

## Respuesta de la soya a inoculantes microbianos en el norte de Tamaulipas, México\*

### Soybean response to microbial inoculants in northern Tamaulipas, Mexico

Arturo Díaz Franco<sup>1</sup>, Agustín Magallanes Estala<sup>1§</sup>, Armando Aguado Santacruz<sup>2</sup> y José Luis Hernández Mendoza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Río Bravo-INIFAP. Carretera Matamoros-Reynosa km 61, C. P. 88900. Río Bravo, Tamaulipas, México. <sup>2</sup>Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5 C. P. 38110, Celaya, Guanajuato, México. <sup>3</sup>Centro de Biotecnología Genómica- Instituto Politécnico Nacional. Blvd. Del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C. P. 88710, Reynosa, Tamaulipas, México. §Autor para correspondencia: magallanes.agustin@inifap.gob.mx.

#### Resumen

Con el propósito de conocer la respuesta de la soya var. 'Vernal' a la efectividad de inoculantes microbianos, se realizaron estudios en condiciones de invernadero, campo, así como de validación. En invernadero se compararon ocho microorganismos en suelo estéril, donde se obtuvo mayor diámetro de tallo, biomasa radical y número de vainas con la inoculación independiente o combinada de la rizobacteria *Bradyrhizobium japonicum* [Cell-Tech® (CT)] y el hongo micorrizógeno *Rhizophagus intraradices* [micorriza INIFAP (MI)]. En un experimento de campo se evaluaron CT, MI, CT+MI, CT+MI+18-46-00, y testigo absoluto. El mayor número de nódulos por planta se registró con la coinoculación de CT+MI. CT+MI con o sin fertilización inorgánica también se obtuvo la mayor biomasa, número de vainas, peso de grano por planta y rendimiento de grano. En el estudio adicional de validación con siembra mecanizada se midieron CT, MI, CT+MI y testigo en suelo fertilizado (18-46-00) o no. Los resultados indicaron que los mayores rendimientos se registraron con la coinoculación CT+MI, con o sin la fertilización inorgánica. Aunque el análisis económico mostró que la mayor rentabilidad de la producción de soya fue con la coinoculación en suelo no fertilizado. El efecto sinérgico de la coinoculación con CT+MI, representa una alternativa biotecnológica que atiende a una necesidad de manejo sostenible de la soya.

#### Abstract

In order to know the response of soybean var. 'Vernal' to the effectiveness of microbial inoculants, studies were conducted in the greenhouse, field and validation. Greenhouse eight microorganisms in sterile soil, where increased stem diameter, root biomass and pod number was obtained with the independent or combined inoculation rhizobacteria *Bradyrhizobium japonicum* [Cell-Tech® (CT)] and the mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices* [mycorrhiza INIFAP (MI)]. In a field experiment CT, MI, CT+MI, CT+MI+18-46-00, and absolute control were evaluated. The highest number of nodules per plant was recorded with co-inoculation of CT+MI. CT+MI with or without inorganic fertilization the highest biomass, number of pods per plant grain weight and grain yield was also obtained. In the validation study with additional mechanized planting CT, MI, CT+MI and control in fertilized soil (18-46-00) or not measured. The results indicated that the highest yields were recorded with CT+MI co-inoculation with or without inorganic fertilization. Although economic analysis showed that the higher profitability of soybean production was co-inoculation with non-fertilized soil. The synergistic effect of co-inoculation with CT+MI represents a biotechnological alternative that serves a need for sustainable management of soybeans.

\* Recibido: agosto de 2014  
Aceptado: enero de 2015

**Palabras clave:** *Glycine max*, endomicorriza, rizobacterias.

**Keywords:** *Glycine max*, endomycorrhiza, rhizobacteria.

## Introducción

La soya (*Glycine max*) es una leguminosa con uso de oleaginosa de mayor importancia a nivel mundial por su gran cantidad de usos, debido a su alto contenido de proteína y energía, ya que en promedio, el grano seco contiene 20% de aceite y 40% de proteína. En México la producción de soya es menor a su consumo, es el cuarto país importador de soya en el mundo, pues tan sólo en 2009 se importaron 3.5 millones de toneladas y se produjeron 153 mil toneladas, equivalente a 4.7% del consumo total nacional para ese año. El 58% de la producción nacional se concentra en el estado de Tamaulipas (ASERCA, 2010), donde recientemente ha habido una expansión del cultivo en áreas irrigadas de la zona norte del estado.

La soya como leguminosa, depende de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico mediante bacterias simbióticas, la cual ha sido abundantemente estudiada; encontrándose que esta característica ha hecho posible que la inoculación de semilla con *Bradyrhizobium* sp. se considere una práctica alterna para suplir el uso de fertilizantes inorgánicos en el cultivo (Cassán *et al.*, 2009; Zilli *et al.*, 2010).

Sin embargo, existen diversos microorganismos benéficos que representan elementos promisorios para integrar soluciones a problemas agroambientales ya que tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, mejorar la disponibilidad y la asimilación de los nutrientes, y contribuir a una mayor sanidad de las plantas (Vassey, 2003; Adesemoye y Kloepper *et al.*, 2009). Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Trichoderma* spp., son de los microorganismos más estudiados. Las RPCV con actividad simbiótica o de 'vida libre', tienen la capacidad de estimular a las plantas a través de producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, o biocontrol de fitopatógenos mediante compuestos antifúngicos como sideróforos o enzimas líticas (Glick *et al.*, 1999; Cassán *et al.*, 2009; Vassey, 2003; Xiang *et al.*, 2012).

Los HMA manifiestan diferentes actividades simbióticas que inducen a una mayor exploración del suelo a través de una red de hifas, disminuyen los efectos de condiciones

## Introduction

The soybean (*Glycine max*) is a legume with use of major oilseed worldwide for its many uses, due to its high content of protein and energy, because on average, the dry grain contains 20% oil and 40% protein. In Mexico soybean production is less than consumption, is the fourth importer of soybeans in the world, because in 2009 alone 3.5 million tons were imported and produced 153 thousand tonnes, equivalent to 4.7% of total national consumption that year. 58% of domestic production is concentrated in the state of Tamaulipas (ASERCA, 2010), which has recently been an expansion of cultivation in irrigated areas of upstate.

Soybean as legume depends on the biological fixation of atmospheric nitrogen by symbiotic bacteria, which has been extensively studied; finding that this feature has allowed seed inoculation with *Bradyrhizobium* sp., considered an alternative practice to replace the use of inorganic fertilizers in the crop (Cassán *et al.*, 2009; Zilli *et al.*, 2010).

However, there are many beneficial microorganisms that represent promising elements to integrate agro-environmental problems and solutions that have the ability to promote plant growth, improve the availability and uptake of nutrients, and contribute to better plant health (Vassey, 2003; Adesemoye and Kloepper *et al.*, 2009). The plant growth promoting rhizobacteria (RPCV), arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Trichoderma* spp., are the most studied microorganisms. The RPCV with symbiotic or 'free-living' activity, have the ability to stimulate the plants through phytohormone production, nitrogen fixation, or biocontrol of phytopathogens by siderophores or antifungal compounds such as lytic enzymes (Glick *et al.*, 1999; Cassán *et al.*, 2009; Vassey, 2003; Xiang *et al.*, 2012).

AMF symbiotic manifest different activities that induce further exploration of the soil through a network of hyphae, reduce adverse effects of abiotic conditions for the plant, produce plant hormones that promote plant growth, facilitate the absorption of nutrients such as N, P, Fe, Zn, Cu and Mn, produce glomalin adhering soil particles, and induces protective action against some phytopathogenic soil (Liu *et al.*, 2000; Boomsma and Vyn, 2008; Smith and Read, 2008). The genus *Trichoderma* also has various mechanisms

abióticas adversas para la planta, producen fitohormonas que promueven el crecimiento de la planta, facilitan la absorción de nutrientes como N, P, Fe, Zn, Cu y Mn, producen glomalina que adhiere las partículas del suelo, e induce acción protectora contra algunos fitopatógenos del suelo (Liu *et al.*, 2000; Boomsma y Vyn, 2008; Smith y Read, 2008). El género *Trichoderma* asimismo, cuenta con diversos mecanismos que estimulan el crecimiento de las plantas. Se ha reportado en esos hongos la producción de fitohormonas, descomponen la materia orgánica mediante solubilización, limitan la acción de patógenos radicales con la producción de enzimas hidrolíticas, agresivo micoparasitismo y colonización saprofítica (Benítez *et al.*, 2004; Masunaka *et al.*, 2011).

No obstante, algunos microorganismos benefician en mayor grado a un determinado hospedero comparado con otros, además de que su funcionalidad puede ser alterada bajo determinadas condiciones edafoclimáticas, hecho que muestra las marcadas diferencias existentes entre especies e incluso entre cepas de la misma especie (Klironomos, 2003; Yon *et al.*, 2004; Hungria *et al.*, 2010; Montero *et al.*, 2010). En soya se ha observado una mejor respuesta con la interacción de la simbiosis tripartita, *Bradyrhizobium* sp., HMA y planta (Antunes *et al.*, 2006; Babalola *et al.*, 2009). En México, dentro de las prácticas de producción de soya, se ha recomendado tradicionalmente la inoculación de semilla; sin embargo, no existe información documentada sobre el tipo de inoculante y su respuesta en el cultivo. El presente trabajo se realizó en soya y describe dos objetivos: a) seleccionar la efectividad de bioinoculantes comerciales y experimentales en condiciones de invernadero; y b) determinar la respuesta de inoculación de semilla en campo.

## Materiales y métodos

El trabajo de investigación se hizo en el Campo Experimental Río Bravo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Río Bravo, Tamaulipas (25° 57' latitud norte, 98° 01' longitud oeste; 25 msnm), durante 2011 y 2012. Es un área semiárida (subtropical), con temperatura y precipitación media anual de 23 °C y 635 mm, respectivamente. El trabajo se puso en suelos Vertisoles, cuyas propiedades en presiembra se describen en el Cuadro 1. Las determinaciones para el análisis del suelo fueron: pH en 1:2 (suelo-agua); la materia orgánica se midió con dicromato de potasio; la conductividad eléctrica se midió en una pasta saturada;

that stimulate the growth of plants. It has been reported in those fungi producing phytohormones, decompose organic matter by solubilization limit the action of root pathogens to production of hydrolytic enzymes, mycoparasitism and aggressive saprophytic colonization (Benítez *et al.*, 2004; Masunaka *et al.*, 2011).

However, some microorganisms benefit most to a given host compared to others, and its functionality can be altered under certain soil and climatic conditions, a fact that shows the marked differences between species and even between strains of the same species (Klironomos, 2003; Yon *et al.*, 2004; Hungria *et al.*, 2010; Montero *et al.*, 2010). In soybeans, we have seen a better response to the interaction of the tripartite symbiosis *Bradyrhizobium* sp., and AMF plant (Antunes *et al.*, 2006; Babalola *et al.*, 2009). In Mexico, in the practices of soybean production has been traditionally recommended seed inoculation; however, there is no documented information on the type of inoculant and its response in culture. This work was done in soybeans and describes two objectives: a) the effectiveness of selected commercial and experimental bioinoculants under greenhouse conditions; b) determine the response of seed inoculation on field.

## Materials and methods

The research was done in the Experimental Field Río Bravo, at the National Research Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP), Río Bravo, Tamaulipas (25° 57' north latitude, 98° 01' west longitude, 25 m), during 2011 and 2012 a semi-arid area (subtropical), with mean annual temperature and precipitation of 23 °C and 635 mm, respectively. The work began in vertisols, whose properties are described preplant in Table 1 determinations for soil analysis were: PH in 1:2 (soil-water); the organic matter was measured with potassium dichromate; electrical conductivity was measured in a saturated paste; the (NO<sub>3</sub>-N) inorganic nitrogen with salicylic acid method; available P was obtained by the method of Olsen; and K available by the method of atomic absorption.

The soybean variety used was 'Vernal', whose plant is determinate growth habit, with high sensitivity to photoperiod, erect medium size, and reaches an average height of 80 cm; the stem and pods have gray pubescence, and the flower is white.

el nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) con el método de ácido salicílico; el P disponible se obtuvo por el método de Olsen; y el K disponible mediante el método de absorción atómica.

La variedad de soya utilizada fue 'Vernal', cuya planta es de hábito de crecimiento determinado, con alta sensibilidad al fotoperiodo, de porte medio erecto, y alcanza una altura promedio de 80 cm; el tallo y las vainas tienen pubescencia color gris, y su flor es de color blanco.

**Cuadro 1. Características químicas y físicas de los suelos utilizados en los estudios. Ciclo agrícola otoño- invierno 2011-2012, Campo experimental Río Bravo.**

**Table 1. Chemical and physical soil properties used in the studies. Agricultural cycle autumn-winter 2011-2012, experimental Río Bravo.**

Estudio	pH	MO (%)	CE ( $\text{dS cm}^{-1}$ )	N ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	P ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	K ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Textura
Invernadero	8.1	1.4	1.2	33.5	23.1	1063	Franco-arenoso
Campo	7.9	1.7	1.1	11.5	15.0	897	Migajón-arcilloso
Validación	7.7	1.8	0.9	10.4	17.0	807	Arcillo-arenoso

### Experimento en invernadero

En condiciones de invernadero se hizo una selección previa de efectividad de inoculantes microbianos comerciales y experimentales. Se utilizaron macetas de bolsas de plástico con capacidad de 7 kg. El suelo (Cuadro 1) se mezcló con Termolita® al 20% (v/v) y se esterilizó con bromuro de metilo. Los inoculantes bacterianos fueron: 1) Quinzavo (*Bradyrhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp.;  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), Azul Natural, S. A., Durango, Durango; 2) Cell-Tech® (*Bradyrhizobium japonicum*;  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), Novozymes BioAg Inc., Brookfield, WI.; 3) Biofertibuap (*Azospirillum* spp.;  $5 \times 10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue.; 4) *Azospirillum* sp. (Cepa TlaxC4;  $5 \times 10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ), Campo Experimental Bajío, INIFAP; y 5) Bacteriano 2709 (*Pseudomonas* spp.;  $5 \times 10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ), Campo Experimental Bajío, INIFAP.

Los hongos fueron: 1) *Trichoderma asperellum* (Cepa 703;  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{g}^{-1}$ ), Centro de Biotecnología Genómica, IPN; 2) Burize ST® (*Rhizophagus intraradices*;  $>40$  esporas  $\text{g}^{-1}$ ), Buckman Laboratories, S. A., Jiutepec, Morelos; y 3) micorriza INIFAP (*Rhizophagus intraradices*;  $>40$  esporas  $\text{g}^{-1}$ ), Campo Experimental General Terán, INIFAP. Adicionalmente se incluyó la inoculación combinada Cell-Tech® y micorriza INIFAP. El tratamiento testigo no fue inoculado. Las macetas se llenaron a la mitad y en ese

### Greenhouse experiment

Under greenhouse conditions, prior selection of commercial and experimental effectiveness of microbial inoculants was made. Pots plastic bags with capacity of 7 kg were used. The soil (Table 1) was mixed with Termolita® 20% (v/v) and sterilized with methyl bromide. Bacterial inoculants were: 1) quinzavo (*Bradyrhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp.,  $1 \times 10^9$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), Blue Natural,

SA, Durango, Durango, 2) Cell-Tech® (*Bradyrhizobium japonicum*,  $1 \times 10^9$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), Novozymes BioAg Inc., Brookfield, WI.; 3) Biofertibuap (*Azospirillum* spp.,  $5 \times 10^8$  CFU  $\text{g}^{-1}$ ), Autonomous University of Puebla, Puebla; 4) *Azospirillum* sp., (Cepa TlaxC4,  $5 \times 10^8$  CFU  $\text{g}^{-1}$ ), Experimental Field Bajío, INIFAP; and 5) 2709 Bacterial (*Pseudomonas* spp.,  $5 \times 10^8$  CFU  $\text{g}^{-1}$ ), Experimental Field Bajío, INIFAP.

Fungi were 1) *Trichoderma asperellum* (Strain 703,  $1 \times 10^7$  spores  $\text{g}^{-1}$ ), Center for Biotechnology Genomics, IPN; 2) Burize ST® (*Rhizophagus intraradices*;  $>40$  spores  $\text{g}^{-1}$ ), Buckman Laboratories, SA, Cuernavaca, Morelos; and 3) mycorrhizal INIFAP (*Rhizophagus intraradices*;  $>40$  spores  $\text{g}^{-1}$ ), Field Experimental General Terán, INIFAP. Additionally, the combined inoculation Cell-Tech® and mycorrhizal INIFAP included. The control treatment was not inoculated. The pots were filled to half this level and bacteria Bacteria were inoculated at 2 mL or g and fungi to 5 g per pot, and then the other half is supplemented with the ground.

Soybean seeds used were disinfected with a solution of sodium hypochlorite 10% for 10 min. Planting was on 28 July 2011 at a depth of  $\approx 2$  cm and two plants were left per pot; in total there were 10 pots per treatment. Chlorophyll content was measured in situ, using 10 readings (SPAD index) leaves taken in the upper third of the plants start flowering state (R1) with a portable meter Minolta SPAD-502®. In the state of

nivel las bacterias se inocularon a razón de 2 mL o g y los hongos a 5 g por maceta, después se complementó la otra mitad con el suelo.

Las semillas de soya utilizada se desinfectaron mediante una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 10 min. La siembra fue el 28 de julio de 2011 a una profundidad de  $\approx 2$  cm y se dejaron dos plantas por maceta; en total fueron 10 macetas por tratamiento. Se midió el contenido de clorofila *in situ*, mediante 10 lecturas (índice SPAD) tomadas en hojas del tercio superior de las plantas en estado de inicio de floración (R1), con un medidor portátil Minolta SPAD-502®. En el estado de formación de vaina (R3) se midió la altura, el diámetro de tallo, la biomasa radical y el número de vainas por planta. La información se analizó mediante un diseño completamente aleatorizado y la separación entre medias fue mediante Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### Experimento en campo

En un suelo no fertilizado durante dos años (Cuadro 1) se desarrolló un experimento para evaluar la respuesta de la soya a los inoculantes Cell-Tech® (C) y micorriza INIFAP (M). La siembra se estableció con humedad residual el 21 de marzo de 2012 con 45 kg ha<sup>-1</sup> de semilla, depositando 22-23 semillas por metro. La unidad experimental fue de cuatro surcos (0.81 m) de 4 m de longitud, las cuales se repitieron seis veces en un diseño en bloques al azar. Para el manejo de los riegos y de otras prácticas agronómicas se siguieron las indicaciones locales (CERIB, 2011).

En estado de floración al 50% (R2) se midió el índice SPAD de clorofila en 10 lecturas del tercio superior de la planta, además se sacaron con pala seis plantas de forma aleatoria por parcela para cuantificar el número de nódulos por planta. Los tratamientos consistieron en: 1) Cell-Tech® a dosis de 75 mL en 27 kg de semilla (C); 2) micorriza INIFAP, 2 kg en 45 kg de semilla (M), mezcla hecha con 120 mL de carboximetil celulosa como adherente y 1.2 L de agua; 3) La inoculación dual de C + M, mismas dosis; 4) C + M, mismas dosis, más la adición de 18 kg ha<sup>-1</sup> de N y 46 kg ha<sup>-1</sup> de P, cuyas fuentes fueron urea y superfosfato de calcio, respectivamente, compuestos incorporados lateralmente en el surco al momento de la siembra; y 5) testigo absoluto. Durez (R8) también se tomaron seis plantas por parcela, para estimar la biomasa seca, el número de vainas y el peso de grano por planta; el rendimiento de grano, ajustado a 14% de humedad, fue obtenido de los surcos centrales. Los

pod formation (R3) height, stem diameter, root biomass and number of pods per plant was measured. Data were analyzed using a completely randomized design and the separation between means was by Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### Field experiment

In an unfertilized soil for two years (Table 1) an experiment was developed to evaluate the response of soybeans to Cell-Tech® (C) and INIFAP mycorrhizal (M) inoculants. The planting was established with residual moisture on March 21, 2012 with 45 kg ha<sup>-1</sup> of seed depositing 22 to 23 seeds per meter. The experimental unit was four rows (0.81 m) of 4 m in length, which were repeated six times in a randomized block design. For management of irrigation and other agronomic practices local directions (CERIB, 2011) were followed.

At flowering stage, 50% (R2) chlorophyll SPAD index measured in 10 readings in the upper third of the plant and is scooped six plants per plot at random to measure the number of nodules per plant. The treatments consisted of: 1) Cell-Tech® at a dose of 75 mL in 27 kg of seed (C); 2) mycorrhizal INIFAP, 2 kg to 45 kg of seed (M), 120 mL mixture made with carboxymethyl cellulose as a bonding and 1.2 L of water; 3) The dual inoculation of C + M, same doses; 4) C+M, same doses, plus the addition of 18 kg ha<sup>-1</sup> of N and 46 kg ha<sup>-1</sup> P, whose sources were urea and calcium superphosphate respectively laterally compounds incorporated in the furrow at the planting; and 5) absolute control. Maturity (R8) six plants per plot were also taken to estimate dry biomass, pod number and grain weight per plant; grain yield adjusted to 14% moisture was obtained from the central rows. Data were subjected to analysis of variance and mean separation was by Tukey ( $p \leq 0.05$ ), plus some correlations and regressions between variables were made.

### Validation study

In order to follow up on the experimental results, a study was conducted under conditions of semi soy management grounds on the Experimental Field Río Bravo (Table 1). Mechanized planting was established on July 24, 2012, with residual moisture and precision seeder Emerg Max®, which was adjusted to a density of 22 seeds per meter was used. The treatments were: 1) Cell-Tech® at doses of 75 mL at 27 kg seed (C); 2) mycorrhizal INIFAP, 2 kg to 45 kg of seed (M), 120 mL mixture made with carboxymethyl cellulose as a bonding and 1.2 L of water; 3) C+M simultaneous inoculation, same doses; and 4) absolute control. These

datos se sometieron a análisis de varianza y la separación de medias fue con Tukey ( $p \leq 0.05$ ), además se hicieron algunas correlaciones y regresiones entre variables.

### Estudio de validación

Para dar seguimiento a los resultados experimentales obtenidos, se realizó un estudio en condiciones de manejo de soya semicomercial en terrenos del Campo Experimental Río Bravo (Cuadro 1). La siembra mecanizada se estableció el 24 de julio de 2012, con humedad residual y se utilizó una sembradora de precisión Max Emerg®, la cual se ajustó a una densidad de 22 semillas por metro. Los tratamientos evaluados fueron: 1) Cell-Tech® a dosis de 75 mL en 27 kg de semilla (C); 2) micorriza INIFAP, 2 kg en 45 kg de semilla (M), mezcla hecha con 120 mL de carboximetil celulosa como adherente y 1.2 L de agua; 3) inoculación simultánea C + M, mismas dosis; y 4) testigo absoluto. Estos tratamientos se sometieron en dos condiciones de fertilización inorgánica: Fertilizado (18 kg ha<sup>-1</sup> de N y 46 kg ha<sup>-1</sup> de P) y no fertilizado. El fertilizante, que consistió de urea y Mapito (11-52-00), se calentó y se aplicó con inyectoros en forma líquida y en banda al suelo, 20 días después de la siembra. Cada tratamiento se sembró en franjas de tres surcos de 150 m de longitud.

El manejo agronómico del cultivo fue en base a las recomendaciones locales (CERIB, 2011). La estimación del promedio de rendimiento de grano fue en estado de madurez (R8), la cual se hizo mediante muestreo de seis subparcelas de 5 m de largo que se trillaron y el grano se ajustó a 14% de humedad. Los rendimientos obtenidos se analizaron mediante las comparaciones de los tratamientos (t-student,  $p \leq 0.05$ ). Con el rendimiento se obtuvo la rentabilidad de los tratamientos en función a la relación beneficio-coste, considerando el fertilizante (\$1 150.00) y aplicación (\$160.00), 1 310.00 \$ ha<sup>-1</sup>; micorriza INIFAP, 280.00 \$ ha<sup>-1</sup>; Cell-Tech, 190.00 \$ ha<sup>-1</sup>; precio base de soya (6 161.00 \$ t<sup>-1</sup>) y estímulo de producción (1 500.00 \$ t<sup>-1</sup>), dan un costo de 7 661.00 \$ t<sup>-1</sup>.

## Resultados y discusión

### Experimento en invernadero

Los inoculantes microbianos modificaron significativamente las características de la planta de soya 'Vernal', pues en la mayoría de las variables los valores de los inoculantes superaron a los de las plantas testigo. Igualmente,

tratamientos fueron sometidos a dos condiciones de fertilización inorgánica: Fertilizado (18 kg ha<sup>-1</sup> de N y 46 kg P ha<sup>-1</sup>) y no fertilizado. El fertilizante consistió de urea y Mapito (11-52-00) que se calentó y se aplicó con nebulizadores y la banda, 20 días después de la siembra. Cada tratamiento fue sembrado en franjas de tres surcos de 150 m de longitud.

El manejo agronómico del cultivo fue en base a las recomendaciones locales (CERIB, 2011). La estimación del promedio de rendimiento de grano fue en estado de madurez (R8), la cual se hizo mediante muestreo de seis subparcelas de 5 m de largo que se trillaron y el grano se ajustó a 14% de humedad. Los rendimientos obtenidos se analizaron mediante las comparaciones de los tratamientos (t-student,  $p \leq 0.05$ ). Con el rendimiento se obtuvo la rentabilidad de los tratamientos en función a la relación beneficio-coste, considerando el fertilizante (\$1 150.00) y aplicación (\$160.00) 1 310.00 \$ ha<sup>-1</sup>; micorriza INIFAP, 280.00 \$ ha<sup>-1</sup>; Cell-Tech, 190.00 \$ ha<sup>-1</sup>; precio base de soya (6 161.00 \$ t<sup>-1</sup>) y estímulo de producción (1 500.00 \$ t<sup>-1</sup>), dan un costo de 7 661.00 \$ t<sup>-1</sup>.

## Results and discussion

### Greenhouse experiment

Microbial inoculants significantly modify the characteristics of the soybean plant 'Vernal', since most of the variables inoculants values exceeded those of the control plants. Hernández and Chailloux (2004) also evaluated several rhizobacteria mycorrhizal fungi in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and determined by wide variations in plant height, diameter and total biomass between microorganisms. The highest rate was recorded chlorophyll SPAD with Cell-Tech, Biofertibuap, INIFAP mycorrhizal inoculation and the Combined Cell-Tech and mycorrhizal INIFAP. Plant height was larger with *T. asperellum*. With no significant difference with Cell Tech, Biofertibuap, INIFAP Mycorrhiza and C+M (Table 2).

The larger diameter of stem, root biomass and number of pods was obtained with independent or combined inoculation of mycorrhiza and Cell-Tech INIFAP. Bioassay results (Cassan *et al.*, 2009) indicated that the strain *Azospirillum brasilense* Az39 and/or E109 of *B. japonicum*, increased the dry biomass of soybean root. Corbera and Naples (2011) noted that usually evaluated separately the effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria (AMF), but the combined effects of these agencies have

Hernández y Chailloux (2004) evaluaron en invernadero diferentes hongos micorrizógenos y rizobacterias en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y determinaron amplias variaciones en altura de planta, diámetro y biomasa total entre los microorganismos. El mayor índice de clorofila SPAD se registró con Cell-Tech, Biofertibuap, micorriza INIFAP y en la inoculación combinada Cell-Tech y micorriza INIFAP. La altura de planta fue superior con *T. asperellum*, sin diferencia significativa con Cell Tech, Biofertibuap, Micorriza INIFAP y C+M (Cuadro 2).

El mayor diámetro de tallo, biomasa radical y número de vainas se obtuvo con la inoculación independiente o combinada de Cell-Tech y micorriza INIFAP. Resultados de bioensayos (Cassán *et al.*, 2009) indicaron que la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* y/o E109 de *B. japonicum*, incrementaron la biomasa seca de raíz de soya. Corbera y Nápoles (2011) señalaron que por lo general se ha evaluado, por separado, los efectos de rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), pero los efectos combinados de esos organismos han sido menos ensayados. Resultados de invernadero con diferentes cultivos fueron consistentes al demostrar incrementos en la biomasa o longitud radical, cuando se inocularon con HMA (Yon *et al.*, 2004; Díaz y Garza, 2006; Tchabi *et al.*, 2010; Oseni *et al.*, 2010). Se encontró una asociación positiva entre el número de vainas con el índice SPAD ( $r=0.86^{**}$ ), con la altura de planta ( $r=0.72^*$ ), con el diámetro de tallo ( $r=0.92^{**}$ ) y con la biomasa radical ( $r=0.85^{**}$ ).

been less tested. Greenhouse results were consistent with different cultures to demonstrate increases in biomass or root length, when inoculated with AMF (Yon *et al.*, 2004; Díaz and Garza, 2006; Tchabi *et al.*, 2010; Oseni *et al.*, 2010). A positive association between the number of pods with SPAD ( $r=0.86^{**}$ ) index, plant height ( $r=0.72^*$ ), with stem diameter ( $r=0.92^{**}$ ) and biomass was found radical ( $r=0.85^{**}$ ).

### Field experiment

The variables evaluated in soybean 'Vernal' were significantly affected by the treatments in the field (Table 3). The combined inoculation of mycorrhiza Cell-Tech INIFAP and fertilization with 18-46-00, recorded the highest value in the SPAD chlorophyll index. Although in all treatments carried Cell-Tech (*B. japonicum*) was where the largest number of nodules per plant was observed, highlighted the combination of Cell-Tech and mycorrhizal INIFAP, where the record was superior to other treatments. This phenomenon, but has no clear explanation is also related to similar results reported in other studies with soybean field (Jalaluddin, 2005; Babalola *et al.*, 2009; Meghvansi and Mahna, 2009).

The largest amount of biomass, number of pods, weight of grain per plant and grain yield were obtained with the combination of Cell-Tech and mycorrhizal INIFAP (no fertilization), and Cell-Tech-mycorrhizal INIFAP on floor 18-46-00; undoubtedly be associated

**Cuadro 2. Efectividad de inoculantes microbianos en la soya var. 'Vernal' en invernadero. Ciclo agrícola otoño-invierno 2011-2012, Campo experimental Río Bravo.**

**Table 2. Effectiveness of microbial inoculants in Soybean var. 'Vernal' in greenhouse. Agricultural cycle autumn-winter 2011-2012, experimental Río Bravo.**

Inoculante	Índice SPAD	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Biomasa radical (g)	Número de vainas
Quinzavo	34.7 bc*	44.8 b	31.2 b	8.2 b	19.2 b
Cell-Tech (C)	37.2 a	45.9 ab	32.7 a	9.2 a	25.2 a
Biofertibuap	37 a	45.1 ab	30.9 bc	7 c	18.1 c
Micorriza INIFAP (M)	36.8 a	45.7 ab	33 a	9.1 a	25.4 a
C + M	37.7 a	45.8 ab	33.6 a	9.5 a	27.6 a
<i>Azospirillum</i> sp.	35.6 b	43.3 bc	30 c	7.2 c	18.4 c
Bacteriano 2709	33.5 c	41.7 d	28.1 d	6.3 d	13.9 d
<i>T. asperellum</i>	35.6 b	47.4 a	31.3 b	8.3 b	19.1 b
Burize ST	35.5 b	44.4 b	31 b	8.2 b	19.7 b
Testigo	32.8 d	36.6 c	28 d	6.8 c	12.3 d
P>F	0.03	0.001	0.001	0.001	0.001

\*Valores unidos con la misma letra son semejantes (Tukey, 0.05).

## Experimento en campo

Las variables evaluadas en soya 'Vernal' fueron afectadas significativamente por los tratamientos en campo (Cuadro 3). La inoculación combinada de Cell-Tech más micorriza INIFAP y la fertilización con 18-46-00, registró el valor más alto en el índice SPAD de clorofila. Si bien, en todos los tratamientos que llevaron Cell-Tech (*B. japonicum*) fue donde se observaron mayor número de nódulos por planta, destacó la combinación de Cell-Tech y micorriza INIFAP, donde el registro fue superior al resto de los tratamientos. Este fenómeno, aunque no tiene una clara explicación, también está relacionado con resultados similares reportados en otros estudios con soya en campo (Jalalunddin, 2005; Babalola *et al.*, 2009; Meghvansi y Mahna, 2009).

with chemical fertilization inoculants not potentiated soybean productivity. These results are consistent with those obtained by Hernández and Cuevas (2003), and Meghvansi Mahna (2009) and Cabrera and Nápoles (2011), who conclude that there is a synergistic interaction through dual inoculation of *Bradyrhizobium* sp., and AMF, which increases the values of yield components and grain yield of soybean, compared to the single inoculation of the symbionts. This may be due, among other factors, to co-inoculated soybean plants show higher leaf content of N, P and K, the plants inoculated with a single organism (Babalola *et al.*, 2009; Cabrera and Nápoles, 2011). These effects combine to provide the plant more nutrition, which also has significant effect on yield components and grain yield.

**Cuadro 3. Respuesta de la soya 'Vernal' a la inoculación de Cell-Tech (*B. japonicum*) y micorriza INIFAP (*R. intraradices*) en campo. Ciclo agrícola otoño-invierno 2011-2012, Campo experimental Río Bravo.**

**Table 3. Soybean response 'Vernal' inoculation of Cell-Tech (*B. japonicum*) and mycorrhizal INIFAP (*R. intraradices*) in field. Agricultural cycle autumn-winter 2011-2012, Experimental Field Río Bravo.**

Tratamiento	Índice SPAD	Planta			Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )	
		Número de nódulos	Biomasa seca (g)	Número de vainas		Peso de grano (g)
Cell-Tech (C)	53.9 c	61 b	38.5 bc	56.4 b	12.2 b	2311 b
Micorriza (M)	55.9 bc	5 d	41.2 ab	52.3 b	12.6 b	2477 b
C+M+18-46-00	59.5 a*	29 c	47.3 a	73 a	15.5 a	2782 a
C+M	58.3 ab	89 a	45.6 a	67.9 ab	14.3 a	2699 a
Testigo	50 d	0 d	34.1 c	50.7 c	9.8 c	2080 c
P>F	0.001	0.001	0.006	0.004	0.04	0.008

\*Valores unidos con la misma letra son semejantes (Tukey, 0.05).

La mayor biomasa, el número de vainas, el peso de grano por planta, así como el rendimiento de grano se obtuvieron con las combinaciones de Cell-Tech y micorriza INIFAP (sin fertilización), y Cell-Tech-micorriza INIFAP en suelo con 18-46-00; siendo indudable que la fertilización química asociada con los inoculantes no potencializó la productividad de la soya. Estos resultados son coincidentes a los obtenidos por Hernández y Cuevas (2003), Meghvansi y Mahna (2009) y Cabrera y Nápoles (2011), quienes concluyen que existe una interacción sinérgica a través de la inoculación dual *Bradyrhizobium* sp. y HMA, la cual incrementa los valores de los componentes de rendimiento y el rendimiento de grano de soya, comparados con la inoculación individual de los simbioses. Lo anterior puede obedecer, entre otros factores, a que las plantas de soya coinoculadas muestran mayor contenido foliar de N, P y K, que las plantas inoculadas con un solo organismo (Babalola *et al.*, 2009; Cabrera y Nápoles, 2011); éstos efectos se unen para proporcionar a la planta inoculada

Except the number of nodules, other variables were positively correlated ( $r \geq 0.97^{**}$ ), noted that even if the SPAD index was taken at flowering stage, maintained a close association with the number of pods and grain yield (Figure 1). It was found that the SPAD chlorophyll index is correlated with the content of extractable chlorophyll (Marquard and Tipton, 1987) and with the leaf nitrogen (Piekielek and Fox, 1992; Loredó *et al.*, 2008), so it is considered an indicator of the nutritional and health status of the plant. Similarly, Díaz *et al.* (2008) found an  $r = 0.93$  the SPAD index in bloom with corn grain yield. Compared to the greenhouse experiment reveals that the results obtained with Cell-Tech and mycorrhizal INIFAP in sterile soil, parallel those obtained in natural field conditions.

## Validation

The results of the validation study showed that inorganic fertilizer (18-46-00) in general had no impact on the production and profitability of soybeans. This dose has been



una mayor nutrición, que también tiene efecto importante en los componentes de rendimiento y en la producción de grano.

Excepto el número de nódulos, las demás variables correlacionaron positivamente ( $r \geq 0.97^{**}$ ), se destacó que aun cuando el índice SPAD fue tomado en estado de floración, mantuvo una estrecha asociación con el número de vainas y el rendimiento de grano (Figura 1). Se ha comprobado que el índice SPAD de clorofila se encuentra correlacionado con el contenido de clorofila extraíble (Marquard y Tipton, 1987) y con el nitrógeno foliar (Piekielek y Fox, 1992; Loredó *et al.*, 2008), por lo que se considera un indicador del estatus nutrimental y sanitario de la planta. De forma similar, Díaz *et al.* (2008) encontraron un  $r = 0.93$  entre el índice SPAD en floración con el rendimiento de grano de maíz. En comparación con el experimento de invernadero se revela que los resultados conseguidos con Cell-Tech y micorriza INIFAP, en suelo estéril, son paralelos a los obtenidos en condiciones naturales de campo.

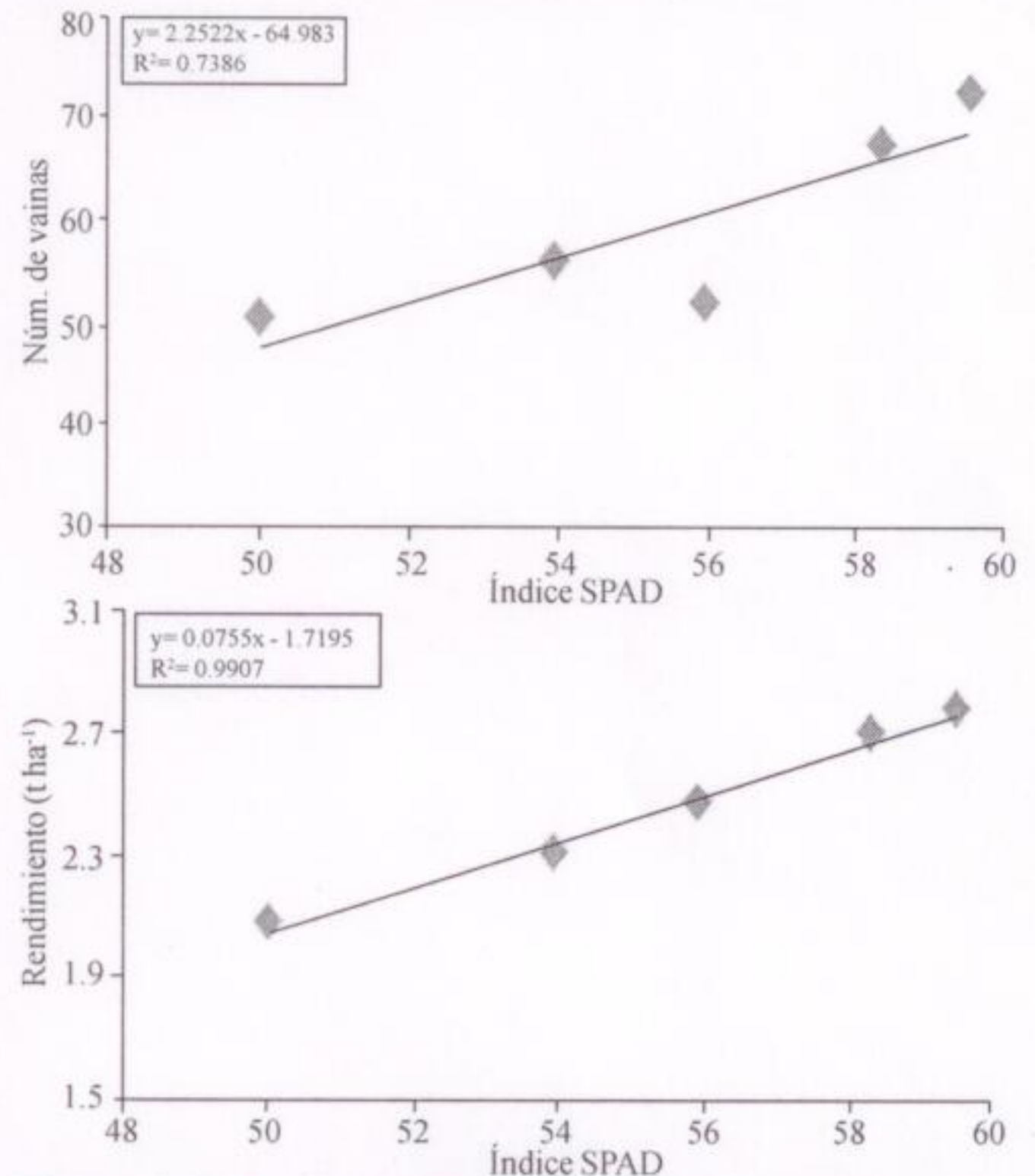
**Validación**

Los resultados del estudio de validación demostraron que la fertilización inorgánica (18-46-00) en general no tuvo impacto en la producción y rentabilidad de la soya. Ésta dosis de fertilizante ha sido recomendada en regiones productoras de soya en México (Maldonado *et al.*, 2007; CERIB, 2011) y utilizada por los productores particularmente en condiciones de riego. Los sistemas agrícolas con uso continuo de fertilizantes, tienen repercusiones negativas no solo en el ambiente, sino además, algunos autores señalan que los resultados de la fertilización inorgánica en soya han mostrado inconsistencias, inclusive en muchos casos la práctica no es económica (Wood *et al.*, 1993; Salvagiotti *et al.*, 2008; Adesemoye and Kloepper, 2009).

De la misma manera, la interacción entre la fertilización inorgánica y los inoculantes no contribuyó a optimizar la productividad de la soya (Cuadro 4). Al respecto, Salvagiotti *et al.* (2008) indicaron que para incrementar el potencial de rendimiento, son necesarios estudios que incluyan los requerimientos nutricionales de la soya asociados a cepas específicas de rizobacterias simbióticas.

Es relevante destacar que hubo compatibilidad entre el sistema de siembra mecanizada utilizado (comúnmente usado por los productores) y la semilla de soya inoculada. Lo anterior es debido a la importancia que tiene en conocer la relación existente entre los inoculantes seleccionados y

recommended fertilizer in soybean production regions in Mexico (Maldonado *et al.*, 2007; CERIB, 2011) and used by producers particularly under irrigation. Agricultural systems with continuous use of fertilizers have a negative impact on not only the environment, but also, some authors point out that the results of inorganic fertilization in soybean have shown inconsistencies, including in many cases the practice is not economical (Wood *et al.*, 1993; Salvagiotti *et al.*, 2008; Adesemoye and Kloepper, 2009).



**Figura 1. Relación entre en número de vainas (arriba) y el rendimiento de grano (abajo) de soya ‘Vernal’ y lecturas SPAD en estado de floración (R<sup>2</sup>). Ciclo agrícola otoño-invierno 2011-2012, Campo experimental Río Bravo.**

**Figure 1. Relation between number of pods (above) and grain yield (below) of soybean ‘Vernal’ and SPAD readings in bloom stage (R<sup>2</sup>). Agricultural cycle Autumn-Winter 2011-2012, Experimental Field Río Bravo.**

Similarly, the interaction between inorganic fertilizer and inoculants did not contribute to optimize the productivity of soybean (Table 4). In this regard, Salvagiotti *et al.* (2008) indicated that to increase yield potential, studies are needed that include soy nutritional requirements associated with specific strains of symbiotic rhizobacteria.

It is relevant to note that there was compatibility between mechanized planting system used (commonly used by producers) and inoculated soybean seed. This is due to the

los sistemas mecanizados de producción, con el fin de que sean integrados dentro del modelo agronómico del cultivo (Plenchette *et al.*, 2005; Grageda *et al.*, 2012). Los mayores rendimientos se registraron con la coinoculación Cell-Tech y micorriza INIFAP, con o sin fertilización. No obstante, con la misma coinoculación, la mayor rentabilidad obtenida fue en suelo no fertilizado. Con Cell-Tech y micorriza INIFAP en suelo fertilizado, la diferencia en el ingreso neto y beneficio-coste con respecto al testigo fue de \$3 896.00 y 0.35, respectivamente; sin fertilización química, las diferencias fueron de \$5 352.00 y 0.54, respectivamente (Cuadro 4). Es indiscutible que los altos costos de los fertilizantes inorgánicos impactan negativamente en la economía de los sistemas de producción. Estos resultados son coincidentes y confirman a los obtenidos experimentalmente.

importance in knowing the relationship between the selected inoculants and mechanized production systems in order to be integrated in the agronomic model crop (Plenchette *et al.*, 2005; Grageda *et al.*, 2012). The highest yields were recorded with coinoculation Cell-Tech and mycorrhizal INIFAP, with or without fertilization. However, with the same coinoculation, the highest yield obtained was in unfertilized soil. With Cell-Tech and mycorrhizal INIFAP in fertilized soil, the difference in the net cost-benefit and income relative to the control was \$3 896.00 and 0.35, respectively; without chemical fertilization, the differences were of \$5 352.00 and 0.54, respectively (Table 4). It is indisputable that the high costs of inorganic fertilizers negatively affect the economics of production systems. These results are consistent and confirm those obtained experimentally.

**Cuadro 4. Rendimiento obtenido en el estudio de validación y análisis económico de los tratamientos. Ciclo agrícola otoño-invierno 2011-2012, Campo experimental Río Bravo.**

**Table 4. Yield obtained in the validation study and economic analysis of treatments. Agricultural cycle Autumn-Winter 2011-2012, Experimental Field Río Bravo.**

Fertilizante	Inoculante	Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> )	Costos de producción (\$ ha <sup>-1</sup> )	Ingreso bruto (\$ ha <sup>-1</sup> )	Ingreso neto (\$ ha <sup>-1</sup> )	B/C
18-46-00	Cell-Tech (C)	1.88 b*	10 490.00	14 403.15	3 913.15	1.37
	Micorriza (M)	1.9 b	10 580.00	14 556.38	3 976.38	1.38
	C + M	2.25 a	10 770.00	17 237.81	6 467.81	1.6
	Testigo	1.68 cd	10 300.00	12 870.90	2 570.90	1.25
00-00-00	Cell-Tech (C)	1.86 bc	9 180.00	14 249.93	5 069.93	1.55
	Micorriza (M)	1.85 bc	9 270.00	14 173.31	4 903.31	1.53
	C + M	2.22 a	9 460.00	17 007.98	7 547.98	1.8
	Testigo	1.49 d	8 990.00	11 185.43	2 195.43	1.26

\*Valores unidos con la misma son semejantes mediante t-student ( $p \leq 0.05$ ).

El efecto sinérgico de la inoculación con Cell-Tech y micorriza INIFAP en soja 'Vernal', que incrementó el rendimiento y la rentabilidad de la producción, representa una alternativa biotecnológica que atiende a una necesidad de manejo sostenible de los agrosistemas, donde el papel de los microorganismos se ha incrementado de manera prominente dentro de la conservación y la fertilidad de los suelos.

## Conclusiones

De los inoculantes microbianos evaluados en soja bajo condiciones de invernadero, se obtuvo la mayor efectividad con la inoculación independiente o combinada de los tratamientos Cell-Tech y micorriza INIFAP. Estos mismos tratamientos demostraron en campo que la mayor biomasa,

The synergistic effect of inoculation with mycorrhizal Cell-Tech and soy INIFAP 'Vernal', which increased the performance and profitability of production, represents a biotechnological alternative that serves a need for sustainable management of agricultural systems, where the role of microorganisms has increased prominently in conservation and soil fertility.

## Conclusions

Microbial inoculants evaluated in soybean under greenhouse conditions, the greater effectiveness was obtained with independent or combined inoculation of Cell-Tech and INIFAP mycorrhizal treatments. These same treatments in the field showed that the highest biomass, number of pods per

número de vainas, peso de grano por planta y rendimiento de grano, se obtuvieron con la coinoculación de Cell-Tech y micorriza INIFAP en suelo con o sin fertilización inorgánica (18-40-00). Los resultados de validación indicaron que los mayores rendimientos se registraron con la coinoculación de Cell-Tech y micorriza INIFAP, con o sin la fertilización inorgánica. El análisis económico mostró que la mayor rentabilidad (B/C= 1.8) de la producción de soya fue con la coinoculación en suelo no fertilizado.

## Agradecimiento

Esta contribución fue financiada por la Fundación Produce Tamaulipas y el Patronato para la Investigación, Fomento y Sanidad Vegetal de Tamaulipas, a través del proyecto Núm. 363567454.

## Literatura citada

- Adesemoye, A. O. and Kloepper, J. W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1-12.
- Antunes, P. M.; Varennes, A.; Zhang, T. and Goss, M. J. 2006. The tripartite symbiosis formed by indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* and soybean under field conditions. *J. Agron. Crop Sci.* 192:373-378.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 2010. La importancia del frijol soya. Dirección de estudios y análisis de mercados. [www.infoaserca.gob.mx/fichas/ficha30-soya201007.pdf](http://www.infoaserca.gob.mx/fichas/ficha30-soya201007.pdf).
- Babalola, O. A.; Atayese, M. O. and Soyoye, T. 2009. Influence of *Bradyrhizobium* and two *Glomus* species on the growth and yield of soybean. *J. Agr. Sci. Env.* 9:79-95.
- Benítez, T.; Rincón A. M.; Limón, M. C. and Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7:249-260.
- Boomsma, C. R. and Vyn, J. T. 2008. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crops Res.* 108:14-31.
- Cassán, F.; Perrig, D.; Sgroy, V.; Masciarelli, O.; Penna, C. and Luna, V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*). *Soil Biol.* 45:28-35.
- Centro de Investigación Regional Noreste (CERIB). 2011. Paquetes tecnológicos de producción de cultivos. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. 40 p.
- Corbera, G. J. y Nápoles, G. M. 2011. Inoculación conjunta *Bradyrhizobium elkanii*-hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya. *Cultivos Trop.* 32:13-19.
- plant grain weight and grain yield was obtained with the co-inoculation of Cell-Tech and INIFAP mycorrhiza in soil with or without inorganic fertilizer (18-40-00). The validation results showed that the highest yields were recorded with co-inoculation of mycorrhiza and Cell-Tech INIFAP, with or without inorganic fertilization. The economic analysis showed that the higher profitability (B/C= 1.8) of soybean production was co-inoculation with non-fertilized soil.

*End of the English version*



- Díaz, F. A. y Garza, C. I. 2006. Colonización micorrízica arbuscular y crecimiento de genotipos de pasto Buffel (*Cenchrus ciliaris*). *Rev. Fitotec. Mex.* 29:203-206.
- Díaz, F. A.; Salinas, G. J.; Garza, C. I. y Mayek, P. N. 2008. Impacto de labranza e inoculación micorrízica arbuscular sobre la pudrición carbonosa y rendimiento de maíz en condiciones semiáridas. *Rev. Fitotec. Mex.* 31:257-263.
- Glick, B. R.; Patten, C. L.; Holguín, G. and Penrose, D. M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press. London. 267 p.
- Grageda, C. O.; Díaz, F. A.; Peña, C. J. y Vera, N. J. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 3:1261-1274.
- Hernández, M. and Cuevas, F. 2003. The effect of inoculating with arbuscular mycorrhiza and *Bradyrhizobium* strains on soybean (*Glycine max*) crop development. *Cultivos Trop.* 24:19-21.
- Hernández, M. y Chailloux, M. 2004. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos Trop.* 2:5-12.
- Hungría, M.; Rubens, C.; Souza, E. and Pedrosa, F. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yield of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413-425.
- Jajajuddin, M. 2005. Effect of inoculation with VAM-fungi and *Bradyrhizobium* on growth and yield of soybean. *Pak. J. Bot.* 37:169-173.
- Klironomos, J. M. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:2292-2301.
- Liu, A.; Hamel, C.; Hamilton, R. I.; Ma, B. L. and Smith, D. L. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays*) grown in soil at different P and micronutrients levels. *Mycorrhiza* 9:331-336.
- Loredo, O. C.; Espinosa, D.; Ferrera, C. R.; Castellanos, J. y Pérez, J. 2008. Biofertilización bacteriana del pasto buffel. *In: Díaz, F. A. y Mayek, P. N. (Eds.). La biofertilización como tecnología sostenible. Plaza y Valdés, CONACYT. México. 55-66 pp.*
- Maldonado, M. N.; Ascencio, L. G. y Ávila, V. J. 2007. Guía para cultivar soya en el sur de Tamaulipas. Campo Experimental Sur de Tamaulipas, INIFAP. Folleto Núm. 2. 83 p.
- Marquard, R. D. and Tipton, J. L. 1987. Relationship between extractable chlorophyll and *in situ* method to estimate leaf greenness. *HortScience* 22:1327.
- Masunaka, A.; Mitsuro, H. and Takenaka, S. 2011. Plant-growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicas*. *Microbes Environ.* 26:128-134.

- Meghvansi, M. K. and Mahna S. K. 2009. Evaluating the symbiotic potential of *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium japonicum* in vertisol with two soybean cultivars. *Amer-Eurasian J. Agr.* 2:21-25.
- Montero, L.; Duarte, C.; Cun, R.; Cabrera, J. A. y González, P. J. 2010. Efectividad de biofertilizantes micorrízicos en el rendimiento de pimiento (*Capsicum annuum*) cultivado en diferentes condiciones de humedad del sustrato. *Cultivos Trop.* 31:11-14.
- Oseni, T. O.; Shongwe, S. N. and Masarirambi, T. 2010. Effect of arbuscular mycorrhiza inoculation on the performance of tomato nursery seedlings in vermiculite. *Int. J. Agr. Biol.* 12:789-792.
- Piekielek, W. P. and Fox, R. H. 1992. Use of chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. *Agron. J.* 84:59-65.
- Plenchette, C.; Dauphin, C. C.; Maynard, J. M. and Fortin, J. A. 2005. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* 85:31-40.
- 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 Res.* 108:1-13.
- Smith, G. S. and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3<sup>rd</sup> (Ed.). Academic Press. London. 750 p.
- Tchabi, A.; Coyne, D.; Hountondji, F.; Lawouin, L.; Wiemken, A. and Oehl, F. 2010. Efficacy of indigenous arbuscular mucorrhizal fungi for promoting white yeam (*Dioscorea rotundata*) growth in West Africa. *Appl. Soil Ecol.* 45:92-100.
- Vassey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
- Wood, C. W.; Torbert, H. A. and Weaver, D. B. 1993. Nitrogen fertilizer effects on soybean growth, yield and seed composition. *J. Prod. Agric.* 6:354-360.
- Xiang G.; Lu X.; Wu. M.; Zhang, H.; Pan R.; Tian J.; Li, S. and Liao, H. 2012. Co-inoculation with rhizobia and AMF inhibited soybean red crown rot: from field study to plant defense-related gene expression analysis. *PLoS One* 7:33-37.
- Yon, R. Y.; Pons, B. N.; Fernández, M. F. y Rodríguez, H. P. 2004. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Ecol. Aplic.* 3:162-171.
- Zilli, J. E.; Campo, R. J. e Hungria, M. 2010. Eicácia da inoculacao de *Bradyrhizobium* em pre-semeadura da soja. *Pesq. Agrop. Bras.* 45:335-338.