

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO**



Efecto de Inoculantes en la Formación de Nódulos de Especies Leguminosas soya  
*Glycine max* L. y crotalaria *Crotalaria juncea* L. con Potencial Forrajero para la  
Comarca Lagunera

**Por:**

**Jaime Alberto Salas Moreno**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Torreón, Coahuila, México  
Agosto 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO**

**Efecto de Inoculantes en la Formación de Nódulos de Especies Leguminosas  
soya *Glycine max* L. y crotalaria *Crotalaria juncea* L. con Potencial  
Forrajero para la Comarca Lagunera**

Por:

**Jaime Alberto Salas Moreno**

**TESIS**

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Aprobada por:



Dr. Arturo Gaytán Mascorro

Presidente



Ing. Heriberto Quirarte Ramírez

Vocal



M.C. Yasmin Ileana Chew Madinaveitia

Vocal externo



M.C. Rafael Ávila Cisneros

Vocal suplente



M.C. Rafael Ávila Cisneros

Coordinador de la División de Carreras Agronómicas

UNSA  
Unidad Laguna



Coordinación de la División  
de Carreras Agronómicas

Torreón, Coahuila, México  
Agosto 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO**

**Efecto de los Inoculantes en la Formación de Nódulos de Especies Leguminosas  
soya *Glycine max* L. y crotalaria *Crotalaria juncea* L. con Potencial  
Forrajero para la Comarca Lagunera**

Por:

**Jaime Alberto Salas Moreno**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

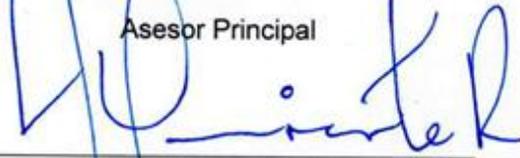
Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Arturo Gaytán Mascorro

Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Yasmin Ileana Chew Madinaveitia

Asesor Principal Externo

  
\_\_\_\_\_  
Ing. Heriberto Quirarte Ramírez

Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Rafael Ávila Cisneros

Coasesor

*UNSA  
Unidad Laguna*

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Rafael Ávila Cisneros  
Coordinador de la División de Carreras Agronómicas

  
*Coordinación de la División  
de Carreras Agronómicas*

Torreón, Coahuila, México  
Agosto 2025

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado a un sueño, que fue una meta y hoy es una realidad, por el trabajo en conjunto y por el desarrollo personal. Todo el esfuerzo, disciplina y dedicación que hicieron posible este resultado.

Este trabajo está dedicado con mucho cariño a las personas que siempre estuvieron presentes en mi vida, padres, hermanas, familia, amigos y profesores. Puedo decir con mucha gratitud que estuvieron en mi vida siempre los mejores.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Gracias Dios**

Gracias a Dios por la vida y el sendero que en ella me tocó, gracias por las circunstancias y personas que en mi camino estuvieron, gracias por cada una de las experiencias que me hicieron crecer de manera personal y profesional.

Gracias Dios por este bonito sueño que me diste y por tan hermosa profesión que hoy se me ha dado la dicha de concluirla.

Te agradezco Dios por las personas que a mi lado estuvieron y son parte del cumplimiento de este logro.

### **Gracias familia**

A mis padres y hermanas les agradezco por todo lo vivido, por ayudarme, aconsejarme y estar ahí presentes en cuanto más se necesitó. Por cada palabra de aliento, por cada consejo, por cada bendición.

### **Gracias Narro**

A mi poderosísima Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser mi Alma Mater.

### **Gracias Campo Experimental**

A el Campo Experimental-INIFAP que me abrió las puertas para poder realizar este proyecto de tesis. Por brindarme sus instalaciones y los conocimientos de sus investigadores.

### **Gracias profesores**

A mis profesores que a lo largo de mi trayectoria me formaron como un profesional competente, capaz de solucionar y mejorar. Y dentro de lo general quisiera agradecer a:

### **Gracias Doctor Arturo Gaytán Mascorro**

A mi profesor y asesor que respeto y admiro el Doctor Arturo Gaytán Mascorro, que es una inspiración y ejemplo a seguir. Gracias por brindarme su tiempo y conocimiento todo este tiempo.

### **Gracias M.C. Yasmin Ileana Chew Madinaveitia**

A mi asesora la M.C. Yasmin, por todo el tiempo dedicado en este proyecto, por todo su conocimiento compartido conmigo.

### **Gracias Ingeniero Heriberto Quirarte Ramírez**

A mi profesor y asesor el Ingeniero Heriberto por su tiempo y conocimientos compartidos conmigo a lo largo de este proyecto.

Agradezco infinitamente a todas las partes involucradas en este proyecto, que no es solo un logro mío, porque sin cada uno de ustedes no hubiera sido capaz de poder estar aquí en este momento de mi vida. **MUCHAS GRACIAS A TODOS!**

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>5</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>5</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
2.1. Panorama del uso y disponibilidad de nitrógeno (suelo-atmósfera) para la productividad de cultivos.....	6
2.2. Ciclo del Nitrógeno.....	8
2.3. Interacción leguminosas-bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.....	9
2.4. Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico por especies leguminosas.....	10
2.5. Respuesta de leguminosas a la formación de nódulos en planta.....	12
2.6. Factores que afectan la simbiosis Rhizobium-leguminosa, formación, número y tamaño de los nódulos.....	12
2.7. Efecto ambiental: Temperatura y pH del suelo.....	13
2.8. Textura y estructura del suelo.....	14
2.9. Fertilización Inorgánica.....	14
2.10. Salinidad.....	15
2.11. Respuesta de cultivares a inoculantes de bacterias fijadoras de nitrógeno...	16
2.12. Fenología de leguminosas en respuesta a la inoculación y fertilización nitrogenada.....	17
2.13. Número y tamaño de nódulos.....	17
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. Características de la Comarca Lagunera.....	19
3.2. Ubicación del experimento.....	19
3.3. Establecimiento del experimento.....	19
3.4. Diseño experimental.....	20

3.5.	Inoculación de las semillas.....	20
3.6.	Muestreo de raíces.....	20
3.7.	Evaluación de nódulos .....	20
3.8.	Tamaño de nódulos.....	21
3.9.	Fenología .....	21
3.10.	Análisis de datos.....	21
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
4.1.	Primer muestreo: Etapa vegetativa .....	22
4.1.1.	Porcentaje de nódulos activos e inactivos.....	22
4.1.2.	Tamaño de los nódulos.....	24
4.1.3.	Porcentaje de nódulos activos .....	24
4.1.4.	Porcentaje de nódulos inactivos .....	26
4.2.	Segundo muestreo: Etapa inicio de floración.....	27
4.2.1.	Porcentaje de nódulos activos e inactivos.....	27
4.2.2.	Tamaño de los nódulos.....	28
4.2.3.	Porcentaje de nódulos activos .....	28
4.2.4.	Porcentaje de nódulos inactivos .....	31
4.3.	Tercer muestreo: Etapa inicio de llenado de vainas .....	32
4.3.1.	Porcentaje de nódulos activos e inactivos.....	32
4.3.2.	Tamaño de nódulos .....	34
4.3.3.	Porcentaje de nódulos activos .....	34
4.3.3.	Porcentaje de nódulos inactivos .....	37
4.4.	Fenología .....	39
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>REVISION BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> Porcentaje de nódulos activos e inactivos en la etapa vegetativa en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	23
<b>Cuadro 2</b> Porcentaje de nódulos (activos e inactivos) para la interacción inoculación-fertilización X cultivos en la etapa vegetativa en los cultivos bajo evaluación. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	24
<b>Cuadro 3</b> Porcentaje de nódulos activos por tamaño en la etapa vegetativa en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	25
<b>Cuadro 4</b> Porcentaje de nódulos inactivos por tamaño (categorías 1, 2, 3, 4) en la etapa vegetativa en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	26
<b>Cuadro 5</b> Porcentaje de nódulos activos e inactivos en la etapa reproductiva de inicio de floración en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	28
<b>Cuadro 6</b> Porcentaje de nódulos activos por tamaño en la etapa reproductiva de inicio de floración en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	29
<b>Cuadro 7</b> Interacción AxB (inoculación con bacterias/fertilización X cultivos de soya/crotalaria) para el porcentaje de nódulos activos de tamaño grande (categoría 4). Ciclo primavera-verano de 2023. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.....	30
<b>Cuadro 8</b> Porcentaje de nódulos inactivos por tamaño en la etapa reproductiva de inicio de floración en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	32
<b>Cuadro 9</b> Porcentaje de nódulos activos e inactivos en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....	33
<b>Cuadro 10</b> Interacción AxB (inoculación con bacterias/fertilización X cultivos de soya/crotalaria) para el porcentaje de nódulos activos. Ciclo primavera-verano de 2023. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.....	34

**Cuadro 11** Porcentaje de nódulos activos por tamaño (categoría 1, 2, 3, 4) en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....35

**Cuadro 12** Interacción AxB para el porcentaje de nódulos activos de tamaño mediano y grande en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....37

**Cuadro 13** Porcentaje de nódulos inactivos por tamaño (categoría 1, 2, 3, 4) en la etapa reproductiva de inicio de crecimiento de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....38

**Cuadro 14** Porcentaje de nódulos inactivos de tamaño grande (categoría 4)) en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....39

**Cuadro 15** Días después de la siembra a las etapas vegetativa (ocho hojas-V8), inicio de floración (IF) e inicio de crecimiento de vaina (ICV) y altura en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....40

**Cuadro 16** Días después de la siembra a la etapa vegetativa (V8), en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023. ....41

## RESUMEN

En la Comarca Lagunera, la producción intensiva de forrajes requiere de altas cantidades de energía (uso de fertilizantes inorgánicos) para tener niveles de productividad aceptables. Una opción al uso de fertilizantes nitrogenados es el cultivo de especies leguminosas como la soya y la crotalaria; cultivos que, en asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno, pueden prescindir o disminuir éste insumo sin detrimento del rendimiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de soya y crotalaria a la fertilización nitrogenada y uso de inoculantes en la formación de nódulos activos e inactivos. El ensayo consistió en usar fertilización nitrogenada e inoculantes específicos en soya y crotalaria. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones con arreglo factorial 2x2. Se registró el porcentaje y tamaño de nódulos activos e inactivos en las etapas vegetativa, inicio de floración e inicio de llenado de vaina. Hubo interacción entre tratamientos y las especies evaluadas para el porcentaje total de nódulos en las etapas vegetativa e inicio de llenado de vaina. En floración la respuesta de las especies a los tratamientos fue independiente. La soya mostró mayor porcentaje de nódulos activos en todas las etapas de desarrollo con el uso de inoculantes superando a la fertilización química. De manera general, la soya tuvo menor porcentaje de nódulos pequeños que crotalaria, y mayor porcentaje de nódulos medianos y grandes en floración e inicio de llenado de vaina. En crotalaria en inicio de llenado de vaina el tratamiento fertilizado, tuvo mayor porcentaje de nódulos de tamaño grande con respecto al tratamiento inoculado. La crotalaria mostró mayor precocidad que la soya para llegar a cada etapa fenológica. La asociación inoculantes-leguminosas, es una opción para reducir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados.

**Palabras clave:** Leguminosas, *Rhizobium*, Inoculación, Fertilización, Nódulos, Soya, Crotalaria

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la interacción leguminosas-bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, ha sido motivo de redes de investigación nacionales e internacionales. Estos estudios son importantes para entender cómo se abastecen de nitrógeno los cultivos de leguminosas como soya y crotalaria, especialmente en suelos deficientes de materia orgánica y de nitrógeno; magnificando la importancia del uso de inoculantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Las especies de importancia agronómica y que forman parte de los patrones de cultivos de interés para la alimentación humana o animal, incluyen a especies de gramíneas y especies leguminosas; de esta manera, se pueden mencionar a cultivos de grano pequeño, maíz, sorgo, o cultivos de leguminosas como alfalfa y la soya. La ventaja de las especies leguminosas es que pueden fijar nitrógeno atmosférico y que, dependiendo de la eficiencia de fijación de este nutriente en el suelo, puede ser utilizado por cultivos que forman parte de la rotación en las siembras comerciales en explotaciones agrícolas. El fundamento de los sistemas de producción agrícolas y pecuarios es la producción de biomasa, que tiene una fuerte relación con aspectos de nutrición de los cultivos y uso de radiación solar.

Los sistemas de producción tradicionales dependen del uso de insumos, principalmente de agua y fertilizantes nitrogenados (Guo *et al.*, 2023; Gonzales, 2025). El nitrógeno es el principal nutriente y el de mayor demanda a nivel mundial en los sistemas de producción agropecuarios, al incrementar su productividad. En el año 2022, la producción de fertilizante nitrogenado fue de 118 millones de toneladas métricas y se espera que, en los próximos años, su demanda sea mayor (Ritchie *et al.*, 2022); al ser el nitrógeno factor limitante en el desarrollo de los cultivos (Del Papa *et al.*, 2024). Estudios sugieren que la

demanda de alimentos para el año 2050, se incrementa en un 50% por la proyección de aumento en la población mundial que se estima será de diez mil millones de personas. (FAO, 2017). Por lo anterior, se deben realizar cambios en los sistemas de producción convencionales para enfrentar los retos a nivel mundial a mediano y largo plazo, causados por la disminución o pérdida de recursos naturales, el cambio climático (Wanyenze *et al.*, 2023) y los niveles de eficiencia en la aplicación de insumos que deberán lograrse, como es la aplicación de fertilizantes nitrogenados. A través del desarrollo de la agricultura se han buscado métodos alternativos para la producción de cultivos; el uso de fertilizantes nitrogenados ha marcado un antes y un después en los niveles de producción, manteniendo esta situación en los sistemas de producción actuales; a pesar de los riesgos de contaminación que representa su aplicación (Diptimayee y Deole, 2019; Mahmud *et al.*, 2020; Gonzales, 2025). Entre las consecuencias más significativas en el ambiente por el uso de fertilizantes es la aceleración de la eutrofización (González, 2025).

En México se tienen grandes retos para disponer de tecnologías e insumos para mantener o incrementar los niveles de productividad de los cultivos, ya que se tiene dependencia tecnológica de otras latitudes debiendo importar insumos tales como fertilizantes inorgánicos, semillas, equipo, maquinaria, entre otros. Al respecto, Mendoza *et al.*, (2024), mencionan que la dependencia de México del extranjero vulnera la soberanía alimentaria; aunado a lo anterior los cambios sociopolíticos y climáticos, amenazan el sustento del campo.

En la Comarca Lagunera, la producción intensiva de forrajes es una de las actividades agrícolas más importantes y demandan altas cantidades de energía (expresados en aplicación de agua, fertilizantes, pesticidas, uso de maquinaria, entre otros), para obtener

buenos rendimientos en los cultivos. A nivel regional, la siembra de gramíneas como maíz (46,694 ha) y sorgo (23,535 ha), y de leguminosa como la alfalfa (38,609 ha) tienen rendimientos promedio en maíz de 42.8 t/ha; en sorgo de 42.2 t/ha; y en alfalfa de 90.0 t/ha (SIAP, 2024); y son la base de las dietas para alimentación del ganado, principalmente ganado bovino.

Los sistemas agrícolas intensivos se distinguen por ser sistemas en monocultivo que inducen cambios en la población microbiana en el suelo; dando como resultado pocos aportes de carbono y de materia orgánica, lo cual hace que se pierda la fertilidad del suelo de manera progresiva, y consecuentemente una baja producción en las cosechas posteriores (Vázquez *et al.*, 2020).

Las leguminosas, son económicamente importantes por su calidad y aporte de proteína en la dieta de los rumiantes y mejoran la fertilidad del suelo, mediante la fijación biológica del nitrógeno (FBN). En este proceso intervienen bacterias (Rhizobios) que convierten el nitrógeno atmosférico elemental ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) y nitratos  $NO_3$  en forma aprovechable para las plantas. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) aporta mayor cantidad de nitrógeno al suelo y es un proceso más económico, en comparación con el costo de los fertilizantes nitrogenados. La simbiosis leguminosas-rizobios representa el 70% del total de la FBN (Wang *et al.*, 2015) (Rong *et al.*, 2020).

En regiones áridas y semiáridas como la Comarca Lagunera, que tienen suelos pobres en materia orgánica y nutrientes, los fertilizantes orgánicos e inorgánicos se utilizan para incrementar su fertilidad, pero altas dosis, pueden contaminar el suelo, y agua. En estas regiones, se ha considerado a los cultivos de leguminosas como una opción para restaurar y rehabilitar suelos (Bianco, 2020; López-Alcocer *et al.*, 2020). Además, al incluir leguminosas (forrajeras y de grano) a sistemas de producción de forrajes, se

prescindió de 27 a 58% de fertilizantes nitrogenados y las emisiones de óxido nitroso de se redujeron de 23 a 52% (Reckling *et al.*, 2016).

Los fertilizantes químicos son recursos limitados y considerando los continuos aumentos en sus costos, tendrán implicaciones en los modelos de producción agrícolas a mediano y largo plazo; razón por la cual, todas las tecnologías y esfuerzos destinados a mejorar el uso de estos recursos, son de vital importancia.

### **OBJETIVO**

Evaluar el efecto de inoculantes en la formación de nódulos en las especies leguminosas soya y crotalaria, con potencial forrajero para la Comarca Lagunera.

### **HIPOTESIS**

Ho: No hay respuesta a la aplicación de inoculantes en la formación de nódulos en raíces en las leguminosas soya y crotalaria.

Ha: Si hay respuesta a la aplicación de inoculantes en la formación de nódulos en raíces en las leguminosas soya y crotalaria.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

En este apartado se tratan algunas generalidades sobre la fijación biológica del nitrógeno atmosférico; el ciclo del nitrógeno; respuestas morfológicas y fisiológicas de especies leguminosas a la aplicación de inoculantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno; efecto ambiental; tipo de inoculantes; manejo del cultivo, y diferencias genéticas entre cultivares. La respuesta del cultivo de la soya a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico ha sido ampliamente documentada, sin embargo, para el cultivo de crotalaria no se tiene la misma situación; por lo cual las referencias tratadas en este escrito, se refieren a estudios de investigación con relación posible a la aquí generada.

### **2.1. Panorama del uso y disponibilidad de nitrógeno (suelo-atmósfera) para la productividad de cultivos**

En la agricultura intensiva, los fertilizantes son un componente principal para la producción de los cultivos. Cuando se excede en su aplicación, se generan problemas de contaminación ambiental y de salud pública. Contribuyen a la salinidad del suelo, acumulación de metales pesados, a la eutrofización del agua, al calentamiento global por la emisión de gases de efecto invernadero, agotamiento de ozono atmosférico, acumulación de nitratos y acidificación de los suelos a nivel mundial, nacional, regional y local. Incluso el proceso para la síntesis de los fertilizantes es una fuente de contaminación de metales pesados (Hg, Cd, As, Pb, Cu, Ni) (Rodríguez *et al.*, 2019; Mahmud *et al.*, 2020; Hayashi, 2022; Gonzales, 2025)

Los principales problemas por el uso de nitrógeno en la agricultura tienen relación con las prácticas agrícolas (Rodríguez *et al.*, 2019) que aceleran la contaminación del medio ambiente en pro de mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos. Camarillo y Mangan

(2020) mencionan que los sistemas de producción deben de adecuarse a las zonas en específico para utilizar los recursos disponibles.

La degradación del suelo por prácticas inadecuadas en su manejo impacta negativamente en su fertilidad y esto a su vez limita la producción de los cultivos y por ende en la producción de alimentos. La adaptación de especies ante los cambios de ambiente (incluido el suelo) por el cambio climático, modifica los modelos de producción agropecuarios y son elementos o factores que influyen en las condiciones de pobreza y migración rural al impedir que los suelos proporcionen bienes y servicios de manera esperada (Cotler *et al.*, 2016; Estrada-Herrera *et al.*, 2017).

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmosfera, representa el 78% de su composición; pocos organismos, principalmente bacterias, reducen este gas y lo utilizan como fuente de nitrógeno; estos organismos, lo incorporan en la planta y en el suelo en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) para ser utilizado (Guo *et al.*, 2023). Las especies leguminosas, utilizan el nitrógeno atmosférico a partir de la simbiosis con microorganismos capaces de fijar ese nitrógeno en las raíces y posteriormente en el suelo para que sea aprovechado por las plantas o los cultivos. Las especies no leguminosas, dependen de fertilizantes químicos para su desarrollo y producción (Guo *et al.*, 2023), aunque en los últimos años se han reportado avances en el uso de nutrientes del suelo con microorganismos en especies o cultivos no leguminosas, como son los microorganismos promotores de crecimiento y que pueden ser hongos (Morán-Diez *et al.*, 2021), bacterias (Martínez *et al.*, 2021) u otros microorganismos (Weidner *et al.*, 2017).

La reserva natural de nitrógeno en el suelo, es la materia orgánica; pero al igual que en la atmósfera, éste no es asimilable por las plantas, por lo cual debe ser mineralizado a la

forma inorgánica como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Lewis, 1993). Lo anterior indica la importancia de cualquier esfuerzo para mejorar la situación de las explotaciones agrícolas y pecuarias.

La Comarca Lagunera es una de las zonas agropecuarias más consolidadas en México; sin embargo, la actividad agrícola demanda una gran cantidad de insumos para la producción de cultivos entre los que destaca el nitrógeno inorgánico, teniendo como consecuencia una situación de altos costos de producción afectando la rentabilidad de las explotaciones agrícolas. Lo anterior ha determinado que los sistemas de producción actuales en esta región no sean sustentables por lo que campos de estudio emergentes como la simbiosis con FBN, sean de importancia.

De acuerdo con Saynes *et al.*, (2016), del total de nitrógeno que se aplicó en un experimento en maíz, solo fue aprovechado entre el 30% y 50%. Estos mismos autores mencionan que al aplicar estiércol bovino como fertilizante nitrogenado, solamente fue aprovechado entre el 30 y 50%.

## **2.2. Ciclo del Nitrógeno**

El nitrógeno es el nutriente de mayor demanda a nivel mundial y el más limitante para el desarrollo de las plantas, tanto en ecosistemas naturales como en los sistemas agronómicos. En la atmósfera, el nitrógeno representa el 78% del total de los gases, y se encuentra en forma molecular ( $\text{N}_2$ ), que no es utilizable directamente por las plantas. Otros compuestos de nitrógeno en la atmósfera, pero en cantidades mínimas son el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) y amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). Existen plantas que en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno originan compuestos susceptibles de incorporarse al suelo o a los seres vivos (Lewis, 1993). La mayoría de

las plantas de interés agronómico dependen de los fertilizantes, producto de la síntesis química, para su crecimiento y producción (Beyhaut *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2023; Del Papa *et al.*, 2024).

En el suelo, la principal reserva de nitrógeno es la materia orgánica; el 98% en forma de compuestos orgánicos y 2% en forma inorgánica. El 70% de las emisiones antropogénicas anuales a nivel mundial, se relacionan con actividades agrícolas (Signor *et al.*, 2013), o a la producción agropecuaria (Saynes-Santillán *et al.*, 2016). El óxido nitroso se produce como parte de la actividad humana teniendo una concentración en la atmósfera de 334 ppm.

El recurso agua es afectado por los fertilizantes inorgánicos; la nitrificación genera un exceso de nitratos que por lixiviación provocan la contaminación de los mantos acuíferos y la eutrofización del agua (Fonseca *et al.*, 2020; González, 2025).

### **2.3. Interacción leguminosas-bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico**

La simbiosis entre plantas y cepas de microorganismos benéficos, requiere incorporar cepas o aislamientos cuando su población no es la adecuada o específica para la leguminosa a sembrar, o definitivamente no se encuentran en el suelo. Esto se logra con la aplicación de microorganismos directamente al suelo o a las semillas, conocidos como inoculantes o biofertilizantes, los cuales varían de acuerdo a las cepas y los microorganismos (Restrepo *et al.*, 2015; O'Callaghan *et al.*, 2022). El inóculo con cepas de *Rhizobium* que se asocian con las leguminosas son una opción para el aporte de nutrientes y disminuir fertilizantes nitrogenados, sin detrimento del rendimiento del cultivo; además de reducir costos de producción y conservar la fertilidad del suelo (O'Callaghan *et al.*, 2022).

## 2.4. Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico por especies leguminosas

La familia de las fabáceas (*Fabaceae*) están integradas en tres subfamilias (*Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*), incluye 750 géneros y casi 2,000 especies (Llamas y Acedo, 2016; Gómez *et al.*, 2002). Estas especies en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Mezorhizobium* fijan el nitrógeno atmosférico de la rizosfera para su aprovechamiento (Tang, *et al.*, 1986; Fernández-Pascual *et al.*, 2002; Bianco, 2020). De manera general a éstas bacterias se les denomina rizobios o rizobios, ya que anteriormente las bacterias que formaban nódulos, se agrupaban en el género *Rhizobium* (Fernández-Canigia, 2020).

Fijación biológica de nitrógeno (FBN). La simbiosis inicia con un reconocimiento de los *Rhizobium* y exudados (flavonoides, fenoles, azúcares, ácidos dicarboxílicos, aminoácidos) de las raíces de las leguminosas. Los Rhizobios en respuesta, sintetizan lipochitooligosacáridos (LCO, por sus siglas en inglés) (Oldroyd *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018; Fernández-Canigia, 2020); conocidos como factorNod que influyen en la estructura de los pelos radiculares; éstos se doblan y las bacterias se adhieren a la pared y penetran las raíces para forman los nódulos. En los nódulos los *Rhizobios* se dividen y cambian morfológicamente, diferenciándose en bacteroides (Bianco, 2020). En los nódulos la enzima nitrogenasa rompe la unión triple del N<sub>2</sub> para formar dos moléculas de amonio NH<sub>4</sub>, accesibles para las plantas (Bianco, 2020; Fernández-Canigia, 2020). Los nódulos activos, que fijan el nitrógeno, tienen una coloración interna rosada-roja por la leghemoglobina que regula el flujo de oxígeno en el nódulo; cantidad suficiente de oxígeno para los bacteroides, pero en exceso inactiva a la nitrogenasa (Fernández-Luqueño y Espinoza-Victoria, 2008).

Se estima que entre el 50% y el 80% del total de nitrógeno que necesitan las plantas leguminosas, es fijado por FBN (Mengel *et al.*, 1987). De hecho, la cantidad de nitrógeno fijado por cultivos de leguminosas ha sido comparado con las cantidades suministradas con los fertilizantes inorgánicos (Meyer *et al.*, 2018); otro aspecto es la cantidad de nitrógeno residual, disponibles para el siguiente cultivo (Mayer *et al.*, 2003). En la interacción leguminosas-bacterias, se forman nódulos en las raíces, donde se realiza la fijación de nitrógeno que puede variar de 24 a 584 kg N ha<sup>-1</sup> y en algunos casos, abastecer hasta el 90% de los requerimientos de las plantas (Ángeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015; López-Alcocer *et al.*, 2020). Se reporta que la soya fija aproximadamente 16.6 millones de toneladas anuales de nitrógeno a nivel mundial (Hungria y Mendes, 2015); en Argentina, el promedio es de 150 kg/ha (Fernández-Canigia, 2020). En México, en un estudio conducido en la Chontalpa Tabasco; Almeida-Santos *et al.*, (2019), reportan que con *Crotalaria juncea* el aporte de nitrógeno al suelo ha sido de 151.6 kg/ha y de 173.4 kg/ha a los 40 y 60 días, respectivamente. En el sur de Florida (EUA), se reporta un aporte de nitrógeno al suelo equivalente a 145 kilos por acre (359 kg/ha) por éste cultivo y 7.0 t/acre (17.29 t/ha) de forraje verde (Wang *et al.*, 2015).

Una ventaja fisiológica que distingue al cultivo de la soya es la capacidad que tiene para la FBN por la simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*. y que le permite tener altos porcentajes de proteína (38% al 45%) que es un indicador de calidad para la alimentación humana o alimentación animal (Nápoles *et al.*, 2014).

## **2.5. Respuesta de leguminosas a la formación de nódulos en planta**

La selección de aislados o cepas es de importancia para la formación de nódulos efectivos. De nódulos de plantas de soya sin la adición de bacterias fijadoras de nitrógeno, sembradas en suelos donde se han utilizado inoculantes, se aislaron bacterias del género *Bradyrhizobium* capaces de infectar las raíces. Estas bacterias están adaptadas a las condiciones fisicoquímicas del suelo y condiciones ambientales de la región al establecer la simbiosis bacteria-leguminosa y formar nódulos efectivos en las raíces de las plantas (Ferreira *et al.*, 2022).

## **2.6. Factores que afectan la simbiosis Rhizobium-leguminosa, formación, número y tamaño de los nódulos**

La formación de nódulos en leguminosas es de importancia para que ocurra la fijación biológica de nitrógeno atmosférico; aspecto de mucha relevancia para tener sistemas de producción sustentables a mediano y largo plazo, ya que se proyecta una mayor demanda de alimentos, entre 30 y 50%, para el año 2050.

En las leguminosas para que se realice la simbiosis con los rhizobios debe existir un reconocimiento huésped-bacteria. La planta exuda ciertos compuestos que activan o atraen a los rhizobios para que invadan la raíz y posteriormente se formen los nódulos e inicie la fijación biológica del nitrógeno (FBN). La fijación de nitrógeno atmosférico puede ser afectado por factores de ambiente (Ramoneda *et al.*, 2020; Jamilah *et al.*, 2025); temperatura del suelo, salinidad, nitratos (Fernández-Pascual *et al.*, 2002); diferencias en textura y pH del suelo (Jamilah *et al.*, 2025); por la estructura del suelo (Raducu y Gherghina, 2013); diferencias en manejo de cultivos por efecto de riego (de Carvalho *et al.*, 2012); por herbicidas (Zuffo *et al.*, 2014); diferencias entre variedades (Cerezini *et al.*

2017); por el tipo de inóculo de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (Bunkura *et al.*, 2021); entre otros. Se han hecho esfuerzos para optimizar la formación de nódulos en soya a través de la modificación genética de cultivares y tener incrementos en rendimiento y calidad de semilla.

### **2.7. Efecto ambiental: Temperatura y pH del suelo**

En el cultivo de soya el pH y la temperatura del suelo afecta el número y la materia seca de los nódulos. En un suelo con pH de 4.9 se registraron menos nódulos y menor materia seca en comparación a un suelo con pH de 5.6. En cuanto al efecto de la temperatura del suelo, el número de nódulos y materia seca fue mayor a 16°C que a 10°C (Napoles *et al.*, 2014). Sin embargo, los inoculantes juegan un papel importante en aminorar esos factores, al utilizar un inoculante inducido, la disminución de nódulos y materia seca, fue menor que al utilizar un inoculante sin inducir (Napoles *et al.*, 2014). En leguminosas nativas, el número y tamaño de los nódulos estuvo relacionado con el pH, a pH ácido (4.0) se tienen menos nódulos y más pequeños que a pH de 6.8-8.0 (Bécquer y Prévost, 2014). Además, un pH ácido favorece la disponibilidad de ciertos elementos que pueden ser tóxicos para la planta y los rizobios como aluminio y manganeso (Farquharson *et al.*, 2022), pero la deficiencia de fósforo más un pH ácido afecta la nodulación (Bécquer y Prévost, 2014). La temperatura del suelo interfiere en la formación de nódulos y fijación de nitrógeno por los rizobios en los cultivos; siendo la soya sensible a esta condición por ser un cultivo de origen tropical, subtropical. Temperaturas menores de 25°C o de 17°C retrasan la fijación de nitrógeno en 2.5 y 7.5 días, respectivamente por cada grado que disminuye la temperatura (Zhang *et al.*, 1995). Altas temperaturas en el suelo, también afectan a los Rizobios, algunos mueren a los 35°C (Farquharson *et al.*, 2022).

## **2.8. Textura y estructura del suelo**

La textura del suelo es otro factor en la nodulación de leguminosas, un suelo arenoso se tienen más nódulos en las raíces, en comparación a un suelo arcilloso y un suelo limoso. En suelos franco arenosos existen más poros entre sus partículas, por lo tanto, un buen drenaje y aireación (Jamila *et al.*, 2025). Esto es importante, porque los rizobios son microorganismos aerobios (Farquharson *et al.*, 2022). En la raíz, los nódulos se distribuyen en la raíz principal y en las laterales o secundarias, si solo se encuentran en la parte superior, es probable que en las capas subyacentes la textura del suelo impida una adecuada aireación y formación de nódulos (Pommeresche y Hansen, 2017)

La estructura del suelo es la manera en la cual están dispuestos los agregados del suelo en forma y tamaño y están relacionados con la actividad de la fauna del suelo, así como con la aireación y compactación. En un estudio realizado por Raducu y Gherghina (2013), mencionan que la actividad de la macrofauna y microfauna en la superficie del suelo permite una mayor aireación que en perfiles inferiores del suelo. Esta situación permitió una mayor nodulación (número y tamaño de nódulos) en las raíces de la soya en la superficie del suelo.

## **2.9. Fertilización Inorgánica**

Otro aspecto, es la energía que la planta destina para la FBN en comparación al uso del fertilizante nitrogenado. En la FBN, la planta emplea 16 moléculas de ATP para convertir una molécula de nitrógeno ( $N_2$ ) en dos de amonio ( $NH_4$ ) (Pereyra, 2001; Buscot, 2005; Hay y Porte, 2006), y 12 moléculas más de ATP para la asimilación y transporte del  $NH_4$ , en total son 28 moléculas de ATP en la FBN (Buscot, 2005). Por cada gramo de nitrógeno fijado, la planta aporta 10 a 15 gramos de glucosa a los rizobios para transformar el  $N_2$  a  $NH_4$  (Buscot, 2005; Hay y Porte, 2006). En cambio, para transformar el nitrógeno del

suelo, la planta requiere 12 ATPs (Pereyra, 2001). En términos de eficiencia de energía, la asimilación de nitratos del suelo es de seis a ocho veces más eficiente que la FBN (Fernández-Caningia, 2020). El exceso de nitratos en el suelo inhibe la fijación biológica del nitrógeno (FBN) por los Rizobios al restringir su población, diversidad, motilidad y simbiosis con las leguminosas (Abd-Alla *et al.*, 2023). La combinación de tipo de inóculo, aplicación de fósforo y 25 kg/ha de nitrógeno, favorecieron la nodulación en soya mejorando el crecimiento de la planta, producción de semilla y absorción de nutrientes debido al potencial para fijar nitrógeno atmosférico en soya (Tahir *et al.*, 2009); sin embargo, la eficiencia en nodulación fue menor al incrementar la dosis de nitrógeno a 50 kg/ha. En otro estudio conducido por Zuffo *et al.* (2018) reportan que la oportunidad de aplicación de fertilizante nitrogenado afecta la nodulación en soya; aplicar nitrógeno a los 30 días después de la emergencia redujo la capacidad de nodulación; aplicar fertilizante nitrogenado a los 50 días después de la emergencia, mejoró la nodulación. Estos mismos autores mencionan que en soya se pueden tener altos rendimientos de grano sin aplicar fertilizante químico; con aplicaciones de 60 kg/ha de nitrógeno, no se mejoraron los componentes de rendimiento ni el rendimiento de grano.

### **2.10. Salinidad**

La salinidad y los nitratos actúan en la enzima nitrogenasa, al reducir su actividad e interfieren en la difusión de oxígeno a través de la corteza del nódulo. Los bacterioides en el nódulo requieren éste elemento para su actividad respiratoria (Fernández-Pascual *et al.*, 2002). Los herbicidas afectan a la enzima nitrogenasa, pero algunas moléculas, favorecen la fijación de nitrógeno y el rendimiento (Fernández-Pascual *et al.*, 2002).

## 2.11. Respuesta de cultivares a inoculantes de bacterias fijadoras de nitrógeno

La soya se asocia de forma natural con bacterias del género *Bradyrhizobium* para fijar nitrógeno atmosférico; dicha asociación es afectada por condiciones del suelo y condiciones de estrés a la que sea sometido el cultivo. En un estudio conducido por Nápoles *et al.* (2014), para evaluar la respuesta de la soya a la aplicación de inoculantes bajo condiciones de baja temperatura y exceso de humedad en suelo ácido, encontraron que con aplicación de inoculantes se favoreció la nodulación del cultivar Pionner 94M30 bajo condición de baja temperatura (16°C), y una condición de suelo inundado. De las condiciones de estrés estudiadas, el pH y las bajas temperaturas afectaron más la nodulación en soya.

En variedades de frijol con dos tipos de inoculantes, sin inoculante y con fertilización nitrogenada, el número de vainas por planta, semillas por vaina y rendimiento fue diferente entre variedades. Para las fuentes de nitrógeno (con inoculo, sin inóculo y fertilización inorgánica), no hubo diferencias significativas; aunque con fertilización nitrogenada se tuvo el mayor rendimiento. Esto indica que los inoculantes son una opción viable para la producción de la leguminosa sin utilizar fertilización nitrogenada (Cantaro-Segura *et al.*, 2019). En el cultivo de crotalaria, los parámetros de peso fresco y seco del follaje y de la raíz, altura y número de hojas, variaron de acuerdo al inoculo proveniente de nódulos de plantas de crotalaria silvestres e incluso superaron o igualaron a la fertilización nitrogenada (Guamán *et al.*, 2016). Las variaciones en la capacidad de nodulación en soya están relacionadas con diferencias genéticas y características propias de cada variedad (Felisberto *et al.*, 2015).

## **2.12. Fenología de leguminosas en respuesta a la inoculación y fertilización nitrogenada**

La inoculación con Rhizobios específicos para cada cultivo, ha impactado en la fenología y en componentes de rendimiento de las plantas. En variedades de soya inoculadas con productos comerciales y aislado nativo de *Rhizobium* y variedades sin inocular, se tiene respuesta diferencial a favor de la inoculación y entre variedades-tipo de inoculo en altura de planta, peso seco de planta, peso fresco y peso seco de raíz (Soto *et al.*, 2021). Estos mismos autores indican que el número de nódulos también fue dependiente de la variedad y el tipo de inoculo.

## **2.13. Número y tamaño de nódulos**

Las diferencias en tamaño y número de nódulos en las plantas también están influenciadas por los cultivos y entre los cultivos entre las variedades y los inoculantes. Los nódulos, por su crecimiento se clasifican en dos tipos: crecimiento determinado, los cuales en pocas semanas alcanzan su crecimiento máximo, tienen un período corto de vida y son de forma esférica; la soya tiene nódulos de éste tipo. Crecimiento indeterminado, la actividad meristemática es más prolongada, tienen un periodo de vida mayor y son de forma alargada, ramificada como en alfalfa y trébol (Gualtieri y Bisseling, 2000; Bianco, 2020).

Es importante optimizar el número de nódulos en leguminosas para mejorar rendimiento y calidad en leguminosa como la soya; en cultivos como frijol y chícharo, esta acción requiere más tiempo, debido a que son especies diploides y el número de genes CLE (péptidos relacionados con CLAVATA3/REGIÓN DE ENVOLVIMIENTO DEL EMBRIÓN, conocidos como CLE inducidos por rizobios (RIC), es limitado (Shen y Bisseling, 2025).

Zhong *et al* (2024) han mostrado evidencias de que un aumento moderado en el número de nódulos puede mejorar tanto la asimilación de nitrógeno como la producción de materia seca, al equilibrar las relaciones fuente demanda en soya. De esta manera se ha logrado mejorar rendimiento y contenido de proteína, indicando que aumentar el número de nódulos hasta un valor óptimo, se puede mejorar la productividad de los cultivos. Estos mismos autores reportan que al evaluar cultivares mutantes de soya con dos alelos independientes con respecto a los cultivares convencional elite, en todos los ensayos conducidos en China a través de años y localidades; tuvieron incrementos en rendimiento de grano del 10 al 31%, y porcentajes de proteína del orden del 1.77% al 4.42% sin afectar el contenido de aceite.

En frijol, el tamaño, número, peso fresco y peso seco de nódulos, estuvo condicionado por las variedades y entre estas, el tipo de inoculante usado. Las variedades de frijol con fertilización química también desarrollaron nódulos; se considera que fue debido a la simbiosis con cepas nativas, pero su porcentaje de efectividad fue menor que con los inoculantes y sin inoculantes (fertilización) (Cantaro-Segura *et al.*, 2019). En crotalaria, al inocular la semilla con cepas de rhizobium nativas, provenientes de plantas silvestres de crotalaria, la nodulación fue efectiva, pero vario el número de nódulos por planta de acuerdo al aislado utilizado (Guamán *et al.*, 2016).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Características de la Comarca Lagunera.**

La Comarca Lagunera se localiza en la parte central del Norte de México, entre los meridianos 101° y 104° longitud oeste de Greenwich y los paralelos 24° 59' y los 26° 53' latitud norte, a una altura media sobre el nivel del mar de 1,139 msnm. La región está conformada por cinco municipios del estado de Coahuila y 10 del estado de Durango. Su extensión territorial es de 47,980 km<sup>2</sup>. La clasificación del clima es BWhw"(e'), árido seco (García, 2004). Predomina el tipo de suelo de los xerosoles, típicos de las zonas secas y áridas. Los suelos son en su mayoría calcáreos. La precipitación media anual es de 230 mm y una temperatura promedio de 20-25°C

#### **3.2. Ubicación del experimento.**

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias (INIFAP)-Campo Experimental La Laguna, localizado en Matamoros, Coahuila, a 25° 53' 33" latitud norte y 103° 24' longitud oeste.

#### **3.3. Establecimiento del experimento.**

En el lote donde se estableció el experimento, previamente se sembró triticale para extraer los nutrientes residuales (blanqueo). La preparación del terreno consistió de subsoleo, arado, rastreo, nivelación y surcado a 0.65 m. La textura del suelo en el estrato 0-30 cm es arcillosa con 7.7 de pH y 1.2 dS de conductividad eléctrica.

La siembra en húmedo fue el 15 de mayo de 2023. Los riegos de auxilio fueron a los 17, 37, 57 y 73 días después de la siembra (dds).

Para evaluar el efecto de los inoculante a base de rizobium en los cultivos de soya (*Glycine max* L. variedad Nainari) y crotalaria (*Crotalaria juncea* L. cv. Común), en la

formación de nódulos, se utilizó semilla inoculada y semilla sin inocular, pero con fertilización química nitrogenada. En las parcelas con la semilla sin inocular, se fertilizó con Nitrógeno y Fosforo (250-80-00) con Novatec Solub 45 y ácido fosfórico ( $P_2O_5$ ), respectivamente. En las parcelas con semilla inoculada, solamente se aplicó ácido fosfórico (00-80-00).

### **3.4. Diseño experimental**

Bloques al azar con cuatro repeticiones, con un arreglo factorial 2X2; el factor A fue el tratamiento con inóculo de rizobios o con fertilización nitrogenada, y el factor B, las especies crotalaria y soya.

### **3.5. Inoculación de las semillas**

Previo a la siembra, las semillas de soya fueron inoculadas con la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*, con una dosis de 141.8 g por cada 22.7 kg de semilla. Para crotalaria fue con un inoculante a base de tres bacterias *Bradyrhizobium* sp. (Vigna), *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*; la dosis fue de 340 g por cada 22.68 kg de semilla.

### **3.6. Muestreo de raíces**

Fueron realizados tres muestreos en las etapas fenológicas vegetativa, inicio de floración e inicio de llenado de vaina. Para el muestreo, con una pala se hicieron zanjas alrededor de las plantas, teniendo cuidado de extraer la mayor cantidad de raíces. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico identificadas con el número de parcela. Las raíces fueron lavadas con agua, para retirar el exceso de tierra.

### **3.7. Evaluación de nódulos**

Los nódulos de las raíces, se observaron con un microscopio estereoscópico para determinar su capacidad de fijación de nitrógeno, en base a su coloración interna; los

nódulos rosa o roja, se consideran activos y los nódulos de coloración blancos o verdes, como inactivos. La coloración rosa/roja es por la leghemoglobina (Pommeresche y Hansen, 2017).

### **3.8. Tamaño de nódulos**

Los nódulos activos e inactivo, se clasificaron en tres tamaños y cuatro categorías: tamaño pequeño (Categoría 1= $\leq$ 2.00 mm; Categoría 2=2.1-3.0 mm); tamaño mediano (Categoría 3=3.1-4.0 mm) y tamaño grande (Categoría 4= $\geq$ 4.1 mmm). Para medir los nódulos se utilizó un Vernier.

### **3.9. Fenología**

En los cultivos de crotalaria y soya con semilla inoculada o con fertilización nitrogenada, se registraron los días requeridos, desde la siembra, hasta la etapa vegetativa (V8-ocho hojas) y las etapas reproductivas de inicio de floración e inicio de llenado de vaina. Se registró también la altura de las plantas.

### **3.10. Análisis de datos**

Con los porcentajes de nódulos activos e inactivos, y tamaños de nódulos activos e inactivos por muestreo; al igual que los datos de fenología, se realizaron análisis de varianza, para comparar las medias se utilizó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Previo al análisis, los datos de porcentajes, se transformaron con el arcoseno de la raíz cuadrada, para que la varianza fuera más constante. El análisis fue realizado con el programa estadístico SAS versión 9.3 (SAS Institute, 2011).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Primer muestreo: Etapa vegetativa

#### 4.1.1. Porcentaje de nódulos activos e inactivos

En el muestreo de raíces realizado durante la fase vegetativa, a los  $\text{dds}$ , el análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas dentro de los niveles del factor A; y diferencias significativas en los diferentes niveles de B, y para la interacción AxB. En éste muestreo solamente se formaron nódulos activos o inactivos en el tratamiento con inoculación de bacterias, no habiendo respuesta al tratamiento de fertilización química para la formación de nódulos. Con inoculación de semilla, se tuvo un 75.87% de nódulos activos mientras que, con fertilización química, no hubo respuesta a la formación de nódulos. En los cultivos bajo estudio, la soya superó a la crotalaria en la formación de nódulos activos, observando una diferencia del 14.95% a favor de la soya (Cuadro 1).

En relación a los nódulos inactivos, solamente se observaron al igual que los nódulos activos, en el tratamiento de inoculación de la semilla con un 24.12%. En ésta etapa, los nódulos activos superaron a los nódulos inactivos en un 51.75%. En referencia a los cultivos, en crotalaria hubo mayor porcentaje de nódulos inactivos que en soya (19.53 vs 4.58%).

**Cuadro 1** Porcentaje de nódulos activos e inactivos en la etapa vegetativa en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	NÓDULOS	
	ACTIVOS	INACTIVOS
<b>Inoculación</b>	75.87a <sup>1</sup>	24.12a
<b>Fertilización</b>	0.0b	0.0b
<b>Soya</b>	45.41a	4.58b
<b>Crotalaria</b>	30.46b	19.53a
<b>A</b>	**	**
<b>B</b>	*	*
<b>AxB</b>	*	*
<b>CV</b>	15.3969	26.63664
<b>R<sup>2</sup></b>	0.980372	0.92
<b>DMS Tukey</b>	0.1239	0.1239

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

Para la interacción A X B; el análisis mostró que el efecto de los tratamientos sobre la formación de nódulos no fue independiente ya que hubo una respuesta diferencial de los cultivos a los niveles de fertilización o inoculación probados. La formación de nódulos durante la fase vegetativa solamente ocurrió cuando la semilla ha sido inoculada con bacterias fijadoras de nitrógeno (Cuadro 1, Cuadro 2).

El cultivo de soya fue estadísticamente diferente a la crotalaria en cuanto al porcentaje de nódulos activos, superándola en un 29.9%. En contraparte, el porcentaje de nódulos inactivos fue mayor en crotalaria que en soya. Los nódulos activos e inactivos, solo se presentaron cuando se utilizaron los inóculos a base de bacteria fijadoras de nitrógeno en ambos cultivos (Cuadro 2).

**Cuadro 2** Porcentaje de nódulos (activos e inactivos) para la interacción inoculación-fertilización X cultivos en la etapa vegetativa en los cultivos bajo evaluación. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	SOYA	CROTALARIA
<b>NÓDULOS ACTIVOS</b>		
<b>Inoculación</b>	90.82Aa <sup>1</sup>	60.92Ab
<b>Fertilización</b>	0.0Ba	0.0Ba
<b>NÓDULOS INACTIVOS</b>		
<b>Inoculación</b>	9.17Ab	39.07Aa
<b>Fertilización</b>	0.0Aa	0.0Ba

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ); letras mayúsculas en cada columna, son para comparar entre tratamientos de inoculación-fertilización de nódulos activos y de nódulos inactivos; letras minúsculas entre hileras, son para comparar medias de nódulos activos y medias de nódulos inactivos entre especies.

#### 4.1.2. Tamaño de los nódulos

Debido a que hubo diferencias entre especies leguminosas para que ocurriera la nodulación, se procedió a agrupar los nódulos de acuerdo a su tamaño. Esta variable es de importancia ya que está asociada con condiciones del suelo, de ambiente, de la especie de cultivo, incluso de la variedad, tipo y la densidad de rizobios en suelo, al influir en la cantidad de nódulos que se pueden formar.

#### 4.1.3. Porcentaje de nódulos activos

El tamaño de nódulos activos formados durante la fase vegetativa mostró diferencias estadísticas solamente a nivel del factor A, en tres de las cuatro categorías de nódulos consideradas (Cuadro 3). En el mismo cuadro, se muestra que los nódulos de tamaño pequeño categoría 1 (< 2.0 mm) y categoría 2 (2.1-3.0 mm); superaron en promedio en un 60% a los nódulos de tamaño mediano (3.1-4.0 mm), ya que el porcentaje de nódulos

medianos representó el 40% del promedio de nódulos pequeños. La diferencia entre las categorías 1 y 2 de tamaño pequeño ha sido del 20.47% a favor de la categoría 1. Aunque no hubo diferencias estadísticas a niveles del factor B, el cultivo de crotalaria tuvo un mayor porcentaje de nódulos pequeños, principalmente de la categoría 2, que el cultivo de soya. En soya, el porcentaje de nódulos medianos fue mayor que en crotalaria. Ninguna especie formó nódulos de tamaño grande (Cuadro 3). No hubo formación de nódulos de tamaño grande (> 4.0 mm) por efecto de inoculación /fertilización, ni por efecto de cultivos.

**Cuadro 3** Porcentaje de nódulos activos por tamaño en la etapa vegetativa en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>NODULOS ACTIVOS</b>			
	<b>PEQUEÑOS</b>		<b>MEDIANOS</b>	<b>GRANDES</b>
	<b>Categoría 1</b> <b>(&lt;0.2 mm)</b>	<b>Categoría 2</b> <b>(2.1 – 3.0 mm)</b>	<b>Categoría 3</b> <b>(3.1 – 4.0 mm)</b>	<b>Categoría 4</b> <b>(&gt; 4.1 mm)</b>
<b>Inoculación</b>	52.05a <sup>1</sup>	31.58a	16.41a	0.0
<b>Fertilización</b>	0.0 b	0.0 b	0.0 a	0.0
<b>Soya</b>	24.85 a	9.01 a	16.15 a	0.0
<b>Crotalaria</b>	27.20 a	22.56 a	0.26 a	0.0
<b>A</b>	*	*	ns	-
<b>B</b>	ns	ns	ns	-
<b>AxB</b>	ns	ns	ns	-
<b>CV</b>	78.84993	59.94012	55.16457	-
<b>R<sup>2</sup></b>	0.57564	0.672297	0.762167	-
<b>DMS Tukey</b>	0.5067	0.3121	0.2235	-

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

#### 4.1.4. Porcentaje de nódulos inactivos

Para la formación de nódulos inactivos, solamente hubo respuesta a la aplicación de inóculo en el porcentaje de nódulos pequeños categoría 1 (>2.0 mm), y en el porcentaje de nódulos medianos (3.1-4.0 mm), destacando la formación de nódulos pequeños con un 71.88% (Cuadro 4). En el mismo cuadro se muestra la falta de respuesta de las especies probadas, ya que no hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de nódulos inactivos formados; sin embargo, se observó un mayor porcentaje de nódulos pequeños en crotalaria, y solo en este cultivo se registraron nódulos de tamaño mediano.

**Cuadro 4** Porcentaje de nódulos inactivos por tamaño (categorías 1, 2, 3, 4) en la etapa vegetativa en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>NODULOS INACTIVOS</b>			
	<b>PEQUEÑOS</b>		<b>MEDIANOS</b>	<b>GRANDES</b>
	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>	<b>Categoría 3</b>	<b>Categoría 4</b>
	<b>(&lt;0.2 mm)</b>	<b>(2.1 – 3.0 mm)</b>	<b>(3.1 – 4.0 mm)</b>	<b>(&gt; 4.1mm)</b>
<b>Inoculación</b>	71.88a <sup>1</sup>	0.0	3.12a	0.0
<b>Fertilización</b>	0.0b	0.0	0.0a	0.0
<b>Soya</b>	25.00a	0.0	0.0a	0.0
<b>Crotalaria</b>	46.88a	0.0	3.12a	0.0
<b>A</b>	*	-	ns	-
<b>B</b>	ns	-	ns	-
<b>AxB</b>	ns	-	ns	-
<b>CV</b>	97.01425	-	400	-
<b>R<sup>2</sup></b>	0.793939	-	0.6	-
<b>DMS Tukey</b>	0.6603	-	0.1602	-

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

## **4.2. Segundo muestreo: Etapa inicio de floración**

### **4.2.1. Porcentaje de nódulos activos e inactivos**

En el muestreo realizado al inicio de floración, el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas en los niveles del factor A, no hubo diferencias entre niveles del factor B, ni para la interacción AxB. Se tuvo un alto porcentaje en el total de nódulos activos (incluyendo todas las categorías) cuando fue aplicado el inoculante a la semilla, consecuentemente fueron capaces de invadir las raíces y formar los nódulos tanto en soya como en crotalaria, aunque sean inoculantes con cepas específicas para cada cultivo. El uso de inoculantes bacterianos superó al tratamiento con fertilización química en 85.75% en la formación de nódulos activos totales (Cuadro 5).

En cuanto a nódulos inactivos, aunque no fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos del factor A, con inoculación se tuvo un 12.34% de nódulos totales, y con fertilización química un 23.08%, superando en 10.74% el tratamiento con inoculación. El porcentaje promedio de nódulos activos entre cultivos fue de 45.5% y de un 17.6% para nódulos inactivos (Cuadro 5). La falta de interacción AxB indica que no hubo un efecto aditivo para la formación total de nódulos con la aplicación combinada de inoculante/ fertilización y tipo de cultivos evaluados. En éste muestreo de inicio de floración, se detectaron nódulos activos e inactivos tanto en la inoculación con bacterias como con la fertilización química, pero con un porcentaje mayor de nódulos activos, a favor del tratamiento de inoculación con las bacterias (Cuadro 5).

**Cuadro 5** Porcentaje de nódulos activos e inactivos en la etapa reproductiva de inicio de floración en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	NÓDULOS	
	ACTIVOS	INACTIVOS
<b>Inoculación</b>	87.67a <sup>†</sup>	12.34a
<b>Fertilización</b>	1.92b	23.08a
<b>Soya</b>	45.05a	17.46a
<b>Crotalaria</b>	44.55a	17.95a
<b>A</b>	**	ns
<b>B</b>	ns	ns
<b>AxB</b>	ns	ns
<b>CV</b>	8.944463	94.57929
<b>R<sup>2</sup></b>	0.992652	0.376403
<b>DMS Tukey</b>	0.0809	0.4997

<sup>†</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ). \*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

#### 4.2.2. Tamaño de los nódulos

#### 4.2.3. Porcentaje de nódulos activos

Con respecto al porcentaje de nódulos activos al inicio de floración, se tuvo registro en todas las categorías o tamaños de los nódulos. Hubo diferencias altamente significativas en el factor A para el porcentaje de nódulos tamaño pequeño categoría 2 (2.1-3.0 mm); y diferencias significativas para el porcentaje de nódulos activos de tamaño mediano (3.1-4.0 mm) y grande (>4.1 mm); todos a favor del tratamiento de inoculación con respecto al tratamiento de fertilización química (Cuadro 6).

Por otra parte, el análisis estadístico indicó diferencias significativas dentro de los niveles del factor B; y para la interacción AxB solamente para el porcentaje de nódulos activos de tamaño grande (Cuadro 6). Debido a que no hubo independencia de factores de estudio para la formación de nódulos de tamaño grande, esta variable depende tanto del

tratamiento como de los cultivares evaluados. En los tamaños de nódulos pequeños (categoría 1 y categoría 2) y medianos; aunque no hubo diferencias estadísticas entre soya y crotalaria, fue en crotalaria donde se tuvo un mayor porcentaje de estas categorías (59.78 vs 32.03%) (Cuadro 6).

**Cuadro 6** Porcentaje de nódulos activos por tamaño en la etapa reproductiva de inicio de floración en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>NODULOS ACTIVOS</b>			
	<b>PEQUEÑOS</b>		<b>MEDIANOS</b>	<b>GRANDES</b>
	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>	<b>Categoría 3</b>	<b>Categoría 4</b>
	<b>(&lt;0.2 mm)</b>	<b>(2.1 – 3.0 mm)</b>	<b>(3.1 – 4.0 mm)</b>	<b>(&gt; 4.1 mm)</b>
<b>Inoculación</b>	44.60a <sup>1</sup>	20.12a	14.10a	21.17a
<b>Fertilización</b>	12.50a	0.0b	0.0b	0.0b
<b>Soya</b>	13.65a	7.92a	10.46a	17.96a
<b>Crotalaria</b>	43.45a	12.20a	3.63a	3.21b
<b>A</b>	ns	**	*	*
<b>B</b>	ns	ns	ns	*
<b>AxB</b>	ns	ns	ns	*
<b>CV</b>	55.14554	14.55218	40.26441	31.15402
<b>R<sup>2</sup></b>	0.724617	0.943716	0.691531	0.871032
<b>DMS Tukey</b>	0.3756	0.0629	0.1494	0.1324

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

En el porcentaje de nódulos de tamaño grande activos, los tratamientos no fueron independientes, hubo interacción de la inoculación de semillas con bacterias y la fertilización química; así como de los cultivos. En soya se tuvo un 35.92% de nódulos cuando se trataron las semillas con el inóculo de las bacterias fijadoras de nitrógeno. No

se tuvo formación de nódulos grandes en el tratamiento de fertilización en ambas especies. También la soya fue diferente estadísticamente de la crotalaria en cuanto al porcentaje de nódulos grandes, en este cultivo se tuvo un 29.5% más de nódulos de esa categoría (35.92 vs 6.42%) (Cuadro 7). La aplicación de inóculo de bacterias en soya favoreció la formación de nódulos de tamaño grande con un 35.92% del total de nódulos formados a inicio de floración. En crotalaria se tuvo la misma respuesta con respecto a la inoculación de la semilla, sin embargo, la respuesta fue de menor magnitud que la que se presentó en soya ya que solamente se tuvo un 6.42% de nódulos de tamaño grande (Cuadro 7). En el mismo cuadro se observa que la soya respondió mejor que la crotalaria para la formación de nódulos de tamaño grande en respuesta a la inoculación de semilla con bacterias fijadoras de nitrógeno. Tal vez sea una respuesta a la especificidad del inóculo utilizado en cada especie.

**Cuadro 7** Interacción AxB (inoculación con bacterias/fertilización X cultivos de soya/crotalaria) para el porcentaje de nódulos activos de tamaño grande (categoría 4). Ciclo primavera-verano de 2023. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	SOYA	CROTALARIA
	<b>NÓDULOS GRANDES (&gt;4.1 mm)</b>	
<b>Inoculación</b>	35.92Aa <sup>1</sup>	6.42Ab
<b>Fertilización</b>	0.0Ba	0.0Aa

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ); letras mayúsculas en cada columna, son para comparar entre tratamientos de inoculación-/fertilización de nódulos activos. Letras minúsculas entre hileras, son para comparar medias de nódulos activos de tamaño grande entre especies.

#### **4.2.4. Porcentaje de nódulos inactivos**

No hubo respuesta a los tratamientos evaluados para el porcentaje de nódulos inactivos a ningún nivel del factor A, del factor B, ni para la interacción AxB (Cuadro 8). No obstante, a la no significancia estadística, en éste muestreo se observó que, con la inoculación con bacterias, se tuvo un mayor porcentaje en el tamaño de nódulos en las cuatro categorías consideradas en este estudio, con respecto a la fertilización química. De manera general, con la inoculación de las semillas, se tuvo un mayor porcentaje de nódulos inactivos que con la fertilización nitrogenada; y en cuanto a los cultivos, crotalaria mostro un mayor porcentaje de nódulos inactivos que la soya (Cuadro 8).

En soya y crotalaria, también predominaron los nódulos pequeños (categorías 1 y 2), pero en mayor porcentaje en crotalaria superando a la soya en un 18.35%; y entre las dos categorías se tuvo un mayor porcentaje de nódulos menores de 2.0 mm (categoría 1). Los nódulos medianos y grandes, tuvieron valores similares en los dos cultivos, con un margen de mayor diferencia para los nódulos grandes en crotalaria, con 2.48% más que en soya (Cuadro 8).

**Cuadro 8** Porcentaje de nódulos inactivos por tamaño en la etapa reproductiva de inicio de floración en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>NODULOS INACTIVOS</b>			
	<b>PEQUEÑOS</b>		<b>MEDIANOS</b>	<b>GRANDES</b>
	<b>Categoría 1</b> <b>(&lt;2.0 mm)</b>	<b>Categoría 2</b> <b>(2.1 – 3.0 mm)</b>	<b>Categoría 3</b> <b>(3.1 – 4.0 mm)</b>	<b>Categoría 4</b> <b>(&gt; 4.1mm)</b>
<b>Inoculación</b>	60.20a <sup>1</sup>	21.15a	1.75a	4.37a
<b>Fertilización</b>	22.73a	0.0a	0.0a	2.27a
<b>Soya</b>	32.29a	14.58a	1.03a	2.08a
<b>Crotalaria</b>	50.64a	6.56a	0.73a	4.56a
<b>A</b>	ns	ns	ns	ns
<b>B</b>	ns	ns	ns	ns
<b>AxB</b>	ns	ns	ns	ns
<b>CV</b>	106.4937	134.0174	327.2191	132.3741
<b>R<sup>2</sup></b>	0.622823	0.849906	0.431342	0.805051
<b>DMS Tukey</b>	0.8215	0.3142	0.1345	0.1454

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

### 4.3. Tercer muestreo: Etapa inicio de llenado de vainas

#### 4.3.1. Porcentaje de nódulos activos e inactivos

En éste muestreo hubo diferencias altamente significativas para el porcentaje de nódulos activos entre niveles del factor A y para la interacción A x B; no hubo diferencia entre especies de cultivos (Cuadro 9). La inoculación de semilla con bacterias de *Rhizobium* formó un 55.88% más de nódulos activos que el tratamiento de fertilización química (Cuadro 9); con la inoculación de las semillas se registraron 73.66% de nódulos activos y con fertilización química 17.78%. En el mismo cuadro se muestra que en contraparte, hubo mayor porcentaje de nódulos inactivos en el tratamiento de fertilización química,

aún y cuando no fueron detectadas diferencias estadísticas. El porcentaje promedio de nódulos activos y nódulos inactivos entre las especies evaluadas fue de 45.72% y de 35.52%, respectivamente; superando en ambas categorías de nódulos, la crotalaria a la soya.

**Cuadro 9** Porcentaje de nódulos activos e inactivos en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	NÓDULOS	
	ACTIVOS	INACTIVOS
<b>Inoculación</b>	73.66a <sup>i</sup>	26.34a
<b>Fertilización</b>	17.78b	44.71a
<b>Soya</b>	41.13a	21.36a
<b>Crotalaria</b>	50.31a	49.69a
<b>A</b>	**	ns
<b>B</b>	ns	ns
<b>AxB</b>	*	ns
<b>CV</b>	24.61152	41.24744
<b>R<sup>2</sup></b>	0.911606	0.787269
<b>DMS Tukey</b>	0.2232	0.3178

<sup>i</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

La significancia en la interacción AxB, indica que la formación de nódulos activos depende del efecto combinado de la inoculación/fertilización y de la especie de cultivo que se trate. Tanto la soya como la crotalaria respondieron mejor a la inoculación de semilla con *Rhizobium* que a la fertilización nitrogenada. En soya la formación de nódulos activos tuvo un 82.27% de nódulos formados y superó a crotalaria en 17.22%, en esta variable,

aunque estadísticamente, no hay diferencias entre los dos cultivos (Cuadro 10). En crotalaria se tuvo un mayor porcentaje de nódulos activos con inoculación, con respecto a la fertilización química ya que formó un 29.48% más de nódulos activos que éste. En soya no se registraron nódulos con la fertilización nitrogenada (Cuadro 10).

**Cuadro 10** Interacción AxB (inoculación con bacterias/fertilización X cultivos de soya/crotalaria) para el porcentaje de nódulos activos. Ciclo primavera-verano de 2023. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	SOYA	CROTALARIA
	<b>NÓDULOS ACTIVOS</b>	
<b>Inoculación</b>	82.27Aa <sup>1</sup>	65.05Aa
<b>Fertilización</b>	0.0Ba	35.57Bb

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ); letras mayúsculas en cada columna, son para comparar entre tratamientos de inoculación-fertilización de nódulos activos; letras minúsculas entre hileras, son para comparar medias de nódulos activos entre especies.

#### 4.3.2. Tamaño de nódulos

#### 4.3.3. Porcentaje de nódulos activos

Para el tamaño de nódulos activos, el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas en el porcentaje de nódulos pequeños categoría 1 entre niveles del factor B. Hubo diferencias significativas para nódulos de tamaño mediano para la interacción A x B; y para el porcentaje de nódulos de tamaño grande hubo diferencias estadísticas en los niveles de A, niveles de B y para la interacción A x B (Cuadro 11). En el porcentaje de nódulos pequeños y medianos, los valores de los nódulos en el tratamiento de inoculación, son mayores a los de fertilización, pero sin diferencias estadísticas, predominando los pequeños categoría 1 (<2.0 mm). Solo en los nódulos grandes (>4.1

mm), su porcentaje es diferente entre inocular o fertilizar, con mayor porcentaje de este tipo de nódulos cuando se inocula la semilla (25.23 vs 7.77%) (Cuadro 11). Para los cultivos de soya y crotalaria, el porcentaje de nódulos pequeños categoría 1, fue diferente al de crotalaria con 49% más de ésta categoría, que en soya. Para los nódulos grandes, la diferencia a favor de soya fue del 14.96% (Cuadro 11).

En crotalaria también predominaron esos tamaños de nódulos en comparación a la soya, confirmando la respuesta de este cultivo para la formación de nódulos que se han venido tratando o presentando en este trabajo (Cuadro 11).

**Cuadro 11** Porcentaje de nódulos activos por tamaño (categoría 1, 2, 3, 4) en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>NODULOS ACTIVOS</b>			
	<b>PEQUEÑOS</b>		<b>MEDIANOS</b>	<b>GRANDES</b>
	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>	<b>Categoría 3</b>	<b>Categoría 4</b>
	<b>(&lt;2.0 mm)</b>	<b>(2.1 – 3.0 mm)</b>	<b>(3.1 – 4.0 mm)</b>	<b>(&gt; 4.1mm)</b>
<b>Inoculación</b>	46.86a <sup>1</sup>	16.42a	11.47a	25.23a
<b>Fertilización</b>	14.14a	8.33a	5.00a	7.77b
<b>Soya</b>	6.00b	10.00a	10.01a	23.98a
<b>Crotalaria</b>	55.00a	14.76a	6.46a	9.02b
<b>A</b>	ns	ns	ns	*
<b>B</b>	**	ns	ns	*
<b>AxB</b>	ns	ns	*	**
<b>CV</b>	48.28566	50.55903	25.51741	30.06488
<b>R<sup>2</sup></b>	0.832737	0.57187	0.791615	0.887064
<b>DMS Tukey</b>	0.3393	0.2355	0.1006	0.1567

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).  
\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

Al igual que el muestreo realizado durante etapa reproductiva al inicio de floración, en éste muestreo de inicio de llenado de vainas, los porcentajes de nódulos de tamaño mediano y tamaño grande en soya, superaron al tratamiento de fertilización nitrogenada (Cuadro 12).

Los nódulos medianos y grandes, en soya solo se detectaron cuando se inoculó la semilla, registrándose 20.02% y 47.97%, respectivamente de ellos; en crotalaria se tuvo mayor cantidad de nodulos medianos en el tratamiento de fertilización nitrogenada con 10.0%, que cuando se inoculó la semilla (2.92%) (Cuadro 12).

En lo que respecta al cultivo de crotalaria, se registraron porcentajes mayores de nódulos activos de tamaño mediano (10.0%) con fertilización nitrogenada, que cuando se inoculó la semilla (2.92%) (Cuadro 12); aunque siguen representando valores menores cuando se les compara con los porcentajes de nódulos que se tuvieron en el cultivo de la soya (Cuadro 12).

En los nódulos grandes, se observó la misma tendencia que con nódulos de tamaño mediano; solamente nódulos con la inoculación en soya con un 47.97%, en crotalaria mayor porcentaje de nódulos en la fertilización nitrogenada 15.55%, pero sin deiferencias estadísticas con la inoculación (2.50%). Entre especies, la soya supera a la crotalaria (47.97% vs 2.50%) (Cuadro 12).

**Cuadro 12** Interacción AxB para el porcentaje de nódulos activos de tamaño mediano y grande en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	SOYA	CROTALARIA	SOYA	CROTALARIA
	MEDIANOS (3.1-4.0 mm) Categoría 3		GRANDES (>4.1 mm) Categoría 4	
<b>Inoculación</b>	20.02Aa <sup>i</sup>	2.92Ab	47.97Aa	2.50Ab
<b>Fertilización</b>	0.00Ba	10.00Ba	0.00Ba	15.55Aa

<sup>i</sup>Medias seguidas con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ); letras mayúsculas en cada columna, son para comparar entre tratamientos de inoculación-fertilización de nódulos activos; letras minúsculas entre hileras, son para comparar medias de nódulos activos entre especies.

#### 4.3.3. Porcentaje de nódulos inactivos

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas en el porcentaje de nódulos pequeños en las dos categorías entre especies de cultivos (factor B); y diferencias significativas en niveles del factor A, factor B y para la interacción A x B en el porcentaje de nódulos de tamaño grande (Cuadro 13). De manera general se puede decir que la formación de nódulos promediando sobre especies de cultivo, y en base a los porcentajes registrados, la tendencia para la formación de nódulos sería formar nódulos pequeños, nódulos grandes, y nódulos de tamaño mediano. En todas las categorías de nódulos, se tuvo mayor respuesta cuando se aplicó inoculante con *Rhizobium*, a excepción de los nódulos pequeños categoría 2 (Cuadro 13).

**Cuadro 13** Porcentaje de nódulos inactivos por tamaño (categoría 1, 2, 3, 4) en la etapa reproductiva de inicio de crecimiento de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>NODULOS INACTIVOS</b>			
	<b>PEQUEÑOS</b>		<b>MEDIANOS</b>	<b>GRANDES</b>
	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>	<b>Categoría 3</b>	<b>Categoría 4</b>
	<b>(&lt;0.2 mm)</b>	<b>(2.1 – 3.0 mm)</b>	<b>(3.1 – 4.0 mm)</b>	<b>(&gt; 4.1mm)</b>
<b>Inoculación</b>	33.40a <sup>1</sup>	22.63a	10.73a	31.75a
<b>Fertilización</b>	23.69a	27.68a	3.27a	7.83b
<b>Soya</b>	7.23b	12.76b	7.20a	35.30a
<b>Crotalaria</b>	49.86a	37.54a	6.81a	4.28b
<b>A</b>	ns	ns	ns	*
<b>B</b>	**	*	ns	*
<b>AxB</b>	ns	ns	ns	*
<b>CV</b>	57.30611	67.70134	137.8256	59.01658
<b>R<sup>2</sup></b>	0.818949	0.726369	0.527775	0.894548
<b>DMS Tukey</b>	0.3332	0.3604	0.2923	0.2514

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

En el Cuadro 14 se indican los resultados de la interacción de los factores AxB para los nódulos inactivos de tamaño grande. El cultivo de la soya presentó un mayor porcentaje de nódulos inactivos, y se observó la misma tendencia que para la formación de nódulos activos en el sentido de que se tiene mayor respuesta con la inoculación de la semilla con bacterias de Rhizobium, con respecto al cultivo de crotalaria.

**Cuadro 14** Porcentaje de nódulos inactivos de tamaño grande (categoría 4)) en la etapa reproductiva de inicio de llenado de vaina en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	SOYA	CROTALARIA
	GRANDES (>4.1 mm) Categoría 4	
<b>Inoculación</b>	58.10Aa <sup>†</sup>	5.40Ab
<b>Fertilización</b>	12.50Ba	3.17Aa

<sup>†</sup>Medias seguidas con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ); letras mayúsculas en cada columna, son para comparar entre tratamientos de inoculación-fertilización de nódulos inactivos; letras minúsculas entre hileras, son para comparar medias de nódulos inactivos entre especies.

#### 4.4. Fenología

Los días para la ocurrencia de la fase vegetativa (ocho hojas), a inicio de floración, e inicio de crecimiento de vainas; así como la altura de planta; no fueron afectados por los tratamientos de inoculación/fertilización, tal y como mostraron los análisis estadísticos (Cuadro 15). Se tuvo una respuesta diferencial entre los cultivos evaluados, observándose que la soya fue más tardía para llegar a cada etapa de desarrollo con respecto a crotalaria, lo cual puede representar una ventaja dentro del sistema de producción de forrajes para la Comarca Lagunera. Lo anterior indica que la crotalaria tiene un ciclo de cultivo más corto y mayor porte de plantas que la soya, explicándose esta respuesta por la altura de planta registrada.

**Cuadro 15** Días después de la siembra a las etapas vegetativa (ocho hojas-V8), inicio de floración (IF) e inicio de crecimiento de vaina (ICV) y altura en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>V8</b>	<b>IF</b>	<b>ICV</b>	<b>ALTURA</b>
	<b>Días después de la siembra</b>			<b>cm</b>
<b>Inoculación</b>	31.5a <sup>1</sup>	46.00a	59.50a	121.96a
<b>Fertilización</b>	29.50a	45.50a	59.37a	121.06a
<b>Soya</b>	40.62a	49.62a	68.00a	94.83b
<b>Crotalaria</b>	20.37b	41.87b	50.87b	148.18a
<b>A</b>	ns	ns	ns	ns
<b>B</b>	**	**	**	**
<b>AxB</b>	*	ns	ns	ns
<b>CV</b>	5.75718	2.891531	1.800944	8.861227
<b>R<sup>2</sup></b>	0.989429	0.959459	0.994213	0.946444
<b>DMS Tukey</b>	21	16	13	13

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra en cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ).

\*Significativo (0.01), \*\*Altamente significativo (0.001); ns: no significativo.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas solamente en la fase vegetativa para la interacción AxB. En soya se requirieron 43 dds con el tratamiento de inoculación a la semilla, para que las plantas tuvieran ocho hojas (V8); 4.7 días más que con la fertilización nitrogenada (Cuadro 16). En cada nivel de inoculación /fertilización, la soya necesitó más tiempo que crotalaria para llegar a la etapa de ocho hojas; resultado de las diferencias interespecíficas que distinguen a cada cultivo en la aparición de cada etapa de desarrollo.

**Cuadro 16** Días después de la siembra a la etapa vegetativa (V8), en los cultivos de soya y crotalaria con inoculación de bacterias fijadores de nitrógeno o con fertilización nitrogenada. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2023.

	<b>SOYA</b>	<b>CROTALARIA</b>
<b>Inoculación</b>	43.00Aa <sup>1</sup>	20.00Ab
<b>Fertilización</b>	38.25Ba	20.75Ab

<sup>1</sup>Medias seguidas con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey  $\leq 0.05$ ); letras mayúsculas en cada columna, son para comparar entre tratamientos de inoculación-fertilización en días requeridos para la fase vegetativa; letras minúsculas entre hileras, son para comparar medias de días requeridos para la fase vegetativa entre especies.

## 5. DISCUSIÓN

La inoculación de semilla con bacterias fijadoras de nitrógeno específicas para inducir la nodulación en soya y crotalaria en la Comarca Lagunera, mostró beneficios ya que se tuvieron diferencias con respecto a la fertilización con nitrógeno en dosis de 250 kg/ha y 80 kg/ha de fósforo. La bondad de aplicación del inóculo se pudo observar ya que en ambos cultivos se tuvo formación de nódulos activos tal y como lo indica la igualdad estadística en esta variable. En soya, la forma de los nódulos era redonda o esférica con crecimiento determinado; en crotalaria de forma lobular de crecimiento indeterminado (Gualtieri y Bisseling, 2000; Bianco, 2020) La respuesta de la soya a la fertilización o inoculación con bacterias para fijación de nitrógeno podría ser de utilidad en suelos poco fértiles y con poca fijación de nitrógeno; como los que se tienen en la Comarca Lagunera (parte de los estados de Coahuila y Durango) que se caracterizan por tener bajos contenidos de materia orgánica.

La respuesta en leguminosas para mejorar rendimiento de grano a la aplicación de fertilización ha sido inconsistente. Al respecto, se ha encontrado una correlación negativa entre la aplicación de fertilizante nitrogenado con la capacidad de nodulación; fijación de nitrógeno, y rendimiento de grano en soya (Salvagiotti *et al.*, 2008; Salvagiotti *et al.*, 2009; Wesley, 1998). Salvagiotti *et al.* (2008) mencionan que bacterias fijadoras de nitrógeno pueden suministrar entre el 50 y 60% de nitrógeno en soya pero que se fija menos nitrógeno al incrementar la fertilización nitrogenada. Abd-Alla *et al.* (2023) indican que el exceso de nitratos en el suelo inhibe la fijación biológica del nitrógeno por Rhizobios al reducir su población y capacidad simbiótica en soya. Con la aplicación de fósforo y 25 kg /ha de nitrógeno, se ha reportado mejoras en nodulación; crecimiento de planta, rendimiento de grano y absorción de nutrientes en soya; sin embargo, la eficiencia en la

formación de nódulos disminuyó al incrementar la dosis de nitrógeno (Mahmood *et al.*, 2009); dosis superiores a 50 kg/ha de nitrógeno no mejoraron la nodulación. Zuffo *et al.* (2018) reportan que en soya se pueden tener altos rendimientos de grano sin aplicar fertilizante y que una dosis de 60 kg/ha de nitrógeno no mejoraron su rendimiento. Por su parte Soto y Álvarez (2021), mencionan que en soya se ha incrementado la altura de planta, peso seco de planta y peso seco de raíz, así como tener una mayor masa vegetativa al aplicar biofertilizantes con *Bradyrhizobium*.

Algunos investigadores han aplicado cantidades ilimitadas de fertilizante nitrogenado para evaluar la dependencia de la soja de la FBN. Wilson *et al.* (2014) suministraron 500 kg/ha de nitrógeno en dos aplicaciones y mencionan que se tuvieron ganancias en rendimiento en cultivares modernos de soya debido a la respuesta en aplicación de fertilizante y al impacto del mejoramiento genético que se ha tenido en este cultivo y que de manera paralela al mejorar para alto rendimiento, también se tuvieron avances en la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico; expresando este efecto en la eficiencia para la formación de nódulos en las raíces de soya. Estos mismos autores proyectaron ganancias en rendimiento de soya de 3.23 kg/ha/año durante el periodo 1923 a 2008, lo que resultaría en un impacto de mejoramiento genético de 85 kg/ha Cafaro *et al.* (2017) al aplicar altas dosis de nitrógeno en cinco aplicaciones (295 a 775 kg/ha), encontraron mayor rendimiento de grano, número y peso de semilla y biomasa aérea. En un estudio subsecuente (Cafaro *et al.*, 2020) reportaron que con altas dosis de nitrógeno se tuvieron valores mayores de índice de área foliar, crecimiento del cultivo, acumulación de nitrógeno y eficiencia en el uso de radiación, logrando una mayor producción y rendimiento. Estos autores mencionan que la falta de bacterias fijadoras de nitrógeno nativas y nitrógeno en el suelo, limitó el rendimiento de la soya.

En este ensayo, la respuesta a la inoculación en la formación de nódulos activos fue mayor al inicio de la floración con un 87.6%, porcentaje mayor que durante la fase vegetativa y la fase reproductiva; en relación a los tamaños de nódulos, la soya tuvo menor porcentaje de nódulos pequeños que crotalaria, y mayor porcentaje de nódulos medianos y grandes en floración e inicio de llenado de vaina. Los nódulos tienen un periodo de vida determinado y la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico puede variar durante el ciclo del cultivo (Fernández-Luqueño y Espinoza-Victoria, 2008). Condiciones de estrés o de ambiente desfavorable también pueden afectar la simbiosis Rhizobium-leguminosas y consecuentemente la fijación de nitrógeno (Fernández-Pascual *et al.*, 2002). En su artículo de revisión sobre fertilización nitrogenada en soya, Salvagiotti *et al.* (2008) indican que programar aplicaciones de nitrógeno puede aumentar el rendimiento ya que evitan que se inhiba la formación de nódulos. Zuffo *et al.* (2018) reportan que la oportunidad de aplicación de fertilizante nitrogenado afecta la nodulación en soya; aplicar nitrógeno a los 30 días después de la emergencia redujo la capacidad de nodulación; aplicar fertilizante nitrogenado a los 50 días después de la emergencia, mejoró la nodulación. Estos mismos autores mencionan que en soya se pueden tener altos rendimientos de grano sin aplicar fertilizante químico; con aplicaciones de 60 kg/ha de nitrógeno, no se mejoraron los componentes de rendimiento ni el rendimiento de grano.

En una serie de experimentos conducidos en Illinois USA en varios años y localidades Vonk *et al.*, (2024), concluyen que en soya se tuvo poco aumento en rendimiento por la aplicación de fertilización de nitrógeno, y que bajo condiciones favorables de ambiente particularmente con disponibilidad de agua, la respuesta en rendimiento fue significativa, aunque estos aumentos en rendimiento pueden ser no rentables por el costo del

fertilizante. Estos mismos autores reportan que es mejor aplicar fertilizante en varias dosis durante el desarrollo del cultivo. Aplicar fertilizante al momento de la siembra en una sola aplicación estimula el crecimiento de la planta en sus primeras etapas de desarrollo en lugar de suministrar nitrógeno durante toda la temporada del cultivo.

En el presente experimento, con el tratamiento de fertilización sin inóculo, también ocurrió la formación de nódulos tanto en soya como en crotalaria. En soya fueron detectados durante en inicio de floración e inicio de llenado de vaina, pero de acuerdo a la coloración de los mismos, corresponden a nódulos inactivos; mientras que en crotalaria hubo formación de nódulos activos e inactivos en inicio de flotación e inicio de llenado de vaina; en esta última etapa, se tuvo mayor porcentaje de nódulos activos de tamaño grande que con el tratamiento de inoculación; lo anterior como consecuencia de la acción de posibles bacterias nativas fijadoras de nitrógeno presentes en el suelo. Esta respuesta ha sido consignada en otros estudios al reportar que se pueden formar nódulos en soya ya que puede haber cepas nativas fijadoras de nitrógeno capaces de formar nódulos (Ndusha *et al.*, 2019). Para conocer la capacidad de las cepas nativas de *Rhizobium* en el suelo del ensayo de prueba para la formación de nódulos, se necesitarían hacer otro tipo de estudios. No obstante, con fertilización no se logró formar la misma cantidad de nódulos que con la inoculación realizada.

De acuerdo a los resultados de este estudio, la capacidad de formación de nódulos se debe a la especificidad de las bacterias de *Bradyrhizobium japonicum* en soya y a la mezcla de inóculo de bacterias en crotalaria con *Bradyrhizobium* sp. (Vigna), *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* utilizados. La soya mostró un mayor porcentaje de nódulos activos en las tres etapas de muestreo (vegetativa, floración, e inicio de llenado de vainas), representando una opción como

leguminosa forrajera en el patrón de cultivos de la Comarca Lagunera. La crotalaria es un cultivo que se puede utilizar como abono verde y para mejorar la fertilidad de los suelos por su posible aporte de nitrógeno al suelo. En México, en el estado de Tabasco se han reportado aportaciones de nitrógeno de 151 y 173 kg/ha a los 40 y 60 días después de la emergencia (Almeida-Santos, 2019). Las leguminosas por su relación con *Rhizobium* y su capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno, se pueden considerar en los patrones de cultivo para mejorar la estructura del suelo y prescindir, aunque no sea en su totalidad de la fertilización nitrogenada. En frijol, la fertilización intermedia más semilla tratada con inoculante fue similar a la fertilización nitrogenada (Acuña *et al.*, 2001).

## 6. CONCLUSION

La aplicación de inoculación de bacterias comerciales evaluadas en soya y crotalaria ha sido favorable para la formación de nódulos bajo las condiciones de ambiente y suelo probados en la Comarca Lagunera. Los resultados indican, dadas las diferencias entre cultivos para la formación de nódulos, la importancia de usar inoculantes específicos de *Rhizobium* para cada cultivo de leguminosa que se quiera establecer. El hecho de que se hayan formado nódulos en raíces de soya y de crotalaria al final del ciclo de cada cultivo, indican que las bacterias del inóculo probado contendieron con las posibles razas nativas de *Rhizobium* que pueda haber en el suelo de este ensayo.

## 7. REVISION BIBLIOGRÁFICA

- Abd-Alla, M.H., Al-Amri, S.M., El-Enany, A.-W.E. 2023. Enhancing *Rhizobium*-legume symbiosis and reducing nitrogen fertilizer use are potential options for mitigating climate change. *Agriculture* 13(11):2092.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture13112092>
- Almeida-Santos, L.E., Obrador-Olán, J.J., García-López, E., Castelán-Estrada, M., y Carrillo-Ávila, E. 2019. Cultivo e incorporación de *Crotalaria juncea* L. en un suelo cañero de la Chontalpa, Tabasco, México. *Agroproductividad* 12(7):87-93.
- Ángeles-Núñez, J.G. y Cruz-Acosta, T. 2015. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:929-942
- Bécquer, C. J. y Prévost, D. 2014. Potencial de formación de nódulos en leguminosas forrajeras y de granos de rizobios, nativos de Sancti Spíritus, Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(3):301-307
- Beyhaut, E., Abreo, E., Barlocco, C., Larnaudie, V., y Altier., N. 2023. Capítulo 7. Tecnología de inoculantes rizobianos y aporte de nitrógeno proveniente de la atmósfera a los sistemas de producción. Pp. 137-150. *En: Aportes científicos y tecnológicos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) del Uruguay a las trayectorias agroecológicas*. G.P. García-Inza, J.M. Paruelo y R. Zoppolo (Editores generales). 1a ed - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Fundación CICCUS.
- Bianco, L. 2020. Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *IDESIA*. 38(2):21-29
- Bunkura, A.B., Ewusi-Mensah, N., Logah, V, and Kefale, H.D. 2021. Legume-rhizobium specificity effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba* L.). *Nature Portfolio. Scientific Reports* 11:3678
- Buscot, F. 2005. What are soils? *In: Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions*. F. Buscot and A. Varma. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 3-18
- Cafaro, L.M.N., Monzon, J.P., Lindquist, J.L., Arkebauer, T.J., Knops, J.M.H., Unkovich, M., Specht, J.E., and Grassini, P. 2020. Insufficient nitrogen supply from symbiotic fixation reduces seasonal crop growth and nitrogen mobilization to seed in highly productive soybean crops. *Plant. Cell Environ.* 43(8):1958–1972.  
<https://doi.org/10.1111/pce.13804> 558
- Cafaro, L.M.N., Monzon, J.P., Specht, J.E., and Grassini, P. 2017. Is soybean yield limited by nitrogen supply? *F. Crop. Res.* 213:204–212.  
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.08.009>

- Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., y Zúñiga-Dávil, D. 2019. Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. IDESIA (Chile), 37(4):73-81
- Cerezini, P., Lima, F.D.D.S., Pípolo, A.E., Hungria, M., and Nogueira, M.A. 2017. Water restriction and physiological traits in soybean genotypes contrasting for nitrogen fixation drought tolerance. Sci. Agric. 74(2):110-117. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0462>
- Cotler, H., Martínez, M., y Etchevers, J.D. 2016. Carbono orgánico en suelos agrícolas de México: Investigación políticas públicas. Terra Latinoamericana 34: 125-138.
- de Carvalho, F.G., da Silva, A.J.N., Melo, M.N.D.S., and Melo, J.N.D.S. 2012. Effect of Irrigation with Sewage Effluent and Rhizobia Inoculation on Growth of Tropical Tree Legumes in Northeast Brazil. International Journal of Agriculture and Forestry, 2(1):72-78
- Del Papa M, F., Delgado, M. J., Irisarri, P., Lattanzi, F.A., and Monza, J. 2024. Editorial: Maximizing nitrogen fixation in legumes as a tool for sustainable agriculture intensification, volume II. Front. Agron. 6:1387188. <https://doi:10.3389/fagro.2024.1387188>
- Diptimayee, D. and Deole, S. 2019. Review on the Role of Biological Nitrogen Fixation in the Environmental Terms. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 8(08):2660-2665. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.308>
- Estrada-Herrera, I.R., Hidalgo-Moreno, C., Guzmán-Plazola, R., Almaraz Suárez, J.J., Navarro-Garza, H., y Etchevers-Barra, J.D. 2017. Indicadores de calidad de suelo para evaluar su fertilidad. Agrociencia 51: 813-831.
- FAO (2017). The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. 163 p. <http://www.fao.org/global-perspectives-studies>
- Farquharson, EA, Ballard, R.A, Herridge, D.F, Ryder, M.H, Denton, M.D., Webster, A., Yates, R.J., Seymour, N.P., Deaker, R.J., Hartley, E, Gemmel, L.G, Hackney, B., and O'Hara, G.W. 2022. *Inoculating Legumes: Practice and Science*, Grains Research and Development Corporation, Australia. ISBN 978-1-922342-08-9. 120 p.
- Felisberto, G., Bruzi, A.T., Zuffo, A.M., Zambiazzi, E.V., Soares, I.O., de Rezende, P.M., and Silva, B.F.B. 2015. Agronomic performance of RR® soybean cultivars using different pre-sowing desiccation periods and distinct post-emergence herbicides. African Journal of Agricultural Research, 10(34):3445-3452
- Fernández-Canigia, M.V. 2020. Factores determinantes de la nodulación. Edición ampliada y actualizada. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 91 p.

- Fernández-Luqueño, F., y Espinoza-Victoria, D. 2008. Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 26:133-144
- Fernández-Pascual, M., De María, N., y De Felipe, M.R. 2002. Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. *Ciencia y Medio Ambiente – CCMA-CSIC*. 195-202
- Ferreira, LM., Arenas, M.R., Caballero, P.C., Samudio, O.A., Mussi, C.E., y Nakaya, H.D. 2022. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias del género *Bradyrhizobium* provenientes de parcelas agrícolas de la localidad de Loma Plata, Boquerón-Paraguay. *Rev. Soc. cient. Parag.* 2022;27(1):5-17. <https://doi.org/10.32480/rscp.2022.27.1.5>
- Fonseca-López, D., Vivas, N. J., and Balaguera-López, H. E. 2020. Techniques applied in agricultural research to quantify nitrogen fixation: a systematic review. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(1), e1342 [https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num1\\_art:1342](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1342)
- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1>
- Gualtieri, G. and T. Bisseling. 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* 42: 181-194.
- Gómez, M.E., Rodríguez, L., Murgueito, E., Ríos, C.I., Rosales, M.M., Molina, C.H., Molina, C.H., Molina, E., y Molina, J.P. 2002. Árboles y arbustos forrajeros utilizados en la alimentación animal como fuente proteica. Tercera edición. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria. Cali, Colombia. 147 p.
- Guamán, D.F., Torres, G.R., Granda, M.K., y Nápoles, G.M.C. 2016. Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. en el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 37(1):28-33.
- Guo, K., Yang, J., Yu, N., Luo, L., and Wang, E. 2023. Biological nitrogen fixation in cereal crops: Progress, strategies, and perspectives. *Plant Commun.* 4(2):100499 <http://doi.10.1016/j.xplc.2022.100499>
- Ritchie, H., Roser, M., and Rosado, P. 2022. Fertilizers. Published online at OurWorldinData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/fertilizers' [Online Resource]
- Hay, R.K.M. and Porter, J.R. 2006 *The physiology of crop yield*. 2<sup>nd</sup>. Edition. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. 314 p.

- Hungria, M., and Mendes, I.C. 2015. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA, Volume 2, pp. 1009–1024.
- Jamilah, Sunadi, Novia, P., Yessirita, N., Utama, M.Z.H., Haryoko, W., and Resti, S. 2025. Investigating the impact of soil pH and texture on legume species root nodule formation. *Intl J Agric Biol* 33:330103. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.2249>
- Hayashi, K. 2022. Nitrogen cycling and management focusing on the central role of soils: a review, *Soil Science and Plant Nutrition*, 68(5-6):514-525, <https://doi.org/10.1080/00380768.2022.2125789>
- Lewis, O. A. M. (1993). Plants and Nitrogen. The Institute of Biology's Studies in Biology N° 166.
- Llamas, F., y Acedo, C. 2016. Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *Ambiociencias*. (14):5-18.
- López-Alcocer, J.J., Lépiz-Idelfonso, R., González-Eguiarte, D.R., Rodríguez-Macías, R., and López-Alcocer, E. 2020. Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol cultivado y silvestre. *Terra Latinoamericana* 38:841-852.
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., and Missaoui, A. 2020. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants* 9(1), 18. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Martínez, B.B., Antonio, V.V., Bello-Martínez, J., Palemón, F.A., Romero, R.Y., Orbe, D.D., y Toribio, J.J. 2021. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal para incrementar la producción de *Lactuca sativa* L. en campo. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 11(2):449-452
- Mayer, J., Buegger, F., Jensen, E.S., Schloter, M., and Heß, J. 2003. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a <sup>15</sup>N in situ stem labelling method. *Soil Biology & Biochemistry* 35:21–28. [http://doi:10.1016/S0038-0717\(02\)00212-2](http://doi:10.1016/S0038-0717(02)00212-2)
- Mengel, D.B., Segars, W. and Rehm, G.W. 1987. Soil fertility and liming. In: Wilcox, J.R. ed. Soybeans: Improvement, production and uses. 2nd edition. Am. Soc. Agron. Madison, W.I., p. 461-496.
- Meyer, J.N., Hurtado, P., y Piccinetti, C.F. 2018. Capítulo 7. Importancia del nitrógeno en la producción agrícola en zonas áridas. pp. 109-127. *In: Producción científico-técnica del INTA San Luis; 2da parte. Estación Experimental Agropecuaria San Luis, INTA*

- Morán-Diez, M.E., Martínez de Alba, Á.E., Rubio, M.B., Hermosa, R., Monte, E. 2021. *Trichoderma* and the Plant Heritable Priming Responses. *J. Fungi*, 7(4):318. <https://doi.org/10.3390/jof7040318>
- Nápoles, G.M.C., González-Anta, G., Ferreira, A., Rossi, A., Hernández, F.I., y Costales, M.D. 2014. Efecto de diferentes inoculantes sobre la nodulación de la soja cultivada en condiciones de estrés. *Cultivos tropicales* 35(4):45-51
- Ndusha, B.N., Onwonga, R.N., Nabahungu, L.S., Mushagalusa, N.G., Matendo, R.E. y Keya, S.O. 2019. Cepas de rizobios autóctonos: la solución milagrosa para mejorar la fijación biológica de nitrógeno y el rendimiento de la soja (*Glycine max* L. Merr.) en diferentes condiciones de suelo en la provincia de Kivu del Sur, República Democrática del Congo. *Afri. J. Agri. Res.* 14, 2038-2047. <https://doi:10.5897/AJAR2019.14457>
- O'Callaghan, M., Ballard, R.A. and Wright, D. 2022. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil Use Manage.* 38:1340-1369. <https://doi.org/10.1111/sum.12811>
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45: 119-44.
- Pereyra, C.M. 2001. Asimilación del nitrógeno en plantas. Facultad de Agronomía. Universidad de La Pampa. 14 p.
- Pommeresche, R. and Hansen, S. 2017. Examining root nodule activity on legumes. *FertilCrop Technical Note*. 4 p.
- Raducu, D., and Gherghina, C.A. 2013. The impact of soil structure on soybean nodulation. *Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series Vol. XLIII*:277-282
- Ramoneda, J., Roux, J.J.L., Frossard, E., Frey, B., Gamper, H.A. 2020. Geographical patterns of root nodule bacterial diversity in cultivated and wild populations of a woody legume crop. *FEMS Microbiol Ecol* 96:1–13
- Reckling, M., Bergkvist, G., Watson, C.A., Stoddard, F.L., Zander, P.M., Walker, R.L., Pristeri, A., Toncea, I., and Bachinger, J. 2016. Trade-Offs between Economic and Environmental Impacts of Introducing Legumes into Cropping Systems. *Front. Plant Sci.* 7:669. <https://doi:10.3389/fpls.2016.00669>
- Restrepo, F.G. M., N. A. Ceballos, A.N., Sánchez, T.O.J., y Valenzuela, O.K.T. 2015. Importancia de los inoculantes biológicos en la agricultura. Centro editorial: Universidad Católica de Manizales: Universidad de Caldas: Colciencias. 39 p.

- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M. y Pennock, D. 2019. *La contaminación del suelo: una realidad oculta*. Roma, FAO. 139 p.
- Rong, L., Haifeng, C., Zhonglu, Y., Songli, Y., and Xin'an, Z. 2020. Research status of soybean symbiosis nitrogen fixation. *Oil Crop Science*, 5(1):6-10 <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2020.03.005>
- Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Walters, D.T., Weiss, A., and Dobermann, A. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research*, 108:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.001>
- Salvagiotti, F., Specht, J.E., Cassman, K.G., Walters, D.T., Weiss, A., and Dobermann, A. 2009. Growth and nitrogen fixation in high-yielding soybean: Impact of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal*, 101(4):958–970. <https://doi.org/10.2134/agronj2008.0173x>
- SAS Institute. 2011. The SAS system for windows, release 9.3. Statistical Analysis Systems Inst., Cary, NC.
- Saynes-Santillán, V., Etchevers-Barra, J.D., Paz-Pellat, F. y Alvarado-Cárdenas, L. O. 2016. Emisiones de gases de efecto invernadero en sistemas agrícolas de México. *Terra Latinoam*. 34(1):83-96.
- Shen, D., and Bisseling, T. 2025. Soybean breeders can count on nodules. *Trends in Plant Science*, 30(1):10-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2024.09.013>
- SIAP. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2024. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. [https://nube.agricultura.gob.mx/cierre\\_agricola/](https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/)
- Signor, D., Cerri, C.E.P., and Conant, R. 2013. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. *Environ Res. Lett.* 8(1):1-9. <http://doi:10.1088/1748-9326/8/1/015013>
- Soto, V.J., Catuto, S.A., y Álvarez, V.M. 2021. Evaluación del crecimiento y nodulación de plantas de soya (*Glycine max*) inoculadas con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum* en Manglaralto, Santa Elena (Ecuador). *Revista Científica y Tecnológica UPSE* 8(2):27-32
- Tahir, M.M., Abbasi, N.K., Rahim, N., Khaliq, A., and Kazmi, M.H. 2009. Effect of *Rhizobium* inoculation and NP fertilization on growth, yield and nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in the sub-humid hilly region of Rawalakot Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *African Journal of Biotechnology* 8(22):6191-6200
- Tang, M. 1986. Factores que afectan la simbiosis leguminosa-rhizobium. *Pastos y forrajes*. 9(3):193-209.

- Vázquez, J., Alvarez, V.M., Iglesias, A.S., y Castillo, J. 2020. La incorporación de enmiendas orgánicas en forma de compost y vermicompost reduce los efectos negativos del monocultivo en suelos. *Scientia Agropecuaria*. 11(1):105- 112.
- Wang, Q., Li, Y., Klassen, W., and Hanlon, Jr. E.A. 2015. Sunn hemp-A promising cover crop in Florida. IFAS Extension. University of Florida. SL 306. <https://doi.org/10.32473/edis-tr003-2015>
- Wang, Q., Liu, J.m and Zhu, H. 2018. Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. *Front. Plant Sci.* 9:313. <https://doi.10.3389/fpls.2018.00313>
- Wanyenze, R.K., Alfvén, T., Ndejjo, R., Viberg, N., Båge, K., Batte, C., Helldén, D., Lindgren, H., William, M.R., Ndeezi, G., Swartling, P.S., Nawangwe,B., and Ottersen, O.P. 2023. Sustainable health—a call to action. *BMC Public Health* 3(1): 3. <https://doi:10.1186/s44263-023- 00007-4>
- Weidner, S., Latz, E., Agaras, B., Valverde, C., and Jousset, A. 2017. Protozoa stimulate the plant beneficial activity of rhizospheric pseudomonads. *Plant and Soil* 410:509-515
- Wesley, T. L., Lamond, R. E., Martin, V. L., and Duncan, S.R. 1998. Effects of late-season nitrogen fertilizer on irrigated soybean yield and composition. *Journal of Production Agriculture*, 11(3):331–336. <https://doi.org/10.2134/jpa1998.0331>
- Wilson, E.W., Rowntree, S.C., Suhre, J.J., Weidenbenner, N.H., Conley, S.P., Davis, V. M., Diers, B.W., Esker, P.D., Naeve, S.L., Specht, J.E., and Casteel, S.N. 2014. Genetic gain × management interactions in soybean: II. nitrogen utilization. *Crop Science*, 54(1):340–348. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.05.0339>
- Zhang, F., Lynch, D.H., and Smith, D.L.1995. Impact of low root temperatures in soybean [*Glycine max.* (L.) Merr.] on nodulation and nitrogen fixation. *Environmental and Experimental Botany*, 35(3):279-285.
- Zhong, X., Wang, J., Shi, X. , Bai, M., Yuan, C., Cai, C., Wang, N., Zhu, X., Kuang, H., Wang, X., Su, J., He, X., Liu, X., Yang, W., Yang, C., Kong, F., Wang, E., and Guan, Y. 2024. Genetically optimizing soybean nodulation improves yield and protein content. *Nat. Plants* 10(736–742) <https://doi.org/10.1038/s41477-024-01696-x>
- Zuffo, A. M., Peter, F.A., Azevedo, N.J.C., Pereira, P.L., Alcantara, N.F., and Ribero, A.F. 2014. Microbiological attributes in a latosol in glyphosate application under water deficit conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 9(32): 2495-2505.
- Zuffo, A.M., Steiner, F., Busch. A., and Zoz, T. 2018. Response of early soybean cultivars to nitrogen fertilization associated with *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, 48(4):436-446