

## Artículo científico

## Productividad de bermuda Tifton 85, inoculada con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum*, sometida a estrés de sequía agrícola

### Productivity of Tifton 85 bermudagrass, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*, subject to agricultural drought stress

Carlos José Bécquer-Granados<sup>1</sup>, Urbano Ávila-Cordoví<sup>1</sup>, José Ángel Nápoles-Gómez<sup>1</sup>, Yaldreisy Galdo-Rodríguez<sup>1</sup>, María Hernández-Obregón<sup>1</sup>, Ivón Muir-Rodríguez<sup>1</sup>, Orquidia Álvarez-Figueroa<sup>1</sup> y Fernando Medinilla-Nápoles<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spiritus, Apdo. 2255, ZP 1, CP 62200, Sancti Spiritus, Cuba

<sup>2</sup>Centro Meteorológico Provincial de Sancti Spiritus, Cuba

<sup>1</sup>Email: pastosp@enet.cu

#### Resumen

Se llevó a cabo un experimento de campo, en condiciones estresantes de sequía agrícola, para evaluar el efecto de la inoculación combinada con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en variables agroproductivas del híbrido Tifton 85 (*Cynodon dactylon*). El diseño experimental fue de parcela testigo, con cinco réplicas y tres tratamientos: testigo fertilizado con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (150 kg de N/ha), control absoluto y tratamiento inoculado. Se evaluó el peso seco de la parte aérea (PSPA), el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del PSPA (IEIPSPA), la longitud del tallo (LT) y la floración (Flor.). En el PSPA se constató la superioridad estadística del tratamiento inoculado (326,8 g/m<sup>2</sup>) sobre el control absoluto (230,0 g/m<sup>2</sup>), aunque estos dos tratamientos, a su vez, fueron inferiores al testigo fertilizado (492,4 g/m<sup>2</sup>). Respecto al IEIPSPA, el tratamiento inoculado presentó un 42,1 % más de biomasa que el control absoluto. En la LT no existieron diferencias estadísticas entre el tratamiento inoculado (28,9 cm) y el control absoluto (27,0 cm), mientras que el testigo fertilizado (36,8 cm) superó a ambos. No hubo diferencias entre tratamientos en la floración. Se concluye que, a pesar de que no existió efecto de los inoculantes microbianos en el estado de floración del cultivo, ni en la longitud del tallo, se obtuvo una productividad de biomasa aérea en el tratamiento inoculado superior a la del control absoluto. De manera general, se demostró la eficiencia de los inoculantes microbianos utilizados.

Palabras clave: *Cynodon dactylon*, floración, inoculación.

#### Abstract

A field trial was conducted, under stressing conditions of agricultural drought, in order to evaluate the effect of combined inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum* on agroproductive variables of the hybrid Tifton 85 (*Cynodon dactylon*). The experimental design was control plot, with five replicas and three treatments: control fertilized with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (150 kg of N/ha), absolute control and inoculated treatment. The dry weight of the aerial part (APDW), inoculation efficiency index based on the APDW (IEIAPDW), stem length (SL) and flowering (Flow.), were evaluated. In the APDW the statistical superiority of the inoculated treatment (326,8 g/m<sup>2</sup>) over the absolute control (230,0 g/m<sup>2</sup>), was observed, although these two treatments, in turn, were lower than the fertilized control (492,4 g/m<sup>2</sup>). With regards to IEIAPDW, the inoculated treatment showed 42,1 % more biomass than the absolute control. In SL there were no statistical differences between the inoculated treatment (28,9 cm) and the absolute control (27,0 cm), while the fertilized control (36,8 cm) surpassed both. There were no differences among treatments in flowering. It is concluded that, although there was no effect of the microbial inoculants on the flowering status of the crop, or on the stem length, a productivity of aerial biomass was obtained in the inoculated treatment higher than that of the absolute control. In general, the efficiency of the microbial inoculants used was proven.

Keywords: *Cynodon dactylon*, flowering, inoculation.

#### Introducción

Tifton 85 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers] es un híbrido resultante del cruce de Tifton 68 con una accesión de bermuda sudafricana que se introdujo en Estados Unidos como pasto y para heno en los

estados sureños húmedos, según McNamee (2014), quien señaló, además, que las ventajas de esta graminéa, las cuales incluyen un alto potencial de biomasa, tolerancia a la sequía y a los insectos y

respuestas excepcionales a la fertilización con nitrógeno, la hacen muy popular en el sur de Estados Unidos. En Cuba, al igual que otras gramíneas estoloníferas de pasto, esta variedad se introdujo con éxito como fuente de fibra y nutrientes para la ganadería vacuna, y es una de las variedades de pasto reconocidas en la Lista Oficial de Variedades Comerciales de Cuba (MINAG, 2016). Schwantes *et al.* (2017) aseguran que esta variedad responde bien a la fertilización orgánica; mientras que Ames *et al.* (2015) hallaron que Tifton 85 era superior en materia seca y otros indicadores para la producción de heno, en comparación con variedades de avena.

La productividad de los cultivos se afecta por diversos factores ambientales estresantes; y se conoce que el estrés hídrico, provocado por la sequía, limita el crecimiento y la productividad de los cultivos, especialmente en áreas áridas y semiáridas (Yang *et al.*, 2009). Si se tiene en cuenta además que el género *Cynodon* se caracteriza por su capacidad de extraer grandes cantidades de nutrientes del suelo (Pant *et al.*, 2004), existe entonces la necesidad de buscar vías menos costosas y de mayor impacto ambiental que los fertilizantes químicos para garantizar una adecuada nutrición de este pasto.

Las rizobacterias pueden contribuir a que las plantas toleren mejor los efectos de la sequía; entre estas, los rizobios ocupan un lugar importante en la inducción de tolerancia al estrés. Hussain *et al.* (2014) demostraron, en ensayos *in vitro*, que existían aislados rizobiales provenientes de leguminosas de grano tolerantes a condiciones de sequía, debido a su producción de catalasa. Hay antecedentes en Cuba del efecto positivo de *Bradyrhizobium* al combinarlo con *Trichoderma harzianum* en pastos, como buffel formidable (Bécquer *et al.*, 2017a); y en cereales, como triticale (Bécquer *et al.*, 2016b) y maíz (Bécquer *et al.*, 2017b), cultivos que se encontraban sometidos a condiciones de estrés por sequía.

Por otra parte, el hongo filamentoso *Trichoderma* induce mecanismos de defensa y estimula el crecimiento vegetal (Woo *et al.*, 2014). Uno de los factores que contribuyen a la actividad biológica beneficiosa de algunas especies de *Trichoderma* está relacionado con una amplia variedad de metabolitos secundarios que estas producen (Vinale *et al.*, 2014a; 2014b).

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la combinación de *Bradyrhizobium* sp. y *T. harzianum* en variables agroproductivas de bermuda Tifton 85, durante estrés continuado por sequía agrícola.

## Materiales y Métodos

**Localización.** El experimento se montó durante la tercera decena de diciembre de 2016, en una parcela de producción de semillas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus, Cuba; situada a 21° 53' 00" de latitud norte y los 79° 21' 25" de longitud oeste, y a una altura de 40 msnm.

**Cepa de rizobio.** Se aplicó la cepa Ho5, perteneciente al género *Bradyrhizobium* sp., microsimbionte de *Desmodium triflorum*, leguminosa procedente de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba (Bécquer *et al.*, 2016b).

**Cepa de Trichoderma.** Se utilizó el producto TRICOSAVE 34 (LABIOFAM, S.A.), compuesto por un sustrato de cáscara y cabecilla de arroz inoculado con micelios esporulados de *T. harzianum* A-34.

**Material vegetal.** Se evaluó el híbrido Tifton 85 [*C. dactylon* (L.) Pers].

### Preparación de los inóculos:

**Trichoderma.** Este producto, por recomendación técnica del fabricante, se añadió a agua corriente, a razón de 35 g/L; y se filtró con gasa, antes de inocular las plantas ( $1-2 \times 10^9$  conidios/g). El título final de la suspensión ( $10^6-10^8$  conidios/mL) se correspondió con lo recomendado por Wolffhechel y Jensen (1992).

**Bradyrhizobium.** La cepa creció en medio sólido levadura-manitol y se resuspendió en medio líquido hasta lograr una concentración celular de  $10^6-10^8$  UFC/mL, lo que se comprobó mediante el conteo de células viables (Vincent, 1970). Para la inoculación de las plantas, se diluyó el inóculo en proporción 1:10 en solución salina 0,9 %.

**Agrotecnia del experimento.** Se montó el experimento sobre una parcela previamente establecida, de 34 x 16 m, destinada a la producción de semilla de bermuda Tifton 85. Se efectuó un corte de establecimiento para proceder a la inoculación, y no se aplicó riego durante el período experimental. Se cosechó a los 132 días posteriores a dicho corte.

### Inoculación de las plantas:

- Con *Trichoderma*. La inoculación se realizó inmediatamente después del corte de establecimiento, con un aspersor manual de 20 L de capacidad cuyo contenido se vertió sobre los tallos recién cortados, de tal forma que al regular el surtidor se inocularon 3 440 mL de inóculo líquido en el área del tratamiento correspondiente (dosis equivalente a 250 L/ha de suspensión final, según recomendación del fabricante).

- Con *Bradyrhizobium*. La inoculación se realizó a los 15 días después de la aplicación inicial con *Trichoderma*, con un aspersor manual de 20 L de capacidad cuyo contenido se vertió sobre los rebrotes de las plantas, por lo que se inocularon 3 440 mL de inóculo líquido (suspensión final) en el área del tratamiento correspondiente (dosis de 20 L/ha de inóculo inicial).

El tratamiento control absoluto recibió 3 440 mL de agua corriente al inicio y 3 440 mL a los 15 días. Al testigo fertilizado se le aplicó 3,2 kg de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , equivalente a 150 kg de N/ha, y recibió 3 440 mL de agua corriente al aplicarse el fertilizante y 3 440 mL a los 15 días.

*Evaluación de las variables climáticas.* Los datos de temperatura, precipitación, humedad relativa y vientos, así como su análisis, se colectaron en la Estación Meteorológica de Sancti Spiritus.

*Determinación del estado de sequía agrícola.* El estado de sequía agrícola se determinó a través del índice de aridez o índice de sequía agrícola (IE) (Solano *et al.*, 2004), el cual se utilizó para comprobar si el experimento se realizaba en condiciones de estrés hídrico:

$\text{IE} = \text{ETR} / \text{ETP}$ , donde:

ETR: evapotranspiración real estimada, dependiente del estado de humedad del suelo.

ETP: evapotranspiración potencial estimada, dependiente de las condiciones atmosféricas.

Cuando  $\text{ETR} = \text{ETP}$ , el aprovisionamiento de agua del suelo es adecuado. Cuando  $\text{ETR} < \text{ETP}$ , hay insuficiencia de agua.

*Composición agroquímica básica del suelo experimental.* El suelo del área experimental se corresponde con el tipo Fluvisol mullido (Hernández-Jiménez *et al.*, 2015); presenta un contenido muy bajo de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (13,2 mg/100 g de suelo- Oniani) y de  $\text{K}_2\text{O}$  (14,5 mg/100 g de suelo-Oniani), así como

de materia orgánica (2,25 %- Walkley-Black), pH-4,8 y una capacidad de intercambio catiónico de 18 meq/100 g (Mehlich).

*Diseño experimental y análisis estadístico.* Se aplicó un diseño experimental de parcela testigo, con tres tratamientos y cinco réplicas. Los tratamientos fueron: 1) Inoculado: *Trichoderma* en el corte + *Bradyrhizobium* sp. a los 15 días del corte (Trich.+Ho 13.15d.); 2) Control absoluto (CA); 3) Testigo fertilizado con 150 kg de N/ha (TF). Se dividió el área en tres franjas de 4 m de ancho y 34 m de largo (136 m<sup>2</sup>), con calles de 2 m. Cada franja se consideró un tratamiento, y las réplicas se tomaron en cada parcela. Se realizó un análisis de ANOVA. Las diferencias entre medias se determinaron por LSD de Fisher. Los datos porcentuales se transformaron por  $\text{arccosen}\sqrt{P}$  y se utilizó el programa estadístico StatGraphics Centurion XV.

Como variables, se evaluaron: el peso seco de la parte aérea (PSPA, g/m<sup>2</sup>), con un marco de 0,25 m<sup>2</sup>; la longitud del tallo (LT, m) y la inflorescencia (flor, %). Además, se calculó el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del PSPA (IEIPSPA, %), según la fórmula de Santillana *et al.* (2012):

$\text{IEI} = [(\text{Tratamiento inoculado} - \text{control absoluto}) / \text{control absoluto}] \times 100$

## Resultados y Discusión

### *Estado de la sequía agrícola*

El mes de noviembre culminó con un IE regular, y el de diciembre con IE insuficiente (tabla 1). La sequía agrícola se agudizó en el periodo de enero a abril, y se mantuvo el IE con categoría de crítico en cada uno de los meses y de muy crítico en marzo.

Los principales indicadores del balance hídrico para la Estación Experimental de Pastos y Forrajes

Tabla 1. Principales indicadores del balance hídrico y de la categoría de sequía agrícola.

Período	Humedad inicial (%)	Humedad final (%)	ETP	ETR	Escorrimento	IE
Noviembre/2016	35,5	31,1	4,40	2,70	8,5	R
Diciembre/2016	31,1	24,9	4,28	0,52	2,3	I
Enero/2017	24,9	16,6	3,99	0,91	1,3	C
Febrero/2017	16,6	12,4	4,54	0,12	0,1	C
Marzo/2017	12,4	6,9	5,99	0,11	0	MC
Abril/2017	6,9	8,2	4,86	2,21	2,4	C

ETP: evapotranspiración potencial estimada, ETR: evapotranspiración real estimada.

R: regular, I: insuficiente, C: crítico, MC: muy crítico.

de Sancti Spíritus –basado en los datos del pluviómetro ubicado en la periferia del área de estudio–, se muestran en la tabla 1. La pérdida de humedad del suelo ocurrió de forma progresiva en el período experimental y la evapotranspiración fue pobre, sobre todo en febrero y marzo de 2017.

#### *Peso seco de la parte aérea e índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del PSPA*

Se halló diferencia estadística del tratamiento inoculado con relación al control absoluto, aunque los dos fueron inferiores al testigo fertilizado (tabla 2). Este resultado no es sorprendente, ya que al ser el N el nutriente que se requiere en mayor cantidad en los sistemas forrajeros de producción (Snyder y Leep, 2007), es lógico que la planta tome el elemento de mayor disponibilidad y asimilación en el suelo, proceso que los microorganismos no pueden facilitar de igual forma. No obstante, se notó el efecto positivo de los inoculantes microbianos con este mismo tratamiento respecto al control absoluto.

En el IEI, el tratamiento inoculado presentó un 42,1 % más de biomasa aérea que el control absoluto. Bécquer *et al.* (2017a) hallaron resultados superiores en este indicador en *Cenchrus ciliaris* L., al someter dicha gramínea a estrés por sequía. Alwhibi *et al.* (2017) informaron que plantas de tomate inoculadas con *T. harzianum* mostraron incremento en el follaje, las raíces y la clorofila, en comparación con los controles no inoculados. En un experimento con vid, Pascale *et al.* (2017) encontraron que dos cepas de *T. harzianum* fueron capaces de mejorar el rendimiento, los contenidos de polifenoles y la actividad antioxidante de las plantas. Por otra parte, se conoce que cepas de *Rhizobium sullae*, aisladas en la región semiárida de Túnez y moderadamente tolerantes a la sequía, incrementaron de forma significativa la biomasa aérea seca de plantas inoculadas en este tipo de estrés ambiental (Fitouri *et al.*, 2012).

Al proceder la cepa Ho5 (*Bradyrhizobium* sp.) de un ecosistema ganadero árido de Cuba (Bécquer *et al.*, 2016b), se corrobora lo expresado por Timusk *et al.* (2014) acerca de que los ambientes extremos pueden ser la fuente de rizobacterias con un alto potencial de tolerancia, que puede transferirse a las plantas.

Cuando se extrapolaron los datos (tabla 2), el tratamiento inoculado presentó un rendimiento de 3 268 kg/ha (estadísticamente superior al control absoluto), por lo que se puede inferir el efecto positivo de estos microorganismos en el pasto que se sometió a estrés por sequía agrícola.

Por otra parte, el rendimiento del testigo fertilizado fue de 4 924 kg/ha. McNamee (2014), en el segundo año de establecimiento de una parcela de bermuda Tifton 85, con 168 kg de N/ha y en condiciones edafoclimáticas más favorables que las de este experimento, obtuvo rendimientos entre 4 251 y 6 260 kg/ha. Si se tiene en cuenta que en el presente experimento se utilizó una dosis más baja de fertilizante, además de las limitaciones ambientales severas, se infiere el alto potencial de esta variedad en condiciones ambientales estresantes de Cuba, tanto al fertilizarla con productos biológicos, como con portadores industriales de nitrógeno.

#### *Longitud del tallo e índice de eficiencia de la inoculación sobre la base de la longitud del tallo*

No existieron diferencias estadísticas entre el tratamiento inoculado (28,9 cm) y el control absoluto (27,0 cm), en la longitud del tallo; mientras que el testigo fertilizado (36,8 cm) superó a ambos tratamientos. No obstante, al calcular el IEI se constató una diferencia de 7 % con respecto al control absoluto (tabla 3).

Estos resultados no coinciden con los de Bécquer *et al.* (2016a), quienes inocularon Triticale con una cepa de *Bradyrhizobium* sp. y *T. harzianum* en el momento de la siembra, tratamiento que propició

Tabla 2. Peso seco de la parte aérea e índice de eficiencia de la inoculación.

Tratamiento	PSPA (g/m <sup>2</sup> )	IEI (%)	PSPA (kg/ha), extrapolado
Control absoluto	230,0 <sup>c</sup>	-	2 300,0 <sup>c</sup>
Tratamiento inoculado	326,8 <sup>b</sup>	42,1	3 268,0 <sup>b</sup>
Testigo fertilizado	492,4 <sup>a</sup>	-	4 924,0 <sup>a</sup>
ES ±	28,069 <sup>***</sup>		280,69 <sup>***</sup>

PSPA: peso seco de la parte aérea; IEI: índice de eficiencia de la inoculación.

\*\*\* p < 0,001

Tabla 3. Longitud del tallo e índice de eficiencia de la inoculación sobre la base de la LT.

Tratamiento	LT (cm)	IEI (%)
Control absoluto	27,0 <sup>b</sup>	-
Tratamiento inoculado	28,9 <sup>b</sup>	7,0
Testigo fertilizado	36,8 <sup>a</sup>	-
ES ±	1,81985 <sup>***</sup>	

LT: Longitud del tallo; IEI: índice de eficiencia de la inoculación  
 \*\*\* $p < 0,001$

una mayor elongación del tallo en las plantas sometidas a sequía agrícola; así como con los resultados que obtuvieron Bécquer *et al.* (2017a) en *C. ciliaris*, al inocular con *T. harzianum* y *Bradyrhizobium* sp., también en condiciones de sequía. Es posible que la cantidad de fitohormonas encargadas de la elongación celular en el tallo no fuera suficiente para la especie forrajera que se utilizó, a pesar del efecto positivo de estas en la biomasa total. Además, el estrés hídrico severo al cual se sometió el cultivo debió influir negativamente en este proceso.

### Floración

No hubo diferencias entre los tratamientos (tabla 4) en cuanto a la floración. Sánchez-López *et al.* (2012) plantearon que la inoculación de tomate con diversas bacterias rizosféricas aumentó significativamente la floración de las plantas, debido quizás a la capacidad de estas bacterias de producir indoles y sideróforos y de solubilizar el fósforo, mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron en este experimento contradicen tal afirmación, lo que indica que el estrés por sequía pudo afectar la capacidad estimuladora de la floración en los microorganismos que se inocularon.

Otra interpretación pudiera basarse en el papel del etileno como responsable de la floración en muchas especies de plantas (Reid, 1995); y, como

durante el estrés por sequía se acentúa la biosíntesis de etileno (Ali *et al.*, 2014), es posible que los microorganismos que se aplicaron al cultivo no fueran capaces de eliminar el precursor de dicha sustancia (1-aminociclopropano, 1 ácido carboxílico-ACC) mediante la ACC-diaminasa (Saleem *et al.*, 2007), propia de ellos, lo cual pudo incidir en este resultado para el tratamiento inoculado.

Se concluye que, a pesar de que no hubo efecto de los inoculantes microbianos en el estado de floración del cultivo, ni en la longitud del tallo, se obtuvo una productividad de la biomasa aérea en el tratamiento inoculado superior a la del control absoluto. De manera general, se demostró la eficiencia de los inoculantes microbianos que se utilizaron, a pesar del estrés por sequía que sufrió el cultivo.

Asimismo, se recomienda evaluar la aplicación de los inoculantes microbianos en áreas más extensas de pastos, en condiciones de sequía agrícola.

### Referencias bibliográficas

- Ali, S. K. Z.; Sandhya, V. & Rao, L. V. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. *Ann. Microbiol.* 64 (2):493–502, 2014.
- Alwhibi, Mona S.; Hashem, A.; Fathi Abd Allah, E.; Alqarawi, A. A.; Soliman, Dina Wafi K.; Wirth, S. *et al.* Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *J. Integr. Agric.* 16 (8):1751–1757, 2017.
- Ames, J. P.; Abbado, Marcela; Dalazen, Deise; Pereira, Edleusa; Andrine, Camila; Ducati, Camila *et al.* Aspects related to production and storage of Tifton 85 bermudagrass hay with white oat IPR 126 and Guapa oversowing. *Ciências Agrárias.* 36 (1):341-352, 2015.
- Bécquer, C. J.; Ávila, U.; Galdo, Yaldreisy; Quintana, Maribel; Álvarez, Orquidia; Puentes, Adelaida *et al.* Selection of *Bradyrhizobium* sp. isolates

Tabla 4. Efecto de los tratamientos en la floración.

Tratamiento	Floración (%)	
	Dato transformado	Dato original
Control absoluto	1,5708	50,0
Tratamiento inoculado	1,5254	47,8
Testigo fertilizado	1,6412	53,2
ES ±	0,122723	

- due to their effect on maize under agricultural drought conditions in Sancti Spiritus, Cuba. *Cuban J. Agric. Sci.* 51 (1):129-138, 2017b.
- Bécquer, C. J.; Ávila, U.; Puentes, Adelaida; Nápoles, J. A.; Cancio, T.; Medinilla, F. *et al.* Response of *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel cv. Formidable), inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*, under drought stress. *Cuban J. Agric. Sci.* 51 (2):1-10, 2017a.
- Bécquer, C. J.; Galdo, Yaldreisy; Mirabal, Analeidis; Quintana, Maribel & Puentes, Adelaida. Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Morpho-cultural evaluation and nodulation (phase I). *Cuban J. Agric. Sci.* 50 (4):607-617, 2016b.
- Bécquer, C. J.; Puentes, Adelaida B.; Ávila, U.; Quintana, Maribel; Galdo, Yaldreisy; Medinilla, F. *et al.* Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en triticale (X. Triticosecale Wittmack), en condiciones de estrés por sequía. *Pastos y Forrajes.* 39 (1):19-26, 2016a.
- Fitouri, S. D.; Trabelsi, D.; Saïdi, Sabrine; Zribi, K.; Jédi, F. B. & Mhamdi, R. Diversity of rhizobia nodulating *Sulla (Hedysarum coronarium L.)* and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Ann. Microbiol.* 62 (1):77-84, 2012.
- Hernández-Jiménez, A.; Pérez-Jiménez, J. M.; Bosch-Infante, D. & Castro-Speck, N. *Clasificación de los suelos de Cuba.* Mayabeque, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Instituto de Suelos, Ediciones INCA, 2015.
- Hussain, M. B.; Zahir, Z. A.; Asghar, H. N. & Asgher, M. Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat? *Int. J. Agric. Biol.* 16:3-13, 2014.
- McNamee, Courteney E. *Stockpiled 'Tifton 85' Bermudagrass for cow-calf production as influenced by nitrogen fertilization.* A thesis submitted to the Graduate Faculty in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science. Auburn, USA: Auburn University, 2014.
- MINAG. *Lista oficial de variedades comerciales. Registro de variedades comerciales.* La Habana: Ministerio de la Agricultura, 2016.
- Pant, H. K.; Mislevy, P. & Rechigl, J. E. Effect of phosphorus and potassium on forage nutritive value and quantity: environmental implications. *Agron. J.* 96 (5):1299-1305, 2004.
- Pascale, A.; Vinale, F.; Manganiello, G.; Nigro, M.; Lanzuise, S.; Ruocco, M. *et al.* Trichoderma and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Prot.* 92:176-181, 2017.
- Reid, M. S. Ethylene in plant-growth, development and senescence. In: P. J. Davies, ed. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.* 2nd ed. Dordrecht, Netherlands: Kluwer. p. 486-508, 1995.
- Saleem, M.; Arshad, M.; Hussain, S. & Bhatti, A. S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (10):635-648, 2007.
- Sánchez-López, Diana B.; Gómez-Vargas, Ruth M.; Garrido-Rubiano, María F. & Bonilla-Buitrago, Ruth R. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal. en tomate bajo condiciones de invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3 (7):1401-1415, 2012.
- Santillana, Nery; Zúñiga, Doris & Arellano, Consuelo. Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagonico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli.* *Agrociencia Uruguay.* 16 (2):11-17, 2012.
- Schwantes, D.; Gonçalves Jr., A. C.; Richart, A.; Schulz, L.; Manfrin, Jéssica; Schiller, Andréia da P. *et al.* Biofertilization of Tifton 85 with sludge from sewage treatment station of whey industry. *Int. J. Plant Soil Sci.* 16 (3):1-10, 2017.
- Snyder, C. S. & Leep, R. H. Fertilization. In: R. F. Barnes, C. J. Nelson, K. J. Moore and M. Collins, eds. *Forages: the science of grassland agriculture.* Vol. II. 6th ed. Ames, USA: Wiley-Blackwell. p. 355-377, 2007.
- Solano, O.; Vázquez, R.; Menéndez, J. A.; Menéndez, C. & Martín, María E. Modelo agrometeorológico de evaluación de la sequía agrícola. *Convención Trópico 2004. I Taller de Meteorología Tropical.* La Habana: Instituto de Geografía Tropical. <http://repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/1663>. [07/12/2017], 2004.
- Timmusk, Salme; Abd El-Daim, I. A.; Copolovici, L.; Tanilas, Triini; Kännaste, Astrid; Behers, L. *et al.* Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS ONE.* 9 (5):e96086. <http://10.1371/journal.pone.0096086>. [07/12/2018], 2014.
- Vinale, F.; Manganiello, G.; Nigro, M.; Mazzei, P.; Piccolo, A.; Pascale, A. *et al.* A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules.* 19 (7):9760-9772, 2014b.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Woo, S. L.; Nigro, M.; Marra, R. *et al.* Trichoderma secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8:127-139, 2014a.
- Vincent, J. M. *A manual for the practical study of root nodules bacteria.* London: Blackwell Sci. Publications, 1970.
- Wolffhechell, H. & Jensen, D. F. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium vites* for the biological control of post-emergence damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum.* *J. Phytopathol.* 136 (3):221-230, 1992.
- Woo, S. L.; Ruocco, Michelina; Vinale, F.; Nigro, M.; Marra, Roberta; Lombardi, Nadia *et al.* Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.* 8:71-126, 2014.
- Yang, J.; Kloepper, J. W. & Ryu, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14 (1):1-4, 2009.