging from 3.06 to 7.63. For lowland rice genotypes there was a 50% of relation ($r^2=0.52$) between the root exudates and nitrification rates. Altogether, these results indicate that some rice genotypes have the ability to reduce nitrification in soil. Additionally, the Bh-rice rotation system should be further evaluated and implemented in the field to increase rice yields and N use efficiency.

Key Words: nitrogen, nitrification, yield, bioluminescence assay.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Introducción.....	17
Planteamiento del Problema.....	19
Objetivos.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	21
1. Capítulo 1. Revisión. Dinámica del Nitrógeno en los agroecosistemas: relación planta-suelo.....	22
1.1 Dinámica del nitrógeno (N) en el suelo.....	23
1.1.1 Mineralización.....	28
1.1.2 Inmovilización.....	28
1.1.3 Nitrificación.....	29
1.2 Amonio vs. Nitrato.....	31
1.3 Influencia de las plantas sobre la nitrificación.....	33
2. Capítulo 2. Potencial de Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) de <i>Brachiaria humidicola</i> para el rendimiento de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	37
2.1 Materiales y métodos.....	38
2.1.1 Localización y características del suelo.....	38
2.1.2 Población de estudio.....	40
2.1.3 Manejo del experimento en invernadero.....	40
2.1.4 Evaluación de Componentes de rendimiento.....	41
2.1.5 Incubación de suelo.....	41
2.1.6 Cuantificación de AOA y AOB (<i>gen amoA</i>).....	42
2.1.7 Diseño experimental.....	42
2.1.8 Análisis estadístico de datos.....	42
2.2 Resultados y Discusión.....	43

2.2.1 Línea base.....	43
2.2.2 Determinación del efecto residual de IBN liberado por <i>Brachiaria</i> en el suelo para mejorar el rendimiento de arroz.....	47
3. Capítulo 3. Potencial de Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) en Arroz.....	55
3.1 Materiales y métodos	56
3.1.1 Evaluación del potencial de IBN en genotipos de arroz.....	56
3.1.2 Determinación de tasas de nitrificación	61
3.1.3 Cuantificación de AOA y AOB (<i>gen amoA</i>)	61
3.1.4 Análisis estadístico de datos.....	62
3.2 Resultados y Discusión	62
3.2.1 Evaluación del potencial de IBN en genotipos de arroz.....	62
3.2.2 Relación entre tasas de nitrificación y Potencial IBN exudado en genotipos de arroz.....	66
Conclusiones.....	76
Anexo A. Recuento de nematodos Fitoparásitos en 100 cm ³ de suelo para las líneas más susceptibles en suelo arroz (SAR) en la dosis de nitrógeno N180 en el ensayo de rotación Bh-arroz.....	77
Bibliografía.....	78

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema del ciclo del nitrógeno (N). Los procesos mediados por microorganismos del suelo aparecen escritos en color rojo. Los gases aparecen entre corchetes. El subciclo elemental está sombreado de azul, el autotrófico de color rosado y en púrpura el subciclo heterotrófico. Modificado de Robertson y Groffman, 2015.	23
Figura 2. Principales vías de transformación biológica de nitrógeno (N), enzimas asociadas y el estado de oxidación de las formas de N. Modificado de Canfield et al., 2010 - Thamdrup y Dalsgard, 2008.	24
Figura 3. Diseño de parcelas subdividas del sistema de rotación Bh-arroz, siendo la parcela principal el tipo de suelo SBH (suelo cultivado con Bh) y SAR (suelo donde se siembra arroz); la subparcela corresponde a la dosis de nitrógeno (N) de urea N0, N80 y N180 kg/ha; y la sub-subparcela es el material vegetal: 4 líneas de arroz seco, variedad comercial Llanura 11 y Bh CIAT 679 (Bh 679).	43
Figura 4. Tasas de nitrificación en suelos de Corpoica “La Libertad” SBH (suelo cultivado con Bh) y SAR (suelo donde se siembra arroz), con el respectivo control de incubación usando inhibidor sintético diciandiamida (DCD). Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con la misma letra indica que no hay diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$).	44
Figura 5. Dinámica de NH_4^+ y NO_3^- durante 27 días de incubación de los suelos de Corpoica “La Libertad” a) suelo cultivado con Bh (SBH) y b) suelo donde se siembra arroz (SAR). Los datos para cada tiempo de evaluación, son medias + error estándar (n=3).	45
Figura 6. Cuantificación de gen amoA de arqueas amonio-oxidantes (AOA) y bacterias amonio-oxidantes (AOB) en suelo de Bh (SBH) y suelo de arroz (SAR) antes (0 días) y durante el tiempo de incubación de suelo (11 y 19 días) para la determinación de tasas de nitrificación (figura 5 a y b). Barras representan medias + error estándar (n=3).	47
Figura 7. Comparación del crecimiento a los 40 días después de siembra (dds) del genotipo de arroz Llanura 11 (cultivar comercial) en cada suelo de La Libertad SBH (cultivado de Bh) y SAR (sembrado con arroz) para cada dosis de N (0, 80 y 180 Kg/ha).	48
Figura 8. Evaluación de a) Longitud de la planta y b) Valores SPAD a los 40 días después de siembra (dds) en el sistema de rotación Bh-arroz bajo tres dosis de N. Barras representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$) para los valores de longitud y SPAD de plantas sembradas suelo de Bh (SBH) y sin nitrógeno (N0).	49
Figura 9. Tasas de nitrificación de las muestras de suelo colectadas al momento de la cosecha de cada tratamiento evaluado (suelo sin plantas, Bh679 y líneas de arroz seco) con tres dosis de N (0, 80 y 180 kg/ha) en el sistema que simula una rotación Bh - arroz. Barras representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$).	50

- Figura 10. Componentes de rendimiento: a) peso de grano por materia, b) %grano lleno, c) peso de 1000 granos y d) número de panículas por m², de las líneas de arroz secano (3, 18, 23 y 31) y el cultivar comercial Llanura 11, para evaluar el beneficio de la simulación de rotación Bh-arroz utilizando suelos cultivado con Bh (SBH) y arroz (SAR). Barras representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$ y $P \leq 0.01$).52
- Figura 11. Potencial IBN de Exudados de raíz de diferentes genotipos de arroz de riego y de secano, expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz, mediante bioensayo. Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con la misma letra indica que no hay diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$).63
- Figura 12. Potencial IBN (expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz) en tejido de las raíces de genotipos de arroz de riego y de secano. Barras representan medias + error estándar (n=3). No hay diferencias significativas.65
- Figura 13. Análisis de regresión lineal del potencial IBN de tejido y exudado de raíz, medido a través de bioensayo (expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz) de los genotipos de arroz evaluados.66
- Figura 14. Relación de las variables tasas de nitrificación (mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ suelo día⁻¹) y Potencial IBN expresado como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz, en los genotipos de arroz evaluados en suelo Santa Rosa, en la etapa de floración. Barras y valores representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$).67
- Figura 15. Análisis de regresión lineal entre el potencial IBN medido en los exudados (expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz) y tasas de nitrificación de los genotipos de arroz de riego (a) y de secano (b).68
- Figura 16. Análisis de componentes principales (ACP) de las variables respuesta potencial IBN en exudados y tejido de raíz (ATU/g raíz), tasas de nitrificación, valores SPAD, altura de la planta (Longitud cm), biomasa (peso seco de plantas – raíz, hojas y tallos), N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ en suelo.70
- Figura 17. Análisis de clusters de las variables respuesta potencial IBN en exudados y tejido de raíz (ATU/g raíz), tasas de nitrificación, valores SPAD, altura de la planta (Longitud cm), biomasa (peso seco de plantas – raíz, hojas y tallos), conductividad eléctrica (CE) y pH en el exudado de raíz, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, N mineral (N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻).72
- Figura 18. Potencial de IBN (ATU/ g de raíz) medido con el bioensayo usando la cepa recombinante de *Nitrosomonas europaeae*, a partir del exudado de plántulas de 10 días obtenidas por el método de raíz seminal de 4 genotipos de arroz contrastantes criterio % Inhibición de exudado de raíz en bioensayo (Pariasca et al., 2010). Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas en los genotipos según el test LSD ($P \leq 0.05$).73
- Figura 19. Cuantificación del gen amoA de arqueas y bacterias amonio-oxidantes (AOA y AOB) a partir de muestras de suelo colectado durante la cosecha de las plantas al momento de floración de algunos genotipos de arroz, control suelo sin plantas e IBN positivo Bh 679. Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas en los según el test LSD ($P \leq 0.05$).75

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Principales formas de nitrógeno (N) encontradas o producidas en el suelo. Modificada de Myrold, 2005.	25
Tabla 2. Relación entre la fisiología de las plantas y las formas de nitrógeno (N) NH_4^+ y NO_3^-	33
Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de los suelos de La Libertad SBH (suelo de Bh) y SAR (suelo de arroz).	39
Tabla 4. Genotipos de arroz utilizados para la evaluación de IBN.	57
Tabla 5. Características fisicoquímicas y biológicas del suelo Santa Rosa.	58
Tabla 6. Matriz de correlaciones de las variables respuesta potencial IBN en exudados y tejido de raíz (ATU/g raíz), tasas de nitrificación, valores SPAD, altura de la planta (Longitud cm), biomasa (peso seco de plantas – raíz, hojas y tallos), N-NH_4^+ , N-NO_3^-	71

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
IBN	Inhibición Biológica de la Nitrificación
N	Nitrógeno
N₂	Nitrógeno elemental o Dinitrógeno
NH₄⁺	Amonio
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito
N₂O	Óxido nitroso
NH₃	Amoniaco
IN	Inhibición de la Nitrificación
Bh	<i>Brachiaria humidicola</i>
SBH	Suelo sembrado con Bh
SAR	Suelo sembrado con Arroz
DCD	Diciandiamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
ATU	Unidades de aliltiourea
RLU	Unidades de luz relativa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
AMO	Amoniaco monooxigenasa
amoA	Gen que codifica subunidad A de la enzima AMO
AOA	Arqueas amonio-oxidantes
AOB	Bacterias amonio-oxidantes
NUE	Uso eficiente de nitrógeno
dds	Días después de siembra
Ar.A	Arcilla arenosa
A	Arcilla
Gt	Gigatoneladas
seg	Segundos
ha	Hectárea
ATP	Adenosín trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico

Introducción

La nitrificación es un proceso de oxidación mediado por microorganismos, que transforman el amonio (NH_4^+) – relativamente inmóvil – a nitrito (NO_2^-) y a nitrato (NO_3^-) – forma inorgánica de nitrógeno (N) soluble en agua y muy móvil, susceptible de perderse por lixiviación y por desnitrificación en forma de emisiones gaseosas de óxido nitroso (N_2O) (Galloway et al., 2008; Schlesinger, 2009; Bremner y Blackmer, 1978; Leininger, et al. 2006; Canfield et al., 2010) y en consecuencia contribuyendo a la contaminación de cuerpos de agua y el calentamiento global (Vitousek et al., 1997a y 1997b; Matson et al., 1998; Tilman et al., 2001 y 2002; Dinnes et al., 2002; Wagner -Riddle et al., 2007; Turner et al., 2008).

El proceso de nitrificación involucra quimiolitótrofos bacterias amonio-oxidantes (AOB), representada por el género *Nitrosomonas* spp.; autótrofos arqueas amonio- oxidantes (AOA); quimiolitótrofos bacterias oxidantes de NO_2^- , representada por el género *Nitrobacter*; nitrificantes heterótrofos y bacterias de la oxidación anaerobia de NH_4^+ (anammox) (Smith et al., 2003; Chapuis-Lardy et al., 2006; Hayatsu et al., 2008, Mulder et al., 1995; Bremner y Blackmer, 1978; Mosier et al., 1996).

De esta manera, los suelos con uso agronómico muestran altas tasas de nitrificación, dinámica que se ve reflejada en la cantidad de poblaciones microbianas de AOB y AOA que procesan el nitrógeno en el suelo a través de la nitrificación (Subbarao et al., 2012).

Cerca del 70% de los fertilizantes nitrogenados aplicados a los sistemas agrícolas se pierden debido a la nitrificación - desnitrificación, y con la idea de incrementar el N disponible para los cultivos, el agricultor usa más fertilizante, lo que incrementa el impacto ambiental y las pérdidas económicas (Sahrawat y Keeney, 1985; Raun y Johnson, 1999; Galloway et al., 2008; Schlesinger, 2009; Subbarao et al., 2012; Subbarao et al., 2013).

Por lo tanto, se ha buscado inhibir la nitrificación mediante el uso de inhibidores sintéticos tales como nitrapirina, diciandiamida (DCD) y 3,4 dimetil pirazol fosfato (DMPP) (Guthrie y Bomke, 1980; Weiske et al., 2001; Zerulla et al., 2001; Subbarao et al., 2006, 2012). Estos

inhibidores químicos sintéticos son compuestos que retrasan la oxidación del NH_4^+ mediante la supresión de las bacterias nitrificantes del suelo (Hendrickson et al., 1978; Bremner et al., 1981; Rodgers, 1986). Sin embargo, no son ampliamente utilizados en la producción agrícola debido al costo adicional y la variabilidad en la eficacia dependiendo del tipo de suelo y las condiciones climáticas, diferencias en la movilidad y por la falta de disponibilidad (Sahrawat y Keeney, 1985; Subbarao et al., 2012, Goertz, 1994).

Diferentes estudios indican que algunas plantas exudan metabolitos desde las raíces al suelo, que pueden inhibir la nitrificación, como se ha reportado en Bh (*Brachiaria humidicola* [Rendle] Schweick), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), trigo silvestre (*Leymus racemosus*) (Subbarao et al., 2007a, 2009, 2012; Gopalakrishnan et al., 2007; Zakir et al., 2008), arroz (Pariasca et al., 2010) y trigo (*Triticum aestivum*) (O'Sullivan et al., 2016; Moore y Waid, 1971). Esto abre las posibilidades del uso de la inhibición biológica de la nitrificación (IBN) como una alternativa de bajo costo, para una mejor respuesta a la fertilización nitrogenada por parte de los cultivares.

En este sentido, dada la importancia del arroz como alimento básico, y el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados para obtener altos rendimientos que resulta en daños ambientales, la IBN puede proporcionar una alternativa biológica para afrontar el reto de incrementar la productividad de los cultivos con un menor impacto ambiental. Esta investigación corresponde a una evaluación de un sistema de rotación Bh-arroz como una forma de mejorar el rendimiento de líneas de arroz seco con diferentes respuestas a la fertilización nitrogenada, y probar el potencial IBN en diferentes genotipos de arroz validando los métodos estandarizados por los investigadores del Centro Internacional de Agricultura tropical - CIAT (Colombia) en colaboración con Centro Internacional de Investigación para las Ciencias Agrícolas del Japón-JIRCAS (Japón) para la evaluación de la función IBN en Bh y de esta manera contribuir a la ecoeficiencia y futura aplicación en los Llanos de Colombia, donde existen grandes extensiones de campos sembrados con *Brachiaria* spp., y el gobierno colombiano está promoviendo el desarrollo agrícola en la región (Convenio Altillanura) para transformarla en la "despensa" de Colombia.

Planteamiento del Problema

El considerable aumento del uso de insumos agrícolas y la disminución constante de la eficiencia de fertilizantes nitrogenados (Hinsinger et al., 2011; Tilman et al., 2002), han generado consecuencias como contaminación de fuentes de agua por NO_3^- y emisión de gases de efecto invernadero (Vitousek et al., 1997), específicamente el N_2O , el más importante gas de efecto invernadero de contribución antropogénica (Ravishankara et al., 2009), 296 veces más nocivo para la capa de ozono que el dióxido de carbono (CO_2) y 13 veces más que el metano (CH_4) (Reay et al., 2012).

Además, con la idea de incrementar el nitrógeno (N) disponible para los cultivos, el agricultor usa más fertilizante, llevando a continuos ciclos de nitrificación en el suelo lo que incrementa el impacto ambiental y las pérdidas económicas (Subbarao et al., 2013; Subbarao et al., 2012).

Por lo anterior, de manera que se pueda disminuir los costos del uso de fertilizantes para la producción de un cultivo importante como el arroz, se planteó evaluar la actividad IBN en ensayos de invernadero empleando suelos del Piedemonte llanero, y diferentes métodos de fenotipificación de la función IBN desarrollados en *Brachiaria* y sorgo mediante un sistema de rotación *Brachiaria*-arroz con suelos provenientes del Centro de Investigación Corpoica 'La Libertad' con diferente uso agronómico de *Brachiaria* y líneas élite de arroz secano; y el potencial IBN en germoplasma de arroz, en suelo de la estación experimental de Fedearroz 'Santa Rosa' bajo un sistema de secano favorecido.

Objetivos

General

Evaluar la inhibición biológica de la nitrificación (IBN) en arroz (*Oryza sativa* L.) en suelos del Piedemonte llanero.

Específicos

- Determinar el efecto residual de IBN liberado por *Brachiaria humidicola* (Bh) en el suelo bajo un sistema de rotación Bh-arroz.
- Identificar genotipos de arroz con mayor potencial IBN.
- Determinar la relación entre tasas de nitrificación y el potencial IBN medido en exudados de arroz.

Justificación

La función IBN que presentan algunas plantas que exudan metabolitos desde las raíces al suelo, que actúan como inhibidores de la nitrificación, es considerada como un rasgo de la fisiología de las plantas que le confieren competitividad a las plantas en el uso eficiente de N (NUE) por parte de los cultivares (Subbarao et al., 2009, 2013, 2015).

Dada la importancia del arroz como alimento básico, y la gran utilización de fertilizantes nitrogenados para obtener altos rendimientos que resulta en daños ambientales, la IBN puede proporcionar una alternativa biológica para aumentar los rendimientos y al mismo tiempo mejorar la NUE y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (N₂O).

En este sentido, para afrontar el reto de incrementar la productividad de cultivos con un menor impacto ambiental, este estudio en el CIAT integra la investigación independiente de los programas de arroz y de forrajes tropicales, mediante ensayos de invernadero para probar los beneficios del sistema de rotación de Brachiaria-arroz como una forma de mejorar el rendimiento de arroz y de esta manera contribuir a la ecoeficiencia mediante la reducción de la huella de N, y la identificación de la capacidad de IBN en líneas de arroz avanzadas, de modo que se validen en otros cultivos, los métodos para evaluar la IBN que se han venido desarrollando con Brachiaria y al tiempo que se agrega valor a cultivares de arroz con capacidad IBN. Finalmente, una aplicación práctica sería en los Llanos de Colombia, donde existen grandes extensiones de campos con Brachiaria y el gobierno colombiano está promoviendo el desarrollo agrícola en la región.

Hipótesis

El sistema de rotación Brachiaria-arroz muestra un efecto residual de la IBN de Brachiaria y un aumento en el rendimiento de líneas de arroz secano; y se encuentran genotipos de arroz con la capacidad de inhibir la nitrificación en suelos del Piedemonte llanero.

1. Capítulo 1. Revisión. Dinámica del Nitrógeno en los agroecosistemas: relación planta-suelo

El nitrógeno (N) es un elemento importante para la vida, esencial para la síntesis de ácidos nucleicos (ADN, ARN), aminoácidos, proteínas y, por tanto, enzimas, hormonas, moléculas importantes de naturaleza proteica como ATP y clorofila, por ende, es un elemento esencial en todo el crecimiento y desarrollo de la planta (Raven et al., 2004; Hawkesford et al., 2012). Su ciclaje involucra diversos procesos de transformación – mineralización, amonificación, inmovilización, nitrificación, desnitrificación, lixiviación y volatilización – donde influye la biomasa microbiana, las propiedades físicas y químicas del suelo.

La poca disponibilidad de N del suelo es a menudo el factor limitante del crecimiento y del rendimiento de los cultivos, por lo cual la aplicación de fertilizantes de N inorgánico se ha convertido en una estrategia para aumentar los rendimientos de los cultivos en los sistemas agrícolas intensivos en todo el mundo. A nivel mundial, se aplican más de 100 Gt año⁻¹ de N a los cultivos, de los cuales aproximadamente 55 Gt año⁻¹ es capturado por los cultivos o permanece en el suelo (Galloway et al., 2004; Gruber y Galloway, 2008).

Además de esta ineficiencia en el uso de N, la producción y el uso de fertilizantes de N inorgánico ha contribuido a una serie de problemas ambientales, como son las emisiones de gases de efecto invernadero, la eutrofización de las aguas y una disminución de la biodiversidad dentro y fuera de los sistemas agrícolas, debido a que el NO₃⁻ en particular, es fácilmente lixiviado de los suelos agrícolas (Andrews et al., 2011; Butler et al., 2012).

Por lo tanto, se han desarrollado una gama de métodos para reducir esta pérdida de N, por ejemplo, el uso de inhibidores de ureasa y de nitrificación, que puede resultar en aumento de los niveles de las formas de N que las plantas pueden usar (Cameron et al., 2013).

En este sentido, el N que absorben las plantas es un componente clave dentro del ciclo del N (Brackin et al., 2015), por consiguiente, se requiere diseñar nuevas estrategias para mejorar el uso eficiente del N (NUE) por parte de los cultivos, basadas en una mejor comprensión de cómo

es la dinámica del N en los suelos, y la forma en que las transformaciones de N afectan a la absorción de este elemento por las plantas (Zhang et al. 2012; Davidson et al, 2012).

1.1 Dinámica del nitrógeno (N) en el suelo

El ciclo del N consiste en subciclos anidados: a) subciclo elemental, donde la forma gaseosa N elemental (N_2) es convertido en varias formas químicas, gracias a reacciones de oxidación y reducción mediadas por microorganismos; b) subciclo autotrófico que es manejado por la demanda de nitrógeno inorgánico de plantas y de microorganismos autotróficos; y c) subciclo heterotrófico, manejado por la necesidad de carbono (C) orgánico que tienen los organismos heterótrofos (Myrold, 2005) (Figura 1).

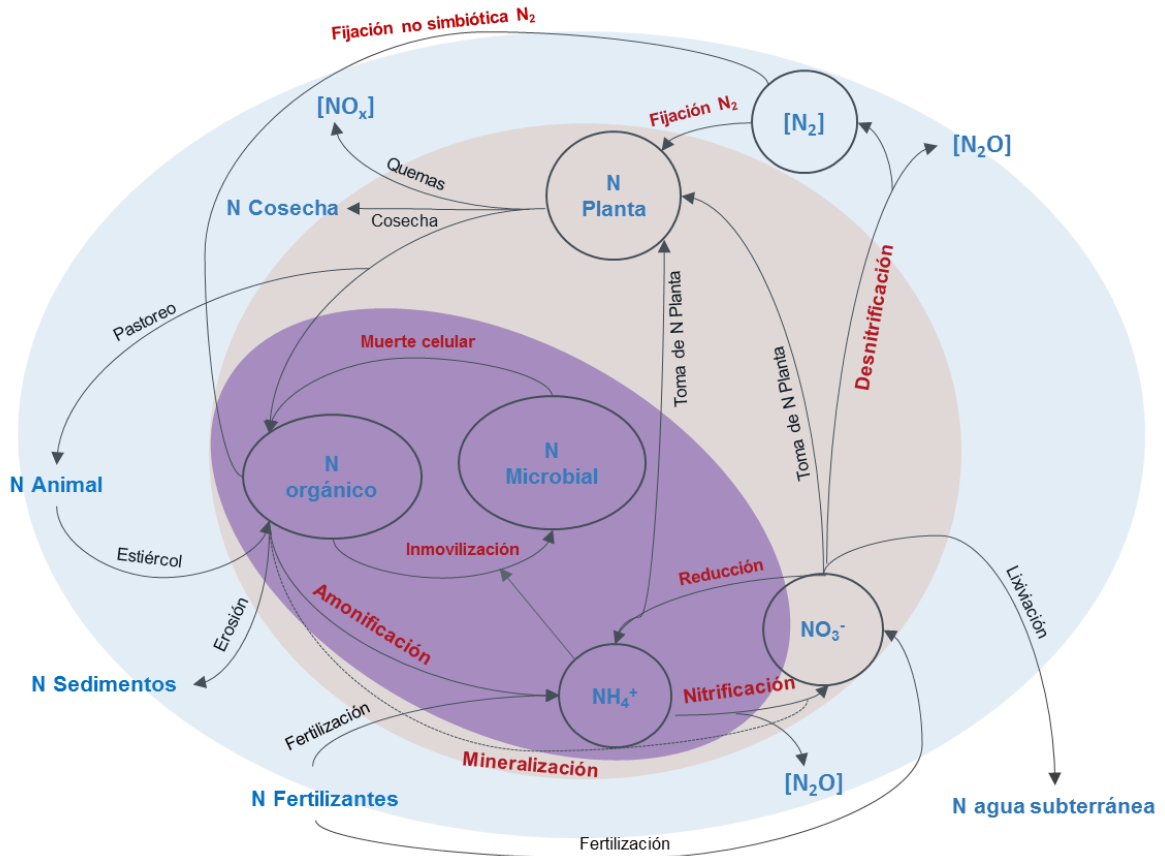


Figura 1. Esquema del ciclo del nitrógeno (N). Los procesos mediados por microorganismos del suelo aparecen escritos en color rojo. Los gases aparecen entre corchetes. El subciclo elemental está sombreado de azul, el autotrófico de color rosado y en púrpura el subciclo heterotrófico. Modificado de Robertson y Groffman, 2015.

El N presente en el suelo (tabla 1) está en forma de compuestos orgánicos en los residuos vegetales, organismos y sustancias húmicas (94-98%); NH_4^+ fijado a las arcillas (1-6%); formas inorgánicas o N mineral presentes en la solución del suelo – NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- (1-2%), y NH_3 , N_2 , NO y N_2O en la fracción gaseosa (McLaren y Cameron, 1996; Moro et al., 2014).

Tabla 1. Principales formas de nitrógeno (N) encontradas o producidas en el suelo. Modificada de Myrold, 2005.

Compuesto (Formula)	Estado de oxidación	Forma presente en el suelo	Características
Amonio (NH_4^+)	-3	Catión electrostáticamente en poder de las superficies cargadas negativamente de arcilla y de los grupos funcionales de la materia orgánica del suelo (Sahrawat, 1989). Se encuentra disuelto en la solución del suelo, como gas amoníaco (NH_3) - fuente ionizada en el agua del suelo (Robertson y Groffman, 2015).	Se volatiliza como NH_3 a pH alto - suelos alcalinos (Sahrawat, 1989), asimilado por plantas y microorganismos, sustrato de nitrificantes autótrofos y oxidantes anaerobios (anammox). Producto de la actividad de la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de urea. Concentración en extractos de suelo está en un rango de 0.1-10 g N m ⁻² . Cantidad típica es 1 g N m ⁻² asumiendo 1 m ³ suelo a 1 m de profundidad una densidad de 1.25 g cm ⁻³ .
Hidroxilamina (NH_2OH)	-1	No detectada	Intermediario en la oxidación de NH_3 .
Dinitrógeno (N_2)	0	Gas en la atmosfera y del espacio poroso del suelo.	Es la reserva más grande de N, relativamente insoluble, sustrato para la fijación y producto final de la desnitrificación.
Óxido nitroso (N_2O)	+1	Gas en la atmosfera o disuelto en el suelo.	Gas de efecto invernadero, muy soluble, intermediario en la desnitrificación y coproducto de la nitrificación.
Óxido nítrico (NO)	+2	Gas libre en la atmosfera del suelo o disuelto en la solución del suelo (Robertson y Groffman, 2015).	Químicamente reactivo, un intermediario en la desnitrificación.

Compuesto (Formula)	Estado de oxidación	Forma presente en el suelo	Características
Nitrito (NO ₂ ⁻)	+3	Disuelto en la solución del suelo.	Normalmente se encuentra en muy bajas concentraciones, producto de la oxidación de NH ₃ , sustrato para la oxidación de NO ₂ ⁻ ; un intermediario en la desnitrificación.
Nitrato (NO ₃ ⁻)	+5	Disuelto en la solución del suelo. Anión que no puede unirse a las partículas de arcilla de suelos neutros o básicos, que llevan cargas negativas. Sin embargo, se une a los óxidos de hierro y aluminio (cargas positivas) que están presentes en suelos ácidos (Kafkafi y Tarchitzky, 2012).	Móvil, producto de la nitrificación, susceptible de lixiviarse. Concentración en extractos de suelo está en un rango de 0.1-30 g N m ⁻² . Cantidad típica es 5 g N m ⁻² asumiendo 1 m ³ suelo a 1 m de profundidad una densidad de 1.25 Mg m ⁻³ . En suelos en condiciones aerobias es predominante, en un rango de 1-20 mol m ⁻³ dependiendo del nivel de fertilizante de N adicionado (Crawford y Glass, 1998; Owen y Jones, 2001; Hawkesford et al., 2012).
Nitrógeno orgánico (RNH ₃)	-3	Compuestos presentes en la materia orgánica - proteínas, aminoácidos, polímeros, ácidos nucleicos, amino azúcares, vitaminas, antibióticos, metabolitos intermediarios.	Rango de 100-3000 g N m ⁻² . Cantidad típica es 725 g N m ⁻² (mediana del contenido de N reportado de suelos, sin incluir histosoles que podrían contener 3000 - 8000 g N m ⁻² (Post et al. 1985).

La concentración de las diferentes formas de N varía dependiendo del pH del suelo, la temperatura, la actividad microbiana (Wang et al., 2012) y conforme a la **fijación de N₂** (Jackson et al., 2008).

En los sistemas agrícolas ocurre entradas de N a través de fertilizantes nitrogenados, según Kafkafi y Tarchitzky (2012), sus formas básicas son:

- **N-Urea:** una molécula eléctricamente neutra - CO(NH₂)₂.
- **N- Amoniacal:** que lleva una carga eléctrica positiva- catión NH₄⁺
- **N-Nitrato:** que lleva una carga eléctrica negativa- anión NO₃⁻

La urea (a través de los fertilizantes de urea o de la excreción de los animales) que puede ser utilizada por las plantas (Kraiser et al., 2011; Witte, 2011), es completamente soluble en agua y una vez está en el suelo causa un aumento inicial del pH debido a la actividad de la ureasa (enzima presente en la mayoría de los suelos), transformándose rápidamente (entre 24 y 48 horas después de la aplicación) en NH_4^+ y dióxido de carbono (CO_2). El NH_3 que se produce, interactúa inmediatamente con el agua para dar hidróxido de amonio (NH_4OH), lo que resulta en un aumento localizado del pH del suelo (Court et al., 1962). Cuando se aplica urea en la superficie del suelo, hay pérdidas directas por volatilización de NH_3 (Black, 1968; Hoffman y Van Cleemput, 2004), y en esta volatilización influyen factores como capacidad de intercambio catiónico (CIC), pH, contenido de carbonatos (CaCO_3), contenido de humedad del suelo, temperatura, uso de fertilizantes, plantas y animales de pastoreo. Lo anterior relacionado con la concentración de NH_4^+ que está influenciado por las tasas de nitrificación, de absorción de la planta, de desnitrificación y de inmovilización (Kafkafi y Tarchitzky, 2012; Cameron et al., 2013).

Cuando el NH_4^+ es la fuente de N, en las plantas las concentraciones de Ca y Mg son más bajas que cuando se usa NO_3^- (Van Tuil, 1965), ya que el NH_4^+ puede reemplazar a otros cationes adsorbidos en las arcillas, como el Ca y el Mg, principalmente desplaza al Ca y en menor medida al Mg. A la hora de seleccionar este tipo de fertilizantes amoniacales, se deben tener en cuenta aspectos como la sensibilidad del cultivo a la nutrición con NH_4^+ (Moritsugu *et al.*, 1983), la temperatura en la zona de raíces (Ganmore-Newmann y Kafkafi, 1985), el estadio fisiológico del cultivo (Chio y Bould, 1976; Xu *et al.*, 2001) y las condiciones del suelo.

En suelo saturado, como el sistema de riego de inundación para el cultivo de arroz, la elección común es urea o fertilizantes amoniacales para que el cultivo lo absorba como NH_4^+ (Kafkafi y Tarchitzky, 2012).

En condiciones aeróbicas el NH_4^+ es transformado rápidamente hasta NO_3^- , siendo esta última la forma predominante en el suelo y la principal forma de N absorbido y asimilado por la mayoría de las plantas (Bredemeier y Mundstock, 2000).

Como en el caso de la urea, el NO_3^- se mueve con el agua en el suelo, por lo cual desciende más allá de la zona de raíces, y se pierde por lixiviación, además en condiciones de suelo saturado de agua, hay déficit de oxígeno (O_2) o anaerobiosis y en estas condiciones, muchos microorganismos del suelo para su respiración usan el NO_3^- como aceptor final de electrones, en lugar del O_2 (desnitrificación).

Al respecto, Sebilo et al., 2013 utilizaron isótopos para determinar el grado en que el NO_3^- de fertilizantes ($\text{K}^{15}\text{NO}_3^-$) fue tomado por los cultivos, evaluar el tiempo de permanencia de este en la materia orgánica del suelo, y su tasa de lixiviación a recursos hídricos durante 30 años, hallando la importancia de la materia orgánica del suelo como un amortiguador de la pérdida de N por lixiviación, y la gestión de modelos que permitan comprender y mitigar la lixiviación de NO_3^- . En tanto que Huang, Li y Yao (2014) concluyeron que el NO_3^- (KNO_3) podría inhibir significativamente la abundancia de óxido nitroso reductasa, y por ende causar una alta emisión de N_2O .

Por otra parte, el uso de fertilizantes de NO_3^- como fuente de N aumenta el pH de la rizósfera debido a que la absorción de NO_3^- resulta en un flujo de salida de OH^- de la planta (Marschner, 1995).

Así, la fuente de fertilizante nitrogenado (urea, sales de NH_4^+ o NO_3^-) más adecuada a las condiciones de cultivo, suelo y clima local, será disponible para las plantas de acuerdo a los procesos de transformación de N:

1.1.1 Mineralización

La mineralización del N es la transformación de N orgánico en N inorgánico. Entre los factores que regulan la mineralización se encuentran la aireación, la humedad, cantidad y composición de la materia orgánica y la temperatura (Malavolta, 1980; Marschner, 1995).

En el suelo el N orgánico es mineralizado a NH_4^+ (**amonificación**). La amonificación es mediada por enzimas extracelulares producidas por microorganismos, como proteasas, quitinasas, RNAsas, DNAasas, ureasas; y de enzimas intracelulares aminoácido deshidrogenasa y quinasas, involucradas en la producción final de NH_4^+ , al actuar en la degradación de nucleótidos, aminoácidos y amino azúcares, liberando el NH_4^+ a través de la reacción de desaminación (Myrold, 2005).

1.1.2 Inmovilización

El NH_4^+ es asimilado por plantas y microorganismos, y en la mayoría de los suelos está presente en bajas concentraciones (Myrold, 2005).

En el suelo, la mineralización-inmovilización se produce al mismo tiempo. Mientras que la mineralización resulta en un aumento de N mineral (formas de N disponibles para las plantas),

la inmovilización resulta en una disminución. Los microorganismos tienen necesidad de N para la biosíntesis de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos; cuando este N que requieren está accesible en MO, el N se libera a la par del consumo de C por los microorganismos. Por el contrario, cuando no es suficiente el N (sustratos de baja calidad) para el requerimiento nutricional de los microorganismos, los microorganismos invierten energía en la síntesis de enzimas para la mineralización de N y el producto que se libera al suelo debe ser inmovilizado. La relación C: N es más alta en hongos que en bacterias y arqueas, por lo cual, de manera comparativa los hongos crecen más en sustratos bajos en N (Robertson y Groffman, 2015). De esta manera, dado que la inmovilización resulta en una disminución de las principales fuentes de N para los cultivos (NO_3^- y el NH_4^+), las plantas también absorben y metabolizan una amplia gama de formas N orgánico presentes en el suelo (Haynes y Goh, 1978; Salsac et al., 1987; Begon et al., 1998; Marschner 2008; Boudsocq et al., 2012; Paungfoo-Lonhienne et al., 2012).

1.1.3 Nitrificación

En el proceso de nitrificación, a menudo se ha considerado la nitrificación autotrófica, donde el NH_4^+ (NH_3 es el sustrato del enzima) proveniente de fuentes de N como urea, sulfato de amonio o de la mineralización de la materia orgánica, es oxidado secuencialmente en presencia de O_2 , hasta NH_2OH , que se oxida posteriormente a NO_2^- , y este finalmente es oxidado hasta NO_3^- .

Básicamente la oxidación del NH_4^+ esta mediada por el enzima amoniaco monooxigenasa (AMO). La presencia del gen *amoA* que codifica la subunidad A de este enzima, subunidad conservada en todos los organismos nitrificantes autotróficos arqueas y bacterias amonio-oxidantes (AOA y AOB) sugiere que este es el principal mecanismo de oxidación del NH_4^+ en el suelo (Abell et al., 2012). El alto nivel de conservación del gen *amoA* entre los diferentes linajes demuestra la importancia evolutiva que les ha permitido a los microorganismos nitrificantes establecerse en este nicho ecológico como los principales transformadores de N (Pester et al., 2012).

En suelos ácidos, la nitrificación en su mayoría es autótrofa (De Boer y Kowalchuk, 2001) y es llevada a cabo principalmente por arqueas nitrificantes (He et al., 2012). AOA y AOB tienen diferentes potenciales de nitrificación, AOA tolera más bajas concentraciones de NH_4^+

(Martens-Habbena et al., 2009) y puede adaptarse a condiciones extremadamente secas como un mecanismo para evitar la competencia por NH_4^+ , puesto que las plantas son metabólicamente más activas durante el período de lluvias (Kaye y Hart, 1997; Dore et al., 2008).

Tradicionalmente se ha asumido que las tasas de transformación de N en el suelo son más altas luego de eventos de lluvia que durante períodos secos (Austin et al., 2004). Sin embargo, Parker y Schimel, 2011 han reportado altos flujos de N durante el período seco que durante períodos húmedos en pasturas de California. También señalan que varios mecanismos pueden estar causando estos inesperados patrones, incluyendo la competencia por el NH_4^+ , entre las plantas, AOA y AOB.

Además de la nitrificación autotrófica, otros microorganismos pueden producir NO_2^- y NO_3^- a través de procesos de oxidación enzimática que no están unidos al crecimiento microbiano (no ganan energía con esta actividad, como sí ocurre en la nitrificación autotrófica). Tal es el caso de bacterias oxidantes de metano, cuya enzima metano oxigenasa, es un complejo unido a membrana, que oxida también NH_4^+ , y por otra parte están bacterias y hongos heterotróficos capaces de oxidar el NH_4^+ hasta NO_2^- o NO_3^- (nitrificación heterotrófica). Los nitrificantes heterotróficos incluyen por ejemplo hongos del género *Aspergillus*, y géneros bacterianos como *Alcaligenes*, *Arthrobacter* spp., *Aerobacter aerogenes*, *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas* spp. y *Thiosphaera pantophora* (*Paracoccus pantotrophus*) - una interesante nitrificante heterotrófica que además desnitrifica en condiciones anaeróbicas. En cuanto a la nitrificación heterotrófica, parece importante en algunos suelos y microambientes donde tal vez los nitrificantes autótrofos son inhibidos (Myrold, 2005; Robertson y Groffman, 2015).

Por otro lado, el NO_3^- , resulta en niveles más altos en sistemas de labranza cero, donde hay mayor actividad biológica y nitrificación en el suelo, en comparación con áreas bajo sistemas de labranza convencionales (Moro et al., 2014). En este sentido, grandes cantidades de NO_3^- conduce a mayores pérdidas de N, especialmente en entornos con altas precipitaciones (Crusciol et al., 2011). Este proceso de **lixiviación** no sólo resulta en pérdidas considerables de N, sino que también representa un riesgo de contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Sebilo et al., 2013). Asimismo, el exceso de NO_3^- que no es tomado por las plantas puede perderse al estar disponible como sustrato para el proceso de **Desnitrificación**

– que básicamente es la reducción de NO_3^- a formas gaseosas N_2O , NO y N_2 (Barker y Mills, 1980; Smith et al., 2003, Mora et al., 2005).

Otros procesos que influyen en la disponibilidad de N en el suelo son la **reducción de NO_3^- hasta NH_4^+** bajo condiciones anaerobias por bacterias entéricas anaerobias facultativas como *Escherichia*, *Enterobacter*, anaerobias obligadas como algunas especies de *Desulfovibrio*, *Wolinella*, microaerófilas como *Campylobacter*, y aerobias como *Pseudomonas* (Myrold, 2005).

1.2 Amonio vs. Nitrato

Las plantas en su mayoría tienen la capacidad de utilizar ya sea NH_4^+ o NO_3^- como fuente de N (Haynes y Goh, 1978; Salsac et al., 1987; Boudsocq et al., 2012), pero en ventaja comparativa el catión NH_4^+ está electroestáticamente en poder de las superficies de arcilla cargadas negativamente y los grupos funcionales de la MO del suelo, manteniendo por más tiempo en la rizosfera el N para que pueda ser absorbido por la planta, lo que reduce la pérdida de N por lixiviación, que en contraste, el NO_3^- , es más lábil a ser lixiviado, lo cual ha llevado a la pérdida de N (Slangen y Kerkhoff, 1984; Sahrawat, 1989).

El NH_4^+ puede ser la mayor fuente de N en suelos ácidos (Von Wirén et al., 2000) y en suelos alcalinos se da la volatilización del NH_3 , por lo que es posible en este tipo de suelos, que la nitrificación facilite la retención del N al convertir rápidamente el NH_4^+ en NO_3^- , este último no es susceptible a pérdidas por volatilización (Sahrawat, 1989). Sin embargo, Alcántara y Camargo, 2010 señalan que en latosoles (suelos de regiones tropicales como Brasil), presentan bajo contenido de materia orgánica y tienen carga neta positiva, que favorece la retención de NO_3^- , un anión con adsorción electrostática, predominantemente.

Desde el punto de vista energético, la toma y asimilación de NH_4^+ tiene menor costo energético que la toma y asimilación de NO_3^- . La asimilación del NO_3^- requiere una energía equivalente a 20 moles de ATP / mol de NO_3^- , mientras que la asimilación del NH_4^+ requiere únicamente 5 moles de ATP / mol de NH_4^+ (Salsac et al., 1987).

Así, el ahorro energético en la asimilación de NH_4^+ llevaría a pensar que se daría una mayor producción de biomasa en las plantas que crecen con NH_4^+ a diferencia de las que crecen con NO_3^- . No obstante, el uso combinado de las dos formas de N puede conducir a un mejor

rendimiento de la planta (Tisdale, Nelson y Beaton, 1985). Una mezcla de aproximadamente NH_4^+ / NO_3^- (30/70%) puede aumentar el rendimiento en comparación con solamente NO_3^- (Marschner, 1995; Gentry y Below, 1989) y según expone Subbarao et al. (2006) para la mayoría de los sistemas agrícolas, un balance de dos tercios a un tercio entre NO_3^- y NH_4^+ provee el mejor crecimiento de los cultivos y productividad.

Algunos estudios muestran que si el NH_4^+ es la única fuente de N para las plantas, pueden causar síntomas de toxicidad graves (Barker y Mills, 1980; De Graaf et al., 1998; Britto et al., 2001). Luego esta toxicidad podría contrarrestar la ventaja energética en tomar NH_4^+ en lugar de NO_3^- , y además este último se puede almacenar en los tejidos vegetales. Sin embargo, algunas plantas como el arroz en una etapa temprana de su desarrollo y que están adaptadas a condiciones anaeróbicas del suelo, y plantas adaptadas a suelos ácidos generalmente prefieren NH_4^+ sobre NO_3^- (Kennedy, 1992; Sasakawa y Yamamoto, 1978; Arregocés, 1985; McKane et al., 2002; Malavolta, 1980; Nascente et al., 2011).

En cuanto a la fisiología de las plantas entre la absorción de las dos formas de N inorgánico NH_4^+ y NO_3^- (Tabla 2), Maire et al. (2009) sugiere que los costos fisiológicos y limitaciones físicas limitan la estrategia de la planta en direcciones opuestas y, por tanto, podría imponer una compensación.

De esta forma, las plantas poseen plasticidad en la absorción de diferentes formas de N (Houlton et al., 2007), lo que ha permitido una especialización en la toma de determinada forma de N (Ashton et al., 2010). Aanderud y Bledsoe (2009) notaron que la preferencia de NH_4^+ o NO_3^- está influenciada por la estructura de la comunidad a través de cambios en la competencia por el N, pues observaron una separación parcial en la toma de las formas de N entre pasturas nativas e invasivas en un bosque de robles en California. Por su parte, Boudsocq et al. (2012) señalan que debido a que poco se sabe acerca de la importancia ecológica en la preferencia de las plantas por NH_4^+ frente a NO_3^- para el funcionamiento del ecosistema y la estructura de las comunidades, han modelado esta preferencia mediante dos ecosistemas contrastantes y demostraron que el NO_3^- afecta significativamente a las propiedades del ecosistema, como la biomasa, la productividad y las pérdidas de N.

Tabla 2. Relación entre la fisiología de las plantas y las formas de nitrógeno (N) NH_4^+ y NO_3^- . Elaborado a partir de Andrews et al. (2013).

	NH_4^+	NO_3^-
Crecimiento de la planta	Altas concentraciones pueden causar toxicidad	Alto
Crecimiento de raíces y ápices	Disminuye	Aumenta
Concentración de azúcares y almidones	Alto	Bajo
Contenido de macronutrientes (K^+ , Mg^+ , Ca^+) en hojas jóvenes	Alto	Alto
Contenido de macronutrientes (K^+ , Mg^+ , Ca^+) en hojas maduras	Menor	Mayor
Tasa de movilización de reservas en la semilla prior a germinación	Disminuye	Aumenta
Rompimiento de dormancia en semilla	Reduce dormancia en algunas especies de plantas	Reduce dormancia en muchas especies de plantas
Arquitectura de la raíz	Estimula la formación más que la elongación de yemas laterales	Incrementa la longitud de raíces laterales. Altas concentraciones pueden inhibir el desarrollo de las yemas laterales

1.3 Influencia de las plantas sobre la nitrificación

El éxito o fracaso de las plantas para absorber el N en la zona de la raíz tiene implicaciones no sólo para el crecimiento y rendimiento del cultivo, sino también sobre las pérdidas de N, como las que se desencadenan desde el proceso de nitrificación, en un contraste de funciones y relaciones ecológicas de plantas y la estructura de la comunidad microbiana en el suelo y en la rizosfera (Boudsocq et al., 2012).

En condiciones de acidez las especies de plantas ácido tolerantes tienen una alta toma de NH_4^+ y de este modo disminuye o iguala la nitrificación en la rizosfera comparada con el resto de suelo y por su parte las especies menos tolerantes a la acidez, tienen alta nitrificación en la

rizosfera comparada con el resto de suelo, debido a la baja toma de NH_4^+ . Así, se hablaría de plantas que inhiben la nitrificación y plantas que estimulan la nitrificación (Olsson y Falkengren-Grerup, 2000).

Teniendo en cuenta que algunas plantas son capaces de inhibir (Lata et al., 1999, 2000, 2004; Subbarao et al., 2007a, 2007b) o estimular la nitrificación (Lata et al., 2000; Hawkes et al., 2005), se estaría alterando la cantidad relativa de NH_4^+ y NO_3^- disponible en el suelo para su propia nutrición, así como para la nutrición con N mineral de sus competidores.

El control de las tasas de nitrificación podría desempeñar un papel clave en la dinámica de las comunidades vegetales ya que la estimulación y la inhibición de la nitrificación afectan fuertemente las invasiones de plantas (Lata et al., 2004; Hawkes et al., 2005; Rossiter-Rachor et al., 2009).

La estimulación de la nitrificación previene la invasión y la exclusión entre dos tipos de plantas. Cuando el tipo que estimula la nitrificación es el residente, entonces la disponibilidad de NH_4^+ se reduce fuertemente, mientras que el NO_3^- aumenta en gran medida (Boudsocq et al., 2012).

En este sentido, Hawkes et al., 2005 mostraron que varias plantas anuales exóticas (*Avena barbata* y *Bromus hordeaceus*) fueron capaces de aumentar las tasas de nitrificación en el suelo por un factor de 2, y sugirieron que tal control sobre la nitrificación da una fuerte ventaja a los residentes en la invasión de plantas.

Wheatley et al. (1997), identificaron que plantas de cebada tenían un efecto estimulador durante la etapa de crecimiento temprana, pero un efecto inhibitorio sobre la nitrificación desde el inicio de la etapa reproductiva hasta la madurez. Por su parte, Subbarao et al. (2009) evidencia que los exudados de la raíz de soya estimulan la actividad nitrificante en el suelo.

Sylvester-Bradley et al. (1988) evidenciaron en campo que las tasas de nitrificación fueron estimuladas en los suelos donde se cultivaron leguminosas forrajeras (*Pueraria phaseoloides*, *Centrosema macrocarpum* y *Stylosanthes capitata*) en comparación a pasturas del género *Brachiaria* (*B. decumbens* y *B. humidicola*) que no mostraron estimulación de la nitrificación en el suelo.

Boudsocq et al. (2009) plantearon un modelo de evaluación del impacto de la inhibición de la nitrificación (IN) en funcionamiento de los ecosistemas, informando como una IN puede aumentar la productividad primaria y la fertilidad de los ecosistemas en una manera sostenible. De hecho, la IN realza la conservación de N mineral en el suelo – NH_4^+ , ya que como se ha mencionado, el NO_3^- es más propenso que el NH_4^+ a perderse del ecosistema. Lo cual es de particular importancia en ecosistemas pobres de N y/o en suelos bien drenados.

Al respecto de la inhibición de la nitrificación por plantas, desde 1914, Russell indicó que cultivos como maíz, trigo, girasol y sorgo, pueden influir en la nitrificación y la formación de NO_3^- en los suelos. En cuanto a trigo y maíz, Lyon et al., 1923 observaron que suelos sembrados de trigo y de maíz mostraron niveles más bajos de NO_3^- en comparación con las parcelas de control sin plantas, que fueron igualmente fertilizados. Del mismo modo, Moore y Waid (1971) encontraron bajas tasas de nitrificación en suelos incubados con lavados de raíz de trigo (*Triticum aestivum*) y de raigrás (*Lolium multiflorum*) y señalaron que los factores que inhiben la nitrificación son los compuestos liberados a partir de las raíces. En algunos suelos forestales y de pasturas se observó que la nitrificación es baja (Munro, 1966; Lodhi y Killingbeck, 1980; Vitousek y Matson, 1984; Cooper, 1986; Sylvester-Bradley et al., 1988). Por su parte, Alsaadawi (1988) encontraron que exudados de raíces de sorgo y de girasol inhiben la nitrificación en suelos.

El fenómeno de inhibición biológica de la nitrificación (IBN) se ha venido estudiando en plantas gramíneas forrajeras tropicales de origen africano del género *Brachiaria* y según afirma Subbarao et al. (2007^a), estas plantas pueden sintetizar y liberar de sus raíces compuestos químicos que inhiben la nitrificación, manteniendo el N como NH_4^+ durante períodos más largos de tiempo.

En cuanto a los compuestos químicos implicados en la función IBN, se han encontrado en *B. humidicola* (Bh) metil-p-cumarato y ferulato de metilo en tejido de raíces (Gopalakrishnan et al., 2007), brachialactona en exudados de las raíces (Subbarao et al., 2009), y en los metabolitos exudados de las raíces de *Sorghum bicolor* metil 3, 4-hidroxifenil propionato (MHPP) y sorgoleona y sakuratenina (Zakir et al., 2008; Subbarao et al., 2013).

Zhu et al. (2012) plantean que la liberación de moléculas IBN a la solución del suelo tiene implicaciones energéticas considerables para la planta con alta actividad IBN que ha destinado parte de los fotosintatos para la síntesis de estos compuestos. La relación entre la toma de NH_4^+ , la bomba de ATPasa de la membrana plasmática y la acidificación del medio rizosférico influyen en la liberación de compuestos IBN.

Por su parte, Pariasca et al. (2010) estudiaron la actividad IBN en arroz y se configuran como la primera evidencia de que los exudados de las raíces de arroz pueden reducir las tasas de nitrificación en el suelo, y al igual que en sorgo y Bh encontraron que los iones NH_4^+ estimulan la exudación de compuestos IBN.

Finalmente, dada la importancia de la nitrificación en la utilización de N por parte de los cultivos, y las pérdidas de N, entender la dinámica del N como un elemento importante de soporte de la vida en el planeta, y de particular interés en los agroecosistemas, permite avanzar en el estudio y aplicación de estrategias que promuevan un NUE en los sistemas agrícolas, proporcionando así su sostenibilidad y ecoeficiencia.

2. Capítulo 2. Potencial de Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) de *Brachiaria humidicola* para el rendimiento de arroz (*Oryza sativa* L.)

La Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) permite mantener el nitrógeno (N) mineral del suelo en forma de amonio (NH_4^+) durante mayor tiempo, ya que este es menos móvil y se pierde en menor proporción comparado al nitrato (NO_3^-) que resulta del proceso de nitrificación.

Desde el 2012, en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en colaboración con Centro Internacional de Investigación para las Ciencias Agrícolas del Japón (JIRCAS) y Ministerio Federal de Cooperación Económica y Desarrollo – Alemania (BMZ), se ha venido estudiando el efecto residual de IBN de *Brachiaria humidicola* (Bh) previamente plantado en la rotación Bh - maíz, y su beneficio en términos de rendimiento de grano.

El arroz es un cultivo cereal que prospera en suelos salinos, alcalinos y ácidos. De las 23 variedades del género *Oryza* que existen, se cultivan dos: *Oryza sativa*, originaria del trópico húmedo de Asia, y la *O. glaberrima* de África Occidental (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO, Año internacional del arroz, 2004).

En el año 2014, según FAOSTAT, los principales productores mundiales de arroz fueron China e India. En Colombia, la producción media de arroz fue de 1,828,254 toneladas de arroz cáscara, y la tasa anual de crecimiento económico en términos de área, producción y rendimiento de arroz, fue en descenso, en los últimos años (2010-2014). Tal como lo evidencia datos de las series históricas en las estadísticas arroceras de la Federación Nacional de Arroceros - FEDEARROZ, y donde se muestra también que la zona de los Llanos orientales cuenta con la mayor área sembrada (146,538 hectáreas) con un rendimiento de 4.36 toneladas de arroz “*paddy*” seco (arroz cáscara) por hectárea, para el mismo año.

En cuanto a la nutrición mineral, el arroz requiere 16 elementos esenciales (De Datta 1981), de los cuales el N es uno de los macronutrientes esenciales para su crecimiento, siendo constituyente de aminoácidos, ácidos nucleicos, y clorofila, aumenta el tamaño de las hojas, el

número de espiguillas por panícula, el porcentaje de espiguillas llenas y contenido de proteína en el grano (Doberman y Fairhurst, 2000; Lea y Miflin, 2011).

La urea es el fertilizante de N comúnmente aplicado a los cultivos de arroz. Sin embargo, la recuperación de este N por parte del arroz puede ser tan bajo como un 10% y rara vez supera el 50% (De Datta, 1981), por lo cual, para afrontar el reto de incrementar la productividad de los cultivos de arroz, se utilizan grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados que resultan en daños ambientales.

En este sentido, para obtener altos rendimientos de grano, con un menor impacto ambiental, se evaluó mediante un ensayo en invernadero, que simula un sistema de rotación Bh-arroz de manera que se determine en qué medida líneas de arroz seco del Proyecto colaborativo entre el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT-Colombia) y el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agrícola para el Desarrollo (Cirad-Francia), con diferentes respuestas a la fertilización nitrogenada, se benefician en términos de rendimiento, de una mejora de suelo previamente sembrado con Bh, y determinar el efecto residual de IBN de Bh en el suelo.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Localización y características del suelo

El ensayo en materas de un sistema que simula una rotación Bh-arroz se llevó a cabo en un invernadero experimental del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado a 30°30'17.47" N y 76°21' 24.31" O, en el Km 17 Recta Cali-Palmira (Valle del Cauca, Colombia). El suelo empleado para este estudio fue tomado de la parte superior 20 cm limpiando el área de toda cobertura vegetal, del lote de Agronomía "Loma 5" donde se siembra líneas de arroz seco del Proyecto de mejoramiento de arroz CIAT/Cirad (SAR) y del área de Ganadería "Chipre" donde se encuentra establecido Bh CIAT 679 (SBH), ambos lotes se encuentran en el Centro de Investigación de la Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) La Libertad, ubicado en el Km 17 vía Puerto López (Villavicencio, Meta, Colombia) a 04°03'35.9742'N, 73°28'8.8776' W. El tipo de suelo del área es un oxisol que se clasifica como Typic Haplustox, terrazas altas en la clasificación regional (Orduz et al., 2011). Las características de los suelos antes de la siembra se muestran en la tabla 3. Para ambos suelos

pH 4,7, a este pH posible toxicidad de Al; valores medios de Zn; saturación de bases de 23,1% (SBH) baja y 55% (SAR), niveles bajos de Cu y B (SAR), y altos de Fe (SBH).

Como línea base, previo al inicio del ensayo en invernadero, a los suelos SBH y SAR se les determinó las tasas de nitrificación por medio de incubación de suelo (ver sección 2.1.5) y cantidad (copias de gen amoA) de arqueas y bacterias amonio-oxidantes (AOA y AOB) mediante qPCR (ver sección 2.1.6).

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de los suelos de La Libertad SBH (suelo de Bh) y SAR (suelo de arroz).

Parámetro*	SBH	SAR
Arena %	53.7	32.5
Limo %	8.3	17.8
Arcilla %	37.9	49.8
Textura	A.Ar	A
pH	4.77	4.76
MO (g kg ⁻¹)	28.12	31.54
C orgánico total (g kg ⁻¹)	16.31	18.29
P (mg kg ⁻¹)	3.29	23.33
Ca (cmol kg ⁻¹)	0.51	1.16
Mg (cmol kg ⁻¹)	0.10	0.60
K (cmol kg ⁻¹)	0.10	0.22
Na (cmol kg ⁻¹)	0.00	0.00
Al (cmol kg ⁻¹)	2.36	1.64
CICE (cmol kg ⁻¹)	3.07	3.62
S (mg kg ⁻¹)	16.73	23.02
B (mg kg ⁻¹)	0.44	0.18
Cu (mg kg ⁻¹)	0.69	0.44
Zn (mg kg ⁻¹)	0.73	1.80
Mn (mg kg ⁻¹)	3.79	5.72
Fe (mg kg ⁻¹)	66.36	22.15
N- NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	8.4	0.2
N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	3.47	6.72

*Textura (método del hidrómetro - Bouyoucos) pH (Agua 1:1); Materia Orgánica (Walkley-Black Espectrometría); Carbono orgánico total (1,724 = Factor de Van Bemmelen para convertir el C orgánico en MO); P (Bray II Espectrofotometría), Ca, Mg, K, Na Intercambiable (Absorción Atómica); Capacidad de intercambio catiónico efectiva - CICE (suma de cationes); Al Cambiable (KCl 1M volumetría); S extractable (Ca₃(PO₄)₂ Turbidimetría); B en Agua Caliente (Espectrofotometría Azometina); Cu, Zn, Mn, Fe Extractable (Doble Acido Absorción Atómica), N- NH₄⁺ y N-NO₃⁻ (Espectrofotometría).

2.1.2 Población de estudio

Se seleccionó 4 líneas élite de arroz seco (Línea 3, Línea 18, Línea 23 y Línea 31) que hacen parte del programa de mejoramiento Proyecto CIAT/Cirad, a las que previamente se estimó la respuesta a la fertilización nitrogenada (urea) para el aumento de rendimiento. La Línea 3 y Línea 23 con respuesta (relación directa entre dosis de urea y rendimiento), la Línea 18 y la Línea 31 sin respuesta a la fertilización con urea para el aumento de rendimiento. Como testigo se empleó el cultivar comercial Llanura 11 Cirad 409 (C409), que también presenta respuesta en rendimiento a la fertilización con urea. Además, se empleó el cultivar de Bh CIAT 679 (Bh 679), como control positivo de IBN, de acuerdo a Gopalakrishnan et al. (2009); Subbarao et al. (2009).

2.1.3 Manejo del experimento en invernadero

Preparación del suelo antes de la siembra: a 400 kg de suelo de cada localidad se aplicaron 700 kg/ha de cal dolomítica ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). Pasados 20 días se procedió a la aplicación pre-siembra de P, K, Zn y Mg-S, respectivamente. 93 kg/ha de GranoFos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 40 kg/ha de KCl, 20 kg/ha de Zn y 75 kg/ha de Kieserita ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) - fertilización que llevan a cabo para las líneas de arroz seco que evalúan en lotes de “La Libertad”.

Siembra: el ensayo se realizó bajo un sistema de siembra directa en materas conteniendo 4 kg de cada suelo previamente preparado. Se sembraron semillas de cada línea de arroz, estableciendo 3 plantas por matera. Del control IBN positivo Bh 679 se establecieron estolones de 15 cm de longitud.

Aplicación de fertilizantes post-siembra: la primera aplicación a los 20 días después de siembra (dds) incluyó 40 kg/ha de KCl, y 1/3 de la respectiva dosis de nitrógeno (N). Las dosis de N fueron 0 (N0), 80 (N80) y 180 (N180) kg/ha de N utilizando urea como fuente de N, fraccionando cada dosis (80 y 180 kg/ha) en tres aplicaciones. El uso de dosis contrastantes fue con base en estudios previos sobre el efecto residual de IBN de Bh para el uso eficiente de N (NUE) en un cultivo subsecuente de maíz; y el efecto de la fertilización nitrogenada en términos de rendimiento de líneas de arroz seco que evalúan en lotes de “La Libertad”, cuyo plan de fertilización comprende una dosis de N -urea de 80 kg/ha y la aplicación realizada por agricultores de arroz en Colombia es 180 kg/ha (Berrio et al., 2002).

Mediciones de variables: durante el crecimiento de las plantas se realizó seguimiento visual y a los 40 dds, al término de la fertilización nitrogenada se realizaron mediciones de longitud de planta (hasta la última hoja desarrollada), valoración del contenido de clorofila en tres últimas hojas desarrolladas y en tres sitios de cada hoja, mediante el clorofilometro Minolta® SPAD 502.

Mantenimiento: El manejo del riego se realizó sin restricción hídrica en condiciones de secano, excepto al final de maduración, próximo a cosecha, momento en el que se suspendieron los riegos. El control de plagas fue mecánico para no alterar los tratamientos de dosis de N con aplicación de químicos controladores de plagas y enfermedades, que contienen N en su composición.

2.1.4 Evaluación de Componentes de rendimiento

Una vez maduraron las panículas desarrolladas, se procedió a la cosecha de los materiales separando en bolsas de papel, panículas, hojas, tallos, raíces, y en bolsas plásticas suelo rizosférico.

Se determinó el peso fresco del material foliar colectado, el número de panículas, de granos, y se procedió a secar a 30°C durante 4 días la muestra de grano, para disminuir la humedad (hasta un ideal de 14%) y a 60°C durante 2 días raíces, hojas y tallos.

Una vez seco el material, se procedió a pesar granos llenos y vanos, 100 granos llenos, raíces hojas y tallos.

El rendimiento de grano para cada genotipo de arroz evaluado se expresó como g/matera.

2.1.5 Incubación de suelo

El suelo rizosférico colectado fue secado al aire a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, se maceró y tamizó a malla de 2mm y se tomó por triplicado, 5 g de suelo en frascos de vidrio adicionando 1,5 mL de solución de sulfato de amonio 27 mM, y se incubó a 25°C por 27 días. Durante diferentes tiempos de incubación (luego de un período de pre-incubación de 11 días) se realizó la extracción con KCl 1M en relación 1:10 m/v, para la medición de NH_4^+ y NO_3^- mediante protocolos estándar de colorimetría – espectrofotometría, para estimar el incremento NO_3^- conforme avanza el tiempo de incubación, y finalmente se calcularon las tasas de nitrificación (pendiente de la recta). Se usó como control, el inhibidor

sintético dicianidamida (DCD) en un 20% de la contribución del N que contiene el sulfato de amonio, en la solución a 27 mM.

2.1.6 Cuantificación de AOA y AOB (*gen amoA*)

Para el análisis de AOA y AOB en el suelo, se realizó extracción de ADN a partir de muestras de suelo, usando el kit FastDNA® SPIN Kit For Soil (MP Biomedicals) con modificaciones que incluyen el uso de tiocianato de guanidina para remover ácidos húmicos que son inhibidores de PCR. El ADN extraído se cuantificó con el método de fluorescencia usando picogreen y el equipo GENios (TECAN). La cuantificación de los genes *amoA* de las AOA y AOB se realizó a través de qPCR, usando termociclador Realplex (Eppendorf), y las combinaciones de primers *amoA19F/amoA643R* para AOA (Leininger et al., 2006), *amoA-1F/amoA-2R* para AOB (Rotthauwe et al., 1997). Las reacciones de qPCR se corrieron por triplicado en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 ng de ADN de suelo, 1 µM de cada primer y 10 µl del Brilliant SYBR Green qPCR Master Mix. El control negativo o “*No Template Control*” (NTC) consistió de agua en lugar de ADN. Las condiciones de amplificación de los genes de interés fueron las siguientes: 1) 95°C – 5 min; 2) 95°C – 1.5 min; 3) 55°C – 1.5 min; 4) 72°C 1.5min; 5) Lectura de la placa; 8) Ir al paso 2 por 40 veces más; 9) Curva de “*melting*” desde 65°C hasta 95°C, leer cada 0.2°C, mantener 1 seg; Fin.

2.1.7 Diseño experimental

Para evaluar el sistema de rotación Bh – arroz en invernadero, se utilizó un diseño de parcelas subdivididas con tres repeticiones, empleando como parcela principal el tipo de suelo, como subparcela la dosis de N y sub-subparcela el material vegetal (Figura 3).

2.1.8 Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante el test LSD al 95% de confianza, para identificar diferencias significativas entre tratamientos, empleando el paquete estadístico SAS 9.4.


	Tipo de suelo	Parcela principal SBH SAR
	Dosis N	Subparcela 0, 80 y 180 kg N/ha
	Material vegetal	Sub-subparcela 4 Líneas arroz secano (3,18,23 y 31) 1 variedad comercial arroz secano (Llanura11) Control IBN positivo (Bh 679)
	Unidad experimental: 3 plantas/matera	

Figura 3. Diseño de parcelas subdividas del sistema de rotación Bh-arroz, siendo la parcela principal el tipo de suelo SBH (suelo cultivado con Bh) y SAR (suelo donde se siembra arroz); la subparcela corresponde a la dosis de nitrógeno (N) de urea N0, N80 y N180 kg/ha; y la sub-subparcela es el material vegetal: 4 líneas de arroz secano, variedad comercial Llanura 11 y Bh CIAT 679 (Bh 679).

2.2 Resultados y Discusión

2.2.1 Línea base

A partir del análisis de suelos (tabla 3) se evidencia que los suelos de la zona de Piedemonte llanero (oxisoles) proveniente de Corpoica “La Libertad”, uno con uso agronómico prolongado de Bh 679 (SBH) y el otro cultivado de arroz (SAR) son similares en pH ácido, contenido de MO y Zn, diferentes en aspectos como: mayor contenido de Al (2,36 cmol/kg) en SBH, la saturación de bases en SBH es baja (23,1%) y en SAR es media (55%), valores de P en SAR (alto) y bajo en SBH; niveles bajos de micronutrientes como Cu y B, NH_4^+ en SAR, y altos de NH_4^+ y Fe en SBH, y alto contenido de NO_3^- en SAR.

Teniendo en cuenta estas diferencias, se daría fuerza a la hipótesis de que el IBN mediado por Bh, permite al cultivo de arroz sobreponer la baja fertilidad general que presenta el suelo SBH, debido al mayor contenido de NH_4^+ .

Según Subbarao et al. (2012), el uso prolongado de la tierra por los sistemas agrícolas incluye altas aplicaciones y dosis de fertilizantes nitrogenados, lo que posiblemente incrementaría las tasas de nitrificación en el suelo.

Los resultados de la incubación de suelo SBH y SAR, muestran tasas de nitrificación contrastantes (figura 4), validando la hipótesis de que el efecto inhibitorio de Bh sobre las tasas de nitrificación permanece en el suelo SBH, siendo significativamente menor a la tasa encontrada en SAR. Por otro lado, se observó que la inhibición de la nitrificación promovida por Bh es semejante al inhibidor sintético dicianidamida (DCD).

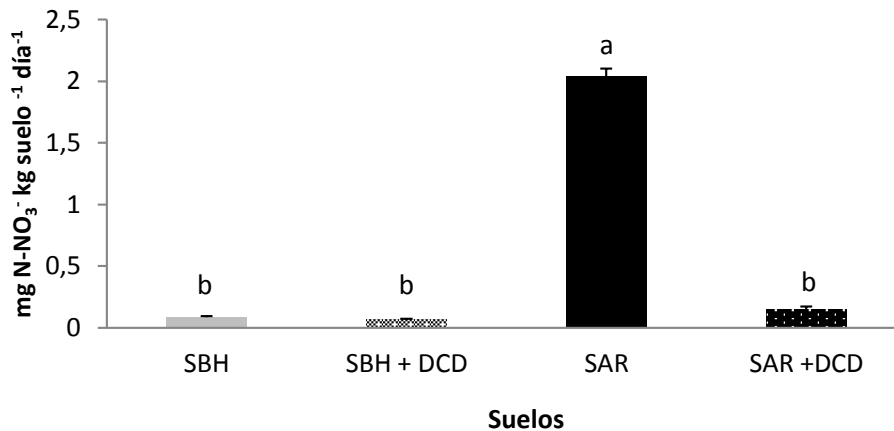


Figura 4. Tasas de nitrificación en suelos de Corpoica “La Libertad” SBH (suelo cultivado con Bh) y SAR (suelo donde se siembra arroz), con el respectivo control de incubación usando inhibidor sintético dicianidamida (DCD). Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con la misma letra indica que no hay diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$).

De esta manera, suelos con uso agronómico como el cultivo de arroz que tienen entradas altas de N proveniente de fertilizantes, muestran altas tasas de nitrificación a diferencia de suelos sembrados con Bh cuyo manejo agronómico tradicional no incluye fertilización nitrogenada, sin embargo, comparando con Subbarao et al., (2009) las tasas de nitrificación de cultivos con actividad y sin actividad IBN, bajo el mismo régimen de fertilización nitrogenada tuvieron una tendencia similar a la encontrada en este estudio, demostrando que el efecto de inhibición de la nitrificación se debe a la liberación de compuestos con actividad inhibitoria sin importar la disponibilidad de sustrato para la nitrificación.

Además, menores tasas de nitrificación permiten mantener el N mineral en forma de NH_4^+ durante más tiempo (Slangen y Kerkhoff, 1984; Subbarao et al., 2007a).

Al respecto, en la figura 5 se muestra que la inhibición de la nitrificación inducida por Bh se mantiene a pesar de la alta dosis de N suministrada durante la incubación de suelo, puesto que

el NH_4^+ y NO_3^- en el suelo SBH y SAR, presentan diferencias en el orden de magnitud a través del tiempo. El suelo SBH presenta mayores contenidos de NH_4^+ en comparación al suelo SAR, y en este último se encuentra el mayor contenido de NO_3^- después de 27 días de incubación.

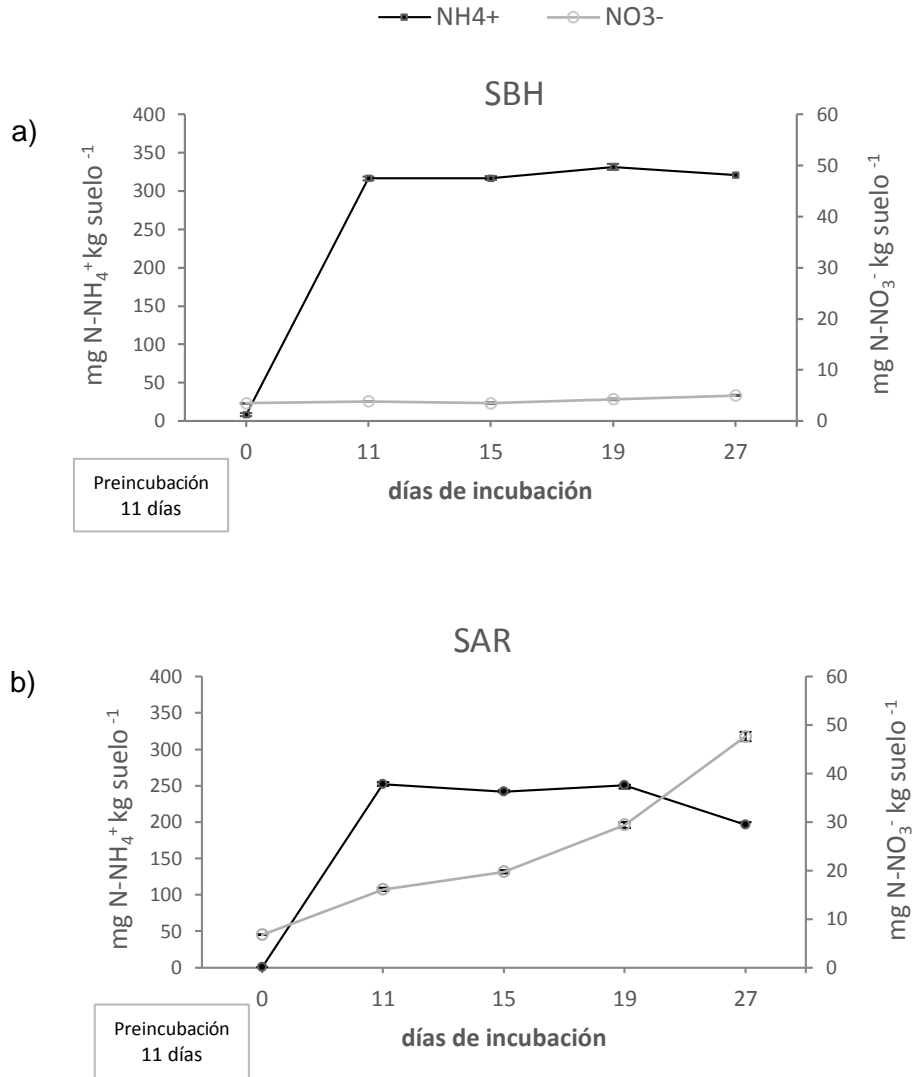


Figura 5. Dinámica de NH_4^+ y NO_3^- durante 27 días de incubación de los suelos de Corpoica “La Libertad” a) suelo cultivado con Bh (SBH) y b) suelo donde se siembra arroz (SAR). Los datos para cada tiempo de evaluación, son medias \pm error estándar (n=3).

Para validar las tasas de nitrificación encontradas, se incluyó la cuantificación del gen *amoA* de la población de nitrificantes, teniendo en cuenta que el uso del gen *amoA*, ha permitido estudiar la dinámica de las poblaciones de nitrificantes en diferentes tipos de suelo (Rotthauwe et al., 1997; Leininger et al., 2006; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012).

Entre tanto, diferentes autores usaron la cuantificación de gen *amoA* como indicadores de IBN (Subbarao et al., 2009; Moreta, 2010a, 2010b y Nuñez, 2015). De esta manera, se puede realizar un seguimiento de la dinámica de nitrificación en el suelo – cantidad de nitrificantes – respecto a su actividad o tasa de nitrificación.

En este sentido, el suelo de uso agrícola cultivado con arroz (SAR) muestra alta tasa de nitrificación, y esta dinámica se ve reflejada en la abundancia de poblaciones microbianas AOA y AOB (Figura 6).

Se evidencia una mayor cantidad de AOA y AOB en SAR respecto a SBH, y un aumento en la población de nitrificantes en la medida que se adiciona NH_4^+ y avanza el tiempo de incubación. Esto indica que la actividad IBN detiene el crecimiento poblacional de nitrificantes y que posiblemente esto impacte las tasas de nitrificación. Así, estos resultados sugieren un posible efecto antibiótico, como el mecanismo de inhibición de la brachialactona, uno de los compuestos que presenta mayor actividad IBN, ha sido reportado como una molécula que inhibe la acción de las enzimas amoníaco monooxigenasa (AMO) e hidroxilamina óxido-reductasa (HAO) (Subbarao et al., 2009). También cabe señalar que en ambos tipos de suelo predominan AOA.

En suelos ácidos, predomina la nitrificación autótrofa y es llevada a cabo principalmente por arqueas nitrificantes (De Boer y Kowalchuk, 2001; He et al., 2012).

Esto último, de acuerdo a Zhang et al. (2012) proporcionan una fuerte evidencia de que en suelos muy ácidos ($\text{pH} < 4.50$), los AOA tienen un papel más importante en la oxidación autótrofa de NH_3 que AOB, al determinar la actividad de nitrificación autótrofa de AOA y AOB durante la incubación de suelos (27 días).

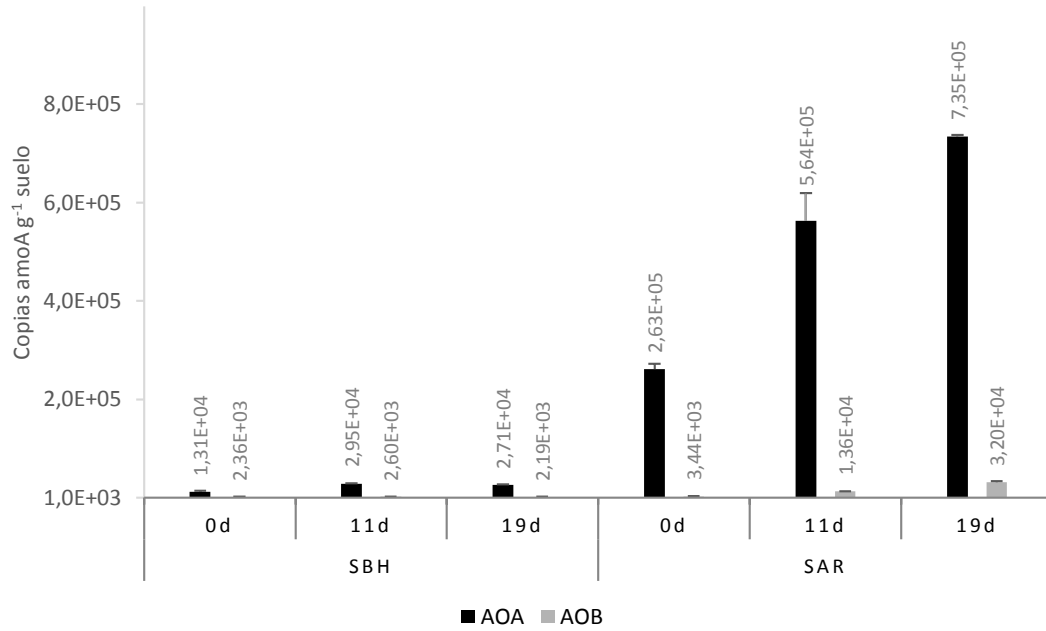


Figura 6. Cuantificación de gen amoA de arqueas amonio-oxidantes (AOA) y bacterias amonio-oxidantes (AOB) en suelo de Bh (SBH) y suelo de arroz (SAR) antes (0 días) y durante el tiempo de incubación de suelo (11 y 19 días) para la determinación de tasas de nitrificación (figura 5 a y b). Barras representan medias + error estándar (n=3).

De esta manera los resultados obtenidos del estado basal de los suelos, confirman diferencias contrastantes, lo que permite evaluar el efecto residual de IBN sobre la productividad de un cultivo indicador, para el caso arroz.

2.2.2 Determinación del efecto residual de IBN liberado por *Brachiaria* en el suelo para mejorar el rendimiento de arroz

Se observó diferencias entre las plantas que crecían en el suelo de Bh (SBH), respecto a las que crecían en el suelo donde se cultiva arroz (SAR). A los 40 días después de siembra (dds), en SBH se evidenció un mejor crecimiento y desarrollo de los materiales de arroz (Figura 7).

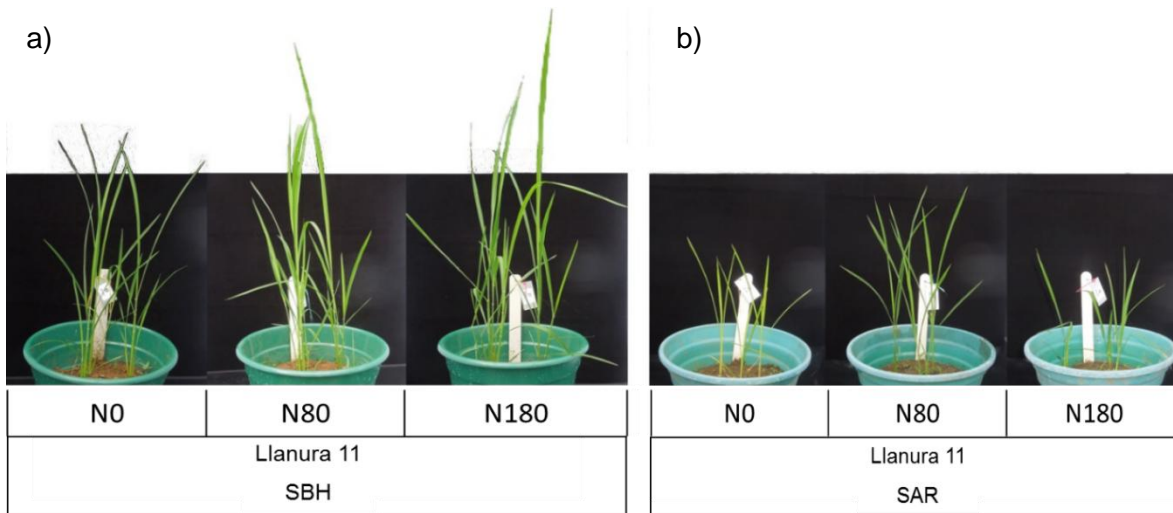


Figura 7. Comparación del crecimiento a los 40 días después de siembra (dds) del genotipo de arroz Llanura 11 (cultivar comercial) en cada suelo de La Libertad SBH (cultivado de Bh) y SAR (sembrado con arroz) para cada dosis de N (0, 80 y 180 Kg/ha).

Además, a los 40 dds se observaron mayores valores de índice de verdor relacionado con el contenido de clorofila, medidos con SPAD (Soil Plant Analysis Development), en plantas de arroz y Bh sembradas en suelo SBH, específicamente cuando no hay aplicación de N (N0) (figura 8).

Los valores SPAD pueden ser convertidos a contenido de clorofila total (mg g^{-1}) utilizando la fórmula $\text{Clorofila (mg g}^{-1}\text{)} = 0.4036 (\text{valor de la lectura del medidor SPAD}) - 0.5527$ ($R^2 = 0.93$) (Jiménez et al., 2015) y se utilizan como una herramienta no destructiva y simple para evaluar la concentración de N en las hojas y por lo tanto el status de nutrición nitrogenada de la planta.

Estos resultados (longitud y valores SPAD) indican que, durante el tiempo de evaluación, el desarrollo de las plantas es mejor en SBH comparado con SAR, resaltando sobretodo una marcada diferencia sin N (N0) en SBH. Por lo tanto, esto puede ser un efecto residual del IBN observado en los resultados anteriores.

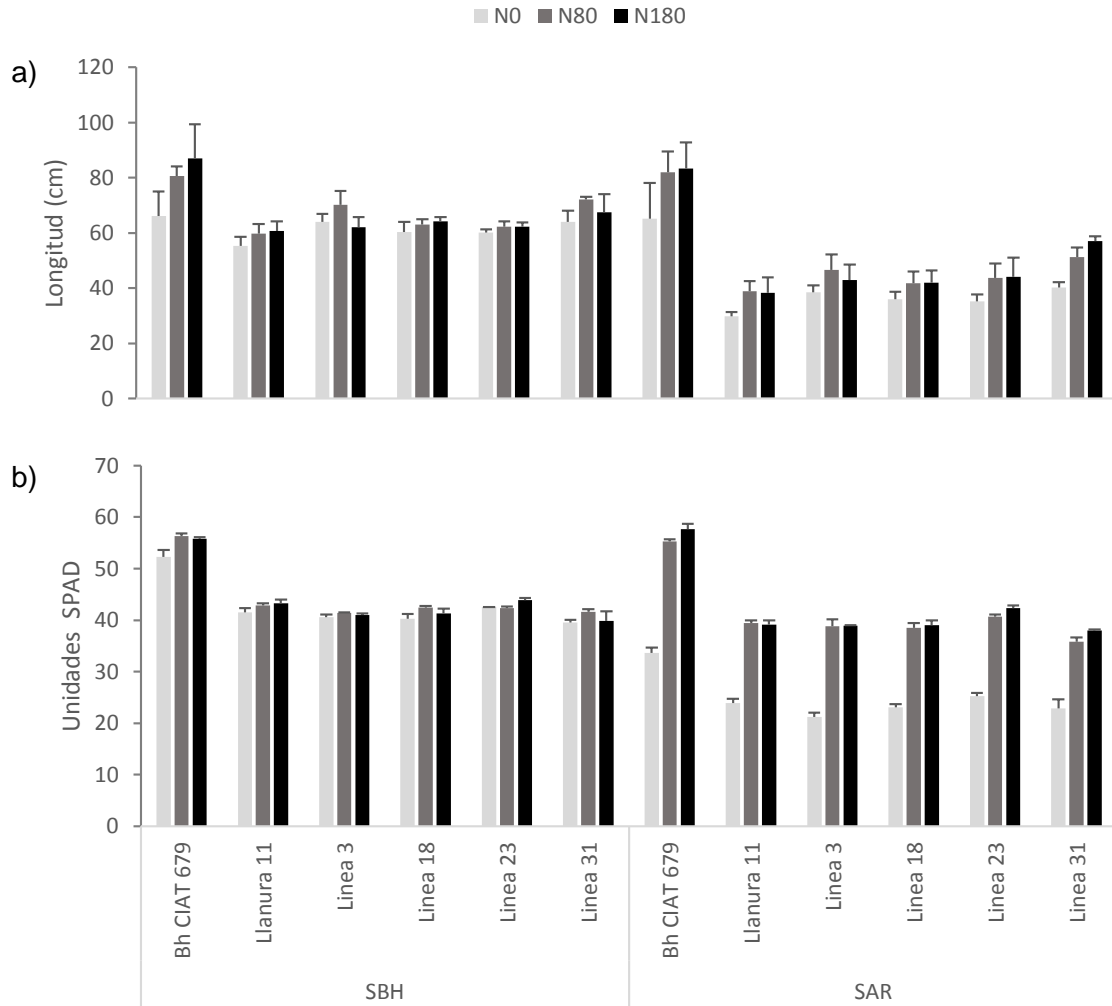


Figura 8. Evaluación de a) Longitud de la planta y b) Valores SPAD a los 40 días después de siembra (dds) en el sistema de rotación Bh-arroz bajo tres dosis de N. Barras representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$) para los valores de longitud y SPAD de plantas sembradas suelo de Bh (SBH) y sin nitrógeno (N0).

Para confirmar si el efecto residual del IBN se mantuvo a través de todo el experimento, se evaluaron las tasas de nitrificación de todos los tratamientos (suelo sin plantas, Bh 679 y líneas de arroz seco) al momento de la cosecha de grano en el sistema que simula una rotación Bh-arroz (Figura 9).

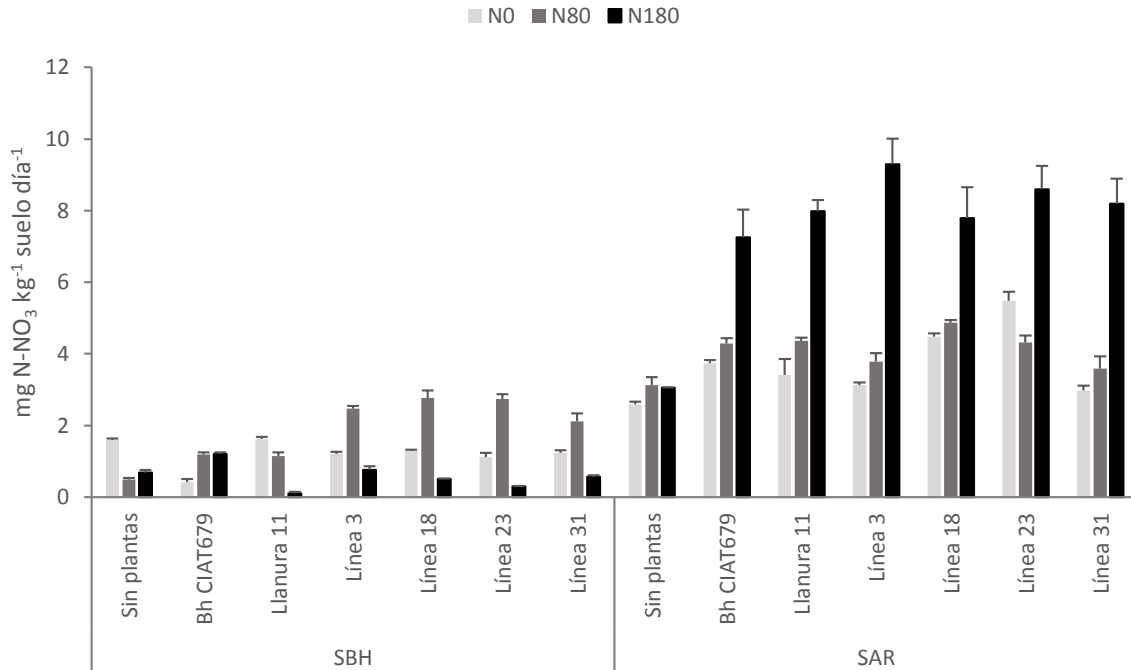


Figura 9. Tasas de nitrificación de las muestras de suelo colectadas al momento de la cosecha de cada tratamiento evaluado (suelo sin plantas, Bh679 y líneas de arroz seco) con tres dosis de N (0, 80 y 180 kg/ha) en el sistema que simula una rotación Bh - arroz. Barras representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$).

Se observa que las tasas de nitrificación son menores para el suelo SBH, manteniéndose el efecto residual de IBN que se observó desde la línea base, incluso en las dosis altas de N. Sin embargo, se puede observar en el suelo SAR que en el control IBN positivo Bh 679, en 3 meses no ha sido tiempo suficiente para acumular en el suelo compuestos IBN, mostrando tasas de nitrificación incluso más altas a la nitrificación basal, lo cual es consecuente con lo observado por Nuñez (2015) quien menciona sobre las tasas de producción de NO₃⁻ a partir de muestras de suelo de un ensayo en materas donde crecieron plantas de una población biparental de Bh, en una escala temporal de 3, 6 y 12 meses, que fue hasta después de 1 año donde las tasas mostraron la acumulación de moléculas IBN en la rizósfera.

Como se ha visto en los resultados de este estudio, desde la línea base, en cuanto a las tasas de nitrificación y cuantificación de gen amoA, las medidas de estas variables se elevan con mayores aplicaciones de N en el suelo de arroz (SAR). En este suelo SAR, el control suelo sin plantas no presenta una respuesta de la actividad nitrificante respecto a la cantidad de N aplicada.

En este sentido, el resultado es inverso al obtenido por Subbarao et al. (2009) donde se encontró la mayor actividad nitrificante para el suelo desnudo en un estudio de campo. Otros autores, como Pariasca et al. (2010) reportan que el suelo desnudo sin plantas no es un buen control respecto a la evaluación de la influencia de exudados de las plantas sobre tasas de nitrificación. Por lo tanto, es evidente que el suelo desnudo presenta dinámicas diferentes a los suelos donde se han establecido plantas, debido a que estas tienen una influencia importante sobre los procesos de transformación que ocurren en el suelo (efecto rizosférico).

Respecto al efecto residual de IBN que se traduce en menores tasas de nitrificación en SBH, permite conservar el N mineral en forma de NH_4^+ por mayor tiempo en el suelo SBH. Lo cual muestra un posible efecto positivo sobre los componentes de rendimiento de las líneas de arroz seco evaluadas en el sistema que simula una rotación Bh - arroz (figura 10). Se observa que las líneas de arroz seco evaluadas presentaron mejor respuesta en el suelo SBH, respecto al suelo SAR, en los componentes principales de rendimiento - número de panículas por m^2 y rendimiento de grano expresado como g/matera (Shiroshita et al. 1962 y Fageria, 2000).

De esta manera, teniendo en cuenta que los mayores rendimientos de grano de arroz fueron observados en SBH y que la semilla o grano es el órgano vertedero de los productos de la fotosíntesis (carbohidratos) en gramíneas como el arroz, estos resultados se podrían relacionar con la literatura que señala más altos contenidos de azúcares y de almidones cuando la fuente de N es NH_4^+ (Andrews et al., 2013).

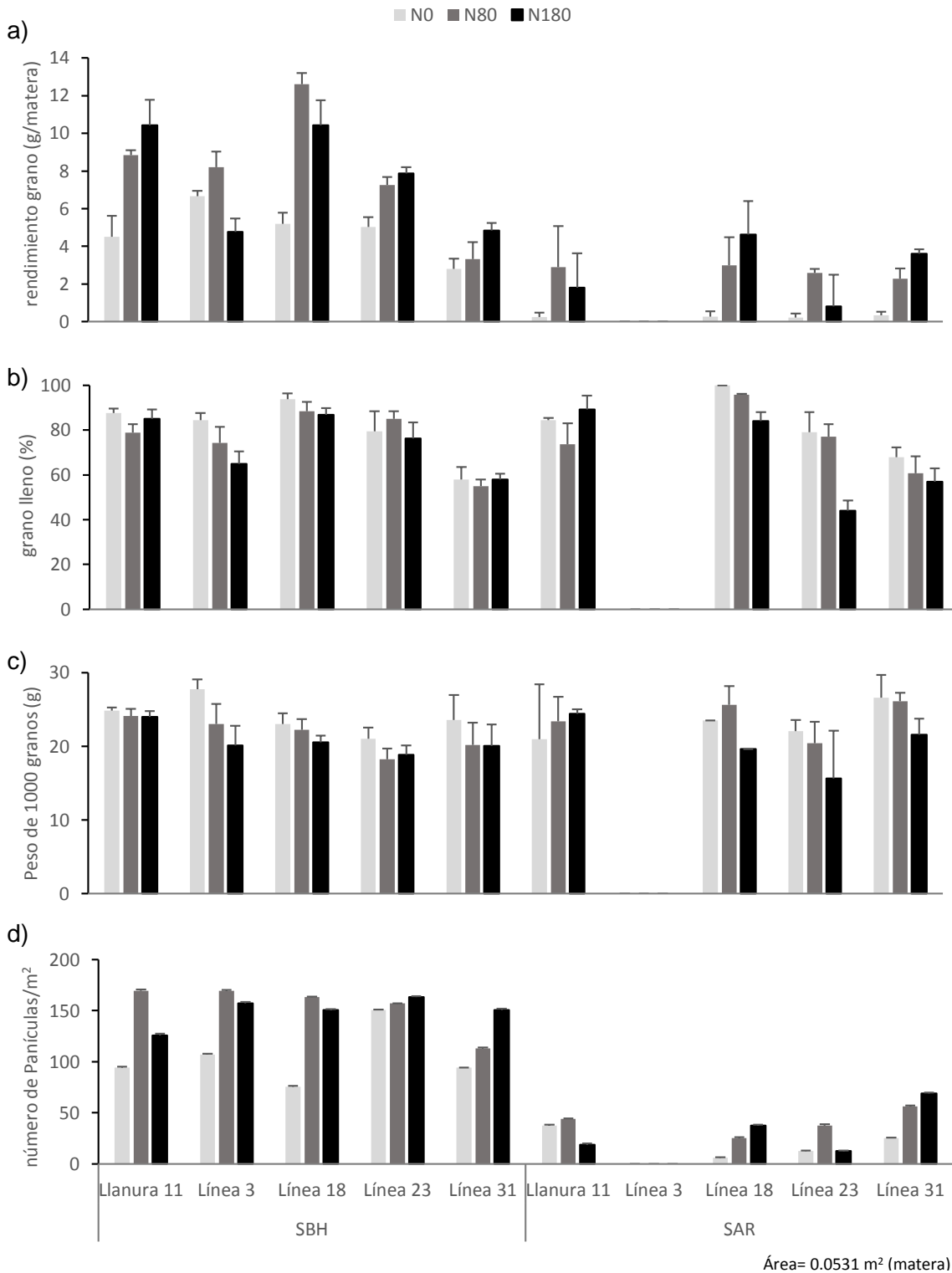


Figura 10. Componentes de rendimiento: a) peso de grano por materia, b) %grano lleno, c) peso de 1000 granos y d) número de panículas por m², de las líneas de arroz secano (3, 18, 23 y 31) y el cultivar comercial Llanura 11, para evaluar el beneficio de la simulación de rotación Bh-arroz utilizando suelos cultivado con Bh (SBH) y arroz (SAR). Barras representan medias + error estándar (n=3). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$ y $P \leq 0.01$).

En el suelo SAR se evidenció que a 0 kg/ha de N (N0) o N nativo, el desarrollo de panículas y por lo tanto de grano, fue significativamente menor respecto al rendimiento encontrado en suelo SBH bajo esta misma dosis de N.

También se encontró que la línea 3 en suelo SAR, no presentó producción de grano en ninguna de las dosis de N. En las unidades experimentales de 80 y 180 kg/ha de N, las plantas de la línea 3 se vieron afectadas con entorchamiento o necrosis rayada, una enfermedad causada por el virus de la necrosis rayada del arroz (VNRA), mediante el vector *Polymyxa graminis*, un patógeno de suelo cuyas esporas resisten en el suelo durante largo tiempo. Esta enfermedad se presenta en los llanos de Colombia desde el año 1991 (Bastidas y Montealegre, 1994).

Dado que el suelo SAR fue traído de los llanos, en el ensayo de invernadero, la enfermedad de entorchamiento se presentó en una o dos plantas por materia de las líneas 23 y 31 de cada una de las 3 repeticiones y en dos repeticiones de Llanura 11, cuando se aplicó 180 kg/ha de N. Este evento patológico no se pudo prevenir con un autoclavado inicial de suelo, puesto que se necesitaba evaluar la actividad de nitrificantes residentes en los suelos evaluados, y sin aplicación de controladores químicos para evitar interferencia en las dosis de N, con adición del N contenido en los productos para control de enfermedades como fungicidas, pesticidas, de estos últimos Yan et al. (2014) encontraron que estos incrementan el contenido de NH_4^+ , disminuye la nitrificación y pueden estimular la desnitrificación.

Puesto que se encontró mayor daño en la dosis N180, se procesaron muestras de suelo donde crecieron las plantas de las líneas que fueron más susceptibles a esta enfermedad, cuantificando nematodos fitoparásitos (anexo 1), de manera que se pudiera establecer alguna relación con la concentración de NH_4^+ y de NO_3^- en el suelo. Los nematodos son uno de los grupos más abundantes y diversos de los organismos del suelo, y se han propuesto como indicadores útiles en el suelo para los cambios en el funcionamiento de los ecosistemas bajo enriquecimiento de N (Wei et al., 2012). Estos autores encontraron una relación negativa entre NH_4^+ y nematodos. Por el contrario, Pan et al., 2015 en sus resultados sobre la influencia de fertilizantes de NH_4^+ y de NO_3^- en la respuesta de los nematodos del suelo en un cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.), indicaron que el número de nematodos disminuyó en los suelos tratados con NO_3^- en comparación con los tratados con NH_4^+ .

Los resultados obtenidos muestran que la simulación de rotación Bh-arroz puede llegar a favorecer la productividad de arroz, por efecto residual del IBN de Bh según las variables respuesta de rendimiento mostradas en la figura 10, y las tasas de nitrificación (Figura 9) y abre la posibilidad de realizar evaluaciones de campo para corroborar estos resultados, en aras de aprovechar los recursos y alternativas para el aumento del rendimiento y reducción de la huella ambiental del cultivo de arroz.

3. Capítulo 3. Potencial de Inhibición Biológica de la Nitrificación (IBN) en Arroz

La nitrificación es un proceso de oxidación de NH_4^+ a NO_3^- mediado por microorganismos, y uno de los procesos (junto con la desnitrificación) por los cuales se pierde gran parte del fertilizante nitrogenado aplicado en un sistema agrícola, lo que ha llevado a suministrar altas dosis de nitrógeno (N), y en consecuencia se da lugar a continuos ciclos de nitrificación en el suelo, incrementando el costo económico e impacto ambiental (Subbarao et al., 2012; Subbarao et al., 2013). Este impacto ambiental se traduce en contaminación de fuentes de agua por lixiviación de NO_3^- y emisiones de óxido nitroso (N_2O) (Vitousek et al., 1997a; Dinnes et al., 2002; Leininger, et al., 2006; Canfield et al., 2010).

En este sentido, para suprimir la actividad de las bacterias nitrificantes del suelo se han desarrollado inhibidores químicos sintéticos tales como nitrapirina, diciandiamida (DCD) y 3,4 dimetil pirazol fosfato (DMPP). Sin embargo, no son ampliamente utilizados en la producción agrícola debido al costo adicional, diferencias en la movilidad, por la falta de disponibilidad y pueden afectar microorganismos benéficos que promueven el crecimiento vegetal y baja efectividad en regiones con alta pluviosidad (Weiske et al., 2001; Zerulla et al., 2001; Subbarao et al., 2006, 2012; Upadhyay et al., 2011).

La inhibición biológica de la nitrificación (IBN) es una característica de las plantas en la que se liberan compuestos por las raíces, que inhiben las rutas bioquímicas de la nitrificación en la rizosfera y le confiere a las plantas competitividad en el uso eficiente del N (NUE), como se ha reportado en *Brachiaria humidicola* (Bh) (Subbarao et al., 2009), sorgo (*Sorghum bicolor*) (Gopalakrishnan et al., 2007), arroz (*Oryza sp.*) (Pariasca et al., 2010) y trigo (*Leymus racemosus* y *Triticum aestivum*) (Subbarao et al., 2007a, 2009, 2012; Gopalakrishnan et al., 2007; Zakir et al., 2008; O'Sullivan et al., 2016; Moore y Waid, 1971). Lo que abre las posibilidades para el uso de IBN como una alternativa de bajo costo en el control de la nitrificación, permitiendo la conservación de N mineral en el suelo (NH_4^+), y así aumentar la productividad y la fertilidad de los ecosistemas pobres de N y/o en suelos bien drenados.

De esta manera, dada la importancia del arroz como alimento básico, y la alta aplicación de fertilizantes nitrogenados para obtener altos rendimientos en este cultivo; evaluar la capacidad de IBN contenida en diferentes genotipos de arroz, les agregaría valor a los cultivares al proporcionar una alternativa biológica para afrontar el reto de incrementar la productividad con un menor impacto ambiental, y por ende contribuir a la ecoeficiencia en los Llanos de Colombia, donde el gobierno colombiano está promoviendo el desarrollo agrícola en la región para transformarla en la "despensa" de Colombia (Convenio Altillanura).

En este estudio se evaluó el potencial IBN en diferentes genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) en suelo del Piedemonte de los Llanos de Colombia (Oxisol), usando metodologías desarrolladas para la determinación de la función IBN en Bh y sorgo, como son el ensayo de bioluminiscencia (bioensayo) con la cepa recombinante *Nitrosomonas europaea*, y la incubación de suelo rizosférico para la determinación de tasas de nitrificación. Se encontró diferencias significativas entre genotipos en el IBN potencial de exudados de la raíz en términos de ATU g⁻¹ de peso seco de raíz y en las tasas de nitrificación expresadas como mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ de suelo día⁻¹. Por lo tanto, explorar la función de IBN en arroz, podría configurar una estrategia para evitar la pérdida de N en los sistemas agrícolas, al disminuir el accionar de los nitrificantes del suelo.

3.1 Materiales y métodos

Los experimentos fueron llevados a cabo en invernaderos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado a 30°30'17.47" N y 76°21' 24.31" O, en el Km 17 Recta Cali-Palmira (Valle del Cauca, Colombia).

3.1.1 Evaluación del potencial de IBN en genotipos de arroz

Experimento 1

Se realizó una evaluación para la característica IBN a 24 genotipos de arroz, que representa cultivares comerciales, variedades locales y líneas élite de programas de mejoramiento de arroz (Tabla 4). Varios de estos genotipos fueron evaluados en potencial IBN por Pariasca et al., 2010 y Moreta, 2010b; y como controles se utilizó *B. humidicola* CIAT 679 (Bh 679) - IBN positivo (Gopalakrishnan et al., 2009; Subbarao et al., 2009), y *Stylosanthes fruticosa* CIAT 12278 - IBN negativo según altas tasas de nitrificación (Nuñez, 2015).

Tabla 4. Genotipos de arroz utilizados para la evaluación de IBN.

Genotipo	(Accesión_ID)	Origen	Subespecie	Ecosistema
Lemont	(BCF 597)	Estados Unidos	<i>Japónica templada</i>	Riego (Fukai en IRRI, 1998)
IR64	(BCF 937)	Filipinas	<i>Indica</i>	Riego (Pariasca et al., 2010; Ogawa et al., 2014)
Nipponbare	(9008272/2013)	Japón	<i>Japónica</i>	Riego (Pariasca et al., 2010)
IR74	(BCF 940)	Filipinas	<i>Indica</i>	Riego (FAO; Sato et al., 1994)
CT21375-F4-43-1	(BCF 2571)	Colombia	<i>Indica</i>	Riego (Ogawa et al., 2014)
CT23057H	(CT23057H)	Colombia	<i>Indica</i>	Riego (CIAT- FLAR)
APO	(IR 55423-01 ó PSBRc9 ó IRTP 19122)	Filipinas	<i>Indica tropical</i>	Secano (George et al., 2002)
Azucena	(BCF 11)	Filipinas	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Pariasca et al., 2010)
Nerica3	(E2/N5)	África	<i>Japónica</i>	Secano (Pariasca et al., 2010)
Dular	(BCF 110)	India	<i>Indica/aus</i>	Secano (IRRI, 1994; Pariasca et al., 2010)
Oryzica llanos 5	(BCF 801)	Colombia	<i>Indica</i>	Secano (Okada y Wissuwa en IRRI, 2005; Lestari et al., 2011)
Moroberekan	(BCF 363)	África occidental	<i>Japónica</i>	Secano (Pariasca et al., 2010)
IAC25	(BCF 140)	Brasil	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Pariasca et al., 2010)
Línea 32	(BCF 1382 ó TOX 718-AL-20-1CM-1JN)	África	<i>Japónica</i>	Secano (Moreta, 2010b)
IAC150	(BCF 137)	Brasil	<i>Japónica</i>	Secano (CIAT- FLAR)
IAC1246	(BCF 136)	Brasil	<i>Japónica</i>	Secano (Jamil et al., 2011)
IAC164	(BCF 138)	Brasil	<i>Japónica</i>	Secano (Brondani et al. 2006)
Llanura 11	(Cirad 409 ó CT11891-2-2-7-M)	Colombia	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Proyecto CIAT/Cirad)
Línea 3	(Línea 3 CIAT/Cirad PCT-4\SA\1\1, Bo\3\1>42-1-6-1-M)	Colombia	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Proyecto CIAT/Cirad)
Línea 18	(Línea 18 CIAT/Cirad PCT-11\0\0\2, Bo\2\1>130-M-3-1-3-3-M)	Colombia	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Proyecto CIAT/Cirad)
Línea 23	(Línea 23 CIAT/Cirad PCT-11\0\0\2, Bo\2\1>46-M-3-2-4-3-M)	Colombia	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Proyecto CIAT/Cirad)
Línea 31	(Línea 31 CIAT/Cirad PCT-11\0\0\2, Bo\2\1>133-M-5-1-4-3-M)	Colombia	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Proyecto CIAT/Cirad)
Way Rarem	(IRTP 23013-C1)	Indonesia	<i>Indica</i>	Secano (Lestari et al., 2011)
IAC47	(BCF147)	Brasil	<i>Japónica tropical</i>	Secano (Pariasca et al., 2010)

El diseño del experimento fue bloques completos al azar con tres bloques, estableciendo el material vegetal en materas (unidad experimental: 3 plantas por matera). Para este estudio se utilizó un suelo Oxisol del Piedemonte Llanero localizado en el Centro de Investigación “Santa Rosa” de Fedearroz, ubicado en la vereda Santa Rosa a 17 kilómetros de Villavicencio, Meta. El suelo fue tomado de los primeros 20 cm y sus propiedades se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características fisicoquímicas y biológicas del suelo Santa Rosa.

Parámetro*	Santa Rosa
Arena %	64.8
Limo %	13.2
Arcilla	22.1
Textura	F.Ar.A
pH	5.93
MO (g kg ⁻¹)	15.97
C orgánico total (g kg ⁻¹)	9.26
P (mg kg ⁻¹)	41.84
Ca (cmol kg ⁻¹)	2.83
Mg (cmol kg ⁻¹)	1.01
K (cmol kg ⁻¹)	0.16
Na (cmol kg ⁻¹)	0.05
CIC (cmol kg ⁻¹)	4.35
S (mg kg ⁻¹)	27.32
B (mg kg ⁻¹)	0.19
Cu (mg kg ⁻¹)	2.25
Zn (mg kg ⁻¹)	4.51
Mn (mg kg ⁻¹)	21.4
Fe (mg kg ⁻¹)	116.34
N- NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	6.26
N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	17.26
Tasa de nitrificación (mg N-NO ₃ ⁻ kg ⁻¹ día ⁻¹)	1.64
AOA (Copias gen amoA g ⁻¹)	2.46 x 10 ⁶
AOB (Copias gen amoA g ⁻¹)	1.08 x 10 ⁵

*Textura (método del hidrómetro - Bouyoucos) pH (Agua 1:1); Materia Orgánica (Walkley-Black Espectrometría); Carbono orgánico total (1,724 = Factor de Van Bemmelen para convertir el C orgánico en MO); P (Bray II Espectrofotometría), Ca, Mg, K, Na Intercambiable (Absorción Atómica); Capacidad de intercambio catiónico - CIC (Amonio Acetato Volumetría); Al Cambiable (KCl 1M volumetría); S extractable (Ca₃(PO₄)₂ Turbidimetría); B en Agua Caliente (Espectrofotometría Azometina); Cu, Zn, Mn, Fe Extractable (Doble Ácido Absorción Atómica); N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻ (Espectrofotometría); Tasa de nitrificación (Incubación de suelo); Cuantificación gen amoA de AOA y AOB (qPCR).

Antes de la siembra del material vegetal, a 400 kg de este suelo Santa Rosa se aplicó 500 kg/ha de cal dolomítica, para adición de Ca y Mg. Pasados 20 días se procedió a la aplicación pre-siembra del equivalente a 1 ha: 100 kg P₂O₅ (DAP), 75 kg (KCl), 20 kg (Zn), 75 kg (Kieserita). Las semillas de los genotipos de arroz se establecieron por siembra directa en materas con 4 kg de suelo previamente preparado. 20 días después de siembra (dds), se completó el restante 75 kg (KCl) y la primera aplicación fraccionada de 146 kg/ha N (urea). La aplicación de urea se fraccionó en tres aplicaciones, corrigiendo el N contribuido por DAP en la presiembra. Este plan de fertilización fue de acuerdo al manejo de materiales con fines de investigación que se lleva a cabo en Santa Rosa.

Durante el crecimiento de las plantas, el manejo del riego fue sin restricción hídrica, en un sistema de secano favorecido, y a los 60 dds, al término de la fertilización nitrogenada se realizaron mediciones de longitud de planta (hasta la última hoja desarrollada), valoración del contenido de clorofila en tres últimas hojas desarrolladas y en tres sitios de cada hoja, mediante el clorofilometro Minolta® SPAD 502.

Para la medición de las variables respuesta se cosecharon las plantas y se tomó las muestras de suelo rizosférico, durante la etapa de floración, ya que específicamente en arroz, durante la floración termina la formación y desarrollo de las raíces y aún no ha cesado la absorción de nutrientes que finaliza en la fase de maduración (Guimarães et al., 2002). La etapa de floración del arroz, es el momento donde el metabolismo es más activo en cuanto a una mayor tasa de exudación de compuestos de las raíces de las plantas (Aulakh et al., 2001a, Aulakh et al., 2001b).

Experimento 2

Con el objetivo de realizar una evaluación rápida de algunos genotipos de arroz contrastantes (Pariasca et al., 2010), se probó la metodología de raíz seminal (Obara et al., 2010 adoptada por Ogawa et al., 2014) en un diseño completamente al azar, que consistió en germinar semillas de 4 genotipos que hacen parte del conjunto de genotipos evaluados en el experimento 1 y establecer en rejillas en contacto con solución hidropónica (Subbarao et al., 2006 modificada por Ogawa et al., 2014), hasta obtener plántulas de 10 días de edad, para la colecta de exudados y posterior ensayo de bioluminiscencia (bioensayo).

Procesamiento de muestras en los Experimentos 1 y 2:

Colecta de los exudados de raíz

Se colectaron exudados de las plantas de arroz, durante 24 horas protegido de la luz, a partir de la estimulación con NH_4^+ en una solución de NH_4Cl 1mM y 0.1 mM CaCl_2 (500mL) ajustada a $\text{pH } 5.8 \pm 0.2$ y continua aireación (Subbarao et al., 2006 y Pariasca et al. 2010). Después de 24 horas, se procedió a tomar pH y conductividad eléctrica a la solución de exudados que posteriormente fue filtrada con papel Whatman N° 2 y congelada para liofilización. Una vez liofilizados los exudados fueron resuspendidos en 15 mL de metanol 100%, agitando suavemente durante 2 horas y secados en un rotoevaporador a 40°C. Se resuspendieron nuevamente en 2 mL de metanol 100% y se pasó por jeringa con un filtro de membrana de 0,22 micras. El filtrado se evaporó completamente en un evaporador de centrifuga, y se resuspendió en 50 μL de dimetil sulfóxido (DMSO). Los controles para la solución de colecta de exudados (NH_4Cl 1mM y 0.1 mM CaCl_2) se sometieron al mismo procedimiento (modificado de Pariasca et al., 2010).

Luego de la colecta de exudados (24 horas) las raíces, tallos y hojas son secadas a 60°C durante 48 horas para la determinación de peso seco. Las unidades ATU se dividen entre el peso seco de raíz de las plantas puestas a exudar.

Extracción con metanol de tejido de raíz

A partir de las muestras secas, se cortaron y molieron las raíces, de las cuales se tomó 100 mg de tejido y se resuspendieron en 2 mL de metanol 100% y se pasó por jeringa con un filtro de membrana de 0,22 micras. El filtrado se evaporó completamente en un evaporador de centrifuga, y se resuspendió en 50 μL de DMSO para estimación del potencial IBN según ensayo de biolumiscencia (bioensayo).

Estimación de IBN potencial basado en el bioensayo

Para cuantificar el efecto de los compuestos IBN sobre una cepa recombinante de *Nitrosomonas europaea* transformada con el gen luciferasa *luxAB* y gen de resistencia al antibiótico kanamicina *Kan* (Iizumi et al., 1998), se siguió la metodología propuesta por Subbarao et al., 2006. La cepa recombinante que produce bioluminiscencia *Nitrosomonas europaea* se cultivó en un medio mineral (medio P) con la siguiente composición (g L^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, KH_2PO_4 0.7, Na_2HPO_4 13.5, NaHCO_3 0.5 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, y (en mg L^{-1}) CaCl_2

H₂O 0.005, Fe-EDTA 0.001 y 0.025 kanamicina, durante 7 días a 28° C y 50 rpm en condiciones de oscuridad. Una vez crecida la bacteria se centrifuga, y el pellet se resuspendió en 50 mL de medio P. Para el bioensayo, se mezclan en tubos eppendorf de 1,5 ml: 250 µl de bacteria, 2 µl de muestra (exudados resuspendidos en DMSO) o de control (solución de exudación resuspendida en DMSO), 198 µl de agua destilada, y se incubó a 15°C a 900 rpm durante 15 min. Alícuotas de 100 µl de la mezcla se añadió a tubos para determinar los valores de luminiscencia RLU (unidades de luz relativa) que fueron cuantificados a través de un luminómetro glomax 20/20 (promega), usando tres réplicas por genotipo. El porcentaje de inhibición fue calculado restando a 1, la fracción del valor de RLU de la muestra y de RLU Control de las mezclas como se mencionó anteriormente, por 100.

La transformación a unidades alitiourea (ATU) el inhibidor sintético de la nitrificación que a una concentración de 0.22 µM, provoca una inhibición de 80% de acuerdo a Subbarao et al., 2007a).

3.1.2 Determinación de tasas de nitrificación

De cada genotipo de arroz en la etapa de floración, se colectó suelo rizosférico a partir del cual se tomó 5 g de suelo por triplicado para ser incubados durante 27 días a 25°C en frascos de vidrio, adicionando sulfato de amonio 27 mM manteniendo capacidad de campo cercana al 60%. Durante diferentes tiempos de incubación hasta 27 días, se realizó la extracción con KCl 1M en relación 1:10 m/v suelo: solución KCl, para la medición de NH₄⁺ y NO₃⁻ siguiendo el protocolo descrito por Subbarao et al., 2006. Finalmente, se determinaron las tasas de nitrificación expresada como la pendiente de la recta.

3.1.3 Cuantificación de AOA y AOB (*gen amoA*)

Para el análisis de AOA y AOB en el suelo, se realizó extracción de ADN a partir de muestras de suelo, usando el kit FastDNA® SPIN Kit For Soil (MP Biomedicals) con modificaciones que incluyen el uso de tiocianato de guanidina para remover ácidos húmicos que son inhibidores de PCR. El ADN extraído se cuantificó con el método de fluorescencia usando picogreen y el equipo GENios (TECAN). La cuantificación de los genes de las AOA y AOB se hizo a través de qPCR, usando termociclador Realplex (eppendorf), y las combinaciones de primers amoA19F/amoA643R para AOA (Leininger et al., 2006), amoA-1F/amoA-2R para AOB (Rotthauwe et al., 1997). Las reacciones de qPCR se corrieron por triplicado en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 ng de ADN de suelo, 1 µM de cada primer y 10 µl del Brilliant

SYBR Green qPCR Master Mix. El control negativo o “*No Template Control*” (NTC) consistió de agua en vez de ADN. Las condiciones de amplificación de los genes de interés fueron las siguientes: 1) 95°C – 5 min; 2) 95°C – 1.5 min; 3) 55°C – 1.5 min; 4) 72°C 1.5min; 5) Lectura de la placa; 8) Ir al paso 2 por 40 veces más; 9) Curva de “*melting*” desde 65°C hasta 95°C, leer cada 0.2°C, mantener 1 seg; Fin.

3.1.4 Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias para identificar diferencias significativas entre tratamientos, y un análisis de regresión lineal para las variables respuesta determinadas, empleando el paquete estadístico SAS 9.4. También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el software estadístico R versión 3.2.2 para Windows.

3.2 Resultados y Discusión

3.2.1 Evaluación del potencial de IBN en genotipos de arroz

La metodología del bioensayo ha permitido analizar la IBN en cultivos importantes, facilitando la identificación de genotipos de Bh, sorgo, arroz y trigo con una relevante actividad IBN. Por otro lado, ha sido útil para identificar los factores que desencadenan la exudación de compuestos IBN en los cultivos mencionados, tales como el NH_4^+ y un pH bajo en la rizosfera (Subbarao et al., 2007a; Subbarao et al., 2013, Pariasca et al., 2010).

El bioensayo expresa el potencial de una raíz para exudar compuestos con una posible capacidad inhibitoria, que puede variar entre genotipos. De esta manera, en los resultados obtenidos en cuanto al potencial IBN exudado de los 24 genotipos de arroz, se aprecia variabilidad dentro del mismo tipo de ecosistema (riego o seco) (Figura 11), sin mostrar una clara tendencia entre los dos ecosistemas.

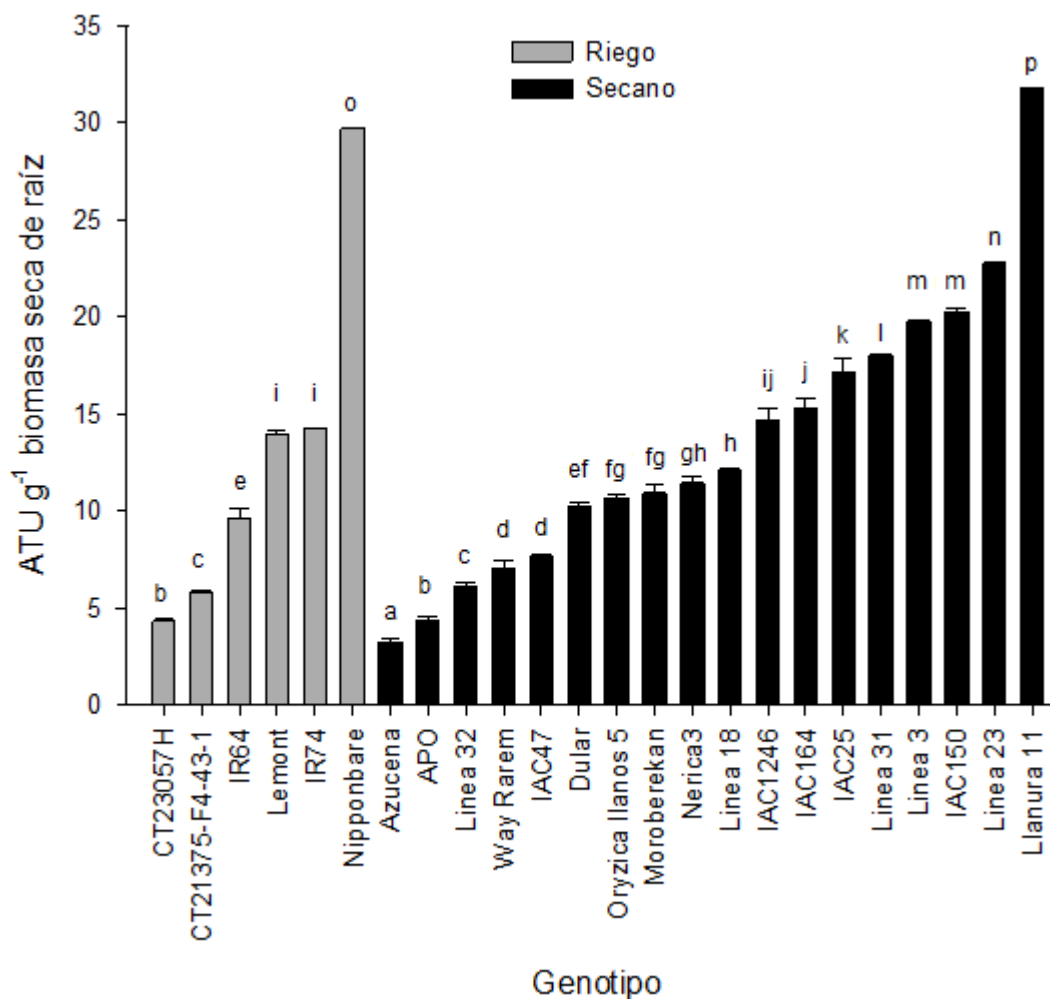


Figura 11. Potencial IBN de Exudados de raíz de diferentes genotipos de arroz de riego y de secano, expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz, mediante bioensayo. Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con la misma letra indica que no hay diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$).

Los genotipos que presentaron mayor potencial IBN a partir de exudados radicales son los cultivares Llanura 11 (secano) y Nipponbare (riego), y de menor potencial IBN fueron Azucena (secano) y CT23057H (riego). Esto sugiere que posiblemente la exudación de moléculas IBN no es un mecanismo adaptativo en respuesta a la competencia por el N disponible en la solución del suelo. Al respecto, la historia evolutiva de la adaptación de genotipos de arroz, podría sugerir una tendencia en menor actividad IBN para genotipos de riego. En suelos inundados la forma dominante de N es NH_4^+ y predominan las condiciones anaeróbicas (Kennedy, 1992; Sasakawa y Yacamoto, 1978; Arregocés, 1985) y bajo esta condición anaeróbica, la nitrificación autotrófica se ve reducida. Sin embargo, el suministro de oxígeno

transportado de la atmósfera hasta las raíces a través del aerénquima del arroz (Armstrong, 1971) y algunas de las fugas de oxígeno desde las raíces del arroz en el suelo apoya la formación de NO_3^- por nitrificación (Frenzel et al., 1992; Gilbert y Frenzel, 1995; Raimbault et al., 1977; Savant y De Datta, 1982).

Pariasca et al., 2010 muestra una evaluación de la actividad IBN de diferentes genotipos de arroz y muestran diferencias en plantas de arroz de 60 días crecidas en cultivo hidropónico, y encontró como el de mayor potencial IBN el genotipo IAC25, de bajo potencial a Nipponbare y potencial medio a Dular, este último y el genotipo IAC25 coincide en la catalogación del potencial, medio y alto, respectivamente. Sin embargo, los autores expresan sus resultados en términos de porcentaje de inhibición de la nitrificación (%IN) a través de bioensayo, y es necesario realizar la determinación de IBN específico (cálculo de ATU teniendo en cuenta el %IN y el peso seco de la raíz) expresado en ATU g^{-1} de peso seco de raíz; ya que el %IN se ve afectado por la biomasa, puede haber inhibiciones muy altas pero poca cantidad de raíz, o viceversa.

El IBN específico-exudado según bioensayo para el exudado IAC25 en suelo de "Santa Rosa", durante la etapa de floración, fue de 17 ATU g^{-1} peso seco de raíz, dentro del rango reportado por Pariasca et al., 2010, que encontró en cultivo hidropónico que el genotipo IAC25, en IBN específico - exudado, va desde 13 hasta 65 ATU g^{-1} peso seco de raíz. Teniendo en cuentas los resultados de ambas investigaciones, este genotipo presenta un alto potencial IBN.

Para la línea 32, la actividad IBN en exudado fue de 6.16 ATU g^{-1} peso seco de raíz, resultado similar al encontrado en este genotipo por Moreta (2010b) (4 ATU g^{-1} peso seco de raíz actividad IBN en exudados - compuestos solubles en agua).

Diferentes reportes han mostrado que el extracto de tejido de raíz es también un indicador de la actividad IBN. En Bh y sorgo (Gopalakrishnan et al., 2007 Subbarao et al., 2013) se estudiaron extractos de tejido de raíz como una variable indicadora de lo que se sintetiza en la raíz, tiene potencial de ser exudado.

En la figura 12, se muestran los resultados de IBN en tejido de raíz obtenidos mediante bioensayo (expresado en términos de ATU/g). En los resultados obtenidos en este estudio, se evidencia una actividad IBN más alta en tejido de raíz que en exudado similar a lo reportado

en otros estudios, siendo más alta la cuantificación en tejido que en exudado (Nuñez, 2014; O’Sullivan et al., 2016).

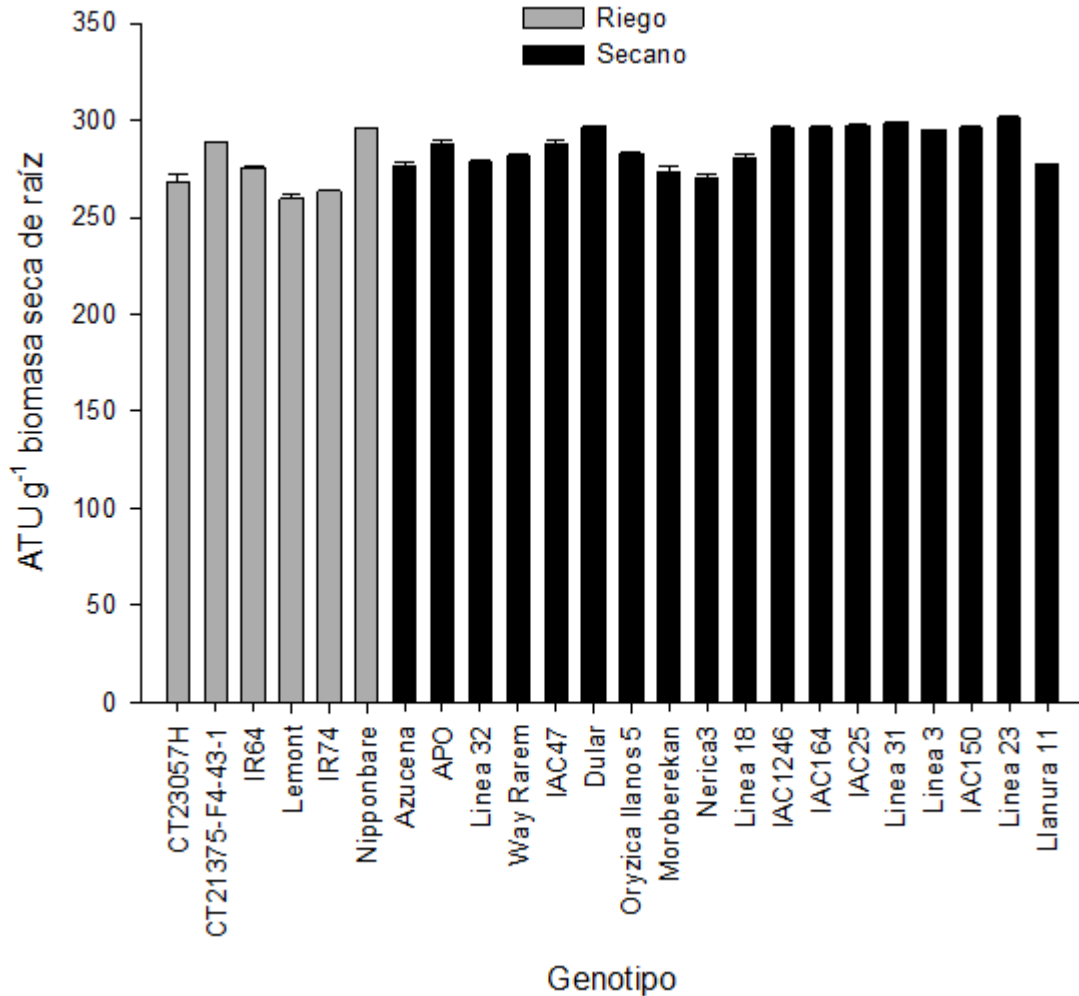


Figura 12. Potencial IBN (expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz) en tejido de las raíces de genotipos de arroz de riego y de secano. Barras representan medias + error estándar (n=3). No hay diferencias significativas.

Por otra parte, relacionar el potencial obtenido de raíz y de exudación, permite evaluar si la actividad IBN presente en la raíz se exuda en igual medida. En este sentido, del análisis de regresión lineal del IBN medido a través de bioensayo, entre exudado y tejido de raíz ($r^2 = 0,35$) (Figura 13), se evidencia una relación moderada, lo que reforzaría la idea anterior de que en tasas de nitrificación no logró verse una disminución sustancial de NO_3^- en el tiempo, debido a una posible diferencia en estabilidad de exudados en el suelo, a través del tiempo.

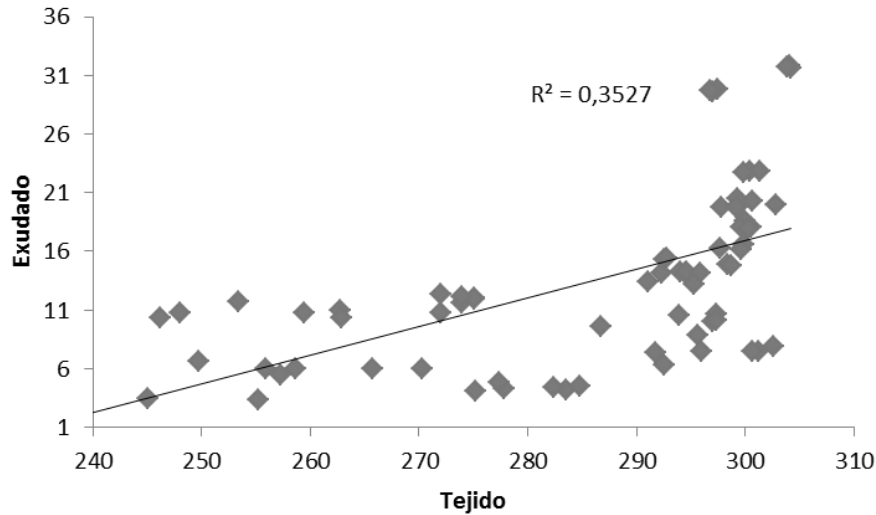


Figura 13. Análisis de regresión lineal del potencial IBN de tejido y exudado de raíz, medido a través de bioensayo (expresados como ATU g⁻¹ de biomasa seca de raíz) de los genotipos de arroz evaluados.

3.2.2 Relación entre tasas de nitrificación y Potencial IBN exudado en genotipos de arroz

Por otra parte, la incubación de suelo rizosférico ha permitido relacionar los compuestos IBN exudados con tasas de nitrificación para Bh y sorgo (Subbarao et al., 2009; Arango et al., 2014; Nuñez, 2014; Subbarao et al., 2012). Al relacionar estas variables respuesta (Figura 12) se puede evidenciar en los genotipos de mayor potencial IBN, menores tasas de nitrificación (por ejemplo, genotipos como Llanura 11, Nipponbare) y de la misma forma genotipos de menor potencial IBN presentan mayores tasas de inhibición (por ejemplo, los genotipos Azucena, APO, CT23057H). Sin embargo, se presentan genotipos donde no se presenta esta relación inversa, donde tasas de nitrificación altas también presentan potencial IBN altos o medios (como en los genotipos Línea 31, Línea 23, IR74). Por ende, los compuestos que están haciendo efecto en el bioensayo pueden ser menos estables en la rizosfera, por lo cual no se ve el efecto a lo largo del tiempo de incubación.

Para determinar si una planta presenta IBN, se tienen en cuenta las variables respuesta de tasas de nitrificación y potencial IBN exudados de raíz (Subbarao et al., 2009; Subbarao et al., 2012). Luego se compararon dichas variables en un análisis de regresión lineal, separando los genotipos por tipo de ecosistema riego y seco.

En los de genotipos de arroz de riego se observa una alta relación entre las variables respuesta ($r^2=0,517$) contrario a los genotipos de arroz seco que no presentaron correlación entre tasas de nitrificación y exudados (Figura 14).

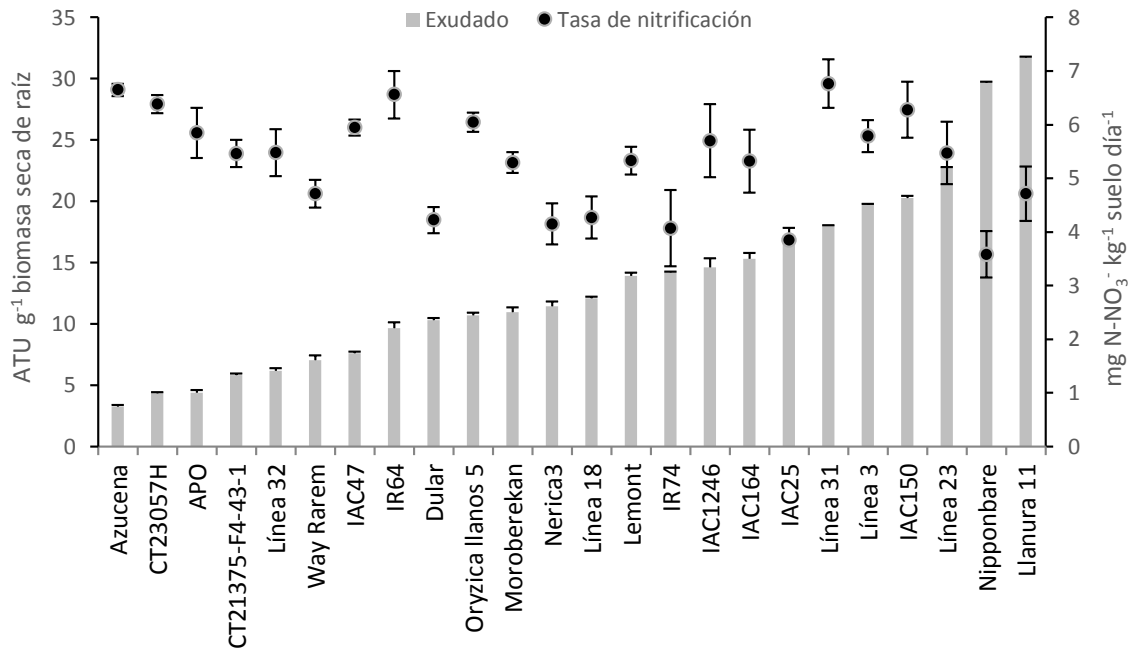


Figura 14. Relación de las variables tasas de nitrificación ($\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$) y Potencial IBN expresado como ATU g^{-1} de biomasa seca de raíz, en los genotipos de arroz evaluados en suelo Santa Rosa, en la etapa de floración. Barras y valores representan medias + error estándar ($n=3$). Diferencias significativas ($P \leq 0.001$).

La variación en el potencial IBN exudado, en los genotipos de arroz seco, respecto a las tasas de nitrificación en el suelo, vislumbraría un efecto del tiempo sobre la estabilidad de los compuestos IBN. Puede ser que diferencias en la composición de los exudados donde uno se degraden más rápido que otro, o en las tasas de exudación a través del ciclo de vida (estado fenológico), siendo la etapa de floración el momento más activo del metabolismo en cuanto a una mayor tasa de exudación (Aulakh et al., 2001a, Aulakh et al., 2001b).

En este sentido, la liberación de exudados de la raíz en el suelo, puede ser de particular importancia durante el crecimiento de las plantas, pues varios son los estudios sobre la colecta y caracterización de exudados de las raíces de plantas, llevados a cabo mediante varios métodos de cultivo de plantas (soluciones hidropónicas y en suelo) (Vaughan, Cheshire y Ord

1994; Jones y Darrah, 1993; Hodge, Grayston y Ord 1996). Muy pocos informes han estudiado exudados de raíces de las plantas de arroz que se cultivan bajo condiciones de inundación (Wassmann y Aulakh, 2000).

Entre los factores que afectan la tasa de exudación de la raíz se incluyen además de la precisión en la colección de exudados, a la fotosíntesis, temperatura, régimen de luz, disponibilidad de nutrientes y especies vegetales (Van Veen et al., 1991; Vancura y Hanzliko, 1972).

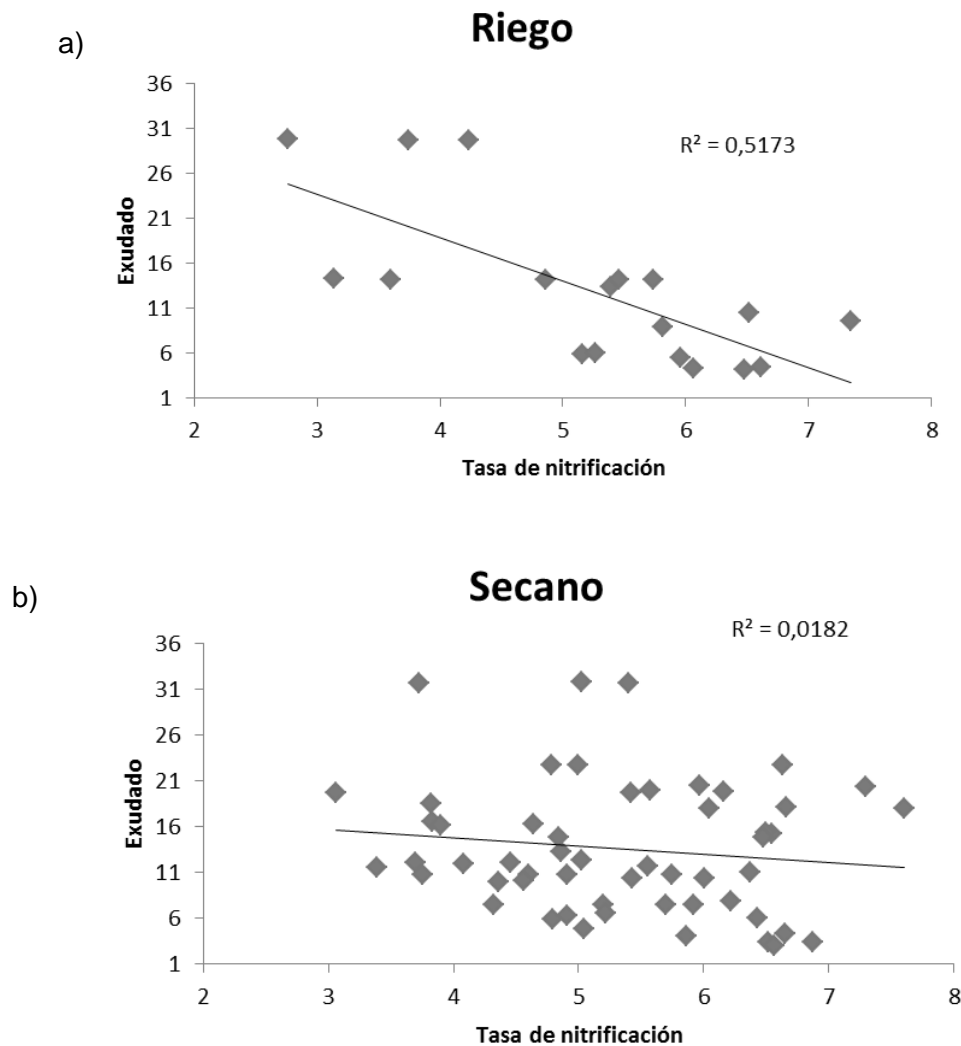


Figura 15. Análisis de regresión lineal entre el potencial IBN medido en los exudados (expresados como ATU g^{-1} de biomasa seca de raíz) y tasas de nitrificación de los genotipos de arroz de riego (a) y de secano (b).

En cuanto a los controles de IBN, control positivo Bh 679 y control negativo *Stylosanthes fruticosa* CIAT 12278, no se observó la tendencia por la cual se seleccionaron estos controles (datos no mostrados). El potencial IBN en exudado y tejido de raíz de Bh 679 fue menor al encontrado en los genotipos de arroz y *Stylosanthes fruticosa* CIAT 12278; y las tasas de nitrificación de Bh 679 fueron altas, contrario a lo observado en otros estudios (Subbarao et al., 2009; Nuñez, 2014). Al respecto, se concluye que para Bh 679, 3 meses no ha sido tiempo suficiente para acumular en el suelo compuestos IBN, mostrando tasas de nitrificación incluso más altas a la nitrificación basal, de acuerdo con lo encontrado en el sistema que simula una rotación Bh-arroz (ver capítulo 2) y con los resultados de las tasas de producción de NO_3^- de una población biparental de Bh, en una escala temporal de 3, 6 y 12 meses (este último tiempo fue el momento en que se encontraron menores tasas de nitrificación) (Nuñez, 2014).

Para determinar la relación existente entre las variables IBN - exudado y tejido de raíz (ATU/g de raíz), tasas de nitrificación en suelo - con otras variables respuesta como valores SPAD, altura (longitud) de la planta, biomasa (peso seco de plantas - raíz, hojas y tallos), N-NH_4^+ , N-NO_3^- , en las muestras de suelo, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Figura 16). Este análisis permitió revelar las variables más correlacionadas (tabla 6) con las variables IBN, y también mostró los genotipos más promisorios para la característica IBN (Figura 17).

El ACP muestra que los tres primeros componentes explicaron el 91% de la variación total observada. El primer componente -Dim 1 explica el 33,7% de la variación total, y las variables potencial IBN en tejido (ATU/g de raíz) y longitud (cm), son las que mayor peso tienen sobre este componente. Adicionalmente el ACP indica que la variable peso de raíz presentó un aporte negativo al componente, y este variable peso de raíz al igual que peso hojas_tallo, al estar separadas estas últimas variables por sí solas explican mucho de la variación total y de allí su importancia, como una razón por la cual el %IN se normaliza con el peso de raíz, dado que no existe una relación de mayor biomasa de raíz con alto IBN o viceversa. En cuanto a las variables, por cada cuadrante del gráfico se puede hacer una agrupación de variables, por ejemplo, tejido (ATU/g de raíz), Longitud (cm) se pueden agrupar y entre ellos construir una sola variable, también SPAD y exudado (ATU/g de raíz), agruparse y conformar otra variable, entre tanto N-NH_4^+ , N-NO_3^- y Tasas de nitrificación agruparse y conformar otra variable. También se observa que las variables que más aportan al componente principal 1, presentan una correlación negativa con las variables evaluadas en suelo (tasas de nitrificación, N-NH_4^+ ,

N-NO_3^- , lo cual es una evidencia del potencial IBN en un cultivo, alto IBN en exudado y tejido y menores tasas de producción de NO_3^- .

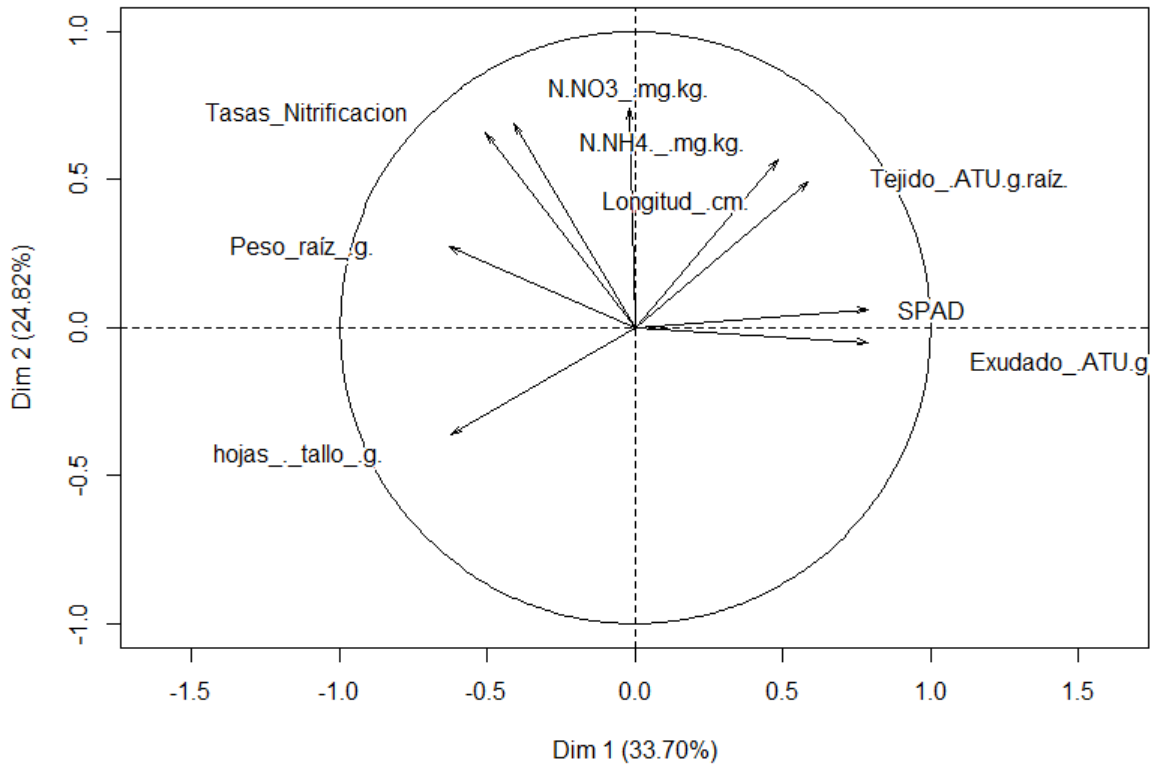


Figura 16. Análisis de componentes principales (ACP) de las variables respuesta potencial IBN en exudados y tejido de raíz (ATU/g raíz), tasas de nitrificación, valores SPAD, altura de la planta (Longitud cm), biomasa (peso seco de plantas – raíz, hojas y tallos), N-NH_4^+ , N-NO_3^- en suelo.

Tabla 6. Matriz de correlaciones de las variables respuesta potencial IBN en exudados y tejido de raíz (ATU/g raíz), tasas de nitrificación, valores SPAD, altura de la planta (Longitud cm), biomasa (peso seco de plantas – raíz, hojas y tallos), N-NH₄⁺, N-NO₃⁻.

	Exudado_.ATU.g.raíz	Tejido_.ATU.g.raíz	Tasas_Nitrificación	SPAD	Longitud_.cm.	Peso_raíz_.g	hojas_.tallo_.g	N.NH ₄ _.mg.kg.	N.NO ₃ _.mg.kg.
Exudado_.ATU.g.raíz.	1.000	0.348	-0.386	0.514	0.265	-0.564	-0.373	-0.230	0.015
Tejido_.ATU.g.raíz.	0.348	1.000	0.006	0.311	0.532	-0.226	-0.203	0.252	0.332
Tasas_Nitrificacion	-0.386	0.006	1.000	-0.302	-0.068	0.330	-0.006	0.583	0.469
SPAD	0.514	0.311	-0.302	1.000	0.449	-0.243	-0.629	-0.195	-0.166
Longitud_.cm.	0.265	0.532	-0.068	0.449	1.000	-0.096	-0.438	-0.030	0.302
Peso_raíz_.g.	-0.564	-0.226	0.330	-0.243	-0.096	1.000	0.190	0.468	0.037
hojas_.tallo_.g.	-0.373	-0.203	-0.006	-0.629	-0.438	0.190	1.000	0.005	-0.195
N.NH ₄ _.mg.kg.	-0.230	0.252	0.583	-0.195	-0.030	0.468	0.005	1.000	0.290
N.NO ₃ _.mg.kg.	0.015	0.332	0.469	-0.166	0.302	0.037	-0.195	0.290	1.000

En la figura 17 se muestra el análisis de agrupamiento (“cluster”) se evidencian 3 grupos con alto, medio y bajo IBN. Los genotipos Llanura 11, Nipponbare, IAC25, Línea 18, Línea 3 y línea 23 (“cluster 3” que se observa en color verde) con alto potencial IBN en exudado (ATU/ g de raíz) y menores tasas de nitrificación (Figura 14).

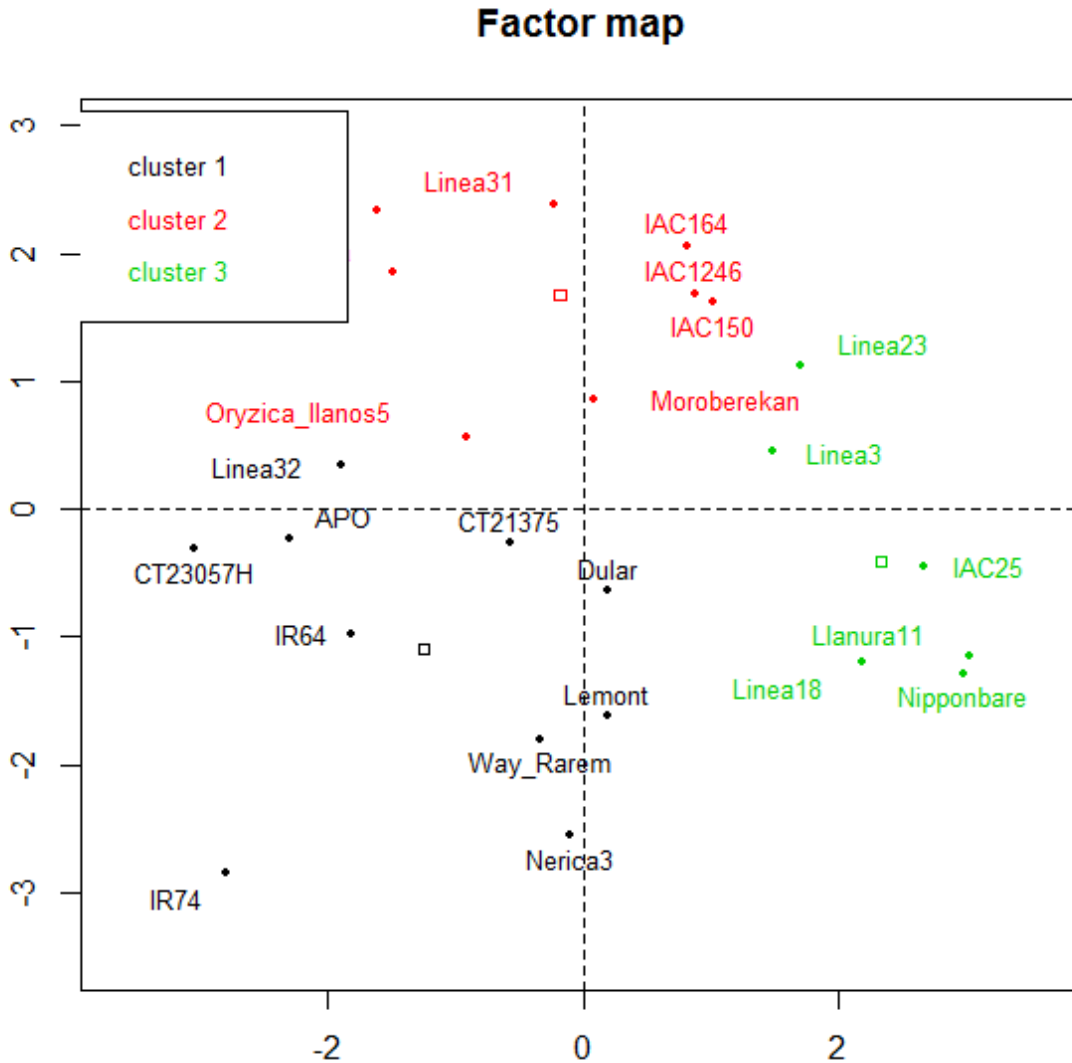


Figura 17. Análisis de clusters de las variables respuesta potencial IBN en exudados y tejido de raíz (ATU/g raíz), tasas de nitrificación, valores SPAD, altura de la planta (Longitud cm), biomasa (peso seco de plantas – raíz, hojas y tallos), conductividad eléctrica (CE) y pH en el exudado de raíz, $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, N mineral ($N-NH_4^+ + N-NO_3^-$).

Teniendo en cuenta que Pariasca et al. (2010) mencionan un efecto de la edad de la planta, siendo el IBN mayor en plántulas. En este estudio se incluyó la evaluación de una metodología denominada raíz seminal (Ogawa et al., 2014), genotipos contrastantes en potencial IBN según bioensayo para exudado de raíz, y a su vez estimar la relación del potencial IBN con la etapa fenológica de la planta, como un indicador del cambio fisiológico promovido por el desarrollo de la planta.

Al respecto, en la figura 18 se reportan los resultados de potencial IBN en exudado y tejido de raíz seminal (ATU/ g de raíz) medido con el bioensayo usando la cepa recombinante de *Nitrosomonas europaea*, a partir del exudado de plántulas de 10 días obtenidas por el método de raíz seminal de 4 genotipos de arroz contrastantes según criterio % Inhibición de exudado de raíz en bioensayo (Pariasca et al., 2010).

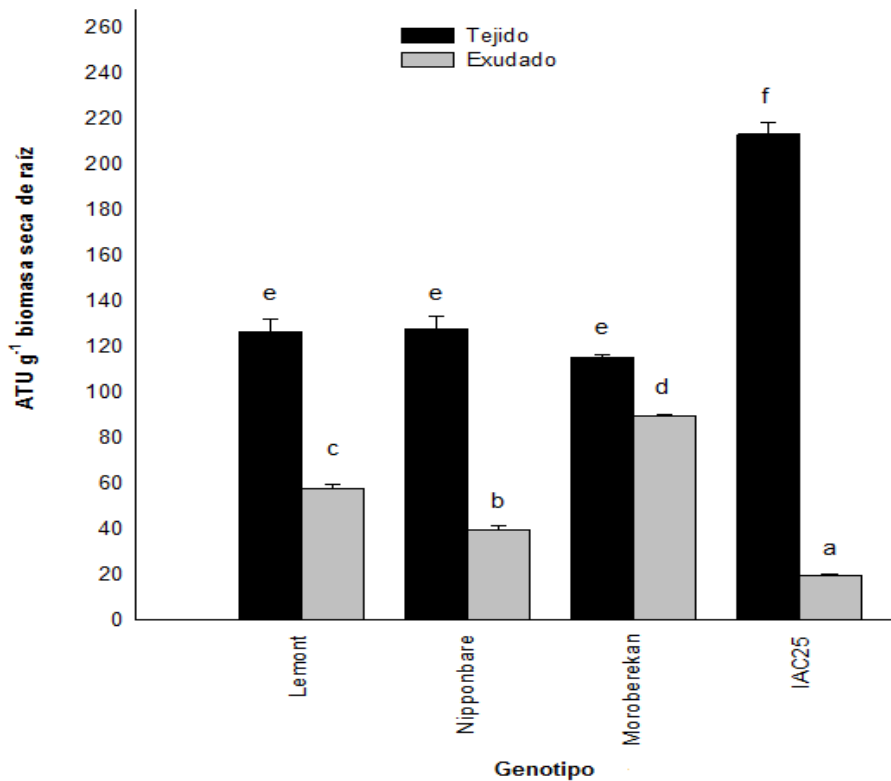


Figura 18. Potencial de IBN (ATU/ g de raíz) medido con el bioensayo usando la cepa recombinante de *Nitrosomonas europaea*, a partir del exudado de plántulas de 10 días obtenidas por el método de raíz seminal de 4 genotipos de arroz contrastantes criterio % Inhibición de exudado de raíz en bioensayo (Pariasca et al., 2010). Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas en los genotipos según el test LSD ($P \leq 0.05$).

Se observa que genotipos como el IAC25 presentaron un alto IBN potencial en tejido de la raíz, pero fue el menor IBN exudado indicando que pueden existir diferencias en la tasa de exudación entre genotipos. Sin embargo, comparado con plantas adultas evaluadas previamente no se observa la misma tendencia en la actividad IBN lo que podría atribuirse a procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo, que afectan la actividad IBN de un genotipo. En otras especies se han reportado diferencias en la exudación de moléculas a través del desarrollo, por ejemplo, en plantas de cebada se encontró estimulación de la nitrificación en etapas tempranas de crecimiento, y un efecto inhibitor desde el inicio de la etapa reproductiva hasta la madurez (Wheatley et al., 1997). Por su parte, Ghoneim et al. (2014) encontraron variaciones en las tasas de nitrificación a diferentes períodos de crecimiento del sorgo.

Por otra parte, para corroborar los resultados obtenidos mediante los otros dos métodos de evaluación de IBN (bioensayo e incubación de suelo), se realizó la cuantificación de genes *amoA* de AOA y AOB, y se encontró menores recuentos de estos genes en muestras de suelo de genotipos de arroz y el control IBN positivo Bh 679, respecto al control suelo sin plantas (Figura 19). Como se mencionó anteriormente para Bh en 3 meses no es tiempo suficiente para la detección en suelo de la característica IBN por bioensayo e incubación. Sin embargo, genes *amoA* si se comporta como generalmente se reporta, bajas cantidades de AOA y AOB para Bh (Subbarao et al., 2009).

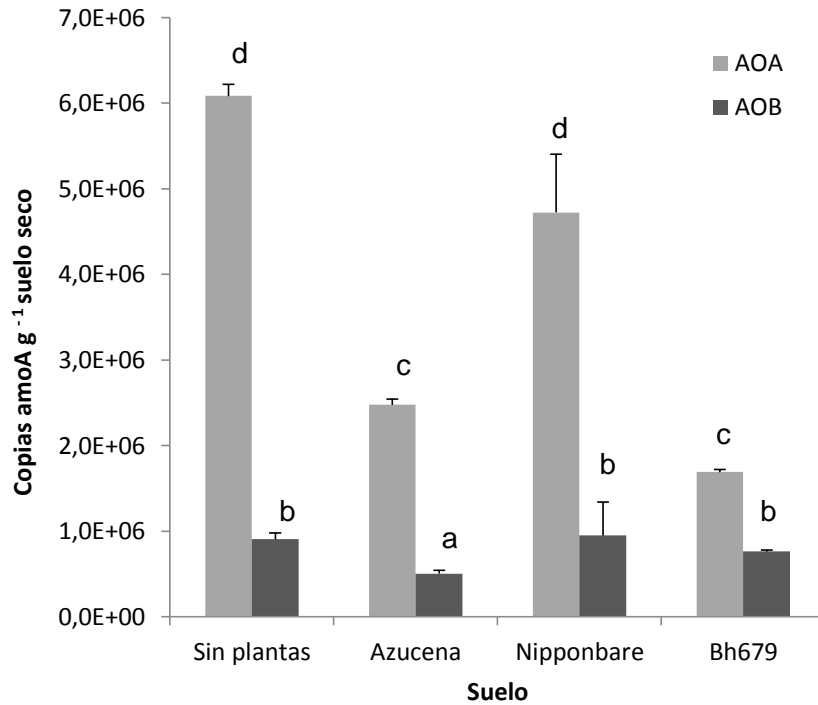


Figura 19. Cuantificación del gen *amoA* de arqueas y bacterias amonio-oxidantes (AOA y AOB) a partir de muestras de suelo colectado durante la cosecha de las plantas al momento de floración de algunos genotipos de arroz, control suelo sin plantas e IBN positivo Bh 679. Barras representan medias + error estándar (n=3). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas en los según el test LSD ($P \leq 0.05$).

En conclusión, los exudados de raíces de arroz pueden inhibir la nitrificación en el bioensayo. Los resultados en las tasas de nitrificación muestran que los compuestos que se exudan desde las raíces de arroz en algunos genotipos son menos estables al no relacionarse con la respuesta inhibitoria en el bioensayo, o que algunos compuestos que se producen no se liberan al suelo.

Los métodos de caracterización del fenómeno IBN que se han estandarizado y validado en el CIAT para Bh han sido eficaces para identificar la función IBN en un diverso germoplasma de arroz, por lo cual también pueden ser utilizados para explorar la actividad IBN en otros cultivos.

Conclusiones

El sistema de simulación de rotación Bh-arroz mostró que el efecto de IBN residual de Bh incide positivamente sobre la productividad del cultivo de arroz, en suelos de baja fertilidad como un Oxisol típico de los Llanos Orientales, y abre la posibilidad de utilizar el IBN en campo para el aumento del rendimiento y reducción de la huella ambiental del cultivo de arroz.

Se encontró actividad IBN en los genotipos de arroz mediante los métodos de fenotipificación de IBN utilizados en Bh y sorgo (bioensayo e incubación de suelo), en un rango de 3.27 a 31.75 ATU g⁻¹ raíz, y desde 3.06 a 7.6. mg N-NO₃- kg⁻¹ de suelo día⁻¹, que permitió identificar genotipos con capacidad de IBN alto, medio y bajo. Se destacó para alto IBN los genotipos de secano Llanura 11 que se cultiva en la región Llanos Orientales y las líneas Proyecto CIAT-Cirad 3, 18 y 23, para la posterior aplicación de IBN en la agricultura.

Se utilizó por primera vez la metodología de raíz seminal para IBN, y se configura como una forma rápida de evaluar la actividad IBN en un amplio germoplasma de arroz, de modo que permita seleccionar genotipos para estudios posteriores relacionados con aplicación de IBN para la agricultura.

Al relacionar las variables de tasas de nitrificación y exudados, se encontró para los genotipos de riego evaluados que se ajustan a un modelo lineal comparado a genotipos de secano, de modo que estas diferencias en exudación para IBN, permitiría aprovechar el uso de herramientas moleculares para la búsqueda de genes relacionados con esta característica.

Anexo A. Recuento de nematodos Fitoparásitos en 100 cm³ de suelo para las líneas más susceptibles en suelo arroz (SAR) en la dosis de nitrógeno N180 en el ensayo de rotación Bh-arroz.

	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Pratylenchus</i>	<i>Xiphinema</i>	<i>Aphelenchus</i>	<i>Tylenchus</i>	<i>Rotylenchulus</i>	Plectidae	Rhabditidae	<i>Acrobes</i>	<i>Dorylaimus</i>	<i>Longidorus</i>	<i>Total</i>
Línea 3	307	40	0	0	13	0	13	33	0	0	0	407
Línea 23	60	67	0	13	20	13	40	40	7	0	0	260
Línea 31	2707	393	67	0	307	40	200	93	40	47	87	3980

Bibliografía

Andrews M., Raven J.A., Lea P.J. (2013) Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Ann Appl Biol* 163 174–199.

Aulakh, M. S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J. and Rennenberg, H. (2001a), Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biology*, 3: 139–148.

Aulakh M, Wassmann R, Bueno C, Rennenberg H (2001b) Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. *Plant and Soil* Volume 230, Issue 1, pp 77-86.

Chapuis-Lardy L, Wrage N, Metay A, chotte JL, Bernoux M (2006) Soils, a sink for N₂O? A review. *Global Change Biology*, 12, 1-17.

Hayatsu M, Tago K, Saito M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science & Plant Nutrition*. 54:33–45.

Mosier, A. R., Valentine, D. W., Parton, W. J., Ojima, D. S., Schimel, D. S., and Delgado, J. A. (1996) CH₄ and N₂O fluxes in the Colorado shortgrass steppe: I. Impact of landscape and nitrogen addition, *Global Biogeochemical Cycles*, 10, 387–399.

Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol.*16(3):177–184.

Subbarao, G. V, Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Rao, I. M., Ishitani, M., Hash, C. T., Kishii, M. (2012). A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of botany*. doi:10.1093/aob/mcs230

Subbarao, G. V, Rao, I. M., Nakahara, K., Sahrawat, K. L., Ando, Y., & Kawashima, T. (2013). Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N₂O emissions in pasture crop – livestock systems, (2), 322–332.

Vitousek P M, Matson P A (1984) Mechanisms of nitrogen retention in forest ecosystems: a field experiment. *Science* 225:51-52.

Vitousek, Peter M. Aber, John D. Howarth, Robert W. Likens, Gene E. Matson, Pamela A. Schindler, David W. Schlesinger, William H. and Tilman, David G. (1997a). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7:737–750.

Vitousek, P M, Mooney H A, Lubchenco J and Melillo J M (1997b) Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277, 494-499.

Dinnes DL, Karlen DL, Jaynes DB, Kaspar TC, Hatfield JL, Colvin TS, and Cambardella CA (2002) Nitrogen management strategies to reduce nitrate leaching in tile drained midwestern soils. *Agron. J.* 94: 153–171.

Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Schleper C (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806–9.

Canfield Donald E., Glazer Alexander N., Falkowski Paul G (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 192; 330, 191-196.

Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Watanabe T, Suenaga K, Rondon M, Rao IM. (2006). Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems – challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25:303–335.

Subbarao GV, Wang HY, Ito O, Nakahara K, Berry WL. (2007a). NH₄⁺ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant and Soil*. 290:245–257.

Upadhyay, R.K. Patra, D.D. and Tewari S.K. (2011). Natural nitrification inhibitors for higher nitrogen use efficiency, crop yield, and for curtailing global warming. *Journal of Tropical Agriculture* 49 (1-2): 19-24.

Weiske, A., Benckiser, G., Herbert, T., and Ottow, J. C. G. (2001). Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments, *Biol. Fertil. Soils*, 34, 109–117.

Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., Horchler von Locquenghien, K., Pasda, G., Radle, M., and Wissemeier, A. H. (2001). 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture, *Biol. Fertil. Soils*, 34, 79–84.

Guthrie, T. F. and A. A. Bomke. (1980). Nitrification inhibition by N-serve and ATC in soils of varying texture. *Soil Sci. Soc. Am. J* 44:314–320.

Gopalakrishnan S, Subbarao GV, Nakahara K, Yoshihashi T, Ito O, Maeda I, Ono H, Yoshida M. (2007) Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55:1385–1388.

Gopalakrishnan, S., Watanabe, T., Pearse, S. J., Ito, O., Hossain, Z. a. K. M., & Subbarao, G. V. (2009). Biological nitrification inhibition by *Brachiaria humidicola* roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55 (5), 725–733.

Subbarao, G. V.; Nakahara, K.; Hurtado, M. P.; Ono, H.; Moreta, D. E.; Salcedo, A. F.; Yoshihashi, T.; Ishitani, M.; Ohnishi-Kameyama, M.; Yoshida, M.; Rondon, M.; Rao, I. M.; Lascano, C. E.; Berry, W. L.; Ito, O. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 106, n. 41, 17302-17307.

Rotthauwe J, Witzel K (1997) The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations, 63(12), 4704–4712.

Zakir HAKM, Subbarao GV, Pearse SJ, Gopalakrishnan S, Ito O, Ishikawa T, Kawano N, Nakahara K, Yoshihashi T, Ono H, Yoshida M. (2008) Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*) *New Phytologist*. 180:442–451.

Pariasca Tanaka, J., Nardi, P., & Wissuwa, M. (2010). Nitrification inhibition activity, a novel trait in root exudates of rice. *AoB plants* (3), plq014.

Raven J.A., Handley L.L., Andrews M. (2004). Global aspects of C/N interactions determining plant – environment interactions. *Journal of Experimental Botany*, 55, 11–25.

Hawkesford M., Horst W., Kichey T., Lambers H., Schjoerring J., Skrumsager Møller I., White P. (2012) Functions of macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edn, 135–189. Ed. P. Marschner. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

Boudsocq, S., Niboyet A., Lata, J. C., Raynaud X., Loeuille N., Mathieu J., Blouin M., Abbadie L., Barot S. (2012). Plant Preference for Ammonium versus Nitrate: A Neglected Determinant of Ecosystem Functioning? *The american naturalist* vol. 180, no. 1, 60-69.

Moore DRE, Waid JS (1971) The influence of washings of living roots on nitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 3, 69–83.

Paungfoo-Lonhienne C., Visser J., Lonhienne T.G.A., Schmidt S. (2012) Past present and future of organic nutrients. *Plant and Soil*, 359, 1–18.

Kraiser T., Gras D.E., Gutiérrez A.G., González B., Gutiérrez R.A. (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1455–1466.

Witte C. P. (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180, 431–438.

Andrews M., Edwards G.R., Ridgway H.J., Cameron K.C., Di H.J., Raven J.A. (2011) Positive plant microbial interactions in perennial ryegrass dairy pasture systems. *Annals of Applied Biology*, 159, 79–92.

Butler J., Garratt M.P.D., Leather S.R. (2012) Fertilisers and insect herbivores: a meta-analysis. *Annals of Applied Biology*, 161, 223–233.

Cameron K.C., Di H.J., Moir J.L. (2013) Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology*, 162, 145–173.

Goertz HM. Kirk-Othmer *Encyclopedia of chemical technology*, Vol. 7. Controlled release technology. New York: John Wiley & Sons; 1994. Controlled release technology (Agricultural) pp. 251–274.

Moro E., Costa C. A., Nascente, A. S., Cantarella H. (2014) Nitrification inhibition in tropical soil under no-tillage system. *Rev. Cienc. Agrar.*, v. 57, n. 2, 199-206.

Malavolta, E. (1980). Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 251p.

Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2. ed. London: Academic Press., 889 p.

McLaren, R. G.; Cameron, K. C. (1996). Soil science: sustainable production and environmental protection. 2nd ed. Auckland: Oxford University Press, 304 p.

Bredemeier, C.; Mundstock, C. M. (2000) Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural*, v. 30, n. 2, 365-372.

Sahrawat KL and Keeneey DR (1985) Perspectives for research on development of nitrification inhibitors. *Commun Soil Sci Plant Anal* 16: 517-524.

Sahrawat, K. L. (1989). Effects of nitrification inhibitors on nitrogen transformations, other than nitrification, in soils. *Adv. Agron* . 42: 279–309.

Crawford N.M., Glass A.D.M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3, 389–395.

Owen A.G., Jones D.L. (2001) Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 651–657.

Crusciol, C. A. C.; Garcia, R. A.; Castro, G. S. A.; Rosolem, C. A. (2011) Nitrate role in basic cation leaching under no-till. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, n. 6, 1975-1984.

Alcântara, M. A. K.; Camargo, O. A. (2010) Manipulação de carga e movimento de nitrato em horizontes B de um Latossolo Vermelho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, n. 2, 204-212.

Von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, a, & Frommer, W. B. (2000). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 254–261.

Austin, A.T., Yahdjian L., Stark J.M. Belnap J., Porporato A., Norton U., Ravetta D.A., Schaeffer S.M. (2004) Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141, 221-235.

Parker S.S., Schimel J.P. (2011). Soil nitrogen availability and transformations differ between the summer and the growing season in a California grassland. *Applied Soil Ecology* 48, 185 – 192.

Kaye J.P., Hart S.C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution* 12, 139 – 143.

Begon, M., J. L. Harper, and C. R. Townsend. (1998). *Ecology*. 3rd ed. Blackwell, Oxford.

Marschner, H. (2008). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Academic Press, London.

Haynes, R. J., and Goh, K. M. (1978). Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.* 53: 465–510.

Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J., and Lesaint, C. (1987). Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805–812.

Houlton, B. Z., D. M. Sigman, E. A. G. Schuur, and L. O. Hedin. (2007). A climate-driven switch in plant nitrogen acquisition within tropical forest communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 8902–8906.

McKane, R. B., L. C. Johnson, G. R. Shaver, K. J. Nadelhoffer, E. B. Rastetter, B. Fry, A. E. Giblin, et al. (2002). Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature* 415: 68–71.

Nascente, A. S.; Kluthkouski, J.; Rabelo, R. R.; Oliveira, P.; Cobucci, T.; Crusciol, C. A. C. (2011). Produtividade do arroz de terras altas em função do manejo do solo e da época de aplicação de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 41, n. 1, 60-65.

O'Sullivan C, Fillery I R P, Roper M M, Richards R A (2016) *Plant and Soil* pp 1-14.

Aanderud, Z. T., and C. S. Bledsoe. (2009). Preferences for ¹⁵N- ammonium, ¹⁵N-nitrate, and ¹⁵N-glycine differ among dominant exotic and subordinate native grasses from a California oak wood- land. *Environmental and Experimental Botany* 65: 205–209.

De Graaf, M. C. C., R. Bobbink, J. G. M Roelofs, and P. J. M Verbeek. (1998). Differential effects of ammonium and nitrate on three heath- land species. *Plant Ecology* 135: 185–196.

Britto, D. T., M. Y. Siddiqi, A. D. M. Glass, and H. J. Kronzucker. (2001). Futile transmembrane cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium NH₄⁺ toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 4255–4258.

Tisdale, S. I.; Nelson, W. I.; Beaton, J. D. (1985). *Soil fertility and fertilizers*. 4. ed. New York: Macmillan, 754 p.

Subbarao, G. V.; Ishikawa, T.; Nakahara, K.; Wang, H. Y.; Berry, W. L. (2006). A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant and Soil*, v. 288, n. 1-2, 101-112.

Maire, V., N. Gross, L. da Silveira Pontes, C. Picon-Cochard, and J.- F. Soussana. (2009). Trade-off between root nitrogen acquisition and shoot nitrogen utilization across 13 co-occurring pasture grass species. *Functional Ecology* 23: 668–679.

Olsson M.O. and Falkengren-Grerup U. (2000) Potential nitrification as an indicator of preferential uptake of ammonium or nitrate by plants in an oak woodland under storey. *Annals of Botany* 85: 299-305.

Jones DL, Darrah PR (1993) Re-sorption of organic-compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. 2. Experimental and model evidence for simultaneous exudation and re-sorption of soluble C compounds. *Plant Soil* 153:47–59.

Lata, J.-C., J. Durand, R. Lensi, and L. Abbadie. (1999). Stable coexistence of contrasted nitrification statuses in a wet tropical savanna ecosystem. *Functional Ecology* 13:762–768.

Lata, J.-C., K. Guillaume, V. Degrange, L. Abbadie, and R. Lensi. (2000). Relationships between root density of the African grass *Hyparrhenia diplandra* and nitrification at the decimetric scale: an inhibition-stimulation balance hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:595–600.

Lata, J.-C., V. Degrange, X. Raynaud, P.-A. Maron, R. Lensi, and L. Abbadie. (2004). Grass populations control nitrification in savanna soils. *Functional Ecology* 18: 605–611.

Subbarao, G. V., M. Rondon, O. Ito, T. Ishikawa, I. M. Rao, K. Nakahara, C. E. Lascano, and W. L. Berry. (2007b). Biological nitrification inhibition (BNI)—is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* 294: 5–18.

Hawkes, C. V., I. F. Wren, D. J. Herman, and M. K. Firestone. (2005). Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters* 8: 976–985.

Ashton, I. W., A. E. Miller, W. D. Bowman, and K. N. Suding. (2010). Niche complementarity due to plasticity in resource use: plant partitioning of chemical N forms. *Ecology* 91: 3252–3260.

Tilman D, Fargione J, Wolff b, D'Antonio C, Dobson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger W H, Simberloff D, Swackhamer D. (2001) Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science* Vol. 292, Issue 5515, pp: 281-284.

Tilman D, Cassman K G, Matson P A, Naylor R & Polasky S (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.

Smith, K. A., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K. E., Massheder, J. and Rey, A. (2003), Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, 54: 779–791.

Turner, R E, N N Rabalais and D Justié (2008). Gulf of Mexico hypoxia: alternate states and a legacy. *Environmental Science and Technology* 42: 2323-2327.

Rossiter-Rachor, N. A., S. A. Setterfield, M. M Douglas, L. B. Hutley, G. D. Cook, and S. Schmidt. (2009). Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. *Ecological Applications* 19:1546–1560.

Boudsocq, S., J.-C. Lata, J. Mathieu, L. Abbadie, and S. Barot. (2009). Modelling approach to analyse the effects of nitrification inhibition on primary production. *Functional Ecology* 23: 220–230.

Zhu, Y., Zeng, H., Shen, Q., Ishikawa, T., & Subbarao, G. V. (2012). Interplay among NH₄⁺ uptake, rhizosphere pH and plasma membrane H⁺-ATPase determine the release of BNIs in sorghum roots – possible mechanisms and underlying hypothesis. *Plant and Soil*, 358 (1-2).

Armstrong W. (1971) Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. *Physiologia Plantarum* 25, 192 - 197.

- Frenzel P., Rothfuss F. and Conrad R. (1992) Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. *Biology and Fertility of Soils* 14, 84-89.
- Gilbert B. and Frenzel P. (1995) Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. *Biology and Fertility of Soils* 20, 93-100.
- Raimbault M., Rinando G., Garcia J. L. and Boureau M. (1977) A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 9, 193-196.
- Savant N. K. and De Datta S. K. (1982) Nitrogen transformation in wetland rice soils. *Advances in Agronomy* 35, 241-302.
- Iizumi T, Mizumoto M, Nakamura KA. (1998). Bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3656–3662.
- Ishikawa T, Subbarao GV, Ito O, Okada K. (2003). Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. *Plant and Soil* 255: 413–419.
- Robertson, G. P. and P. M. Groffman. (2015). Nitrogen transformations. Pages 421-446 in E. A. Paul, editor. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Fourth edition. Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
- Myrold D. (2005) Transformations of nitrogen. Pages 333-367 in Fuhrmann S, Zuberer H. *Principles and application of soil microbiology*. 2nd edition. Prentice Hall.
- He J-Z, Hua H-W, Li, ZhangaL-M (2012) Review Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry* Volume 55, Pages 146–154.
- Arango J, Moreta D, Núñez J, Hartmann K, Domínguez M, Ishitani M, Rao IM (2014) Developing methods to evaluate phenotypic variability in biological nitrification inhibition (BNI) capacity of *Brachiaria* grasses, *Tropical grasslands-Forrajeras Tropicales*: 2, 6–8.
- Moreta D (2010a) Cuantificación de genes de microorganismos amonía oxidantes del suelo a través de PCR en tiempo real y su asociación con la actividad de la inhibición biológica de la nitrificación (BNI) en *Brachiaria humidicola*. Tesis de maestría. Universidad del Valle.
- Moreta D (2010b) A novel strategy to enhance nitrogen use efficiency in crops by exploiting the diversity for biological nitrification inhibition in the rice germplasm. Final Technical Report Vavilov-Frankel Fellowship Program 2009. CIAT.
- Núñez J (2014) Potencial de la inhibición biológica de la nitrificación (IBN) en forrajes tropicales. Tesis de maestría. Universidad Nacional.
- Lestari P, Trijatmiko K R, Reflinur, Warsun A, Tasliyah, Ona I, Vera Cruz C, Bustamam M (2011) Mapping Quantitative Trait Loci Conferring Blast Resistance in Upland Indica Rice (*Oryza sativa* L.) *J. Crop Sci. Biotech.* 14 (1): 57 – 63.

Galloway JN, Townsend AR, Erismán JW, Bekunda M, Cai Z, et al. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* (80-) 320: 889–892.

Galloway J. N., Dentener F. J., Capone D. G., Boyer E. W., Howarth R. W., Seitzinger S. P., Asner G. P., Cleveland C. C., Green P. A. and 6 more (2004) Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future *Biogeochemistry*, Volume 70, Issue 2, pp 153-226.

Schlesinger WH (2009) On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 203.

Barker, A.V. and H.A. Mills (1980) Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. *Hort. Rev.* 2:395-423.

Berrio E, Sanint LR, Correa F, Turande E (2002) Respuesta al uso de nitrógeno en variedades de arroz sembradas en Colombia, 1950–1999. *Foro Arrocero Latinoamericano* 8:22–23.

Kafkafi, U. y Tarchitzky, J. 2012. Fertirrigación: Una herramienta para una eficiente fertilización y manejo del agua. Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes (IFA). Instituto Internacional de la Potasa (IIP). París, Francia y Horgen, Suiza. p. 32 – 43.

Ogawa S, Selvaraj MG, Fernando AJ, Lorieux M, Ishitani M, McCouch S, Arbelaez JD (2014) N- and P-mediated seminal root elongation response in rice seedlings. *Plant Soil* 1–13.

Orduz J, Bueno G, Calderón C, Baquero JE. 2011. Evaluación de gramíneas y leguminosas forrajeras como coberturas y su influencia en el control de malezas en el establecimiento de cítricos en el piedemonte del Meta. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12(2):121-128.

Mora Ravelo, S. G., Sandoval Villa, M., Gavi Reyes, F., & Sánchez García, P. (2005). Emisión de N₂O con fertilización nitrogenada en fertirriego y fertilización convencional. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21, 23–29.

Ghoneim A, Al-Modaihsh A, Naeem S, Metwally T, Gewailly E (2014) Examination of nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*) in soil around its roots. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 4(1): 30-38

Bremner JM, Blackmer AM (1978) Nitrous oxide emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science* 199(4326): 295–296.

Bremner JM, Breitenbeck GA, Blackmer AM (1981) Effect of nitrapyrin on emission of nitrous oxide from soils fertilized with anhydrous ammonia. *Geophysical Research Letters* 8:353–356.

Wagner-Riddle, C., Furon, A., Mclaughlin, N. L., Lee, I., Barbeau, J., Jayasundara, S., Parkin, G., Von Bertoldi, P. and Warland, J. (2007) Intensive measurement of nitrous oxide emissions from a corn–soybean–wheat rotation under two contrasting management systems over 5 years. *Global Change Biology*, 13: 1722–1736.

Raun WR, Johnson GV (1999) Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron J* 91:357-363.

Rodgers GA 1986: Potency of nitrification inhibitors following their repeated application to soil. *Biol. Fertil. Soils*, 2, 105-108.

Hendrickson LL, Keeney DR, Walsh LM, Liegel EA. (1978) Evaluation of nitrapyrin as a means of improving N use efficiency in irrigated sands. *Agronomy Journal*. 70:699-708.

Bastidas H. y Montealegre F. A. 1994. Aspectos generales de la nueva enfermedad del arroz llamada entorchamiento. *Revista Arroz* 43, 30-35.