

Rendimiento de forraje de pasto ovido inoculado con bacterias PGPB

María Myrna Solís-Oba¹
Gisela Aguilar-Benítez²
Rigoberto Castro-Rivera^{1§}
Yuri Villegas-Aparicio³
Job Jonathan Castro-Ramos¹
Aida Solís-Oba⁴

¹Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Ex Hacienda de San Juan Molino, Carretera Tecuexcomac-Tepetitla km 1.5, Tlaxcala. CP. 90700. (mirobatlx@hotmail.com; jonathan-castro@live.com.mx). ²Instituto de Investigación de Zonas Desérticas-Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Altair 200, Colonia del Llano, San Luis Potosí. CP. 78377. (gisela.aguilar@uaslp.mx). ³Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca-División de Estudios de Posgrado. Ex Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. CP. 71230. (yuriva1968@gmail.com). ⁴División de Ciencias Biológicas y de la Salud-Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, México. CP. 04960. (asolis@correo.xoc.uam.mx).

§Autor para correspondencia: rcastror@ipn.mx.

Resumen

Las bacterias PGPB tienen efectos benéficos en el rendimiento de los cultivos. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de cinco bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el rendimiento, altura de planta, unidades SPAD y contenido de proteína de pasto ovido defoliado cada cinco semanas en primavera y verano, bajo condiciones de invernadero. Se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 5 x 2 x 2, siendo la unidad experimental una maceta con diez tallos, con cuatro repeticiones. Las bacterias evaluadas fueron: *Ewingella americana* (digestato), *Ewingella americana* (suelo), *Pseudomonas clororaphis*, *Bacillus toyonensis* y *Microbacterium oxidans*, comparados entre sí y con los controles positivo (triple 17) y negativo (suelo sin fertilización). Los valores altos de MS en primavera lo registraron *E. americana* (3.5 g MS maceta⁻¹), mientras que en verano fue *B. Toyonensis*. Los valores de altura no registraron diferencias ($p > 0.05$) en ambas épocas, las unidades SPAD solo en el verano y *E. americana* registró los menores valores (1.8). El contenido de proteína evidenció que los testigos fueron inferiores a todos los tratamientos que fueron inoculados. Las bacterias estudiadas registraron efectos en todas las variables evaluadas y fueron superiores a la fertilización inorgánica y al suelo sin fertilizar.

Palabras clave: *Bacillus toyonensis*, *Ewingella americana*, *Microbacterium oxidans* y *Pseudomonas clororaphis*.

Recibido: enero de 2020

Aceptado: marzo de 2020

Introducción

Los microorganismos rizoféricos colonizan la rizosfera y mejoran el desarrollo de las plantas, promoviendo un uso eficiente de los minerales, mediante una amplia variedad de mecanismos como la mineralización de la materia orgánica, el control biológico contra patógenos del suelo, la fijación biológica de N, P, K y Zn, entre otros micronutrientes y sintetizan sideroforos, lo que fomenta el desarrollo de las raíces ya que, en este componente de la planta.

Se dan interacciones complejas que ocurren entre los exudados de la raíz derivados de la fotosíntesis y otros procesos fisiológicos de la planta, el suelo y el microbioma, el cual está habitado por una amplia gama de microorganismos que incluyen hongos, bacterias, actinomicetos, algas y nematodos, donde la dominancia está determinada por el producto de los exudados de la raíz (carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenólicos, reguladores del crecimiento, putrescencia, esteroides, azúcares y vitaminas, entre otros compuestos), lo que repercute en la dinámica poblacional y funcional de los microorganismos del suelo, el cual difiere de la zona rizosférica al resto de la población presente en el suelo o sustrato (De-Bashan *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2012; Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Hungria *et al.*, 2016; Mora *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017; Posada *et al.*, 2018; Ramakrishna *et al.*, 2019).

El pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.) es una especie cultivada y aprovechada por su alto valor nutritivo, rápido rebrote, rendimiento de MS, producción de tallos y por ser una especie asociada a leguminosas que permiten un uso más eficiente de la radiación y del recurso suelo (Castro *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2013; Villareal *et al.*, 2014; Flores-Santiago *et al.*, 2018).

La información publicada sobre el uso de biofertilizantes o bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) en esta especie, es nula; sin embargo, éstas han sido reportadas en otros pastos del género *Penisetum* (Criollo *et al.*, 2012), *Brachiaria* (Lopes *et al.*, 2018), *Zea* (Tejada *et al.*, 2016), *Sorgum* y *Triticum* (Naiman *et al.*, 2009; Rangel *et al.*, 2014). Reportando diferencias ($p < 0.05$) por la inoculación o efecto de las bacterias en comparación con el testigo que por lo general se refieren al suelo sin fertilizar.

Montalvo-Aguilar *et al.* (2018), evaluaron el efecto de la fertilización con digestato a diferentes concentraciones y reportaron que el incremento en el rendimiento fue gradual ($p < 0.01$) en relación a la concentración, la cual también presenta una interacción con la frecuencia de cosecha del pasto. En este experimento se evaluó el efecto del digestato (esterilizado y no estéril) como medio de inoculación de las bacterias; así como, el efecto de las bacterias en suelo estéril y no estéril es por ello que el objetivo fue evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el rendimiento de pasto Ovinillo en condiciones de invernadero.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en un invernadero de plástico tipo túnel con ventanas laterales del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional (IPN), ubicado en Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala (19° 16' 50.3" latitud norte, 98° 21' 58.1" longitud oeste, 2 221 msnm). La temperatura a la intemperie se muestra en la Figura 1.

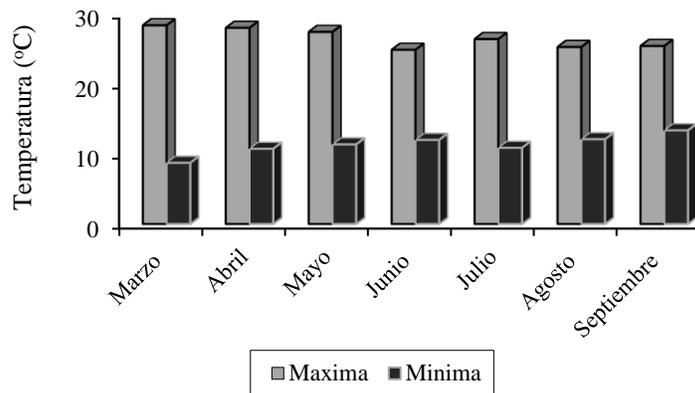


Figura 1. Temperatura promedio máxima y mínima ambiental, en Tepetitla de Lardizabál, Tlaxcala.
[https://www.accuweather.com/es/mx/tepetitla/240244/weather-forecast/240244.](https://www.accuweather.com/es/mx/tepetitla/240244/weather-forecast/240244)

Las semillas de pasto ovido (*Dactylis glomerata* L.) fueron donadas por el laboratorio de forrajes del Posgrado en Ganadería del Colegio de Postgraduados. El digestato se obtuvo de la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). La composta hecha de residuos de jardinería fue donada por la unidad de composteo unidad Zacatenco del Instituto Politécnico Nacional. El suelo utilizado como sustrato se obtuvo de la parcela experimental del CIBA IPN Unidad Tlaxcala, el cual se identificó como Fluvisol de textura arenosa.

La siembra de pasto ovido se realizó colocando 15 semillas en el sustrato que contenía 1.5 kg de suelo en macetas de plástico (unidad experimental). Una vez emergidas las plántulas, se realizó un aclareo manual para dejar sólo 10 tallos por maceta y se dejó un periodo de establecimiento de 45 días después de la siembra, posteriormente se realizó un corte de uniformización a cinco cm de altura, para reducir el efecto de covariable y se inocularon las bacterias plant growth-promoting bacteria (PGPB) directamente a la rizosfera del pasto por medio de jeringas de plástico.

Selección e inoculación de bacterias PGPB

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suelo, composta y digestato. Se cultivó 1 ml en cajas Petri a tres diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} , con un periodo de incubación de 24 h a 30 °C. Se obtuvieron cultivos puros para describir las características particulares y con los morfotipos seleccionados se inocularon en los medios selectivos y específicos: Paenibacillus, Variovorax, Lysobacter, Azospirillum, Streptomyces, Streptomyces, Pikovskaya, Ashby, NFb y NBRIP (Bashan y Holguin, 1997; Noumavo *et al.*, 2013; Beghalem *et al.*, 2017).

Las bacterias que presentaron crecimiento en estos medios se volvieron a inocular en medios específicos Pikovskaya, Ashby, NFb y NBRIP para evaluar su potencial como solubilizadoras de potasio, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo, respectivamente. Las cepas seleccionadas para este experimento se identificaron como *Ewingella americana*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus toyonensis* y *Microbacterium oxidans*, las cuales fueron previamente identificadas mediante secuenciación del ARNr 16S.

La inoculación de las bacterias se realizó directamente en el suelo, en la rizosfera de los macollos al inicio de la temporada, a una concentración de 1×10^8 UFC ml^{-1} , y el medio de inoculación fue el digestato líquido. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $5 \times 2 \times 2$, donde los factores fueron: bacterias (cinco cepas de bacterianas), medio de inoculación (digestato estéril y no estéril) y sustrato (suelo estéril y suelo sin esterilizar). Aunado a eso se establecieron unidades experimentales con suelo sin inocular (testigo negativo) y unidades experimentales con fertilización química (triple 17) como testigo positivo. Los valores de proteína se graficaron en SigmaPlot V.10.0 y los análisis de estadísticos se realizaron mediante el procedimiento GLM del Software estadístico SAS® versión 9.0 para Windows®. Las medias de tratamientos fueron comparadas utilizando Tukey a un nivel de significancia de 5%. Los medios y los sustratos fueron esterilizados en una autoclave marca Prado, modelo AH-80170.

Variables evaluadas

El rendimiento de MS se determinó cada cinco semanas (Velasco *et al.*, 2001) a una altura de cosecha de cinco centímetros, colocando todo el forraje cortado en bolsas de papel previamente identificados. El material vegetal cosechado se lavó y se pesó en fresco, para posteriormente secarlo en una estufa de aire forzado a 70°C , por 48 h hasta un peso constante y se determinó el contenido de materia seca.

Antes de cada defoliación, se registró la altura del forraje con una regla graduada de cincuenta centímetros y una precisión de 0.1 cm, en plantas elegidas al azar, con la regla colocada completamente vertical desde la base de la planta hasta la hoja superior más joven (Castillo *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2011). Asimismo, el contenido de clorofila (unidades SPAD) se midió antes de cada corte, tomando 3 muestras por macollo, colocando el sensor del instrumento Apogee instruments MC-100, en las hojas superiores expuestas con la lígula bien diferenciada.

El contenido de proteína en hojas se obtuvo de una muestra de cada a tratamiento a mediados de cada época evaluada, la cual se molió en un mortero de porcelana y se utilizaron tamices de 0.5 y 0.17 mm, el material obtenido se introdujo en tubos Appendort de 1.5 ml, las cuales fueron analizadas por el equipo Thermo Scientific (Flash 2000 Series, Organic Elemental Analyzer).

Resultados y discusión

El rendimiento de forraje de pasto ovinillo registró que tanto en primavera como en verano existieron diferencias ($p < 0.05$) por efectos de las diferentes bacterias, en primavera *P. clororaphis* fue la que obtuvo el menor registro (2.74 g MS maceta⁻¹) y no fue diferente ($p < 0.05$) al resto de las bacterias a excepción de *E. americana* (suelo), que fue la que registró ($p < 0.05$) el mayor valor (3.5 g MS maceta), superando en 27% a *P. clororaphis* (menor registro), en 20% a *M. oxidans* y *B. toyonensis*, respectivamente y en 5% a la misma especie, que se obtuvo del digestato. Mientras que, en el verano el comportamiento del rendimiento cambió y la bacteria (*E. americana* (suelo)) que obtuvo el mayor rendimiento en primavera, ahora registró ($p < 0.05$) el menor rendimiento (2.98 g MS maceta⁻¹), pero no fue diferente ($p > 0.05$) a su misma especie que se obtuvo del digestato, ni a *P. clororaphis* y *M. oxidans*, donde estas últimas fueron similares ($p > 0.05$) a *B. toyonensis* que fue la que registró ($p < 0.05$) el valor más alto (3.74 g MS maceta⁻¹), superando en 14 y 18% a *M. oxidans* y *P. clororaphis*, respectivamente y en 21 y 25% a *E. americana* de digestato y composta, respectivamente.

El medio de inoculación (digestato) no registró diferencias ($p > 0.05$) entre ser esterilizado y no esterilizado, lo que nos infiere que el resultado en el rendimiento es debido a las bacterias y no al medio mientras que, el mismo resultado se obtuvo con el suelo; es decir, el efecto es el mismo si el suelo está estéril o no, al momento de la inoculación. Con respecto al efecto del factor principal solo se registró que la cepa ($p < 0.05$) tuvo efecto en el rendimiento tanto en primavera como en verano, mientras que el suelo y el digestato no ($p > 0.05$) y en las interacciones solo en el verano se registró que la cepa*suelo fue la que tuvo efecto en el rendimiento (Cuadro 1).

Las unidades SPAD que están estrechamente relacionadas con el contenido de clorofila y por consecuencia del nitrógeno en la planta, no registró diferencias en primavera ($p > 0.05$) entre bacterias; Sin embargo, en el verano a excepción de *E. americana* (suelo) que registró el menor valor (1.8) ($p < 0.05$), en el resto de las bacterias no se registraron diferencias ($p > 0.05$), registrándose que, *B. toyonensis*, *E. americana* (digestato) y *P. clororaphis* fueron las mejores ($p < 0.05$) a pesar de no existir una diferencia entre ellas y superando en un promedio de 70% a la que registró el menor valor. En el análisis de factorial se registró que ni el medio, ni el sustrato presentaron efecto ($p > 0.05$). Sin embargo, solo existió efecto de la cepa en la época de verano, mientras que el resto de los factores y las interacciones no fueron significativas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimiento de materia seca (g MS maceta⁻¹), unidades SPAD y altura del (cm) de pasto Ovilla, inoculado con bacterias PGPB en medios y sustratos esterilizados y no esterilizados.

Factor	Rendimiento		SPAD		Altura	
	Primavera	Verano	Primavera	Verano	Primavera	Verano
Bacterias						
<i>Microbacterium oxidans</i>	2.92 AB	3.26 AB	2.07	2.3 AB	22.3	19.7
<i>Bacillus toyonensis</i>	2.92 AB	3.74 A	2.31	3.1 A	23.2	22.9
<i>Pseudomonas clororaphis</i>	2.74 B	3.16 AB	2.27	2.9 A	22.7	20.9
<i>Ewingella americana</i> Suelo	3.5 A	2.98 B	2.07	1.8 B	22.2	19.7
<i>Ewingella americana</i> Digestato	3.31 AB	3.09 B	2.71	3.0 A	24.5	18.4
Digestato						
Estéril	2.91	3.29	2.34	2.49	23.5	20.1
No estéril	3.25	3.24	2.23	2.81	23.7	20.4
Suelo						
Estéril	3.18	3.28	2.05	2.59	23.5	19.5
No estéril	2.98	3.24	2.52	2.71	23.7	21
Sign.						
Cepa	*	*	ns	*	ns	ns
Suelo	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Digestato	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cepa*Suelo	ns	*	ns	ns	ns	*
Cepa*Digestato	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Digestato*Suelo	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Diferentes literales mayúsculas en columnas son estadísticamente diferentes Tukey ($p < 0.05$). Sign= significancia *= 0.05; ns= no significativo.

Con respecto a la altura del forraje, tanto en primavera como en el verano, no se registraron diferencias ($p > 0.05$). Sin embargo, en la época de verano en el análisis factorial la interacción cepa*suelo, registró un efecto sobre la altura. No obstante, la prueba de medias no registró diferencias, a pesar de que la diferencia en altura entre el valor más alto (*B. toyonensis*) y el más bajo (*M. oxidans* y *E. americana*) fue de 16% (Cuadro 1).

El contenido de proteína registró que a excepción de *P. clororaphis* en el resto de los tratamientos en primavera se registró mayor contenido de proteína que en el verano (Figura 2). Asimismo, en la primavera se evidenció que a excepción del control negativo (suelo solo) y *P. clororaphis*, en el resto de los tratamientos se presentó mayor contenido de nitrógeno en las hojas, siendo *E. americana* (digestato) la que registró el mayor valor (23%), superando 90% al suelo sin fertilizante y 20% al fertilizante químico. En el verano el comportamiento de la proteína en hojas registró que *P. clororaphis* fue la superior (15%), superando en promedio con 61% a los tratamientos testigos (Figura 2).

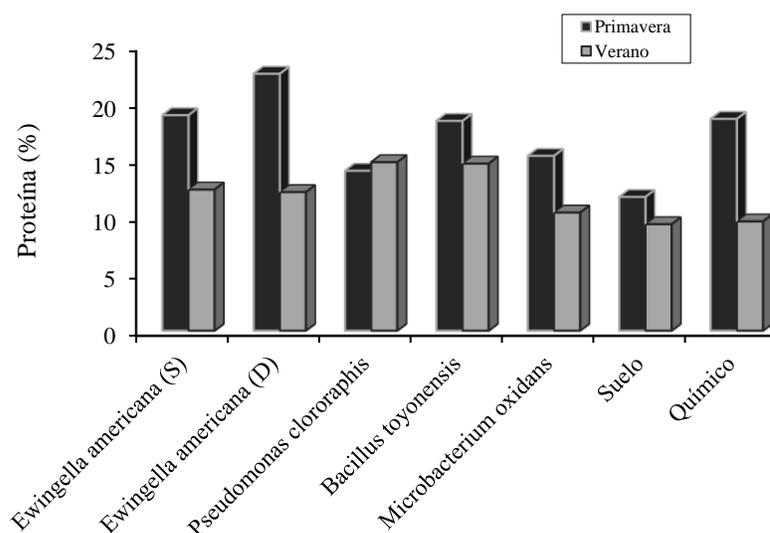


Figura 2. Contenido de proteína en hoja de pasto Ovillo, fertilizado con bacterias PGPB, testigo negativo (suelo) y fertilizante químico en las épocas de primavera y verano de 2018.

Diferentes autores, como Hernández-Garay *et al.* (1997); Moliterno (2002), Ganderats *et al.* (2003), Mendoza-Pedroza *et al.* (2018), Gaytan *et al.* (2019), mencionan que el rendimiento de forraje está determinado por la interacción de los diferentes factores ambientales en un clima o lugar dado, pero la variable ambiental que más influye en el rendimiento de una especie forrajera es la temperatura ambiental (McKenzie *et al.*, 1999).

No obstante, en este experimento se demuestra que esta variable no solo afecta a la planta sino también al suelo y por consecuencia a la microbiota de la rizosfera, la diferencia entre la época de primavera y verano fue de 1.7 °C en la temperatura máxima registrada (Figura 1) y esta diferencia fue suficiente para evidenciar que en primavera *Ewingella americana* registró el mayor efecto en el rendimiento, mientras que en verano lo registró *Bacillus toyonensis* (Figura 3).

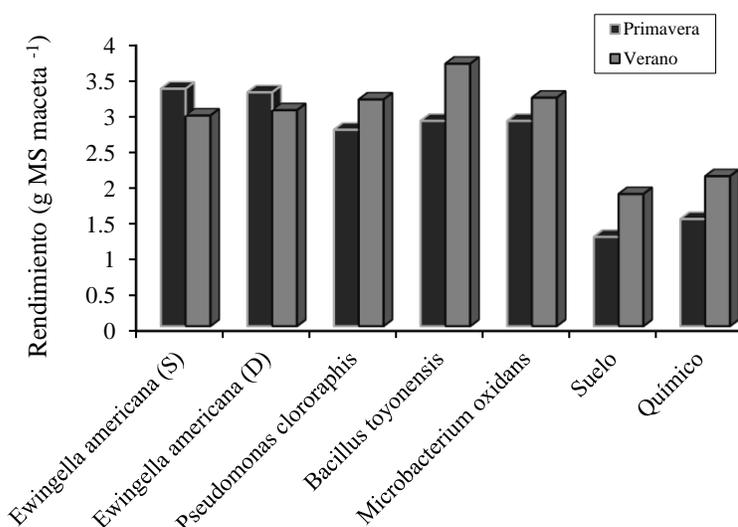


Figura 3. Rendimiento de materia seca de pasto Ovillo, fertilizado con bacterias PGPB, testigo negativo (suelo) y fertilizante químico en las épocas de primavera y verano de 2018.

Mientras tanto *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus toyonensis* y los testigos tuvieron más efecto sobre el rendimiento que en primavera, lo que nos permite inferir que, en las diferentes épocas del año, las poblaciones de bacterias de la rizosfera que tienen simbiosis con los pastos difieren dependiendo de la temperatura ambiental. Sin embargo, otras publicaciones solo han evidenciado y sugerido que inocular bacterias PGPB tiene efectos en el rendimiento en gramíneas (Lopes *et al.*, 2016), para la producción de grano (Rangel *et al.*, 2014), en forrajes de clima tropical (Humgria *et al.*, 2016), en leguminosas (Pérez-Montaña *et al.*, 2014) y en pastos clima templado (Criollo *et al.*, 2012), pero en ningún artículo mencionan el efecto de la temperatura o una conclusión con respecto a esta variable.

Las unidades SPAD, es una colorimétrica de las hojas, las cuales están correlacionadas con el contenido de nitrógeno en la planta, y este elemento está a la vez determina el contenido de proteína. En este experimento se registró que en primavera *E. americana* (suelo), fue la que evidenció el mayor valor de las unidades SPAD y a la vez de proteína, mientras que, en el verano, el menor valor de proteína lo obtuvo *M. oxidans* (Figura 2) que también registró los valores más bajos de unidades SPAD (Cuadro 1). Rodríguez *et al.* (1998); Gonzales-Torres *et al.* (2009), mencionan que los coeficientes de determinación entre las unidades SPAD y el contenido de clorofila en la planta es de 0.79 en promedio. No obstante, estos autores hicieron la determinaron de nitrógeno en toda la planta y la correlacionaron con los valores obtenidos en el medidor de clorofila. Mientras que, en este experimento solo se tomó el registró del medidor portatil en las hojas, que son las que contienen el mayor contenido de proteína en un pasto.

Con respecto al digestato y al suelo, los resultados obtenidos muestran que la condición de la aplicación (estéril o no) no influye en el rendimiento de materia seca del pasto ovillo, a pesar de que el medio no estéril fue 12% superior al esterilizado (digestato) y en el suelo solo se registró una diferencia de 3%. Para el caso del digestato la diferencia en el porcentaje podría deberse a la carga microbiana que tiene efectos beneficios al suelo, mientras que, el aporte de nutrientes sigue siendo el mismo.

Esta aseveración coincide con lo que menciona Tilvikiené *et al.* (2018), quienes reportaron los beneficios de los microorganismos y del aporte de materia orgánica al fertilizar con digestato el pasto ovido por cinco años consecutivos. Montalvo-Aguilar *et al.* (2018), reportaron que entre mayor sea la concentración del digestato, el rendimiento de forraje tiene una tendencia ascendente en el rendimiento de *Lolium perenne*; asimismo, Walsh *et al.* (2012) reportaron que la fertilización con digestato en *Ballico perenne*, supera ($p < 0.05$) en el rendimiento a praderas asociadas con trébol blanco (*Trifolium repens*). Tempere y Viiralt (2014) reportaron que en pastos de clima templado fertilizar con digestato se incrementa el rendimiento en promedio 2.4 t MS ha⁻¹, en comparación con praderas no fertilizadas y es superior en 85% a la fertilización química.

Con respecto a la altura de forraje, se registró que a excepción del testigo negativo ($p < 0.05$), en el resto de los tratamientos en primavera se obtuvieron mayores registros (Figura 4), y los tratamientos con bacterias fueron superiores ($p < 0.05$) a los testigos en esta variable. Algunos autores han evidenciado que los forrajes que presentan las mayores alturas no necesariamente son los más productivos, ya que conforme aumenta la altura de la especie forrajera y se incrementa en rendimiento, en los estratos inferiores, también se va acumulando el material muerto o senescente, lo que sugiere que conforme incrementa la altura de la planta, el rendimiento de forraje es resultado de la biomasa verde o viva y del tejido en descomposición. (Hernández-Garay *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 2003; Montes *et al.*, 2016; Mendoza-Pedroza *et al.*, 2018; Gaytan *et al.*, 2019).

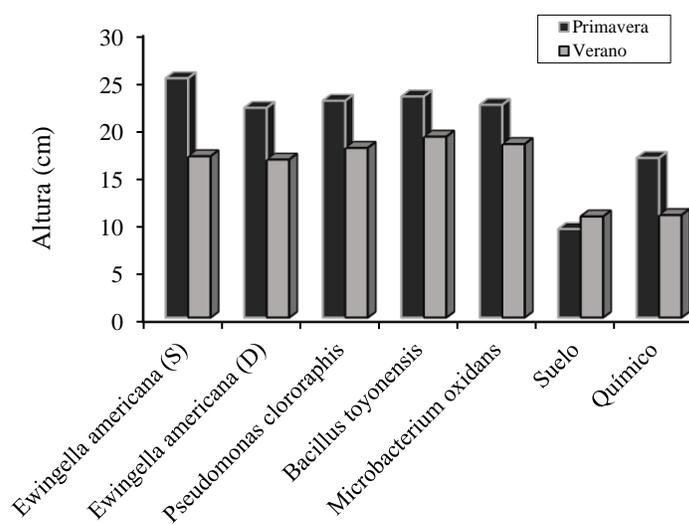


Figura 4. Altura de forraje de pasto Ovido, fertilizado con bacterias PGPB, testigo negativo (suelo) y fertilizante químico en las épocas de primavera y verano de 2018.

Conclusiones

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen efecto directo en el rendimiento de forraje del pasto ovido, y el nivel de influencia está determinado por la temperatura ambiental, por lo que se tendría que evaluar más al respecto, y así podría proponerse un manejo de la inoculación con bacterias PGPB en las diferentes épocas del año. En este experimento todos los tratamientos con bacterias fueron superiores a los testigos, independientemente de que los medios (digestato) y sustratos (suelo) fueran estériles o no.

Agradecimientos

A la MC Stefani Aletse Meza Zamora por la toma de datos y a la MC Laura Jeannette García Barrera, por todo el apoyo en el aislamiento e identificación de las bacterias evaluadas en este trabajo. Al Instituto Politécnico Nacional, Secretaría de Investigación y Posgrado por el financiamiento del proyecto multidisciplinario SIP 20180320.

Literatura citada

- Bashan, Y., and Holguin, G. 1997. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canada. Canadian J. Microbiol. 43(2):103-121.
- Beghalem, H.; Aliliche, K.; Chriki, A. and Landoulsi, A. 2017. Molecular and phenotypic characterization of endophytic bacteria isolated from sulla nodules. Netherlands. Microbial Pathogenesis. 111:225-231. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.049>.
- Castillo, E. G.; Valles M. B. y Jarillo, R. J. 2009. Relación entre materia seca presente y altura en gramas nativas del trópico mexicano. México. Téc. Pec. Méx. 47(1):79-92.
- Castro, R. R.; Hernández, G. A.; Aguilar, B. G. y Ramírez, R. O. 2011. Comparación de métodos para estimar rendimiento de forraje en praderas asociadas. México. Naturaleza y Desarrollo. 9(1):38-46.
- Castro, R. R.; Hernández, G. A.; Ramírez, R. O.; Aguilar, B. G., Enríquez, Q. J. F y Mendoza, P. S. I. 2013. Crecimiento en longitud foliar y dinámica de población de tallos de cinco asociaciones de gramíneas y leguminosa bajo pastoreo. México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 4(2):201-215.
- Castro, R. R.; Hernández, G. A.; Vaquera, H. H.; Hernández G. J. P.; Quero, C. A. R; Enríquez, Q. J. E. y Martínez H. P. A. 2012. Comportamiento productivo de asociaciones de gramíneas con leguminosas en pastoreo. México. Rev. Fitotec. Mex. 35(1):87-95.
- Criollo, P. J.; Obando, M.; Sánchez, M. L. and Bonilla R. 2012. Efecto de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Penicillium clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. Colombia. Revista CORPOICA-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 13(2):189-195.
- De-Bashan, L. E.; Holguin, G.; Glick, B. R. and Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: Microbiología Agrícola: hongos, bacterias y microfauna, control biológico, planta-microorganismo. (Eds.). Ferrara-Cerrato, R. and Alarcon, A. Chapter 8. Published by Ed. Trillas, México city. 170-224 pp.
- Esquivel-Cote, R.; Gavilanes-Ruiz, M.; Cruz-Ortega, R. y Huante P. 2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. Rev. Fitotec. Mex. 36(3):251-258.
- Flore-Santiago, E. J.; Guerrero-Rodríguez, J. D.; Cadena-Villegas, S.; Alejos-de la Fuente, J. I.; Mendoza-Pedroza, S. I.; Luna-Guerrero, M. J.; Peña-Aguilar, M. A. y Hernández-Garay, A. 2018. Dinámica de tallos de pasto Ovillo (*Dactylis glomerata* L.) solo y asociado con Ryegrass perenne (*Lolium perenne* L.) y Trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Agroproductividad. 11(5):10-17.
- Ganderats, F. S. y Hepp, K. C. 2003. Mecanismos de crecimiento de *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Dactylis glomerata* en la zona intermedia de Aysén. Chile. Agric. Téc. 63(3):259-265.

- Gaytan, V. J. A.; Castro, R. R.; Villegas, A. Y.; Aguilar, B. G.; Solís, O. M. M.; Carrillo, R. J. C. y Negrete, S. L. O. 2019. Rendimiento de alfalfa (*Medicago sativa* L.) a diferentes edades de la pradera y frecuencias de defoliación. México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 10(2):353-366.
- González-Torres, A.; Figueroa-Viramontes, U.; Delgado, J. A.; Nuñez-Hernández, G.; Cueto-Wong, J. A.; Preciado-Rangel, P. y Palomo-Gil A. 2009. Calibración del SPAD-502 para evaluar requerimientos de nitrógeno en maíz forrajero. México. Terra Latinoam. 27(4):303-309.
- Hernández-Garay, A.; Matthew, C. and Hodgson, J. 1997. Effect of spring grazing management on perennial ryegrass and ryegrass-white clover pastures. 1. Tissue turnover and herbage accumulation. New Zealand. New Zealand J. Agric. Res. 40:25-35.
- Hungria, M.; Nogueira, M. A. and Silva, A. R. 2016. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. Netherlands. Agric. Ecosys. Environment. 221:125-131.
- Lopes, M. J. S.; Dias-Filho, M. B.; Castro, T. H. R. and Silva, G. B. 2016. Light and plant growth-promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizanta* growth and phenotypic plasticity to shade. United Kingdom Grass and Forage Science. 73(2):493-499.
- McKenzie, B. A.; Kemp, P. D.; Moot, D. J.; Matthew, C. and Lucas, R. J. 1999. Environmental effects on plant growth and development. In: White, J. and Hodgson, J. (Ed.). New Zealand Pasture and Crop Science. Auckland, New Zealand. Oxford University Press. 29-44 pp.
- Mendoza-Pedroza, S. I.; Cadena-Villegas, S.; Hernández-Garay, A.; Vaquera-Huerta, H.; Villareal-González, J. A. y Flores-Santiago, E. J. 2018. Cambios en la frecuencia de defoliación para recuperar la densidad de plantas en una pradera de alfalfa (*Medicago sativa* L.). Agroproductividad. 11(5):51-55.
- Moliterno, E. A. 2002. Variables básicas que definen el comportamiento productivo de mezclas forrajeras en su primer año. Agrociencia. 6(1):40-52.
- Montalvo-Aguilar, K. J.; Castro-Rivera, R.; Solís-Oba, M. M.; Aguilar-Benitez, G.; García-Barrera L. J. y Hernández-Garay, A. 2018. Efecto de la frecuencia de defoliación y la fertilización con digestato en los componentes del rendimiento de Ballico perenne (*Lolium perenne* L.). Agroproductividad. 11(5):3-9.
- Montes, C. F. J.; Castro, R. R.; Aguilar, B. G.; Sandoval, T. S.; Solís, O. M. M. 2016. Acumulación estacional de biomasa aérea de alfalfa var. Oaxaca criolla (*Medicago sativa* L.) Rev. Mex. Cienc. Pec. 7(4):539-552.
- Mora, M.; Demanet, R.; Acuña, J. J.; Viscardi, S.; Jorquera, M.; Rengel, Z. and Durán, P. 2017. Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure. Netherlands. Appl. Soil Ecol. 115:19-26.
- Naiman, A. D.; Latrónico, A. and García de Salomone, I. E. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. France. Eur. J. Soil Biol. 45:44-51.
- Noumavo, P. A.; Kochoni, E.; Didagbé, Y. O.; Adjanohoun, A.; Allagbé, M.; Sikirou, R. and Baba-Moussa, L. 2013. Effect of different plant growth promoting Rhizobacteria on maize seed germination and seedling development. USA. Am. J. Plant Sci. 04(05):1013-1021.
- Pérez-Montaño, F.; Alías-Villegas, C.; Bellogín, R. A.; Del Cerro, P.; Espuny, M. R.; Jiménez-Guerrero, I. and Cubo, T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. Germany. Microbiol. Res. 169(5-6):325-336.

- Posada, L. F.; Álvarez, J. C.; Romero-Tabarez, M.; de-Bashan, L. and Villegas-Escobar V. 2018. Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth system. Germany. Microbiol. Res. 217:69-80.
- Ramakrishna, W.; Yadav, R. and Li, K. 2019. Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. Netherlands. Appl. Soil Ecol. 138:10-18.
- Rangel, L. J. A.; Ramírez, G. R. M.; Cervantes, O. F.; Mendoza, E. M.; García, M. E. y Rivera, R. J. G. 2014. Biofertilización de *Azospirillum* spp. y rendimiento de grano de maíz, sorgo y trigo. Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias UNCUYO. 46(2):231-238.
- Rashid, S.; Charles, T. C. and Glick, B. R. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Netherlands. Appl. Soil Ecol. 61:217-224.
- Rodríguez, M. M. N.; Alcántar, G. G.; Aguilar, S. A.; Etchevers, B. J. and Santizó, R. A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. México. Terra Latinoam. 16(2):135-141.
- Singh, M. V.; Kumari, M. S.; Prakash, V. J.; Kumar, A.; Aeron, A.; Kumar, M P.; Kumar, B. J.; Pattanayak, A.; Neveed, M. and Dotoniya, M. L. 2017. Plan beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. Netherlands. Ecol. Eng. J. Ecotechnol. 107:8-12.
- Tejada, M.; Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Franco-Andreu, L.; Benítez, C. and Parrado, J. 2016. Use of biofertilizers obtained from sewage sludges on maize yield. Netherlands. Eur. J. Agron. 78:13-19.
- Tempere, M. and Viiralt, R. 2014. The efficiency of biogas digestate on grassland compared mineral fertilizer and cattle slurry. Latvia. Research for Rural Development. 1:89-94.
- Tilvikiené, V.; Slepetiené. A. and Kadziuliené. 2018. Effects of 5 years of digestate application on biomass production and quality of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). United Kingdom. Grass and Forage Science. 73(1):206-207.
- Velasco, Z. M. E.; Hernández, G. A.; González, H. V. A.; Pérez, P. J.; Vaquera, H. H. y Galvis, S. A. 2003. Curva de crecimiento y acumulación estacional del pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.). Téc. Pec. Méx. 39(1):1-14.
- Villarreal, G. J. A.; Hernández, G. A.; Martínez, H. P. A.; Guerrero, R. J. D. y Velasco, Z. M. E. 2014. Rendimiento y calidad de forraje del pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.) al variar la frecuencia e intensidad del pastoreo. México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 5(2):231-245.
- Walsh, J. J.; Jones, D. L.; Edwards-Jones, G. and Williams, A. P. 2012. Replacing inorganic fertilizer with anaerobic digestate may maintain agricultural productivity at less environmental cost. United Kingdom. J. Plant Nutr. Soil Sci. 175(6):840-845.