

Biological nitrogen fixation in chipilin (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a sustainable nitrogen source for commercial production

Fijación biológica de nitrógeno en chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), una fuente sostenible de nitrógeno para la producción comercial

Fátima Camarillo-Castillo^{1*}; Francis X. Mangan²

¹Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, Programa Mundial de Trigo. Carretera México-Veracruz km 45, El Batán, Texcoco, Estado de México, C. P. 56237, MEXICO.

²University of Massachusetts Amherst, Stockbridge School of Agriculture. Holdsworth Way, Amherst, MA., 01003-9286, UNITED STATES OF AMERICA.

*Corresponding author: f.camarillo@cgiar.org, tel. 554 941 4604.

Abstract

The increasing demand for fresh produce traditionally consumed by members of the Latino community in their countries of origin provides an opportunity to produce these specialty crops in the Northeastern region of the United States. In Massachusetts, more commercial farmers are interested in growing vegetables common in Latin America. One example is chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a leguminous leafy green native to South and Central America. Preliminary studies indicate that this crop requires nitrogen (N) applications as high as 200 kg·ha⁻¹ to achieve the quality standards required to market this vegetable. The objective of this study was to evaluate the capacity of specific Rhizobia strains to colonize chipilín roots and estimate the N supplied by the bacterial colonization and its impact on quality traits and economic yield. The effects of N supplied by biological fixation in plants inoculated with different Rhizobia species were evaluated. *Rhizobium leguminosarum biovar* colonized chipilín and enhanced the total fresh weight of the crop by 158 kg·ha⁻¹. Supplementary applications of inorganic N had little effect on the efficiency of colonization by the bacterial strains. Furthermore, applying more than 80 kg·ha⁻¹ of N increased only the green color of the leaves and was economically inefficient in increasing the total fresh weight of the crop. Thus, inoculations with *Rhizobium leguminosarum biovar* can be integrated into a sustainable production system for complementing or replacing chemical fertilizers and preventing deleterious effects on the environment.

Keywords: legumes, crop sustainability, chemically fixed fertilizers, leaching, Rhizobia.

Resumen

La demanda creciente de productos frescos consumidos tradicionalmente por miembros de la comunidad latina en su país de origen brinda la oportunidad de producir estos cultivos especializados en la región noreste de los Estados Unidos. En Massachusetts, cada vez más agricultores están interesados en cultivar hortalizas comunes en América Latina. Un ejemplo de ello es el chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), que es una leguminosa de hoja verde nativa de la parte Sur y Centro de América. Estudios preliminares indican que dicho cultivo requiere aplicaciones de nitrógeno (N) de hasta 200 kg·ha⁻¹ para lograr los estándares de calidad necesarios para su comercialización. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de cepas específicas de Rhizobia para la colonización de raíces de chipilín y estimar el N suministrado por la colonización bacteriana, así como su impacto en la calidad y en el rendimiento económico. Se evaluaron los efectos del suministro de N por la fijación biológica de diferentes especies de Rhizobia en plantas inoculadas. *Rhizobium leguminosarum biovar* colonizó al chipilín e incrementó el peso fresco total del cultivo en 158 kg·ha⁻¹. Aplicaciones suplementarias de N inorgánico tuvieron poco efecto sobre la eficacia de colonización por las cepas bacterianas. La aplicación de más de 80 kg·ha⁻¹ de N inorgánico únicamente aumentó el color verde de las hojas, y fue económicamente ineficiente para incrementar el peso fresco total del cultivo. Por lo anterior, las inoculaciones con *Rhizobium leguminosarum biovar* pueden integrarse a sistemas de producción sostenibles para complementar o reemplazar fertilizantes químicos y prevenir efectos nocivos en el medio ambiente.

Palabras clave: leguminosas, sostenibilidad del cultivo, fertilizantes fijados químicamente, lixiviación, Rhizobia.

Please cite this article as follows (APA 6): Camarillo-Castillo, F., & Mangan, F. X. (2020). Biological nitrogen fixation in chipilin (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a sustainable nitrogen source for commercial production. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(2), 125-141. doi: 10.5154/r.rchsh.2020.01.002



Revista Chapingo
Serie Horticultura

Introduction

According to the U.S. Census Bureau, 19 % of the total U.S. population in 2020 is Hispanic and by the year 2060 this will reach 11.2 M people (Vespa, Medina, & Armstrong, 2020). A recent trend among this community is to reside in different areas in addition to the typical “gateway” states of Texas and California. In 2008, Hispanics were the largest ethnic minority in Massachusetts and represented 8 % of the population of the state (Mangan et al., 2008). This rapid expansion of new communities in New England has brought opportunities for commercial farmers to grow and market fresh products popular among these new and growing ethnicities.

In Massachusetts, research trials are actively conducted every year to identify crops that can be produced by local growers and sold in densely populated areas by the Latino community. This transition to the production of new specialty crops is a market opportunity for farmers to increase their profitability. One of the crops currently produced in Massachusetts is chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), also called chepil, a leafy vegetable used in the traditional cuisine of Central America and Southern Mexico (Chávez-Quinones, Roldan-Toriz, Sotelo-Ortiz, Ballinas-Díaz, & López-Zúñiga, 2009). This vegetable grows during the frost-free period with a weekly production of 800 kg·ha⁻¹ and a wholesale value that can reach \$8.83 USD per kilogram.

This article reports on one of the first attempts to commercially produce chipilín in the United States. In Massachusetts, this crop is grown under similar agronomic conditions to those described for collards (*Brassica oleracea*) in the New England Vegetable Management Guide (Howell, 2011). Although the initial economic investment for the establishment of the crop is moderately high, the cost is compensated by the multiple harvests and its excellent wholesale market price. In Massachusetts, it is recommended to grow chipilín under a synthetic row cover to manage the infestation of potato leafhopper (*Empoasca fabae*), and supply macro and micronutrients with inorganic fertilizers through drip irrigation at similar rates to those recommended for collards. As a legume crop, chipilín can naturally fix N from the atmosphere; however, 200 kg·ha⁻¹ of inorganic N are applied to achieve the quality standards required by the market.

Food crops require N fertilizers to improve their yield and quality of crops. Currently, a large percentage of these N fertilizers are chemically synthesized through the Haber-Bosch process, a nitrogen fixation process that requires large amounts of fossil fuels (Olivares, Bedmar, & Sanjuán, 2013). The high environmental cost of synthetic N fertilization requires the identification

Introducción

De acuerdo con la Oficina de Censo de Estados Unidos de América, 19 % de la población total de dicho país, en 2020, es hispana, y para 2060 esta alcanzará los 11.2 millones de personas (Vespa, Medina, & Armstrong, 2020). Una tendencia reciente entre la comunidad hispana es residir en diferentes áreas además de los típicos estados de “ingreso” de Texas y California. En 2008, los hispanos eran la minoría étnica más grande en Massachusetts, y representaban el 8 % de la población del estado (Mangan et al., 2008). Esta rápida expansión de nuevas comunidades en Nueva Inglaterra ha brindado oportunidades para que los agricultores cultiven y comercialicen productos frescos populares entre estas nuevas y crecientes etnias.

En Massachusetts, todos los años se realizan ensayos de investigación para identificar cultivos que se pueden producir localmente y vender en áreas densamente pobladas por la comunidad latina. Esta transición a la producción de nuevos cultivos especializados es una oportunidad de mercado para que los agricultores aumenten su rentabilidad. Uno de los cultivos producidos actualmente en Massachusetts es el chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), también llamado chepil, que es una hortaliza de hoja utilizada en la cocina tradicional de América Central y el Sur de México (Chávez-Quinones, Roldan-Toriz, Sotelo-Ortiz, Ballinas-Díaz, & López-Zúñiga, 2009). Esta hortaliza crece durante el período libre de heladas, con una producción semanal de 800 kg·ha⁻¹ y un valor mayorista que puede alcanzar los \$8.83 USD por kilogramo.

El presente artículo reporta uno de los primeros intentos para producir comercialmente el chipilín en Estados Unidos. En Massachusetts, esta hortaliza se cultiva en condiciones agronómicas similares a las descritas para col (*Brassica oleracea*) en la Guía de Manejo de Hortalizas de Nueva Inglaterra (Howell, 2011). Aunque la inversión económica inicial para el establecimiento del cultivo es moderadamente alta, el costo es compensado por las múltiples cosechas y su excelente precio de mercado mayorista. En Massachusetts se recomienda cultivar chipilín bajo una cubierta sintética para controlar la infestación de la “chicharra” de la papa (*Empoasca fabae*), además de suministrar macro y micronutrientes con fertilizantes inorgánicos a través de riego por goteo con dosis similares a las recomendadas para la col. Como leguminosa, el chipilín puede fijar naturalmente el N de la atmósfera; sin embargo, se aplican 200 kg·ha⁻¹ de N inorgánico para lograr los estándares de calidad requeridos por el mercado.

Los cultivos alimenticios requieren fertilizantes con N para mejorar su rendimiento y calidad. Actualmente, la gran mayoría de estos fertilizantes nitrogenados se

of alternative biological sources of N. Biological nitrogen fixation (BNF) is a sustainable process that can potentially enhance the crop adaptability to environments with low N content. Overall, BNF supplies one fourth of the total amount of N fixed every year worldwide (Masson-Boivin, Giraud, Perret, & Batut, 2009) and decreases CO₂ emissions emitted in the production of inorganic nitrogen fertilizers. Approximately, 80 % of total natural N fixation occurs via symbiosis between leguminous plants and alphaproteobacteria, especially *Rhizobia* (Olivares et al., 2013).

Nitrogen in the gas form (N₂) is an unlimited resource in the atmosphere, but plants need to create a symbiotic relationship with prokaryotes to synthesize these molecules into N-rich compounds such as NH₃, NO₃ and NO₂ (Nasholm, Kielland, & Ganeteg, 2009). The colonization by the symbiont is triggered when the flavonoids of the plant and the Nod proteins are present and develop CLOS Nod factors. CLOS Nod factors induce morphological changes in the plant that allow the bacteria to invade the stem cortex (Cooper, 2004). After intracellular colonization of the root system occurs, the specialized bacteria absorb N₂ from the environment and the enzyme nitrogenase breaks the triple bond in the N₂ to convert it into NH₄ (Havlin, 2014). The efficiency of the N-fixing symbiosis is determined by the specificity between the legume crop and the symbiont. The most efficient nitrogen-fixing systems are symbioses involving Gram-negative bacteria from the genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* (Olivares et al., 2013).

Preliminary trials identified strains from the genus *Bradyrhizobium* as symbionts of chipilín (Barnish & Spinelli, 2011; Isidoro & Messier, 2009). In these results, *Bradyrhizobium* USDA 3456 and 3384, as well as *Bradyrhizobium* PNL0i-Brady, efficiently colonized chipilín root systems and induced the fixation of N with potential for reducing applications of inorganic N (Isidoro & Messier, 2009). Specifically, an increase in N fixation and improvement in the overall health of the plants were associated with inoculations with *Bradyrhizobium* USDA 3456. In Central America, chipilín grows with minimum cultivation requirements and is infected by indigenous soil borne N-fixing bacteria. In a recent study, bacterial strains were isolated from nodules of plants collected in Central America and their efficiency to fix N was evaluated. Some of the bacterial strains were as efficient as inorganic N inputs in supplying this nutrient to the crop (Guamán-Díaz, Torres-Gutiérrez, Granda-Mora, & Nápoles-García, 2016).

In the present study, the colonization capacity of a group of *Rhizobia* strains in chipilín was evaluated and how this colonization affects the economic performance

sintetizan químicamente a través del proceso Haber-Bosch, un proceso de fijación de nitrógeno que requiere grandes cantidades de combustibles fósiles (Olivares, Bedmar, & Sanjuán, 2013). El alto costo ambiental de la fertilización con N sintético requiere de la identificación de fuentes biológicas alternativas de N. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso sostenible que puede mejorar potencialmente la adaptabilidad del cultivo en ambientes con bajo contenido de N. En general, la FBN suministra una cuarta parte de la cantidad total de N fijada cada año a nivel mundial (Masson-Boivin, Giraud, Perret, & Batut, 2009), y disminuye las emisiones de CO₂ emitidas en la producción de fertilizantes nitrogenados inorgánico. Aproximadamente, 80 % de la fijación natural total de N ocurre por la simbiosis entre leguminosas y alphaproteobacteria, especialmente *Rhizobia* (Olivares et al., 2013).

El nitrógeno en forma de gas (N₂) es un recurso ilimitado en la atmósfera, aunque las plantas necesitan crear una relación simbiótica con procariontes para sintetizar estas moléculas en compuestos ricos en N como NH₃, NO₃ y NO₂ (Nasholm, Kielland, & Ganeteg, 2009). La colonización por el simbiote se desencadena cuando los flavonoides de la planta y las proteínas Nod están presentes y desarrollan factores CLOS Nod. Los factores CLOS Nod inducen cambios morfológicos en la planta que permiten a las bacterias invadir la corteza del tallo (Cooper, 2004). Después de la colonización intracelular del sistema radicular, las bacterias especializadas absorben N₂ del ambiente y la enzima nitrogenasa rompe el triple enlace en el N₂ para convertirlo en NH₄ (Havlin, 2014). La eficiencia de la simbiosis en la fijación de N está determinada por la especificidad entre la leguminosa cultivada y el simbiote. Los sistemas de fijación de nitrógeno más eficientes son las simbiosis que involucran bacterias Gram-negativas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Olivares et al., 2013).

Ensayos preliminares identificaron cepas del género *Bradyrhizobium* como simbiotes del chipilín (Barnish & Spinelli, 2011; Isidoro & Messier, 2009). En estos resultados, *Bradyrhizobium* USDA 3456 y 3384, así como *Bradyrhizobium* PNL0i-Brady, colonizaron eficientemente los sistemas de raíz de chipilín e indujeron la fijación de N con potencial para reducir las aplicaciones de N inorgánico (Isidoro & Messier, 2009). Específicamente, inoculaciones con *Bradyrhizobium* USDA 3456 se asociaron con el incremento en la fijación de N y la mejora de la salud general de las plantas. En América Central, el chipilín es cultivado con los requerimientos mínimos y es infectado por bacterias autóctonas de fijación de N del suelo. En un estudio reciente, se aislaron cepas bacterianas de nódulos de plantas recolectadas en América Central y se evaluó su eficiencia para fijar N. Algunas de las cepas

and the specific characteristics of the plant related to marketing was examined. Additionally, the use of bacterial inoculants in large-scale crop production systems was validated as an alternative source of N. To accomplish this, we have established the following specific objectives: 1) determine the N use efficiency of the crop, 2) evaluate the capacity of specific *Rhizobia* strains for colonization, and 3) indirectly estimate the N supplied by the bacterial colonization and assess the impact of the N fixation on quality traits and economic yield.

Materials and methods

Seedling production

Plant seedlings were produced from a single cultivar with seed provided by the Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) in El Salvador. The seeds were sown in plastic trays, 54 by 28 cm, filled with peat moss and covered with 1 cm of vermiculite. Twenty days after sowing, the seedlings were transferred to plastic trays with 72 square cells and placed under controlled conditions until transplant to the field or greenhouse. The settings of the controlled environment were as follows: average temperature of 21 °C during the day, 16 °C at night, and 12 h of light and dark.

Multiplication of the *Rhizobia* strains

The *Rhizobia* strains evaluated were *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) (R_1), *Bradyrhizobium* USDA 3384 (R_2), *Rhizobium leguminosarum* biovar (R_3) and *Bradyrhizobium* USDA 2370 (R_4). The strains R_2 and R_4 were multiplied in modified arabinose gluconate (MAG) liquid medium, with the pH adjusted to 6.6. Bacterial growth was induced by thawing a small portion of the frozen bacteria in 100 mL of liquid MAG medium and placing the solution on a rotary shaker at 200 rpm. After sufficient growth of the bacteria was observed, the solution was diluted in four concentrations (1:1, 1:10, 1:100 and 1:1,000) and transferred to individual petri dishes (100 x 15 mm) with solid MAG medium. The whole procedure was performed under a laminar flow hood. The inoculant for strains R_1 and R_3 was obtained from two commercial products developed by INTX microbials-llc, Indiana, USA. The strain R_1 was inoculated with the commercial product N-DURE® inoculant for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and the strain R_3 with the N-DURE® inoculant for beans (*Phaseolus* spp. L.).

A solution of each of the nitrogen-fixing bacterial strains was prepared with a minimum concentration of 2×10^8 colony-forming units (CFUs). The bacterial colonization of the root system was induced by applying 10 mL of

bacterianas fueron tan eficientes como los insumos inorgánicos de N para suministrar este nutriente al cultivo (Guamán-Díaz, Torres-Gutiérrez, Granda-Mora, & Nápoles-García, 2016).

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de colonización de un conjunto de cepas de *Rhizobia* en chipilín y se examinó cómo esta colonización afecta al rendimiento económico y los caracteres específicos de la planta relacionados con el mercadeo. Adicionalmente, se validó el uso de inoculantes bacterianos en sistemas de producción de cultivos a gran escala como una fuente alternativa de N. Para lograr esto, se establecieron los siguientes objetivos específicos: 1) determinar la eficiencia de uso de N del cultivo, 2) evaluar la capacidad de cepas específicas de *Rhizobia* para la colonización y 3) estimar indirectamente el N suministrado por la colonización bacteriana y evaluar el impacto de la fijación de N en los caracteres de calidad y de rendimiento económico.

Materiales y métodos

Producción de plántula

Las plántulas de un único cultivar se obtuvieron con semillas proporcionadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) de El Salvador. Las semillas se sembraron en bandejas de plástico, de 54 por 28 cm, con turba y cubiertas con 1 cm de vermiculita. Veinte días después de la siembra, las plántulas se transfirieron a bandejas de plástico con 72 celdas y se colocaron en condiciones controladas hasta el trasplante a campo o a invernadero. Las condiciones del ambiente controlado fueron: temperatura promedio de 21 °C durante el día, 16 °C por la noche, y 12 h de luz y oscuridad.

Multiplicación de cepas de *Rhizobia*

Las cepas de *Rhizobia* evaluadas fueron: *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) (R_1), *Bradyrhizobium* USDA 3384 (R_2), *Rhizobium leguminosarum* biovar (R_3) y *Bradyrhizobium* USDA 2370 (R_4). Las cepas R_2 y R_4 se multiplicaron en medio líquido modificado de gluconato de arabinosa (MAG), con pH ajustado a 6.6. El crecimiento bacteriano se indujo descongelando una pequeña porción de las bacterias en 100 mL de medio líquido MAG y colocando la solución en un agitador rotatorio a 200 rpm. Después de observar un crecimiento suficiente de la bacteria, la solución se diluyó en cuatro concentraciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1,000) y se transfirió a cajas Petri individuales (100 x 15 mm) con medio MAG sólido. Todo el procedimiento se realizó bajo campana de flujo laminar. El inoculante para las cepas R_1 y R_3 se obtuvo de dos productos comerciales desarrollados por INTX microbials-llc, Indiana, EUA. La cepa R_1 provino

the solution to the substrate in which the seedlings were growing using a plastic syringe.

Greenhouse experiment

A greenhouse trial (Greenhouse experiment 1) was conducted in 2012 to assess the inoculation efficiency of specific *Rhizobia* strains and determine the interaction of the bacterial colonization with applications of inorganic N. The experiment was carried out at the facilities of the College of Natural Sciences of the University of Massachusetts, Amherst. The general settings of the greenhouse were: 14 h of light with average temperatures of 21 °C during the day and 16 °C at night. The seedlings were transplanted into nursery pots, 18.5 cm in height and 16.2 cm in diameter, filled with a mix of river sand and perlite in 1:1 ratio.

The design of the experiment was a randomized complete block with four replications. In the trial, four *Rhizobia* strains (R_1 , R_2 , R_3 and R_4) and a control treatment (R_0) were evaluated in combination with seven concentrations of N (0, 26.25, 52.5, 105, 157.5, 210 and 262.5 mg·L⁻¹).

The N rates were supplied through a modified 0.5 M Hoagland nutrient solution (Hoagland & Arnon, 1950), using sodium nitrate (NaNO₃) as the main N source. Macro and micronutrients were also included in the Hoagland solution as potassium phosphate (KH₂PO₄), magnesium sulfate (MgSO₄), calcium chloride (CaCl₂) and potassium chloride (KCl) in the following concentrations (mg·L⁻¹): 234 potassium (K), 31 phosphorus (P), 48 magnesium (Mg), 64 sulfur (S), 200 calcium (Ca) and 525 chloride (Cl). The concentrations of the macro and micronutrients remained constant in all seven nutrient solutions, except for sodium (Na): 0, 44, 87, 173, 259, 345 and 432 mg·L⁻¹.

The root systems of the plants were carefully washed, and the number of nodules per plant (NN) and the average weight per nodule (NW, in mg) were recorded once the crop cycle was concluded.

Field experiments

A field evaluation (Field experiment 1) was conducted in 2011 to determine the response of the crop to eight doses of inorganic N. In 2012, an additional experimental trial (Field experiment 2) was carried out to assess the inoculation efficiency of three *Rhizobia* nitrogen fixing bacteria strains under different rates of inorganic N. The two field trials were conducted at the Research Farm of the University of Massachusetts in South Deerfield, Massachusetts. The characteristics of the soil where the experiments were established

del producto comercial inoculante N-DURE® para caupí (*Vigna unguiculata* L.), y la cepa R_3 del inoculante N-DURE® para frijol (*Phaseolus* spp. L.).

Se preparó una solución de cada una de las cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno con concentración mínima de 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). La colonización bacteriana del sistema radicular se indujo al aplicar, con jeringa de plástico, 10 mL de la solución al sustrato donde crecían las plántulas.

Experimento en invernadero

En 2012 se realizó un ensayo en invernadero (Experimento de invernadero 1) para evaluar la eficacia de la inoculación de cepas específicas de *Rhizobia* y determinar la interacción de la colonización bacteriana con aplicaciones de N inorgánico. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Colegio de Ciencias Naturales de la Universidad de Massachusetts, Amherst. Las condiciones generales del invernadero fueron: 14 h de luz con temperatura promedio de 21 °C durante el día y 16 °C por la noche. Las plántulas se trasplantaron a macetas de vivero de 18.5 cm de altura y 16.2 cm de diámetro, llenadas con una mezcla de arena de río y perlita en proporción 1:1.

El diseño experimental fue bloques completos al azar con cuatro repeticiones. En el ensayo se evaluaron cuatro cepas de *Rhizobia* (R_1 , R_2 , R_3 y R_4) y un tratamiento testigo (R_0), en combinación con siete concentraciones de N (0, 26.25, 52.5, 105, 157.5, 210 y 262.5 mg·L⁻¹).

Las dosis de N se suministraron a través de la solución nutritiva de Hoagland 0.5 M modificada (Hoagland & Arnon, 1950), utilizando nitrato de sodio (NaNO₃) como la fuente principal de N. Macro y micronutrientes también se incluyeron en la solución de Hoagland mediante fosfato de potasio (KH₂PO₄), sulfato de magnesio (MgSO₄), cloruro de calcio (CaCl₂) y cloruro de potasio (KCl), lo que aportó las siguientes concentraciones (mg·L⁻¹): 234 de potasio (K), 31 de fósforo (P), 48 de magnesio (Mg), 64 de azufre (S), 200 de calcio (Ca) y 525 de cloruro (Cl). Las concentraciones de macro y micronutrientes se mantuvieron constantes en las siete soluciones nutritivas, a excepción del sodio (Na): 0, 44, 87, 173, 259, 345 y 432 mg·L⁻¹.

Los sistemas radiculares de las plantas se lavaron cuidadosamente, y una vez que el ciclo de cultivo finalizó se registró el número de nódulos por planta (NN) y el peso promedio por nódulo (PN, en mg).

Experimentos en campo

En 2011 se realizó una evaluación en campo (Experimento de campo 1) para determinar la

are as follows: Occum fine sandy loam (coarse-loamy, mixed, mesic Fluventic Dystrudept) with a pH of 6.5, 2.4 % organic matter, 10 ppm P_2O_5 , 53 ppm K, 556 ppm Ca, 65 ppm Mg and 91.23 ppm NO_3 .

The plots were established on raised beds, with a separation of 1.8 m, covered with degradable black mulch (BioTelo®). The seedlings were transplanted 30 cm apart in two rows per bed to obtain a plant density of 29,000 plants·ha⁻¹. Irrigation was provided with a drip system and scheduled according to the information collected from the soil tensiometers (Irrometer®, USA) placed at 38 and 76 cm deep ground. Phosphorus (33.7 kg·ha⁻¹ as P_2O_5) and potassium (123.3 kg·ha⁻¹ as K_2O) were supplied with inorganic fertilizer through drip irrigation according to the general recommendations for kale and collards in the New England Vegetable Management Guide, 2011-2012 (Howell, 2011).

Six rates of inorganic N were evaluated in Field experiment 1 (40, 80, 120, 160, 200 and 240 kg·ha⁻¹), and two additional N rates were included in Field experiment 2 (0 and 280 kg·ha⁻¹). Each rate of N was supplied in five applications containing 12.5 % of the total N each. The N source for both experiments was ammonium nitrate (NH_4NO_3). In Field experiment 2, the Rhizobia strains R_1 , R_2 , R_3 and R_4 were also evaluated in combination with seven concentrations of inorganic N. Both experimental trials were evaluated in a randomized complete block design with five replications.

The fresh shoots (FW, in kg·ha⁻¹) were harvested five times when the marketable size for chipilín of 15 to 20 cm was reached and samples were dried in an oven for 48 h at 75 °C to obtain the dry weight (DW, in kg·ha⁻¹). The color, vigor and uniformity of the crop were recorded on a visual scale from 1 to 5, where 1 was the worst and 5 was the best. Plant height (PH, in cm) was also measured. The following traits were examined only in Field experiment 2: leaf chlorophyll content, determined using a Minolta meter (SPAD-502, Mexico) (SPAD reading); total nitrogen content (TN, in mg·L⁻¹) of dry matter, estimated using the Dumas combustion method in an element analyzer system; and NN and NW, obtained by cleaning the root system within a 35 cm radius around the plant.

Statistical analysis

The FW, DW, SPAD, PH, TN, NN and NW readings were subject to analysis of variance for a randomized completed block experiment.

$$Y_{ijk} = \mu + N_i + R_j + R_j \times N_i + \beta_k + \varepsilon_{ijk} \begin{pmatrix} i = 1...8 \\ j = 1...3 \\ k = 1...5 \end{pmatrix}$$

respuesta del cultivo a ocho dosis de N inorgánico. En 2012, se llevó a cabo un ensayo experimental adicional (Experimento de campo 2) para evaluar la eficiencia de inoculación de tres cepas de bacterias de Rhizobia fijadoras de nitrógeno con diferentes dosis de N inorgánico. Ambas pruebas se llevaron a cabo en la Granja Experimental de la Universidad de Massachusetts en South Deerfield, Massachusetts. Las características del suelo donde se establecieron los experimentos son: occum limo arenoso fino (grava-arcillosa, mezclado, Fluventic Dystrudept) con pH de 6.5, 2.4 % de materia orgánica, 10 ppm de P_2O_5 , 53 ppm de K, 556 ppm de Ca, 65 ppm de Mg y 91.23 ppm de NO_3 .

Las parcelas se establecieron en camas elevadas con separación de 1.8 m, cubiertas con plástico de acolchado negro degradable (BioTelo®). Las plántulas se trasplantaron a 30 cm de distancia en doble hilera por cama para obtener una densidad de plantación de 29,000 plantas·ha⁻¹. El riego se proporcionó con un sistema de goteo y se programó de acuerdo con la información recopilada por tensiómetros del suelo (Irrometer®, EUA) colocados a 38 y 76 cm de profundidad del suelo. El fósforo (33.7 kg·ha⁻¹, como P_2O_5) y el potasio (123.3 kg·ha⁻¹, como K_2O) se suministraron con fertilizante inorgánico mediante riego por goteo de acuerdo con las recomendaciones generales para col rizada y acelgas de la Guía de Manejo de Vegetales de Nueva Inglaterra, 2011- 2012 (Howell, 2011).

En el Experimento de campo 1 se evaluaron seis dosis de N inorgánico (40, 80, 120, 160, 200 y 240 kg·ha⁻¹), y en el Experimento de campo 2 se incluyeron dos dosis de N adicionales (0 y 280 kg·ha⁻¹). Cada dosis de N se suministró en cinco aplicaciones, cada una de las cuales correspondió a 12.5 % del total de N. La fuente de N en ambos experimentos fue nitrato de amonio (NH_4NO_3). En el Experimento de campo 2, las cepas de Rhizobia (R_1 , R_2 , R_3 y R_4) también se evaluaron en combinación con siete concentraciones de N inorgánico. Ambos ensayos experimentales se evaluaron en un diseño de bloques completos al azar con cinco repeticiones.

Los brotes frescos (BF, en kg·ha⁻¹) se cosecharon en cinco ocasiones cuando se alcanzó el tamaño de comercialización del chipilín de entre 15 y 20 cm, y las muestras se secaron en horno durante 48 h a 75 °C hasta obtener el peso seco (PS, en kg·ha⁻¹). El color, el vigor y la uniformidad del cultivo se registraron con una escala visual de 1 a 5, donde 1 fue el peor y 5 el mejor. Asimismo, se midió la altura de la planta (AP, en cm). Los siguientes caracteres se evaluaron solo en el Experimento de campo 2: contenido de clorofila en la hoja, determinado con un medidor Minolta (SPAD-502, México) (unidades SPAD); contenido total de nitrógeno (TN, en mg·L⁻¹) de la materia seca, estimado con el método de combustión de Dumas en un sistema

In the model, Y_{ijk} is the response variable for nitrogen rate i , with the Rhizobia strain j in the k block; μ is the overall mean; N_i is the effect of the i^{th} N rate; R_j is the effect of the j^{th} Rhizobia strain; $R_j \times N_i$ represents the interaction effect of the j^{th} Rhizobia strain with the i^{th} N rate; β_k is the k^{th} block effect and ε_{ijk} is the random error effect for the i^{th} N treatment and j^{th} Rhizobia treatment within the k^{th} block. For the statistical analysis of Field experiment 1 data, the terms R_j and $R_j \times N_i$ were excluded from the linear model.

Tukey's honestly significant difference test was applied for the main effects of Rhizobia and N. Additionally, the statistical association of the N rates and the response variables was evaluated by means of orthogonal polynomial contrasts (linear, quadratic and cubic). This analysis was conducted for the greenhouse trial and for both field trials (Field experiment 1 and 2). A regression model was fitted for the FW with the N rates. The whole analysis was conducted in the SAS software version 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

Results and discussion

Response of the crop to applications of inorganic nitrogen

Statistical differences were detected among the N treatments for FW and PH, with coefficients of variation of 16.9 and 7.7, respectively (Table 1). The total

analyzer of elements, y el NN y PN, obtenidos al limpiar el sistema radicular dentro de un radio de 35 cm alrededor de la planta.

Análisis estadístico

Las lecturas de BF, PS, SPAD, AP, TN, NN y PN se sometieron a análisis de varianza con el diseño experimental de bloques completos al azar.

$$Y_{ijk} = \mu + N_i + R_j + R_j \times N_i + \beta_k + \varepsilon_{ijk} \begin{pmatrix} i = 1...8 \\ j = 1...3 \\ k = 1...5 \end{pmatrix}$$

En el modelo, Y_{ijk} es la variable respuesta para la dosis de nitrógeno i , con la cepa Rhizobia j en el bloque k ; μ es la media general; N_i es el efecto de la i -ésima dosis de N; R_j es el efecto de la j -ésima cepa de Rhizobia; $R_j \times N_i$ representa el efecto de interacción de la j -ésima cepa de Rhizobia con la i -ésima dosis de N; β_k es el efecto del k -ésimo bloque, y ε_{ijk} es el efecto del error aleatorio para el tratamiento con la i -ésima dosis de N y la j -ésima cepa de Rhizobia en el k -ésimo bloque. Para el análisis estadístico de datos del Experimento de campo 1, los términos R_j y $R_j \times N_i$ se excluyeron del modelo lineal.

La prueba de comparaciones de medias de Tukey se usó para los efectos principales de Rhizobia y N. Además, se evaluó la asociación estadística entre las dosis de N y las variables respuesta mediante contrastes

Table 1. Comparisons of means for N rates evaluated in the field for shoot fresh weight (FW) and plant height (PH). Field experiment 1, 2011.

Cuadro 1. Comparación de medias para diferentes dosis de nitrógeno (N) evaluadas en campo para peso de brotes fresco (BF) y altura de planta (AP). Experimento de campo 1, 2011.

Treatment/ Tratamiento	N rate (kg·ha ⁻¹)/ Dosis de N (kg·ha ⁻¹)	FW (kg·ha ⁻¹)/ BF (kg·ha ⁻¹)	PH (cm)/ AP (cm)
NR ₁	40	6,293 ab ^z	13.5 ab
NR ₂	80	6,265 a	13.6 ab
NR ₃	120	6,808 ab	13.8 ab
NR ₄	160	6,610 ab	13.8 ab
NR ₅	200	6,158 ab	13.3 ab
NR ₆	240	5,393 b	12.5 b
ANOVA significance/ Significancia del ANOVA		**	*
Coefficient of variation/ Coeficiente de variación		16.9	7.7
Nitrogen rate contrast ¹ / Contraste para dosis de N ¹		**	*

¹Orthogonal contrast that corroborates the quadratic relationship between the rates of N and the response variable; ANOVA = analysis of variance; *, ** = significant with $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively. ^zMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹Contraste ortogonal que corrobora la relación cuadrática entre las dosis de N y la variable respuesta; ANOVA = análisis de varianza; *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente. ^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

FW harvested during the crop cycle varied from 5.4 to 6.2 t·ha⁻¹, with N rates of 240 and 40 kg·ha⁻¹, respectively. A positive linear association between the BF and the N rate was observed, but only for N applications between 40 and 120 kg·ha⁻¹. When N applications were high (240 kg·ha⁻¹), the commercial yield was reduced by 25 %, compared to that at the N application of 40 kg·ha⁻¹. The average PH of the crop ranged from 12.5 to 13.8 cm, but statistically only the PH of the NR₆ (240 kg·ha⁻¹) treatment was different from the PH of the other N treatments (Table 1). This suggests that the increase in FW associated with N applications from 40 to 120 kg·ha⁻¹ (Figure 1) was due to the accumulation of biomass, rather than an increase in PH.

A quadratic polynomial trend between the FW of the crop and the rates of inorganic N was observed (Figure 1). If two independent linear functions are fitted for N inputs and FW, a positive slope for the N rates of 40, 80 and 120 kg·ha⁻¹ is observed, as well as a negative slope for the N rates of 160, 200 and 240 kg·ha⁻¹. The slopes of these two models were 6.45 and -15.2, respectively. Then, per every kg·ha⁻¹ of inorganic N applied there was an increase of 6.45 kg·ha⁻¹ in FW; however, this trend was observed for N applications below 120 kg·ha⁻¹. In contrast, a decrease of 15.21 kg·ha⁻¹ in FW was observed per every kg·ha⁻¹ of inorganic N applied above 120 kg·ha⁻¹.

ortogonales polinomiales (lineal, cuadrático y cúbico). Este análisis se realizó para el ensayo de invernadero y para ambas pruebas de campo (Experimentos de campo 1 y 2). Adicionalmente, se ajustó un modelo de regresión para BF con las dosis de N. Todos los análisis se realizaron con el programa SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

Resultados y discusión

Respuesta del cultivo a aplicaciones de nitrógeno inorgánico

Se detectaron diferencias estadísticas en las dosis de N para BF y AP, con coeficientes de variación de 16.9 y 7.7, respectivamente (Cuadro 1). La BF cosechada durante el ciclo de cultivo varió desde 5.4 hasta 6.2 t·ha⁻¹, con las dosis de N de 240 y 40 kg·ha⁻¹, respectivamente. Se observó una asociación lineal positiva entre el BF y las dosis de N, pero solo para aplicaciones de N entre 40 y 120 kg·ha⁻¹. Cuando las aplicaciones de N fueron altas (240 kg·ha⁻¹), el rendimiento comercial se redujo 25 %, en comparación con la aplicación más bajas (40 kg·ha⁻¹). La AP promedio del cultivo varió de 12.5 a 13.8 cm, pero solo la AP del tratamiento NR₆ (240 kg·ha⁻¹) fue diferente estadísticamente del resto de las dosis de N (Cuadro 1). Lo anterior sugiere que el aumento de BF asociado con las aplicaciones de N de

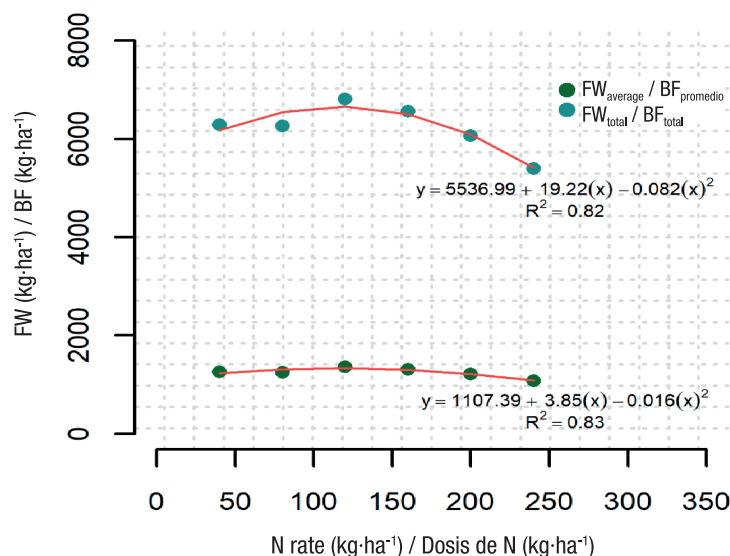


Figure 1. Average shoot fresh weight (FW_{average} in kg·ha⁻¹) and total shoot fresh weight (FW_{total} in kg·ha⁻¹) for six rates of inorganic nitrogen (N) evaluated. Field experiment 1, 2011.

Figura 1. Peso promedio de los brotes frescos cosechados (BF_{promedio} en kg·ha⁻¹) y peso total de brotes frescos cosechados (BF_{total} en kg·ha⁻¹) para seis dosis de nitrógeno (N) inorgánico. Experimento de campo 1, 2011.

Inoculation efficiency of Rhizobia strains

As expected, inoculations with Rhizobia strains had a significant effect on NN and NW ($P \leq 0.01$), and supplementary applications of inorganic N only affected NN. In contrast, the effect of inorganic N on the inoculation efficiency of Rhizobia was only observed in NN. Table 2 presents the average NN per plant and NW per nodule in response to inoculation with the Rhizobia strains. According to these results, the average NN detected with R_1 , R_2 , R_3 , R_4 and R_0 was 51, 38, 128, 39 and 23, respectively. All four strains of Rhizobia induced a larger NN than the native strains from Central America, for which the average NN was 9.4 (Guamán-Díaz et al., 2016). Thus, *Rhizobium leguminosarum biovar* induced the development of six times more nodules than the control treatment, with an average NW of 0.8 mg.

As reported by Isidoro and Messier (2009), *Rhizobium leguminosarum biovar* is a superior symbiont for chipilín and induces the production of a larger number of nodules in the root system. The strains R_1 , R_2 and R_4 also trigger the development of nodules with significantly larger sizes; however, the presence of nodules in roots does not always ensure an efficient N fixation process. In chipilín, only 20 % of the nodules collected from colonized plants by native bacterial strains in Central America contained leghemoglobin (Barnish & Spinelli, 2011), which buffers the concentration of free oxygen and ensures the proper functioning of root nodules.

40 a 120 kg·ha⁻¹ (Figura 1) se debió a la acumulación de biomasa, más que a un aumento en la AP.

Se observó una tendencia polinomial cuadrática entre el BF del cultivo y las dosis de N inorgánico (Figura 1). Si dos funciones lineales independientes se ajustan para las dosis de N y BF, se observa una pendiente positiva para las dosis de N de 40, 80 y 120 kg·ha⁻¹; así como una pendiente negativa para las dosis de 160, 200 y 240 kg·ha⁻¹. Las pendientes de estos modelos fueron 6.45 y -15.2, respectivamente. De esta manera, por cada kg·ha⁻¹ de N inorgánico aplicado hubo un incremento de 6.45 kg·ha⁻¹ de BF; sin embargo, esta tendencia solo se observó para aplicaciones de N por debajo de 120 kg·ha⁻¹. En contraste, hubo una disminución de 15.21 kg·ha⁻¹ de BF por cada kg·ha⁻¹ de N inorgánico aplicado por arriba de 120 kg·ha⁻¹.

Eficiencia de inoculación de cepas de Rhizobia

Como se esperaba, las inoculaciones con cepas de Rhizobia modificaron significativamente a NN y NW ($P \leq 0.01$), y las aplicaciones suplementarias de N inorgánico solo afectaron el NN. En contraste, el efecto del N inorgánico sobre la eficiencia de inoculación de Rhizobia solo se observó en el NN. El Cuadro 2 presenta el NN promedio por planta y el PN individual en respuesta a la inoculación con las cepas de Rhizobia. De acuerdo con estos resultados, el NN detectado en R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_0 fue 51, 38, 128, 39 y 23, respectivamente. Las cuatro cepas de Rhizobia indujeron mayor NN que cepas nativas de América

Table 2. Comparisons of means for Rhizobium strains (R_1 to R_4) and control treatment (R_0) for number of nodules per plant (NN) and average weight per nodule (NW, in mg). Greenhouse experiment 1, 2012.

Cuadro 2. Comparación de medias de cepas de Rhizobium (R_1 a R_4) y tratamiento testigo (R_0) para número de nódulos por planta (NN) y peso promedio por nódulo (PN, en mg). Experimento de invernadero 1, 2012.

Rhizobium strain/Cepa de Rhizobium	NN	NW/PN
R_0 = Control/Testigo	23.0 c ^z	3.3 a
R_1 = <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Vigna)	51.0 b	2.5 a
R_2 = <i>Bradyrhizobium</i> USDA 3384	38.0 bc	2.8 a
R_3 = <i>Rhizobium leguminosarum biovar</i>	128.0 a	0.8 b
R_4 = <i>Bradyrhizobium</i> USDA 2370	39.0 bc	1.6 ab
ANOVA ¹ significance/Significancia del ANOVA ¹	**	*
Coefficient of variation/Coeficiente de variación	7.2	11.7

¹ANOVA = analysis of variance; *, ** = significant with $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively. ²Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹ANOVA = análisis de varianza; *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente. ²Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Recently, an isolated bacterial strain (S.F3.1) with characteristics of the Rhizobiaceae family was identified and linked to a significant increase in fresh and dry weight, plant height, and root biomass (Guamán-Díaz et al., 2016). Furthermore, a detailed analysis to compare the N fixation efficiency of the isolated S.F3.1 and *Rhizobium leguminosarum* biovar in an intensive production system is needed.

The presence of nodules in the root system of the control treatment plants was also reported in a recent study (Guamán-Díaz et al., 2016). In our case, we attributed the development of nodules in plants of the control treatment to unknown Rhizobia strains present in the substrate used for producing the seedlings.

Table 3 presents the NN and PN for the N rates, and a negative trend is observed for the NN and the N concentration of the nutrient solution. When we compared the responses of HS₀ and HS₁, a minimum N supply of 26.25 mg·L⁻¹ seemed to support the development of nodules. Similar to these results, an increase in the NN when 2 mmol·L⁻¹ of N is supplied was reported in alfalfa (*Medicago sativa*) (Salles-de-Oliveira, Anchão-Oliveira, Corsi, Sanches-Duarte, & Mui-Tsai, 2004) and *Crotalaria juncea* (Miranda-Mendonça & Aparecida-Schiavinato, 2005). This minimum N concentration could be enough to support plant growth without negatively affecting the symbiotic

Central, para las cuales el NN promedio fue de 9.4 (Guamán-Díaz et al., 2016). Por lo tanto, *Rhizobium leguminosarum* biovar indujo el desarrollo de seis veces más nódulos que el testigo, con un PN promedio de 0.8 mg.

De acuerdo con Isidoro y Messier (2009), *Rhizobium leguminosarum* biovar es un simbiote superior para el chipilín que induce la producción de una mayor cantidad de nódulos en el sistema radicular. Las cepas R₁, R₂ y R₄ también desencadenan el desarrollo de nódulos con tamaños significativamente mayores; sin embargo, la presencia de nódulos en las raíces no siempre garantiza un proceso eficiente de fijación de N. En el chipilín, solo el 20 % de los nódulos recolectados de plantas colonizadas por cepas bacterianas nativas en América Central contenían leghemoglobina (Barnish & Spinelli, 2011), la cual amortigua la concentración de oxígeno libre y garantiza la función adecuada de los nódulos de la raíz.

Recientemente, se identificó una cepa bacteriana aislada (S.F3.1) con características de la familia Rhizobiaceae que se asoció con un incremento significativo del peso fresco y seco, la altura de la planta y la biomasa de las raíces (Guamán-Díaz et al., 2016). No obstante, se requiere realizar un análisis detallado en un sistema de producción intensivo para comparar la eficiencia de fijación de N del aislado S.F3.1 y *Rhizobium leguminosarum* biovar.

Table 3. Orthogonal polynomial contrasts of different N concentrations in the 0.5 M Hoagland nutrient solution for average number of nodules per plant (NN) and average weight per nodule (NW, in mg).

Cuadro 3. Contrastes ortogonales polinomiales de diferentes concentraciones de nitrógeno (N), en la solución nutritiva Hoagland 0.5 M, para el número de nódulos promedio por planta (NN) y el peso promedio por nódulo (PN, en mg).

Treatment / Tratamiento	Nitrogen concentration (mg·L ⁻¹) / Concentración de nitrógeno (mg·L ⁻¹)	NN	NW / PN
HS ₀	0	91.0	1.5
HS ₁	26.25	105.2	3.4
HS ₂	52.50	62.2	2.5
HS ₃	105.00	51.3	1.9
HS ₄	157.50	30.5	1.9
HS ₅	210.00	40.3	1.9
HS ₆	262.50	19.6	1.8
Significance ¹ / Significancia ¹		**	ns
Trend (nitrogen) ² / Tendencia (nitrógeno) ²		**L	ns

L = significant linear relationship between nitrogen rate and the measured parameter; ns = not significant; *, ** = significant with $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.

L = relación lineal entre dosis de nitrógeno y el parámetro medido; ns = no significativo; *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente.

and biological N-fixation process. However, when the N rate reaches 260 ppm (HS_6), there is a clear reduction in the NN of approximately 82 % compared to HS_1 .

An analysis of the effect of inorganic N on the NN of plants inoculated with the Rhizobia strains is presented in Figure 2. In the graph, the standard concentration of the Hoagland nutrient solution (210 ppm) is represented as 1.0 in the abscissa axis; half of the standard concentration (105 ppm) is represented as 0.5, and 1.25 denotes 262.5 ppm. A clear trend towards a decrease in nodulation and N fixation with high doses of N fertilizer is observed.

Although *Rhizobium leguminosarum biovar* was affected by a large supply of N, the high NN induced by the inoculation with this strain compensated for this inhibition (Figure 2). With N concentrations as high as 260 ppm, there was a reduction in the NN per plant of approximately 200 nodules. The capacity of *Rhizobium leguminosarum biovar* to cope with the inhibition of N fixation under high concentrations of inorganic N and to maximize fixation under low concentrations of N highlights the importance of identifying host-specific Rhizobia strains.

Constant increases in the prices of N fertilizers and fuels have a major effect on production decisions and profitability. Thus, emphasis should be placed on developing new production methods that are suitable both agronomically and economically. The capacity of *Rhizobium leguminosarum biovar* to convert stable N gas from the atmosphere into a biologically useful

La presencia de nódulos en el sistema de raíces de las plantas del testigo también fue informado en una investigación reciente (Guamán-Díaz et al., 2016). En este estudio, el desarrollo de nódulos en plantas del testigo se atribuye a la presencia de cepas de Rhizobia desconocidas en el sustrato utilizado para producir las plántulas.

El Cuadro 3 presenta el NN y el PN para las dosis de N, y se observa una asociación negativa entre el NN y la concentración de N de la solución nutritiva. Al comparar las respuestas de HS_0 y HS_1 , el suministro mínimo de N de $26.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ parece soportar el desarrollo de nódulos. Resultados similares indican un incremento en el NN al suministrar $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de N a alfalfa (*Medicago sativa*) (Salles-de Oliveira, Anchão-Oliveira, Corsi, Sanches-Duarte, & Mui-Tsai, 2004) y a cáñamo (*Crotalaria juncea*) (Miranda-Mendonça & Aparecida-Schiavinato, 2005). Esta concentración mínima de N podría ser suficiente para soportar el crecimiento de la planta sin afectar en forma negativa el proceso de fijación simbiótica y biológica del N. En cambio, cuando la dosis de N alcanza 260 ppm (HS_6), hay una clara reducción del NN de aproximadamente 82 % en comparación con HS_1 .

En la Figura 2 se presenta un análisis del efecto del N inorgánico sobre el NN de las plantas inoculadas con las cepas de Rhizobia. En la gráfica, la concentración estándar de la solución nutritiva Hoagland (210 ppm) se representa como 1.0 en el eje de las abscisas; la mitad del estándar de la concentración (105 ppm) se representa como 0.5, y 1.25 denota 262.5 ppm. Se

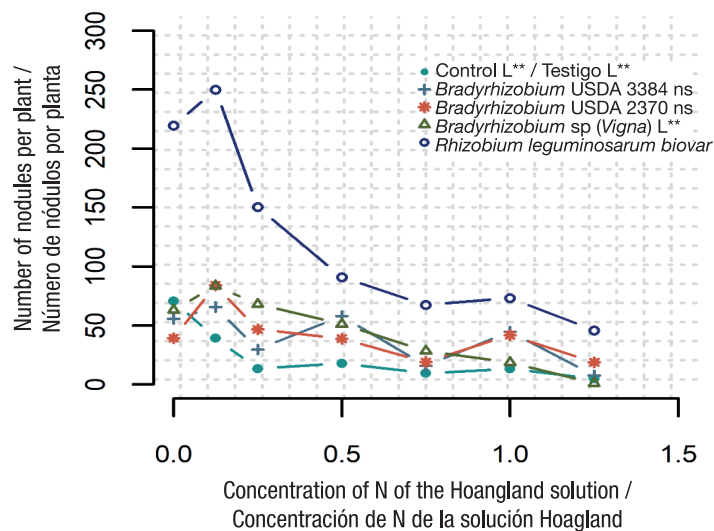


Figure 2. Number of nodules per plant in response to inoculation with four Rhizobia strains across the six nitrogen (N) rates of the 0.5 M modified Hoagland nutrient solution.

Figura 2. Número de nódulos por planta en respuesta a la inoculación de cuatro cepas de Rhizobia con seis dosis de nitrógeno (N) de la solución nutritiva de Hoagland 0.5 M modificada.

form is a major advantage in chipilín production by lowering production costs and mitigating the effects on climate change by replacing all or most of the N needed by the crop.

Nitrogen fixation efficiency of Rhizobia strains in commercial production systems

The colonization efficiency of the four Rhizobia strains was validated under field conditions. Table 4 presents the sources of variation N, Rhizobia strains (R) and their interaction (N x R) for all evaluated traits. Supply inorganic N to the crop showed a positive effect ($P \leq 0.01$) on primary economic traits: color, vigor and uniformity, total FW and on the green color of leaves. This response coincided with preliminary observations, where a constant and large supply of inorganic N dramatically improved the marketable quality of the crop.

Inoculations with the Rhizobia strains also had a positive effect ($P \leq 0.01$) on the FW of the plants. Specific strains induced the increase in the total biomass of the plant but have no effect on the intensity of the green color of the leaves. Although the colonization with the bacterial strains increased

observa una tendencia clara hacía la disminución en la nodulación y la fijación de N con altas dosis del fertilizante nitrogenado.

Aunque *Rhizobium leguminosarum biovar* fue afectado por el gran suministro de N, el alto NN inducidos por la inoculación con esta cepa compensó dicha inhibición (Figura 2). Con concentraciones de N tan altas (260 ppm) hubo una reducción en el NN de aproximadamente 200 nódulos. La capacidad de *Rhizobium leguminosarum biovar* para soportar la inhibición de la fijación de N bajo altas concentraciones de N inorgánico y para maximizar la fijación bajo concentraciones reducidas de N, resalta la importancia de identificar cepas de Rhizobia específicas al huésped.

Los aumentos constantes en los precios de los fertilizantes y combustibles con N tienen un efecto importante en las decisiones de producción y la rentabilidad. Por ello, se debe hacer hincapié en el desarrollo de nuevos métodos de producción adecuados, tanto agronómica como económicamente. La capacidad de *Rhizobium leguminosarum biovar* para convertir el gas N estable de la atmósfera en una forma biológicamente útil es una gran ventaja en la producción de chipilín al disminuir los costos de producción y mitigar los

Table 4. Statistical significance of the analysis of variance of traits evaluated in chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) under different doses of nitrogen (N) and inoculations of Rhizobium (R) strains. Field experiment 2, 2012.

Cuadro 4. Significancia estadística del análisis de varianza de los caracteres evaluados en chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) bajo diferentes dosis de nitrógeno (N) e inoculaciones de cepas de Rhizobium (R). Experimento de campo 2, 2012.

Dependent variable/Variable dependiente	N	R	(N x R)
Quantitative traits/Caracteres cuantitativos			
Fresh weight (kg·ha ⁻¹)/Peso fresco (kg·ha ⁻¹)	**	*	ns
Dry weight (kg·ha ⁻¹)/Peso seco (kg·ha ⁻¹)	**	*	ns
SPAD readings/Unidades SPAD	**	*	ns
Plant height (cm)/Altura de planta (cm)	**	**	ns
Total nitrogen (mg·L ⁻¹)/Nitrógeno total (mg·L ⁻¹)	**	ns	ns
Number of nodules per plant/Número de nódulos por planta	ns	*	ns
Weight per nodule (mg)/Peso por nódulo (mg)	ns	ns	ns
Qualitative traits/Caracteres cualitativos			
Color	**	ns	ns
Vigor	**	ns	ns
Uniformity/Uniformidad	**	ns	ns

ns = not significant; *, ** = significant with $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.

ns = no significativo; *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente.

the NN, there was no effect on the total N content of FW.

High doses of inorganic N decreased N fixation (Table 2). This negative effect on symbiosis was also reported for *Sinorhizobium meliloti* in alfalfa (*Medicago sativa*) when the annual N supply reached 450 kg·ha⁻¹ (Salles-de Oliveira et al., 2004) and for Rhizobia in hemp (Miranda-Mendonça & Aparecida-Schiavinato, 2005). However, the NN was not affected by the continuous increase in N dose in Field Experiment 2 (Table 5). This discrepancy might be caused by differences in the number of times the crop was harvested, and the method employed for the application of the N treatments. Under field conditions, inorganic N was applied every time the crop was harvested, while in the greenhouse, the N was applied every week, and the crop was harvested only once. The constant regrowth of the plants in the field trial might have mined the soil N to the point where it did not affect the formation of nodules or N fixation.

The response of the economic yield of FW to N rates is presented in Table 5. If we analyze the tradeoff between the N application and the FW in Field experiment 2, we determine that per every kg of N

efectos sobre el cambio climático al reemplazar todo o la mayor parte del N requerido por el cultivo.

Eficiencia de la fijación de nitrógeno por cepas de Rhizobia en sistemas de producción comercial

La eficiencia de colonización de las cuatro cepas de Rhizobia se validó en campo. El Cuadro 4 presenta las fuentes de variación en N, cepas de Rhizobia (R) y su interacción (N x R) para los caracteres evaluados. El suministro de N inorgánico al cultivo mostró un efecto positivo ($P \leq 0.01$) en las principales variables económicas: color, vigor, uniformidad, BF total y color verde de hojas. Dicha respuesta coincidió con observaciones preliminares, donde un suministro constante y abundante de N inorgánico mejoró drásticamente la calidad comercial del cultivo.

Las inoculaciones con las cepas de Rhizobia también tuvieron un efecto positivo ($P \leq 0.01$) en el BF de las plantas. Cepas específicas indujeron el incremento de la biomasa total de la planta, pero no mostraron efecto sobre la intensidad del color verde de las hojas. Aunque la colonización con las cepas bacterianas incrementó el NN, no hubo efecto de la colonización sobre el contenido total de N en el BF.

Table 5. Orthogonal polynomial contrasts of the eight rates of inorganic nitrogen evaluated (NR₀ to NR₇). Field experiment 2, 2012.

Cuadro 5. Contrastes ortogonales polinomiales de ocho dosis de nitrógeno inorgánico (NR₀ a NR₇). Experimento de campo 2, 2012.

Nitrogen rate (kg·ha ⁻¹)/ Dosis de nitrógeno (kg·ha ⁻¹)	FW ¹ (kg·ha ⁻¹)/ BF ¹ (kg·ha ⁻¹)	DW (kg·ha ⁻¹)/ PS (kg·ha ⁻¹)	SPAD	TN (mg·L ⁻¹)	PH (cm)/ AP (cm)	NN	NW (mg)/ PN (mg)
NR ₀ 0	4,564	661	44.1	4.4	33.8	16.4	1.9
NR ₁ 40	5,892	838	45.5	4.9	36.9	14.1	1.4
NR ₂ 80	6,974	982	45.9	5.0	39.1	16.7	0.6
NR ₃ 120	6,950	982	46.3	5.1	38.6	13.2	1.9
NR ₄ 160	7,067	982	46.8	5.2	38.0	12.5	0.5
NR ₅ 200	6,870	941	46.8	5.2	37.5	12.0	0.4
NR ₆ 240	6,913	960	47.2	5.3	38.6	11.0	0.5
NR ₇ 280	7,229	1,031	48.1	5.3	38.7	12.8	0.4
Significance/ Significancia	**	**	**	**	**	ns	ns
Polynomial contrast/ Contraste polinomial	**L **Q **C	**L **Q **C	**L **C	**L **Q **C	**L **Q **C	ns	ns

¹FW = shoot fresh weight; DW = shoot dry weight, TN = concentration of N in leaves; PH = plant height; NN = number of nodules in the roots per plant; NW = weight per nodule; ns = not significant; *, ** = significant with $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively; L, Q, C = linear, quadratic or cubic contrasts, respectively, between nitrogen treatment and the parameter evaluated.

¹BF = peso de brotes fresco; PS = peso seco de tallos, TN = concentración de N en hojas; AP = altura de la planta; NN = número de nódulos por planta; PN = peso promedio por nódulo; ns = no significativo; *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente; L, Q, C = contrastes lineales, cuadráticos o cúbicos, respectivamente, entre el tratamiento con nitrógeno y la variable evaluada.

supplied in the range from 0 to 80 kg·ha⁻¹, there is an increase in FW of 30 kg·ha⁻¹ ($P \leq 0.01$). Additional applications above 80 kg·ha⁻¹ are less cost-effective, with a maximum increase in FW of 1.12 kg·ha⁻¹ per kg of N applied. Similar to the FW, a constant supply of N in excess of 80 kg·ha⁻¹ provides an increase of only 0.175 kg·ha⁻¹ ($P \leq 0.01$) in DW per unit of N. The null supply of inorganic N produced only 0.61 t·ha⁻¹ of DW per season, while in tropical areas, the total DW can reach 3.4 t·ha⁻¹ per year (Sosa-Rubio, Cabrera-Torres, Rodríguez, & Ortega-Reyes, 2008). A simultaneous increase in the chlorophyll content and the TN content of leaves was observed with N rates as high as 280 kg·ha⁻¹.

The strong association between the chlorophyll content and the absolute N accumulation in leaves ($r = 0.95$, $P \leq 0.01$) validates the use of the SPAD meter for *in situ* estimations of the plant N content. In rice, corn, barley and wheat, a similar association was determined between the SPAD readings and the concentration of N in leaves (Dwyer et al., 1995; Lin et al., 2010; Peltonen, Virtanen, & Haggrèn, 2008; Reeves, Mask, Wood, & Delaney, 2008; Shukla et al., 2004).

The importance of inorganic N in the expression of marketing quality traits for vegetable production was examined. Differences in the color, vigor and uniformity of the crop were detected. When N was not applied, the average color, vigor and uniformity were 2.3, 2.5 and 2.3, respectively, and with 280 kg·ha⁻¹ of N, the corresponding scores were 3.5, 3.5 and 3.3. Further addition N more than 80 kg·ha⁻¹, and up to 280 kg·ha⁻¹, result in a minimum enhancement in the color of 0.2, in vigor of 0.3 and in uniformity of 0.4. The analysis to determine the effect of Rhizobia inoculations on these three quality characteristics did not show statistical significance.

Table 6 shows the statistical association between the Rhizobia strains and the FW, DW, SPAD reading, TN, PH, NN and NW. A non-significant increase of 158 kg·ha⁻¹ in FW was linked to the inoculation of plants with *Rhizobium leguminosarum* biovar. On the other hand, plants colonized with *Bradyrhizobium* USDA 3384 showed a minimal increase in economic yield but significant improvement in the green color of leaves; however, the same strain significantly decreased NN. On average, *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) and *Rhizobium leguminosarum* biovar induced the development of six more nodules per plant compared to *Bradyrhizobium* USDA 3384. Although colonization with the Rhizobia strains modified the NN, this factor did not affect the weight per nodule.

The plant-microbe association of chipilín and *Rhizobium leguminosarum* biovar and *Bradyrhizobium* USDA 3384 was an efficient N-fixing system, but further efforts are needed to develop cultivars adapted to specific

Por su parte, las altas dosis de N inorgánico disminuyeron la fijación de N (Cuadro 2). Este efecto negativo sobre la simbiosis también se reportó para *Sinorhizobium meliloti* en alfalfa (*Medicago sativa*) cuando el suministro anual de N alcanzó 450 kg·ha⁻¹ (Salles-de Oliveira et al., 2004), y para Rhizobia en cáñamo (Miranda- Mendonça & Aparecida-Schiavinato, 2005). Sin embargo, el NN no fue afectado por el incremento continuo de la dosis de N en el Experimento de campo 2 (Cuadro 5). Esta discrepancia puede ser causada por diferencias en el número de cosechas del cultivo y el método de aplicación de tratamientos con N. En campo, se aplicó N inorgánico cada vez que se cosechó el cultivo, mientras que en invernadero, el N se aplicó semanalmente y el cultivo se cosechó solo una vez. El crecimiento constante de las plantas en la prueba de campo pudo haber generado la extracción del N del suelo hasta el punto en que no afectara la formación de nódulos o la fijación de N.

La respuesta del rendimiento económico del BF a las dosis de N se presenta en el Cuadro 5. Si se analiza el equilibrio entre la aplicación de N y el BF en el Experimento de campo 2, se puede determinar que por cada kg de N suministrado en el intervalo de 0 a 80 kg·ha⁻¹, hay un incremento en BF de 30 kg·ha⁻¹ ($P \leq 0.01$). Aplicaciones superiores de 80 kg·ha⁻¹ son menos rentables, ya que presentan un incremento máximo en BF de 1.12 kg·ha⁻¹ por kg de N aplicado. Similarmente, en PS el suministro de N superior a 80 kg·ha⁻¹ proporciona incrementos ($P \leq 0.01$) de sólo 0.175 kg·ha⁻¹ por unidad de N. La ausencia de N inorgánico produjo solo 0.61 t·ha⁻¹ de PS por ciclo, mientras que en áreas tropicales, el PS total puede alcanzar 3.4 t·ha⁻¹ por año (Sosa-Rubio, Cabrera-Torres, Rodríguez, & Ortega-Reyes, 2008). Adicionalmente, se observó un incremento simultáneo en el contenido de clorofila y el contenido de TN de las hojas con las dosis de N de hasta 280 kg·ha⁻¹.

La asociación alta entre el contenido de clorofila y la acumulación total de N en las hojas ($r = 0.95$, $P \leq 0.01$) valida el uso del medidor SPAD para estimaciones *in situ* del contenido de N de la planta. En arroz, maíz, cebada y trigo, se determinó una asociación similar entre las lecturas de SPAD y la concentración de N en la hoja. (Dwyer et al., 1995; Lin et al., 2010; Peltonen, Virtanen, & Haggrèn, 2008; Reeves, Mask, Wood, & Delaney, 2008; Shukla et al., 2004).

Considerando la importancia de los caracteres de calidad en la producción de hortalizas, se examinó la importancia del N inorgánico en la expresión de dichos caracteres de comercialización, y se detectaron diferencias en el color, el vigor y la uniformidad del cultivo. Cuando no se aplicó N, el color, el vigor y la uniformidad fueron 2.3, 2.5 y 2.3, respectivamente, y con 280 kg·ha⁻¹ de N, los valores correspondientes fueron

Table 6. Comparison of means of three *Rhizobia* strains (R_1 to R_3) and control treatment (R_0). Field experiment 2, 2012. Cuadro 6. Comparación de medias de tres cepas de *Rhizobium* (R_1 a R_3) y testigo (R_0). Experimento de campo 2, 2012.

Rhizobium strain/ Cepa de <i>Rhizobium</i>	FW (kg·ha ⁻¹)/ BF ¹ (kg·ha ⁻¹)	DW (kg·ha ⁻¹)/ PS (kg·ha ⁻¹)	SPAD	TN (mg·L ⁻¹)	PH (cm)/ AP (cm)	NN	NW (mg)/ PN (mg)
R_0 = Control/Testigo	6,674.4 a ²	934.8 a	46.6 ab	5.0	38.1 a	14.3 a	0.8
R_1 = <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>)	6,646.4 a	941.2 a	46.0 b	5.0	37.8 a	15.8 a	0.8
R_2 = <i>Bradyrhizobium</i> USDA 3384	6,077.2 b	858.0 b	48.0 a	5.1	36.4 b	9.0 b	0.4
R_3 = <i>Rhizobium leguminosarum biovar</i>	6,832.4 a	956.4 a	46.0 b	5.1	38.3 a	15.0 a	1.7
Significance/Significancia	*	*	*	ns	**	**	ns

¹FW = shoot fresh weight; DW = shoot dry weight, TN = concentration of N in leaves; PH = plant height; NN = number of nodules in the roots per plant; NW = weight per nodule; ns = not significant; *, ** = significant with $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively. ²Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹BF = peso de brotes fresco; PS = peso seco de tallos, TN = concentración de N en hojas; AP = altura de la planta; NN = número de nódulos por planta; PN = peso promedio por nódulo; ns = no significativo; *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente. ²Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

inoculants and to evaluate how biotic and abiotic factors can affect their fixation efficiency. Additionally, the presence of nodules in the root system of plants in the control treatment suggests potential competition between the native *Rhizobia* in the soil and the introduced strains. When competitors in the soil are poor N fixers, N fixation rates and plant productivity can decrease (Olivares et al., 2013). Therefore, it is important to consider multiple inoculations to ensure adequate colonization by the inoculant.

Conclusions

According to the results presented in this study, applications of inorganic N in excess of 80 kg·ha⁻¹ provide a minimum economic return in terms of economic yield (FW); however, additional N can increase the marketable quality of chipilín. *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains were able to colonize the crop, and specifically the strain *Rhizobium leguminosarum biovar* enhanced FW accumulation. However, the relationship between this colonization and the chlorophyll content of the crop is unclear. Any supplementary applications of inorganic N under field conditions have little impact on the effectiveness of the bacterial colonization, yet to maximize NN and enhance N fixation, it is recommended that N be supplied at a rate not greater than 80 kg·ha⁻¹. Furthermore, there is a need to evaluate the effectiveness of periodic re-inoculations with the best nitrogen-fixing bacteria strains, and to identify genotype-specific nodulation to select an effective and competitive inoculant.

3.5, 3.5 y 3.3. La adición de N en más de 80 kg·ha⁻¹, y hasta 280 kg·ha⁻¹, resultó en una mejora mínima en el color de 0.2, en vigor de 0.3 y en uniformidad de 0.4. Los análisis para determinar el efecto de las inoculaciones de *Rhizobia* en estas tres características de calidad no mostraron significancia estadística.

El Cuadro 6 muestra las asociaciones estadísticas entre las cepas de *Rhizobia* y las variables BF, PS, unidades SPAD, TN, AP, NN y PN. Un incremento no significativo de 158 kg·ha⁻¹ en BF se asoció con la inoculación de plantas con *Rhizobium leguminosarum biovar*. Mientras que un incremento mínimo en el rendimiento económico en las plantas colonizadas con *Bradyrhizobium* USDA 3384 presentó una mejora significativa en el color verde de las hojas; aunque esta misma cepa disminuyó significativamente el NN. En promedio, *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) y *Rhizobium leguminosarum biovar* indujeron el desarrollo de seis nódulos más por planta en comparación con *Bradyrhizobium* USDA 3384. A pesar de que la colonización con las cepas de *Rhizobia* modificó el NN, este carácter no afectó el peso por nódulo.

La asociación planta-microbio, de chipilín con *Rhizobium leguminosarum biovar* y *Bradyrhizobium* USDA 3384, fue un sistema eficiente de fijación de N, pero se necesitan mayores esfuerzos para desarrollar cultivares adaptados a inoculantes específicos y evaluar cómo los factores bióticos y abióticos pueden afectar su eficiencia de fijación. Además, la presencia de nódulos en el sistema radicular de las plantas en el testigo sugiere una competencia potencial entre el *Rhizobia* nativo en el suelo y las cepas introducidas. Cuando los competidores del suelo son ineficientes fijadores de

End of English version

References / Referencias

- Barnish, A., & Spinelli, C. (2011). *Analysis of Leghemoglobin present in Chipilin-Rhizobia symbiosis* (Bachelor thesis). Worcester Polytechnic Institute, USA. Retrieved from <https://web.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-042811-111107/unrestricted/Chipilin.pdf>
- Chávez-Quñones, E., Roldan-Toriz, J., Sotelo-Ortiz, B. E., Ballinas-Díaz, J., & López-Zúñiga, E. J. (2009). Plantas comestibles no convencionales en Chiapas, Mexico. *Revista Salud Publica y Nutricion*, 10(2), 1-11. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=22530>
- Cooper, J. E. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*, 41, 1-62. doi: 10.1016/S0065-2296(04)41001-5
- Dwyer, L. M., Stewart, D. W., Gregorich, E., Anderson, A. M., Ma, B. L., & Tollenaar, M. (1995). Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. *Canadian Journal of Plant Science*, 75(1), 179-182. doi: 10.4141/cjps95-030
- Guamán-Díaz, F., Torres-Gutiérrez, R., Granda-Mora, K., & Nápoles-García, M. C. (2016). Isolation and characterization of rhizobia from *Crotalaria* sp. in southern Ecuador. *Cultivos tropicales*, 37(1), 40-47. doi: 10.13140/RG.2.1.1014.7446
- Havlin, J. (2014). *Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management*. USA: Pearson Education.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). *The water-culture method for growing plants without soil*. Berkeley, California: College of Agriculture, University of California.
- Howell, J. (2011). *New England vegetable management guide*. USA: Agriculture, Food and the Environment.
- Isidoro, M., & Messier, R. (2009). *Selection of optimal Rhizobia strain for Crotalaria Longirostrata*. (Bachelor thesis), Worcester Polytechnic Institute, USA. Retrieved from <https://web.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-042910-120441/unrestricted/MQP0914%5B1%5D.pdf>
- Lin, F. F., Qiu, L. F., Deng, J. S., Shi, Y. Y., Chen, L. S., & Wang, K. (2010). Investigation of SPAD meter-based indices for estimating rice nitrogen status. *Computers and Electronics in Agriculture*, 71(1), 60-65. doi: 10.1016/j.compag.2009.09.006
- Mangan, F. X., de Mendonça, R. U., Moreira, M., del Vecchio-Nunes, S. D., Finger, F. L., Barros, Z. D., Galvão, H., Almeida, G. C., Silva, R., & Anderson, M. D. (2008). Production and marketing of vegetables for the ethnic markets in the United States. *Horticultura Brasileira*, 26(1), 6-14. doi: 10.1590/S0102-05362008000100002
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol*, 17(10), 458-466. doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004
- Miranda-Mendonça, E. H., & Aparecida-Schiavinato, M. (2005). Growth of *Crotalaria juncea* L. supplied with mineral N, las tasas de fijación de N y la productividad de la planta pueden disminuir (Olivares et al., 2013). Además, es importante considerar múltiples inoculaciones para asegurar la adecuada colonización del inoculante.
- ## Conclusiones
- De acuerdo con los resultados presentados en este estudio, las aplicaciones de N inorgánico mayores de 80 kg·ha⁻¹ proporcionan un retorno económico mínimo en términos del rendimiento económico (BF); sin embargo, aplicaciones adicionales de N pueden aumentar la calidad comercial de chipilín. Las cepas de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* colonizaron el cultivo, y específicamente la cepa *Rhizobium leguminosarum* biovar mejoró la acumulación de BF. No obstante, la relación entre esta colonización y el contenido de clorofila del cultivo no es clara. Cualquier aplicación suplementaria de N inorgánico en condiciones de campo tiene poco impacto en la efectividad de la colonización bacteriana, pero para maximizar el NN y mejorar la fijación de N, se recomienda suministrar N con una dosis no mayor de 80 kg·ha⁻¹. Adicionalmente, es necesario evaluar la efectividad de inoculaciones periódicas con las mejores cepas de bacterias fijadoras de N e identificar la nodulación específica del genotipo para seleccionar un inoculante efectivo y competitivo.
- ## Fin de la versión en español
-
- nitrogen. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 181-185. doi: 10.1590/S1516-89132005000200003
- Nasholm, T., Kielland, K., & Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol*, 182(1), 31-48. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x
- Olivares, J., Bedmar, E. J., & Sanjuán, J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 486-494. doi: 10.1094/MPMI-12-12-0293-CR
- Peltonen, J., Virtanen, A., & Haggren, E. (2008). Using a chlorophyll meter to optimize nitrogen fertilizer application for intensively-managed small-grain cereals. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 174(5), 309-318. doi: 10.1111/j.1439-037X.1995.tb01118.x
- Reeves, D. W., Mask, P. L., Wood, C. W., & Delaney, D. P. (2008). Determination of wheat nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter: Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition*, 16(5), 781-796. doi: 10.1080/01904169309364574
- Salles-de Oliveira, W., Anchão-Oliveira, P. P., Corsi, M., Sanches-Duarte, F. R., & Mui-Tsai, S. (2004). Alfalfa yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Scientia Agricola*, 61(4), 433-438. doi: 10.1590/S0103-90162004000400013

- SAS Institute Inc. (SAS). (2011). *SAS/ QC 9.3 User's Guide, version 9.3*. Cary, N.Y., USA: Author. Retrieved from <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/qcug/63964/PDF/default/qcug.pdf>
- Shukla, A. K., Ladha, J. K., Singh, V. K., Dwivedi, B. S., Balasubramanian, V., Gupta, R. K., ... & Yadav, R. L. (2004). Calibrating the leaf color chart for nitrogen management in different genotypes of rice and wheat in a systems perspective. *Agronomy Journal*, 96(6), 1606-1621. doi: 10.2134/agronj2004.1606
- Sosa-Rubio, E. E., Cabrera-Torres, E., Rodriguez, D. P., & Ortega-Reyes, L. (2008). Dry matter seasonal production in grasses and legumes in Quintana Roo, Mexico. *Tecnica Pecuaria en Mexico*, 46(4), 413-426.
- Vespa, J., Medina, L., & Armstrong, D. M. (2020). *Demographic turning points for the United States: population projections for 2020 to 2060*. Washington, DC: United States Census. Retrieved from <https://www.census.gov/library/publications/2020/demo/p25-1144.html>

