

Uso de inoculante y fertilización nitrogenada en la producción de forraje de avena, ballico y trigo

Inoculation and nitrogen fertilization for forage production in annual ryegrass, oats and wheat

Regina Carrillo Romo^a, Mario H. Esqueda Coronado^a, Alma Delia Báez González^b, Gerardo Reyes López^c, Mario H. Royo Márquez^a, José Luis Ibañez González^d

RESUMEN

Los objetivos fueron evaluar el efecto combinado de diferentes dosis de inoculante (*Rhodococcus fascians*) y fertilización nitrogenada en la producción de forraje de gramíneas así como la relación costo/beneficio. Las gramíneas fueron: *Avena sativa* L, *Lolium multiflorum* Lam y *Triticum durum* L con los siguientes tratamientos: inoculación, fertilización nitrogenada (0, 30, 60 kg N ha⁻¹), y la combinación de inoculante y fertilización. Las especies se establecieron en condiciones de riego en un suelo migajón franco arcilloso con pH de 6.7 y 0.34 % materia orgánica. El microorganismo se asperjó a la semilla y posteriormente a las plantas después de cada cosecha de forraje. Se evaluó producción de forraje en términos de toneladas de materia seca (MS) por hectárea. La evaluación económica se realizó utilizando un análisis marginal donde los indicadores fueron: costos variables, producción de forraje y beneficios netos. El experimento se estableció con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3x3 con cuatro repeticiones, donde el primer factor fue la inoculación, el segundo las especies y el tercero las dosis de fertilización nitrogenada. Los resultados muestran que el uso combinado de inoculante más 30 kg N ha⁻¹ produjo 50 % más MS (aproximadamente 11 t más) que cuando se aplica sólo nitrógeno, especialmente en avena y ballico anual. El análisis económico mostró que el mejor tratamiento fue el de inoculación con 30 kg N ha⁻¹ en *Avena sativa* L, con una tasa de retorno marginal por arriba del 60 %.

PALABRAS CLAVE: Inóculo, Fertilización, *Avena sativa*, *Triticum durum*, *Lolium multiflorum*, Producción de forraje, *Rhodococcus fascians*, Análisis económico, Costo/beneficio.

ABSTRACT

The objectives were evaluating the combined effects of different rates of both inoculum (*Rhodococcus fascians*) and nitrogen on forage production of grasses and to perform a cost - benefit economic analysis. The species analyzed were *Avena sativa* L, *Lolium multiflorum* Lam, and *Triticum durum* L through the following treatments: inoculation, nitrogen fertilization (0, 30, 60 kg N ha⁻¹) and a combination of inoculation and fertilization. The species were established under irrigated conditions in a clay loam soil with 6.7 pH, and 0.34 % organic matter. The microorganism was sprayed on the seed and later, on the plants after each forage harvest. Forage production was evaluated in terms of metric tons (t) of dry matter (DM) ha⁻¹. The economic study was performed using marginal analysis, where the indicators were cost variables, forage production and net benefits. The experiment was carried out using a completely randomized design with a 2x3x3 factorial arrangement with four replications, where the first factor was inoculation; the second factor, species; and the third factor, N rate. The results show that the combined use of an inoculum and 30 kg N ha⁻¹ produces 50 % more DM (approximately 11 t) than when only N is used, especially in *Avena sativa* L. and *Lolium multiflorum* Lam. The economic analysis showed that the best treatment was inoculation plus 30 kg N ha⁻¹ for *Avena sativa* L, presenting a marginal return rate of over 60 %.

KEY WORDS: Inoculum, Fertilization, *Avena sativa*, *Triticum durum*, *Lolium multiflorum*, Forage production, *Rhodococcus fascians*, Economic analysis, Cost - benefit.

Recibido el 1 de diciembre de 2008. Aceptado para su publicación el 11 de noviembre de 2009.

a) Sitio Exp. La Campana Chihuahua, CIRNOC-INIFAP-SAGARPA. Ave. Homero # 3744 Fracc. El Vergel. Chihuahua, Chih.Tel. y fax. 01(614) 4810257, 4810769. carrillo.regina@inifap.gob.mx. Correspondencia al primer autor.

b) Laboratorio de Nacional de Modelaje y Sensores Remotos, CIRNOC-INIFAP.

c) Facultad de Contaduría y Administración, UACH.

d) Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, UACH.

Origen de apoyo recibido: Fundación Produce Chihuahua, A. C.

En el estado de Chihuahua se siembran alrededor de 18,850 ha de praderas irrigadas⁽¹⁾, siendo las especies más utilizadas ballico anual, avena y trigo⁽²⁾. Sin embargo, el uso de praderas irrigadas implica altos costos de producción por el uso de fertilizantes, que representan aproximadamente el 35 % del costo total de la pradera⁽³⁾. Por este motivo se buscan opciones para disminuir la cantidad de fertilizante, como es el caso de algunos microorganismos que se pueden utilizar como fuente de reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas), para hacer más eficiente la absorción de nutrientes, ayudando a las plantas en su crecimiento y desarrollo. A los microorganismos concentrados en un sustrato se le denomina inoculadores, los cuales al aplicarlos en combinación con fertilizante aumentan la eficiencia de las plantas en el uso de nitrógeno⁽⁴⁾. En el caso de *Rhodococcus fascians* se ha reportado que produce sustancias con capacidad fitoregulatora. En los sobrenadantes de los medios de cultivo donde se ha multiplicado este microorganismo, se han encontrado sustancias del tipo de las citocininas al utilizar manitol como fuente de carbono^(5,6). Esta bacteria es Gram positiva, aerobia, y se desarrolla en una escala de pH de 6 a 8 y crece a temperaturas desde 10 hasta 40 °C, donde su temperatura óptima de crecimiento es 26 °C⁽⁷⁾.

Una cepa no virulenta de *Rhodococcus* sp aislada en Chihuahua⁽⁸⁾ se usó en un estudio *in vitro* en cultivo de tejidos vegetales, en explantes de zanahoria, donde se comparó la respuesta a la aplicación de *Rhodococcus* contra fitoreguladores sintéticos a diferentes dosis. La mejor concentración de *Rhodococcus* fue 1×10^4 UFC ml⁻¹, que produjo un mayor número de brotes y raíz⁽⁹⁾. Los autores reportaron que a una mayor concentración de esta bacteria, el desarrollo de la planta se atrofia. En otro estudio⁽¹⁰⁾ en el que se utilizó cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de gases y espectrometría de masas, se aislaron compuestos que le dan esa capacidad fitoregulatora. Los compuestos aislados se identificaron como N⁸isopentenil 2metil tioadenosina y N⁶metil isopenteniladenosina.

En un estudio en campo, se aplicó la misma cepa de *Rhodococcus fascians* a plantas de chile jalapeño

Almost 18,850 ha are planted to irrigated pastures⁽¹⁾ in the state of Chihuahua, Mexico, being annual rye-grass, oats and wheat the most common species⁽²⁾. However, irrigated pastures entail high production costs due to fertilizers, which represent almost 35 % of total costs⁽³⁾. Owing to this, different options are being sought to reduce the amount of fertilizer applied, as is the case of microorganisms that can be used as sources of growth regulators (auxins, gibberellins and cytokinins), promoting nutrient absorption, and boosting plant growth and development. Microorganisms concentrated in a substratum are known as inoculums, that when applied to plants together with a fertilizer increase efficiency of N use⁽⁴⁾. In the case of *Rhodococcus fascians*, it has been reported that it can produce substances that act as phyto regulators. In overflows of culture media where this microorganism was grown substances akin to cytokinins have been found when mannitol was used as carbon source^(5,6). This bacterium is gram positive, aerobic and grows in media with pH between 6 and 8 and at temperatures between 10 and 40 °C, being 26 °C the best.

A non virulent *Rhodococcus* spp. strain isolated in Chihuahua⁽⁸⁾ was used in an *in vitro* study of plant tissues in carrot explants, where response to *Rhodococcus* was compared to response to synthetic phyto regulators at different dosages. The best *Rhodococcus* concentration was 1×10^4 UFC ml⁻¹. At this rate it was seen that carrot explants presented a greater amount of both roots and shoots⁽⁹⁾. The authors reported that at a greater rate, plant growth atrophies. In another study⁽¹⁰⁾ where ionic interchange chromatography, gas chromatography and mass spectrography were used, substances which contribute to phyto regulating capacity were isolated. These compounds were identified as N⁸isopentenyl 2methyl thioadenosine and N⁶methyl isopentenyladenosine.

In a field study, the same *Rhodococcus fascians* strain was applied to jalapeno pepper plants and both plant and fruit size was observed. Fruit quality was not altered⁽¹¹⁾. Another author⁽¹²⁾ reports that in experiments carried out on grasses in greenhouses, when *Rhodococcus fascians* was applied, some grasses increased both forage

y se observó un incremento en el tamaño de la planta y de fruto sin alterar la calidad de este último⁽¹¹⁾. Otro autor reporta⁽¹²⁾ que en experimentos realizados con pastos en condiciones de invernadero, al aplicar *Rhodococcus fascians* se observó que algunos zacates aumentaron la producción de forraje y contenido de proteína, lo que se atribuyó a que la producción de citocininas incrementa tanto la producción de brotes como la síntesis de proteínas. Lo anterior concuerda con estudios realizados en invernadero y campo en donde se observó un incremento del crecimiento de plantas inoculadas⁽¹²⁾. El presente estudio tuvo como objetivos: evaluar el efecto combinado de diferentes dosis de fertilización nitrogenada e inóculo de una cepa no virulenta de *Rhodococcus fascians* en la producción de forraje seco de avena, ballico anual y trigo, así como realizar un análisis económico de los tratamientos.

El experimento se llevó a cabo durante el ciclo otoño-invierno 1997-1997 en el Rancho Experimental La Campana (RELC), localizado en la zona centro del estado de Chihuahua, a 29° 20' N, 106° 20' O y altitud de 1,540 m; temperatura media anual de 16 °C con un período libre de heladas de 199 días⁽¹³⁾. El suelo es de textura migajón franco arcillosa con pH de 6.71 y 0.34 % materia orgánica.

Las especies forrajeras que se sembraron fueron: avena coker (*Avena sativa* L) variedad coker, ballico anual (*Lolium multiflorum* Lam) variedad tetrablen 444, trigo rojo (*Triticum durum* L) variedad mesa. La densidad de siembra para la avena y trigo, fue de 130 kg y para ballico anual 35 kg ha⁻¹ semilla pura viable (SPV). El terreno se barbechó y se rastreó dos veces, y la siembra se realizó al voleo en parcelas de 4x4 m⁽¹⁴⁾.

El inóculo que se utilizó fue *Rhodococcus fascians*, cepa no virulenta nativa del suelo de Chihuahua, la cual fue aislada en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la UACH. La cepa se multiplicó en el medio extracto levadura-manitol⁽¹⁵⁾ en agitación constante a 26 °C. En cada aplicación, la concentración de la bacteria se midió en un Nefelómetro de McFarland⁽¹⁶⁾. La solución con el

production and protein content, which were attributed to the effect of cytokinins on shoot production and protein synthesis. This concurs to studies carried out both in greenhouses and in the field where increases plant growth and development in inoculated plants was seen⁽¹²⁾. The objectives of the present study were evaluating the joint effects of different N rates and of *Rhodococcus fascians* non virulent strains on dry matter production in oats, wheat and annual rye grass and carrying out and economic analysis of the different treatments.

The present study was performed in the 1997/97 fall winter cycle at Rancho Experimental La Campana (RELC), in the central part of the State of Chihuahua, at 29° 20' N 106° 20' W, 1,540 m asl and 199 frost free days⁽¹³⁾, soils are clay loams, 6.71 pH, and 0.34 % organic matter content.

The forage species studied were oats (*Avena sativa* L.) var. Coker, annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) var Tetrablen 444 and red wheat (*Triticum durum* L.) var. Mesa. Planting density were 130 kg ha⁻¹ for both wheat and oats and 35 kg for ryegrass of viable seed. Plots were ploughed and twice harrowed before planting. Plots were scatter seeded. Plot size was 4*4 m⁽¹⁴⁾.

Inoculum was a non virulent *Rhodococcus fascians* strain, native to Chihuahua, isolated at the Agrotechnology School (Facultad de Ciencias Agrotecnológicas) of the University of Chihuahua. This strain was multiplied in a mannitol-yeast media with constant agitation at 26 °C. In each application, inoculum concentration was measured with a McFarland nephelometer⁽¹⁶⁾. The solution containing the inoculum was dissolved in sterile distilled water, used for obtaining a 1*10⁴ UFC ml⁻¹ *Rhodococcus fascians* concentration⁽⁹⁾. Seeds were sprayed in the shadow with this solution one day before planting. When dry, they were placed in paper bags. Plants were sprayed at the crown, which is considered the more sensitive area to *Rhodococcus fascians* action⁽¹⁷⁾, with a garden sprayer containing this solution after each cut. Urea was applied separately at the same time.

inóculo se disolvió en agua destilada estéril, para obtener una concentración del *Rhodococcus* de 1×10^4 UFC ml⁻¹(9). Un día antes de la siembra, se asperjó el inóculo a la semilla, a la sombra: una vez seca se colocó la semilla en bolsas de papel. Posteriormente, se aplicó de nuevo el microorganismo después de cada corte, junto con la urea. Dicha aplicación se efectuó utilizando una aspersora de jardín, aplicando en la corona de las plantas, por ser considerada la parte más sensible a la acción de *Rhodococcus*(17).

Durante la siembra se aplicaron al voleo 60 kg ha⁻¹ de fósforo en forma de fosfato diamónico (18-46-00), y la fertilización nitrogenada se realizó con tres niveles de nitrógeno: 0, 30, 60 kg N ha⁻¹. Estos niveles se eligieron tomando en cuenta que en ese tipo de suelo las gramíneas en praderas utilizan 60 kg N ha⁻¹ después de cada corte, y a partir de ésta, se eligieron dosis inferiores a la óptima(18). Para la fertilización nitrogenada se utilizó urea, la cual se aplicó después de cada corte de forraje e inmediatamente se procedió a la aplicación de riego rodado. Se consideró un tratamiento testigo al que no se le aplicó inoculante ni fertilizante alguno.

Como variable de respuesta se consideró la producción de materia seca, empleando para su medición el método de cortes(19). Para lo anterior se usó un cuadrante de 0.5 por 0.5 m y el zacate se cortó cuando alcanzó una altura entre 5.0 y 7.5 cm. Al inicio del experimento, los dos primeros cortes se espaciaron por 68 días, y los siguientes cinco cortes tuvieron una periodicidad de 21 a 28 días. El pasto cosechado se colocó en bolsas de papel, se secó a temperatura ambiente hasta obtener peso constante y el resultado se expresó en toneladas de materia seca por hectárea. Después de cada corte se procedió a cortar todo el pasto para emparejar la parcela y el forraje se retiró del área.

Los tratamientos se establecieron mediante un diseño completamente al azar; con un arreglo factorial 2x3x3, donde el primer factor fue la inoculación (inoculado, no inoculado), el segundo factor fue la especie (avena, ballico anual, trigo) y el tercer factor la fertilización (0, 30, 60 kg N ha⁻¹), con cuatro repeticiones por tratamiento(20). Para el

At planting, phosphorous at 60 kg ha⁻¹ as diamonic fosfate was scattered on plots. N, as urea, was applied at three rates, 0, 30 and 60 kg ha⁻¹. These rates were chosen because it is common practice in this area to fertilize with N at 60 kg ha⁻¹ after each cut, so lower rates were preferred(18). Urea was applied after each cut, and afterwards plots were irrigated by flooding. Control was neither fertilized nor inoculated.

Dry matter production was considered as a response variable. To this end, the method of cuts was employed, in a 0.5*0.5 m square inside each plot. Grass was cut when plants reached 5.0 to 7.5 cm height. At the beginning of the experiment, the interval between the first two cuts was 68 d, the following five cuts showed intervals between 21 and 28 d. Harvested grass was placed in paper bags, dried at room temperature until constant weight and results were recorded as metric tons per hectare (t ha⁻¹). After each cut, the remainder of the plot was cut at the same height and the resulting residue was taken away.

Treatments were set in a completely randomized, 2*3*3 factorial arrangement with four replicates, where the first variable was inoculation (inoculated, non inoculated), the second factor was specie (oats, annual ryegrass, wheat) and the third factor fertilization (0, 30, 60 kg N ha⁻¹)(20). Data were analyzed after dry matter production was converted to natural logarithms. The adjusted model included the three main effects, inoculation, fertilization and specie and all their possible double and triple interactions. A covariance component was included in the fertilization * inoculation repetition. This was because each plot was fertilized and sprayed after each cut with the pre-established rates. The model was processed through the ProcMixed procedure of the SAS statistical software v. 8.2(21), and average comparison was tested through t(22).

Economic assessment of the different treatments was carried out through marginal analysis(23), where total variable costs, forage production and net profits were considered as indicators. These were estimated for obtaining a dominance analysis in order to ascertain the outstanding treatments, based on both forage yield and economic performance.

análisis de los datos, la producción de materia seca se transformó a logaritmo natural. El modelo ajustado incluyó los tres efectos principales: inóculo, fertilización y especie, así como todas sus posibles interacciones dobles y la triple. Se agregó al modelo un componente de covarianza en la repetición dentro de fertilización x inóculo. Lo anterior debido a que se aplicó después de cada corte, inóculo y fertilizante a cada parcela con las dosis seleccionadas desde el inicio del estudio. El modelo se corrió en el procedimiento Proc Mixed de SAS versión 8.2⁽²¹⁾, y la comparación de medias se hizo utilizando pruebas de t ⁽²²⁾.

La evaluación económica se realizó mediante un análisis marginal⁽²³⁾ donde se consideraron como indicadores los costos totales variables, producción de forraje y beneficios netos. Esto se calculó para obtener un análisis de dominancia con la finalidad de detectar los tratamientos más sobresalientes, basado en los beneficios económicos y no solo en rendimientos de forraje.

Los costos totales variables fueron: urea \$5.05/kg; semilla de avena \$7.37/g; ballico anual \$8.11/kg; y trigo \$5.38/kg. El costo del inóculo (\$434.00) consideró el precio del medio de cultivo en el que se multiplicó el microorganismo.

A la producción total de forraje se le dio un valor considerando su precio de venta por kilo, para lo cual se tomó como referencia la estimación de costos de producción de alfalfa para el ciclo agrícola del año en que se efectuó el trabajo. Se utilizó alfalfa como referencia, porque no se tiene información del costo de forraje de praderas irrigadas de invierno en el mercado.

Los beneficios netos de los tratamientos se utilizaron para obtener los beneficios netos marginales. Estos últimos, se calcularon mediante la diferencia entre el tratamiento superior e inferior. También se obtuvieron los costos marginales que se calcularon de la diferencia entre costos variables de los tratamientos superior e inferior. Los cálculos anteriores se realizaron para obtener la tasa de retorno marginal al dividir las cifras de beneficio neto marginal entre el costo marginal expresado en

Total costs variables (MXP) were, urea 5.05 kg⁻¹, oats seed 7.37 kg⁻¹, annual ryegrass seed 8.11 kg⁻¹ and wheat seed 5.38 kg⁻¹. Cost of inoculum, 434.00, took into account the average price of the media where it was multiplied.

Forage yield (kg DM ha⁻¹) was valued at a price that took into account the average production cost for alfalfa in the year of the experiment. Alfalfa was chosen as a reference, because no data on irrigated winter annual forage costs are available in the market. Net profits of the different treatments were used to obtain net marginal profits. These were estimated through the difference between the high and low treatments. Marginal costs were also obtained through differences between variable costs of the high and low treatments. All these estimates were performed for obtaining a marginal rate of return by dividing the net marginal profit by the marginal cost expressed as percentage. The dominance analysis allows eliminating those treatments whose profits are lower than another immediately above.

In forage yield, oats was the best, notwithstanding the inoculation treatment, as it showed similar production to those reported in conditions similar to those prevailing in the central area of Chihuahua⁽²⁴⁾, between 10 and 15 t DM ha⁻¹. Forage yield in oats increased with fertilization amounts ($P < 0.05$), values varying from 4.90 t DM ha⁻¹ in control to 15.37 t when 60 kg N were applied (Table 1), which is the recommendation for irrigated winter cereal pastures⁽¹⁴⁾.

Annual ryegrass yielded less than oats, but its production when inoculated also rose with greater fertilizer amounts (Table 1); yields were 3.5, 8.15 and 11.31 t DM ha⁻¹ for 0, 30 and 60 kg N, respectively. These yields are similar to those usually obtained in central Chihuahua⁽²⁾.

Wheat showed the least yield, and also showed an irregular trend towards fertilization, because the greater yield (8.46 t DM ha⁻¹) was obtained with 30 kg N, and the 60 kg N treatment produced only 7.11 t DM ($P < 0.05$), possibly due to the fact that the wheat used in the present study is not very

Cuadro 1. Producción de forraje de avena, ballico anual y trigo utilizando diferentes dosis de fertilización

Table 1. Forage production (t DM ha⁻¹) in annual ryegrass, oats and wheat using different N fertilizer rates

N Fertilizer (kg N ha ⁻¹)	Oats	Annual ryegrass	Wheat
0	4.90 Cd ± 0.063	3.5 Ce ± 0.042	2.50 Cf ± 0.049
30	11.32 Bd ± 0.131	8.15 Bf ± 0.129	8.46 Ae ± 0.126
60	15.37 Ad ± 0.165	11.31 Ae ± 0.131	7.10 Bf ± 0.135

ABC Different capital letters in columns indicate differences between fertilizer rates ($P < 0.05$).

def Different small letters in columns indicate differences between species ($P < 0.05$).

porcentaje. El análisis de dominancia elimina los tratamientos cuyos beneficios netos sean más bajos con respecto a otro tratamiento inmediato superior.

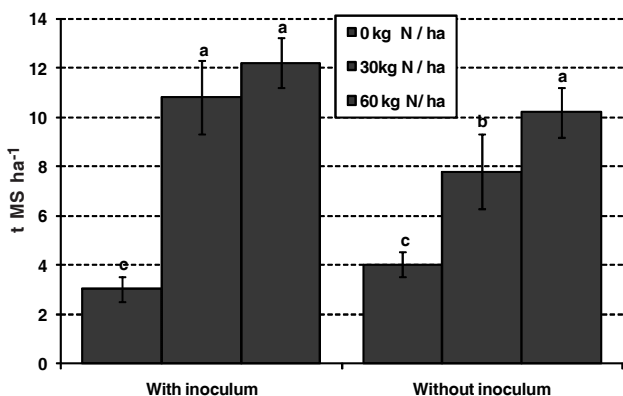
En producción de forraje, la avena resultó ser el cereal con el mayor rendimiento, independientemente del tratamiento de inoculación, ya que mostró una producción similar a la reportada para las condiciones de la región central del estado de Chihuahua, con fluctuaciones de 10 a 15 t MS/ha⁽²⁴⁾. Se observó que los rendimientos de avena se incrementaron conforme aumentó la dosis de fertilización ($P < 0.05$), con valores que fluctuaron desde 4.90 t MS/ha en el tratamiento testigo (sin fertilización), hasta 15.37 t cuando se aplicaron 60 unidades de nitrógeno por hectárea (Cuadro 1),

resistant to cold weather, as plants died during a cold spell in May. Also, this low yield can be attributed to soil effects, as differences in fertility can be found in the same plot⁽²⁵⁾.

With reference to response to inoculation with *Rhodococcus fascians*, increases in forage yield were found in the three species. Data analysis showed interactions between fertilizer and inoculum ($P < 0.07$) and between fertilizer and specie ($P < 0.01$). When inoculated seed was used, forage yield was very similar at both the 30 and 60 kg N treatments. However, the most important feature is that a greater yield was obtained in the 30 kg N plus inoculum treatment, which was very similar to the one obtained with 60 kg without inoculum (Figure 1). This suggests that inoculation with *Rhodococcus fascians* at least sustains forage yield using 50 % less nitrogen fertilizer. When inoculum was used together with 30 kg N, average forage yield increased by 3 t DM vs the non inoculated treatment. Data obtained in the present study concurs with what is reported by other authors^(11,12), who confirm that inoculation increases leaf growth rate and plant biomass production. In a recent study⁽²⁶⁾, it is reported that by inoculating peas with non virulent *Rhodococcus fascians* strains, cytokinin production in plants increased for several days post inoculation. When the auxin:cytokinin ratio changes, aerial growth of plants increases, which helps explain enhanced tillering in grasses⁽²⁷⁾. Inoculation plus 60 kg N did not significantly increase dry matter production, probably due to the fact that this bacteria dies at higher fertilizer rates, as is also the case of other microorganisms that act as biofertilizers, such as *Azospirillum* sp⁽²⁸⁾.

Figura 1. Producción total de forraje de especies inoculadas con *R. fascians* aplicando diferentes dosis de fertilización nitrogenada

Figure 1. Total forage production of species fertilized at different N fertilization rates and inoculated with *R. fascians*



que es lo recomendado para praderas invernales de riego con cereales⁽¹⁴⁾.

El ballico anual tuvo una producción menor a la avena, cuyo rendimiento de materia seca también se incrementó con relación a la dosis de fertilización (Cuadro 1). Sus rendimientos fueron de 3.5, 8.15 y 11.31 t de MS/ha para las dosis de 0, 30 y 60 kg de N, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos para esta misma gramínea en la región central del estado de Chihuahua⁽²⁾.

El trigo fue el cereal que mostró la menor productividad, y además presentó una tendencia irregular con respecto a la fertilización, debido a que con la dosis de 30 kg de N se obtuvo el mayor rendimiento (8.46 t) en comparación con el tratamiento de 60 kg, con una producción de 7.1 t ($P < 0.05$), posiblemente debido a que la variedad de trigo utilizada no es lo suficientemente resistente al frío, ya que por una disminución de temperaturas durante el mes de mayo las plantas murieron. La menor producción de forraje con la dosis de 60 kg de N pudo haberse debido principalmente a efectos de suelo, ya que dentro del mismo terreno se pueden presentar variaciones en fertilidad⁽²⁵⁾.

Con respecto a la respuesta a la inoculación con *Rhodococcus fascians*, se observó un incremento en la producción de forraje en los tres cereales. El análisis de la información mostró interacciones entre fertilizante x inóculo ($P < 0.07$), y entre fertilizante x especie ($P < 0.01$). Cuando se utilizó semilla

In treatments where no fertilizer was used, greater production was seen when not inoculated; however, no differences between treatments were found ($P > 0.05$), but it is considered worth mentioning. Lower production in non fertilized treatments is due to a lower cytokinin flow in plants, due to nitrogen deficiency, thus delaying growth and even causing toxicity^(8,12,29).

In Table 2, different forage yields in oats under different fertilization and inoculation treatments can be seen. When average productions are compared, it can be appreciated that the highest production (16.6 t DM ha⁻¹) is found in the 60 kg N plus inoculum treatment ($P < 0.05$), while the lowest production was found in the non fertilized treatment (4.6 t).

With reference to the effect of inoculation on forage production during the production cycle in the three plant species being studied, inoculation in oats increased yield by 2.49 t DM ha⁻¹ when compared to control (Table 3). This shows that inoculation allowed increasing forage production in oats by something more than 20 %. When cutting dates were analyzed, greater production ($P < 0.05$) was observed in inoculated plots in the samplings of February 4, March 25, April 15, May 7 and June 4. Similar results were obtained in another field study⁽¹²⁾, carried out in *Bouteloua gracilis*, *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* inoculated with *Rhodococcus fascians*. These species showed increases in dry matter production close to 20 %.

Cuadro 2. Producción de avena, ballico anual y trigo en diferentes dosis de nitrógeno y con tratamiento de inoculación con *R. fascians* durante el ciclo de cultivo otoño-invierno (t MS ha⁻¹)

Table 2. Forage yield in oats, annual ryegrass and wheat with different N fertilization rates and inoculated with *R. fascians* in the fall – winter cycle (t DM ha⁻¹)

Fertilization (kg N ha ⁻¹)	Oat		Ryegrass		Wheat	
	Inoculation		Inoculation		Inoculation	
	Without	With	Without	With	Without	With
0	5.3 a	4.6 a	3.6 a	3.3 a	3.0 a	1.9 b
30	8.4 b	14.1 a	6.2 b	10.0 a	8.7 a	8.2 a
60	14.1 b	16.6 a	11.0 a	11.6 a	5.6 b	8.5 a

^{ab} Different letters between rows indicate differences between species in inoculation treatments ($P < 0.05$).

inoculada, la producción de forraje fue similar con las dosis de 30 y 60 kg de N. Sin embargo, el aspecto más importante de la inoculación es que se logró obtener la mayor producción de forraje utilizando 30 kg e inóculo, al igual que con la dosis de 60 kg sin inóculo (Figura 1). Lo anterior indica que la inoculación con *Rhodococcus* permitió mantener la producción de forraje utilizando un 50 % menos de fertilizante nitrogenado. Cuando se utilizó la combinación de 30 kg N e inóculo, la producción promedio de forraje se incrementó en cerca de 3 t MS ha⁻¹ con relación a la misma dosis de fertilización sin inóculo. La información obtenida coincide con los reportes de otros investigadores^(11,12) donde se muestra que la inoculación incrementa la tasa de crecimiento de hoja y la producción de biomasa de la planta. En un estudio reciente⁽²⁶⁾ se observó que mediante la aplicación de cepas no virulentas de *Rhodococcus fascians* a plantas de chícharo, se incrementó la producción de citocininas en la planta por varios días después de la aplicación. Al modificarse la relación auxina-citocinina se incrementa el crecimiento de la parte aérea de la planta, lo que explica el porqué se activa el crecimiento de brotes de los pastos⁽²⁷⁾. La aplicación del inóculo con dosis de 60 kg N no incrementó en forma significativa la producción de materia seca, probablemente a causa de que el microorganismo muere con dosis mayores de fertilización, lo cual ha sido observado en otros microorganismos que actúan como bio-fertilizantes, como es el caso del *Azospirillum*⁽²⁸⁾.

En los tratamientos en que no se utilizó fertilizante, se observó una mayor producción de forraje cuando no hubo inoculación; sin embargo, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos, pero se consideró de importancia mencionarlo. La menor producción en el tratamiento sin fertilizar se debe a que la deficiencia de nitrógeno evita la circulación de las citocininas en la planta provocando un retraso en el crecimiento y pudiendo llegar a causar toxicidad^(8,12,29).

En el Cuadro 2 se presenta la producción de forraje de avena bajo diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada e inoculación. Cuando se comparan las producciones promedio se puede observar que la

Besides, in a recent study⁽²⁶⁾ it is reported that after inoculation with *Rhodococcus fascians*, cytokinin production goes on for several days. In field conditions, when cytokinins are applied to perennial grasses after two weeks, treated plants increased growth by 20 to 30 % more than control⁽²⁷⁾. When these grasses were harvested, productivity was greater, because primary photosynthesis reaction were enhanced⁽³⁰⁾. Another study⁽³¹⁾ reports that when cytokinins were applied in oats, senescence was delayed and photosynthesis enzymes were activated, as happened in the present study.

Annual ryegrass response at different N rates to *Rhodococcus fascians* inoculation is shown in Table 2. The highest forage production (11 t DM ha⁻¹) was obtained when both fertilizer (60 kg) and inoculum were applied. The lowest yield was found in the no fertilizer plus inoculum treatment (3.3 t). On the other hand, the 30 kg N plus inoculum treatment produced 10 t DM. The same N concentration but without inoculum produced only 6 t, that is to say, 4 t less or 40 %.

Annual ryegrass forage production in inoculated and non inoculated plots can be seen in Table 3. At the end of the experiment, the difference between inoculated and non inoculated treatments amounted to 1.56 t DM (Table 2), or 19 %. The greater effects due to inoculation were found on February 4, March 4, May 7 and June 4.

Wheat response to N fertilization and inoculation treatments is shown in Table 2. The highest yield was obtained in the 30 and 60 kg N plus inoculation treatments (8 t DM); however, this yield is similar to those seen in the 30 kg N without inoculation treatments. This shows that in this specie, there was more response to fertilization than to inoculation, and that 30 kg N were enough to obtain a high production, even without inoculation.

Wheat was the specie which showed less response to inoculation, 0.43 t DM for the whole experiment (Table 3), or 7 % more due to inoculation. Only in the first harvest (December 1) a greater yield is seen. Possibly, the inoculum did not survive in this

avena mostró su máxima producción de forraje (16.6 t MS ha⁻¹) con el tratamiento de 60 kg más inóculo ($P < 0.05$); mientras que la menor producción de forraje se obtuvo en ausencia del fertilizante nitrogenado, con sólo 4.6 t.

Con referencia al efecto de la inoculación sobre la producción de forraje durante el ciclo productivo en las tres gramíneas, se observó que la inoculación en la avena mostró un incremento en 2.49 t MS/ha en comparación con el testigo (Cuadro 3). Lo anterior muestra que la inoculación permitió incrementar la producción de forraje de avena en poco más de un 20 %. Al analizar por fecha de corte, se observó una mayor producción ($P < 0.05$) en las parcelas inoculadas en los muestreos de febrero 4, marzo 25, abril 15, mayo 7, junio 4 y abril 15. Resultados similares fueron obtenidos en otro estudio en campo⁽¹²⁾, con *Bouteloua gracilis*, *Chloris gayana* y *Panicum coloratum* inoculadas con *Rhodococcus fascians*. Estas especies presentaron un incremento de cerca del 20 % en la producción de materia seca. Además, un estudio reciente⁽²⁶⁾ muestra que después de la aplicación de *R. fascians* continúa la producción de citocininas por varios días. En condiciones de campo, al aplicar citocininas a pastos perennes después de dos semanas, las plantas tratadas aumentaron su crecimiento de un 20 a 30 % más que el testigo⁽²⁷⁾. Cuando se cosecharon estos pastos, la productividad fue mayor, debido a que se aumentó la actividad de las reacciones primarias de la fotosíntesis⁽³⁰⁾. Otro estudio⁽³¹⁾ mostró que al aplicar citocininas a la avena se retardó la senescencia y activó las enzimas fotosintéticas, lo que ocurrió en este experimento.

La respuesta del ballico anual a la aplicación de *Rhodococcus fascians* con diferentes dosis de fertilización nitrogenada se presenta en el Cuadro 2. La mayor producción de forraje (11 t MS ha⁻¹) se obtuvo cuando se aplicó inóculo y fertilizante (60 kg N). El rendimiento de forraje seco más bajo se reportó al aplicar solamente el inóculo, con 3.3 t. Por otro lado, se observó que el tratamiento combinado de inoculación y 30 kg N produjo 10 t MS. Esta misma dosis de nitrógeno pero sin inóculo sólo produjo 6 t; es decir, se redujeron 4 t de forraje al no inocular el ballico anual, lo que

specie, or perhaps, this low response is explained in another study, where it is mentioned that is less sensitive to cytokinins than other grasses⁽³¹⁾ on their effect on photosynthesis enzymes activation.

It was seen in the three species that from the third harvest onwards (March 4) forage production in

Cuadro 3. Producción de avena, ballico anual y trigo en diferentes fechas de corte y con tratamiento de inoculación con *R. fascians* durante el ciclo de cultivo otoño-invierno (t MS ha⁻¹)

Table 3: Forage production in oats, annual ryegrass and wheat at different cutting dates and inoculated with *R. fascians* in the fall – winter cycle (t DM ha⁻¹)

Cutting date	With inoculum	Without inoculum	Difference
Oats			
December 1	1.45 a	1.36 a	0.09
February 4	2.76 a	1.69 b	1.06
March 4	0.82 a	0.93 a	-0.11
March 25	2.45 a	1.78 b	0.66
April 15	1.30 a	1.77 b	-0.47
May 7	1.62 a	1.22 b	0.39
June 4	1.38 a	0.53 b	0.85
SUM	11.81	9.31	2.49
Annual ryegrass			
December 1	0.94 a	0.67 a	0.27
February 4	0.86 a	0.52 b	0.34
March 4	0.40 b	0.68 a	-0.28
March 25	1.94 a	1.20 a	0.73
April 15	1.48 a	1.82 a	-0.34
May 7	1.63 a	1.21 b	0.41
June 4	1.06 a	0.63	0.43
SUM	8.33	6.77	1.56
Wheat			
December 1	0.92 a	0.40 b	0.51
February 4	0.56 a	0.45 a	0.10
March 4	0.56 b	1.19 a	-0.62
March 25	1.84 a	1.49 a	0.35
April 15	1.17 a	1.36 a	-0.18
May 7	1.16 a	0.89 a	0.27
SUM	6.23	5.80	0.43

ab Different letters between rows show differences in forage yield for each cutting date ($P < 0.05$).

Minus sign indicates greater forage production in fertilized treatments than in inoculated treatments.

equivale a un 38 % más de forraje por efecto de la inoculación.

La producción de forraje de ballico anual en las parcelas inoculadas y no inoculadas se muestra en el Cuadro 3. Al final del experimento, la diferencia en la producción de forraje de ballico anual entre inoculado y no inoculado fue de 1.56 t MS ha⁻¹ (Cuadro 2), lo que equivale a una producción superior en un 19 % por efecto de la inoculación. Los mayores efectos de la inoculación se encontraron en las fechas de cosecha de febrero 4, marzo 4, mayo 7 y junio 4.

La respuesta del trigo a los tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada se muestran en el Cuadro 2. Se observa que la máxima producción de forraje fue en las parcelas inoculadas y con dosis de fertilización de 30 y 60 kg N, con una producción de 8 t MS. Sin embargo, esta producción fue similar a la reportada en las parcelas no inoculadas y con fertilización de 30 kg (8 t MS). Lo anterior muestra que hubo una mayor influencia de la fertilización que de la inoculación,

inoculated non fertilized plots decreased (Table 3). This can be explained by the fact that cytokinin transport is influenced by how N is applied to plants⁽³⁰⁾. In this case, cytokinins could have produced toxicity by accumulating themselves in the plant due to nitrogen deficiency, therefore it can be considered that the presence of NH₄ (due to application of urea) eases cytokinin transport in plants^(30,31). It is worth mentioning that forage production in the three species decreased in both March 4 and April 15 harvests because of low temperatures.

The economic analysis showed that total marginal production costs (MXP) went from 284 to 3,213 ha⁻¹. Forage production went from 2 to 16 t DM ha⁻¹. The best economic results were near to 10,000 ha⁻¹, and net profits fluctuated between 34 and 6,000 ha⁻¹. The dominance analysis excluded 10 treatments out of 18. Of the eight selected treatments, only three were inoculated. The eight selected treatments were: annual ryegrass at 0, 30 and 60 kg N without inoculum and at 30 kg N with inoculum; oats at

Cuadro 4. Análisis de dominancia de especies forrajeras fertilizadas e inoculadas con *R. fascians*

Table 4. Dominance analysis of forage species fertilized with N and inoculated with *R. fascians*

Specie	Fertilization (MXP)	Inoculum (MXP)	Seed (MXP)	Total marginal costs (MXP)	Forage yield (t DM ha ⁻¹)	Forage price (MXP kg ⁻¹)	Yield value (MXP)	Net profit (MXP)	Dominance
Annual ryegrass	0.00	0.00	284.00	284.00	3.670	0.6	2202.00	1918.00	
Wheat	0.00	0.00	700.00	700.00	3.060	0.6	1835.70	1135.70	Dominated
Annual ryegrass	0.00	434.00	284.00	718.00	3.344	0.6	2006.25	1288.25	Dominated
Oats	0.00	0.00	959.00	959.00	5.367	0.6	3220.35	2261.35	
Wheat	0.00	434.00	700.00	1134.00	1.947	0.6	1168.20	34.20	Dominated
Annual ryegrass	910.00	0.00	284.00	1194.00	6.238	0.6	3742.50	2548.50	
Oats	0.00	434.00	959.00	1393.00	4.625	0.6	2774.70	1381.70	Dominated
Wheat	910.00	0.00	700.00	1610.00	8.713	0.6	5227.65	3617.65	
Annual ryegrass	910.00	434.00	284.00	1628.00	10.068	0.6	6040.50	4412.50	
Oats	910.00	0.00	959.00	1869.00	8.462	0.6	5077.05	3208.05	Dominated
Wheat	910.00	434.00	700.00	2044.00	8.212	0.6	4926.90	2882.90	Dominated
Annual ryegrass	1820.00	0.00	284.00	2104.00	11.030	0.6	6618.00	4514.00	
Oats	910.00	434.00	959.00	2303.00	14.183	0.6	8509.50	6206.50	
Wheat	1820.00	0.00	700.00	2520.00	5.646	0.6	3387.30	867.30	Dominated
Annual ryegrass	1820.00	434.00	284.00	2538.00	11.605	0.6	6963.00	4425.00	Dominated
Oats	1820.00	0.00	959.00	2779.00	14.129	0.6	8477.55	5698.55	Dominated
Wheat	1820.00	434.00	700.00	2954.00	8.560	0.6	5136.00	2182.00	Dominated
Oats	1820.00	434.00	959.00	3213.00	16.630	0.6	9978.00	6765.00	

y que 30 kg fueron suficientes para obtener la mayor producción, aún sin utilizar el inóculo.

El trigo fue la especie que presentó la menor respuesta a la inoculación, pues a lo largo del experimento, las parcelas inoculadas produjeron 0.43 t más que las no inoculadas (Cuadro 3), lo que representa únicamente un 7 % más de incremento en la producción por efecto de la inoculación. En el caso del trigo, sólo en la primera cosecha de forraje (diciembre 1) se pudo apreciar un mayor rendimiento. Posiblemente el inóculo no sobrevivió en esta planta, o bien, esta menor respuesta del trigo a la inoculación se explica en otro estudio, en donde se menciona que el trigo es menos sensible a la aplicación de citocininas que otros cereales⁽³¹⁾ en lo que se refiere a activación de enzimas fotosintéticas.

Se observó en las tres especies, que a partir de la tercera cosecha (marzo 4) disminuyó la producción de forraje de las plantas inoculadas donde no se fertilizó con nitrógeno (Cuadro 3). Lo anterior se explica debido a que la producción y transporte de citocininas están influenciados por la forma en que se aplica el nitrógeno a las plantas⁽³⁰⁾. En este caso, las citocininas pudieron haber causado toxicidad al haberse acumulado en la planta por falta de nitrógeno; por lo que se considera que la presencia de NH₄ (por la aplicación de urea) facilita el transporte de las citocininas en las plantas, lo cual no ocurrió al existir deficiencias de nitrógeno^(30,31).

0 kg N without inoculum and at 30 and 60 kg N with inoculum; and wheat at 30 kg N without inoculum (Table 4). Treatments which showed dominance in the marginal analysis were represented mostly by oats and annual ryegrass and only one wheat treatment. The wheat treatment at 30 kg N without inoculation showed the highest rate of return, 4,415.8 %, while the 30 kg N plus inoculum ryegrass treatment showed the lowest, 21.3 % (Table 5).

The economic analysis showed that only the 30 kg N ha⁻¹ plus inoculum in oats was possible to use because of its cost:profit ratio. This treatment obtained a marginal rate of return slightly higher than 60 %, which can be considered quite acceptable⁽²³⁾. However, the cost of the inoculum could be lowered if other less expensive C sources are used^(5,6) for its multiplication, which is one of the main qualities necessary in an inoculum⁽³²⁾.

As a conclusion, it can be stated that inoculation added to fertilization, favored forage yield, especially in oats and annual ryegrass. Besides, inoculation allowed obtaining similar forage yields than when 30 and 60 kg N were applied, which makes us consider that it is possible to reduce by 50 % the amount of N fertilizer. In the case of wheat, effects of inoculation were marginal, as productivity increased barely by 5 %. Relative to economic analysis of inoculated treatments, oats at 30 kg N ha⁻¹ plus inoculation showed a marginal rate of return over 60 %. In accordance with the results

Cuadro 5. Tasa de retorno marginal de tratamientos de fertilización e inoculación en avena, ballico anual y trigo

Table 5. Marginal rate of return for fertilization and inoculation treatments in oats, annual ryegrass and wheat (MXP)

Specie	Variable costs	Marginal cost	Net profit	Marginal net profit	Marginal rate of return
Annual ryegrass	284.00	675.00	1918.00	343.35	50.86
Oats	959.00	235.00	2261.35	287.15	122.19
Annual ryegrass	1194.00	416.00	2548.50	1069.15	257.00
Wheat	1610.00	18.00	3617.65	794.85	4415.83
*Annual ryegrass	1628.00	476.00	4412.50	101.50	21.32
Annual ryegrass	2104.00	199.00	4514.00	1692.50	850.50
*Oats	2303.00	910.00	6206.50	558.50	61.37
*Oats	3213.00		6765.00		

* Inoculated treatments

También es importante mencionar que las disminuciones en la producción de forraje de las tres especies en las cosechas de marzo 4 y abril 15 coincidieron con fuertes disminuciones en la temperatura.

El análisis económico mostró que los costos totales marginales de producción fluctuaron desde los 284 pesos hasta 3,213 pesos por hectárea. La producción de forraje varió de 2 a 16 t MS/ha. Los mejores rendimientos económicos estuvieron cercanos a los 10 mil pesos por hectárea. Los beneficios netos presentaron gran variación con cifras desde los 34 hasta los 6 mil pesos por hectárea. El análisis de dominancia excluyó 10 de 18 tratamientos. De los seleccionados, sólo en dos se usó inóculo. Los ocho tratamientos seleccionados por el análisis de dominancia fueron: ballico anual, con las dosis 0, 30, 60 sin inóculo; y 30 con inóculo; avena, con dosis de 0 sin inóculo, 30 y 60 con inóculo; trigo, 30 sin inóculo (Cuadro 4). Los tratamientos que dominaron en el análisis marginal están representados principalmente por la avena y el ballico anual, y sólo un tratamiento en trigo. El tratamiento de trigo con 30 kg N sin inóculo, obtuvo la mayor tasa de retorno con 4,415.8 %; en tanto que el tratamiento de ballico anual con 30 kg N e inóculo registró la menor, con 21.3 % (Cuadro 5).

En el análisis económico se observó que solamente el tratamiento de avena con inóculo y 30 kg N mostró posibilidades para ser utilizado debido a su relación costo beneficio. Este tratamiento obtuvo una tasa de retorno marginal ligeramente superior al 60 %, que se considera bastante aceptable⁽²³⁾. Sin embargo, una forma de disminuir el costo del inóculo sería el utilizar fuentes de carbono de menor costo para multiplicar el microorganismo^(5,6), lo cual es una de las cualidades necesarias en un inóculo⁽³²⁾.

Se concluye que, la inoculación en forma combinada con la fertilización, favoreció la producción de forraje, específicamente en avena y ballico anual. Además, la aplicación del inóculo permitió obtener una producción similar de forraje, utilizando dosis de 30 y 60 kg de N por ha, con lo cual se puede suponer que es factible reducir la dosis de fertilización

found in the present study, inoculation favored increases in productivity. However, many physiological effects remain unknown, so it is suggested that more basic research on this subject should be carried out, in order to be able to explain more precisely the effects and interactions between different rate of fertilization and inoculation, as well as the individual response in each specie.

End of english version

nitrogenada en un 50 %. En el caso del trigo, los efectos de la inoculación fueron marginales, ya que solo se pudo obtener menos de un 5 % en incremento en la productividad. Con relación al análisis económico de los tratamientos inoculados, la avena con 30 kg N ha⁻¹ fue la que mostró una tasa de retorno marginal por arriba del 60 %. De acuerdo a los resultados obtenidos, la inoculación favoreció el incremento en la productividad; sin embargo, aún se desconocen muchos efectos fisiológicos sobre las plantas, por lo que se sugiere realizar investigación básica que permita explicar en una forma más precisa los efectos y las interacciones entre dosis de fertilización e inoculación así como la respuesta individual de cada una de las especies.

LITERATURA CITADA

1. CIES. Gobierno del estado de Chihuahua. [en línea] <http://www.gobedodechihuahua>. 2002. Consultado Ene 29, 2004.
2. Esqueda M. Especies y variedades forrajeras para el uso de praderas irrigadas en el estado de Chihuahua. Folleto para productores núm. 6. CELC-SAGAR-INIFAP. Chihuahua, Chih. 1998.
3. Echavarría MS. Avances en el desarrollo de praderas irrigadas en el estado de Chihuahua. IX Simposium de ganadería. INIFAP-SAGAR. 1991.
4. Kennedy CA. The rhizosphere and the spermosphere. In: Sylvia D, Furrhmann JJ, Hartel GP, Zubirer AD, editors. Principles and applications of soil microbiology. 1st ed. Upple Saddle River, NJ. USA: Perentice Hall; 1999:398-407.
5. Murai N, Skoog F, Doyle M, Hanson R. Relationship between Cytokinins Production Presence Plasmids and Fasciation Caused by Strains of *Corynebacterium fascians*. Microb 1980;77(1):619-623.
6. Klämb D, Thies G, Skoog F. Isolation of Cytokinins from *Corynebacterium fascians*. Botany 1966;(56):56-90.

FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN LA PRODUCCIÓN DE FORRAJE DE AVENA, BALLICO Y TRIGO

7. Vidaver A, Davis M. Gram positive bacteria. Coryneform plant pathogens. In: Shaad N editor. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. Mn, USA: APS Press; 1998:104-113.
8. González GA. Extracción de metabolitos con actividad de fitoregulación con XAD producido por cepas de *Rhodococcus* y presentes en el producto comercial PHCA [tesis maestría]. Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Chihuahua; 1995.
9. González A, Portillo E. Efecto de algunas especies de *Rhodococcus* y reguladores exógenos en la diferenciación de tejido de zanahoria "in vitro" [tesis licenciatura]. Chihuahua, México: Univ. Autónoma de Chihuahua; 1992.
10. López J. Identificación de metabolitos con capacidad de Fitoregulación producidos por *Rhodococcus* spp [tesis maestría]. Chihuahua, México: Autónoma de Chihuahua; 1992.
11. Romero A, Stala A, Ruiz C. Efecto de biofertilización con microorganismos en plantas de chile jalapeño (*Capsicum anum*) [tesis licenciatura]. Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Chihuahua; 1992.
12. Carrillo R. Efecto de especies de *Rhodococcus* en la diferenciación celular de gramíneas C3 y C4 [tesis maestría]. Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Chihuahua. 1994.
13. Boletín Pastizales. Día del Ganadero. Ed Martín H González. Rancho Exp La Campana INIP-SARH.1982;13(4).
14. Rubio RH, Reyes G, Esqueda M, Chávez A. Establecimiento de praderas de ryegrass y cereales en valles centrales del estado de Chihuahua. Folleto para productores. Num. 4. RELC-INIFAP-SARH, Chihuahua, Chih. 1994.
15. Krieg N. Enrichment e Isolation. In: Gerhart P editor. Manual of methods for general microbiology. 2nd ed. USA: Am Soc Microbiol;1981:112-140.
16. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiology. USA. Wn. C. Brown Publishers; 1990.
17. Vereecke D, Burssens S, Simon-Mateo C, Inze D, Van Montagu M, Goethals K, Jaziri M. The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* 2000;(210):241-251.
18. Davis JG, Westfall DG. Fertilizing-Spring-Seeded small grains [on line]. Available: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/crops> Consulted Jan 15, 2004.
19. Martín RM. Manual de métodos de muestro de vegetación. Métodos de corte para determinar producción de forraje. Melgoza A, Fierro LC editores. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. INIP-SARH. México. Serie Técnico Científica 1980;1(1):52-63.
20. Hicks C. Fundamental concepts in the design of experiment. 2nd ed. USA: Holt Rinehart Winst eds. Library of Congress; 1973.
21. SAS. User's Guide: Versión 8.2. Statistics. SAS. Inst. INC. Cary, NC. 2004.
22. Steel R, Torrie J. Bioestadística. Principios y procedimientos. 2^a ed. México: Editorial Mc Graw Hill. 1985.
23. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos. Un manual metodológico de evaluación económica. Edición completamente revisada. México DF. 1988:38-54.
24. Esqueda M. Fechas de establecimiento y corte de variedades de avena para producción de forraje y doble propósito [tesis maestría]. Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Chihuahua; 1989.
25. Thompson LM, Troeh FR. Soils and fertility. Fourth ed. New York, USA: Mc. Graw Hill, Book Co; 2000.
26. Galis I, Bilyeu, Wool G, Jameson P. *Rhodococcus fascians*: shoot proliferation without elevated cytokinins? *Plant Growth Regulation* 2005;(46):109-115 <http://www.springerlink.com/content/r645622425t05325/>. Consultado Julio 1, 2009.
27. Towne G, Qwensky C. Cytokinins effect on protein and chlorophyll content of Big Blue stem leaves. *J Range Manage* 1983;36(1):75-77.
28. Whitmore AP. The biological management of soil fertility. *Proyect Nelh. J Agric Sci* 2000;(48):115-122.
29. Wang X, Below F. Cytokinins in Enhanced growth and TILLERING of Wheat Induced by Mixed Nitrogen Source. *Crop Sci* 1996; 35:121-126
30. Chernvad'ev I, Obratsov A, Kozlovskikh A, Doman N. Cytokinins as regulators of photosynthesis, respiration and productivity of some perennial cereal grasses. *Appl Biochem Microbl* 1988;23(5):545-554.
31. Badenoch-Jones J, Parker C, Letham D, Singh S. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations of transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant Cell Environ* 1996;(19):504-516.
32. Kennedy A. The rhizosfera and the spermosphere. Principles and applications of soil microbiology. Sylvia D, Furhmann J, Hartel P, Zubirer D editors. USA: Perentice Hall; 1999.

