

Effect of inoculation with beneficial microorganisms on agroproductive variables of *Morus alba*

Efecto de la inoculación con microorganismos benéficos en variables agroproductivas de *Morus alba*

C. J. Bécquer¹, Adelaida B. Puentes², Arachely Cabrera², María Hernández¹ and Ana Sánchez¹

¹Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental de Sancti Spiritus, Cuba (MINAG-GEGAN)

²Universidad José Martí Pérez, Sancti Spiritus, Cuba

Email: cjbecquerg@gmail.com

C. J. Bécquer: <https://orcid.org/0000-0002-5738-7838>

A field experiment was carried out to evaluate the effect of the simple and combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Glomus cubense* on agroproductive variables of *Morus alba*. An experimental design of control plots was used, with six treatments and ten replications. Conventional inoculation techniques were applied. The treatments consisted of EcoMic®, INICA-8, INICA-8+ EcoMic®, absolute control, control fertilized with organic matter and control chemically fertilized. The main stem length (cm), main stem diameter (cm), number of branches, number of leaves, dry weight of leaves (g/plant) were evaluated and the inoculation efficiency index was calculated on the basis of the dry weight of leaves (%). Simple ANOVA analysis and comparison of means by Fisher's LSD were performed. The digit count data were transformed by \sqrt{x} . In the main stem length, the chemically fertilized control highlighted due to its higher values ($P < 0.001$) with respect to the rest of treatments, although it shared common letters with the control fertilized with organic matter at 45 (90.15 cm) and 75 days after sowing (119.50 cm), as well as with EcoMic® + INICA-8, at 135 days after sowing (190.40 cm). Regarding the dry weight of leaves, the treatment inoculated with the combination of EcoMic® + INICA-8 (78.51 g/plant) and the control fertilized with organic matter (76.79 g/plant) were higher to the rest ($P < 0.001$), and statistically similar to each other. It is concluded that the combined inoculation of EcoMic® + INICA-8 exerted a higher effect on the studied variables. The variables that were most favored with the inoculation were the stem length and the number of branches. The simple inoculation of INICA-8 was inefficient in all variables.

Key words: *Azospirillum brasilense*, *Glomus cubense*, nutrition, mulberry.

The cultivation of mulberry (*Morus alba* L.) is an option to guarantee a more balanced animal nutrition. It is a highly productive forage shrub that, although is native to Asia, has adapted excellently to the tropics (Benavides 1994). However, its intensive exploitation requires high amounts of nutrients in the soil, especially nitrogen and potassium, of which it requires a continuous supply (Pentón *et al.* 2014).

To avoid the continuous application of chemical fertilizers, the use of microbial inoculants constitutes an alternative in the search for resources that are friendlier to the environment. The action of soil microorganisms contributes to the sustainability of all ecosystems, when regulating the organic matter dynamics, the carbon sequestration from soil and the emission of greenhouse

Se realizó un experimento de campo para evaluar el efecto de la inoculación simple y combinada de *Azospirillum brasilense* y *Glomus cubense* en variables agroproductivas de *Morus alba*. Se empleó un diseño experimental de parcelas testigo, con seis tratamientos y diez réplicas. Se aplicaron técnicas de inoculación convencionales. Los tratamientos consistieron en EcoMic®, INICA-8, INICA-8+ EcoMic®, control absoluto, testigo fertilizado con materia orgánica y testigo fertilizado químicamente. Se evaluó la longitud del tallo principal (cm), diámetro del tallo principal (cm), número de ramas, número de hojas, peso seco de las hojas (g/planta) y se calculó el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco de las hojas (%). Se realizó análisis de ANOVA simple y comparación de medias por LSD de Fisher. Los datos de conteo de dígitos se transformaron por \sqrt{x} . En la longitud del tallo principal se destacó el testigo fertilizado químicamente por sus valores superiores ($P < 0.001$) con respecto al resto de los tratamientos, aunque compartió letras comunes con el testigo fertilizado con materia orgánica a los 45 (90.15 cm) y 75 días después de la siembra (119.50 cm), así como con EcoMic®+INICA-8, a los 135 días después de la siembra (190.40 cm). En cuanto al peso seco de las hojas, el tratamiento inoculado con la combinación de EcoMic®+INICA-8 (78.51 g/planta) y el testigo fertilizado con materia orgánica (76.79 g/planta) fueron superiores al resto ($P < 0.001$), y estadísticamente similares entre sí. Se concluye que la inoculación combinada de EcoMic®+INICA-8 ejerció un efecto superior en las variables estudiadas. Las variables que más se favorecieron con la inoculación fueron la longitud del tallo y el número de ramas. La inoculación simple de INICA-8 fue ineficiente en todas las variables.

Palabras claves: *Azospirillum brasilense*, *Glomus cubense*, nutrición, mulberry.

El cultivo de la morera (*Morus alba* L.) es una opción para garantizar una nutrición animal más balanceada. Se trata de un arbusto forrajero altamente productivo, que aunque es originario de Asia se ha adaptado de manera excelente al trópico (Benavides 1994). No obstante, su explotación intensiva exige altas cantidades de nutrientes en el suelo, sobre todo nitrógeno y potasio, de los que requiere un aporte continuo (Pentón *et al.* 2014).

Para evitar la continua aplicación de fertilizantes químicos, el uso de inoculantes microbianos constituye una alternativa en la búsqueda de recursos que sean más amigables con el medio ambiente. La acción de los microorganismos del suelo contribuye a la sostenibilidad de todos los ecosistemas, al regular la dinámica de la materia orgánica, el secuestro de carbono del suelo y la emisión

gases, modifying the physical structure of the soil and the water regime, thus improving the efficiency of nutrient acquisition (Singh *et al.* 2011).

Plana *et al.* (2016) point out that the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) leads to a symbiosis of the microorganism with the plant, which allows transporting the necessary nutrients for its metabolism and, at the same time, improves the chemical, physical and biological properties of the soil. It is known that the AMF not only make the extraction of nutrients from the soil more efficient, but also reduce their loss due to washing (Bender *et al.* 2015).

Azospirillum brasilense is another of the microorganisms that are valued for their contribution to the promotion of plant growth. Wing Ching-Jones *et al.* (2016) showed that the application of different strains of *Azospirillum* in *Cynodon nlemfuensis* has a similar effect to the application of nitrogen fertilizer, in terms of the yield of aerial biomass.

When referring to the agronomic performance of mulberry in Cuba, where there is knowledge among farmers about the use of organic fertilizers and biofertilizers, Martín (2010) points out that it is possible to use other sources of fertilization in the country. Therefore, it would be necessary to study the performance of these sources and their combination with chemical fertilizers.

Due to the previous mentioned, the objective of this study was to evaluate the effect of simple and combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Glomus cubense* in agroproductive variables of mulberry.

Materials and Methods

Location of the experiment. The experiment began on September 19, 2019 in an experimental plot belonging to the Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus, Cuba (21° 53' 00'' north latitude and 79° 21' 25'' west longitude, altitude 40 m o.s.l.).

Plant material. *Morus alba* Linn (Moraceae), Yu-62 variety, from the germplasm bank of the Sancti Spiritus Experimental Station was evaluated.

Bacterial strain. The INICA-8 strain, from *Azospirillum brasilense*, provided by the Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes (IIPF) was applied. According to the manufacturer's recommendations, the preparation was diluted in common water, in a ratio of 1:10. The inoculation was performed at the time of transplantation of mulberry seedlings, with an inoculum of 10⁹-10¹⁰ CFU/mL. A 12 L sprayer backpack was used, whose content was dropped on the soil around the seedling. When regulating the spout, each plant approximately received 125 mL of liquid inoculum (40 L/ha of pure inoculum).

Strain of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The inoculation was performed using the ECOMIC® certified mycorrhizal inoculant, which contained 30 spores/g of substrate produced in the Departamento

de gases de invernadero, modifican la estructura física del suelo y el régimen de agua, por lo que mejoran la eficiencia de la adquisición de nutrientes (Singh *et al.* 2011).

Plana *et al.* (2016) señalan que el uso de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) conlleva a una simbiosis del microorganismo con la planta, lo que permite transportar los nutrientes necesarios para su metabolismo y, a la vez, mejora las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo. Se sabe que los HMA no solo hacen más eficiente la extracción de nutrientes del suelo, sino que reducen su pérdida por lavado (Bender *et al.* 2015).

Azospirillum brasilense es otro de los microorganismos que se valoran por su contribución a la promoción del crecimiento vegetal. Wing Ching-Jones *et al.* (2016) demostraron que la aplicación de diferentes cepas de *Azospirillum* en *Cynodon nlemfuensis* tiene un efecto similar a la aplicación de fertilizante nitrogenado, en cuanto al rendimiento de la biomasa aérea.

Al referirse al comportamiento agronómico de la morera en Cuba, donde existe conocimiento entre los productores acerca del uso de abonos orgánicos y biofertilizantes, Martín (2010) señala que es posible utilizar en el país otras fuentes de fertilización. Para ello sería necesario estudiar el comportamiento de dichas fuentes y su combinación con los fertilizantes químicos.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación simple y combinada de *Azospirillum brasilense* y *Glomus cubense* en variables agroproductivas de morera.

Materiales y Métodos

Localización del experimento. El experimento se inició el 19 de septiembre del 2019 en una parcela experimental perteneciente a la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus en Cuba (21° 53' 00'' de latitud norte y los 79° 21' 25'' de longitud oeste, altura de 40 m s.n.m.).

Material vegetal. Se evaluó *Morus alba* Linn. (Moraceae), variedad Yu-62, procedente del banco de germoplasma de la Estación Experimental Sancti Spiritus.

Cepa bacteriana. Se aplicó la cepa INICA-8, de *Azospirillum brasilense*, proporcionada por el Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes (IIPF). Según recomendaciones del fabricante, el preparado se diluyó en agua común, en proporción de 1:10. La inoculación se realizó en el momento del trasplante de las posturas de morera, con un inóculo de 10⁹-10¹⁰ UFC/mL. Se utilizó una mochila aspersora de 12 L, cuyo contenido se echó en el suelo alrededor de la postura. Al regular el surtidor, cada planta recibió aproximadamente 125 mL del inóculo líquido (40 L/ha de inóculo puro).

Cepa de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). La inoculación se realizó mediante el inoculante micorrízico certificado ECOMIC®, que contenía 30 esporas/g de sustrato producido en el Departamento

de Biofertilizantes y Nutrición from INCA. It was applied solid in the soil around the plant (15-20 g/plant), immediately after transplanting the seedling, with a dose equivalent to 50 kg/ha.

Fertilization with organic matter. A mixture of soil and organic matter (3: 1 ratio) was applied, in a dose equivalent to 30 t/ha, whose composition is shown in table 1.

Table 1. Chemical characteristics of soil and organic matter mixture

K ₂ O, (mg/100g)	P ₂ O ₅ , (mg/100g)	O.M, (%)	pH, H ₂ O
17.10	10.90	5.29	6.90

Chemical fertilization. Phosphoric carrier (P₂O₅) was applied in doses of 30 g/plant, equivalent to 100 kg/ha, amount recommended for mulberry (Cifuentes and Sohn 1998).

Agrotechnics of the experiment. It was performed from September 19, 2019 to April 15, 2020, in an area of 40 x 40 m, destined to mulberry sowing in seedlings to obtain green forage. A conventional soil preparation was carried out: plowing, medium harrow, light harrow, crossing, recrossing and furrowing. A 1 x 0.5 m frame was used, with a sowing density of 20,000 pl/ha, for a total of 3,200 plants in the experimental area. Root ball seedlings were used, which were sown at a depth of 10 cm. Irrigation (250 m³/ha) was applied three times in September (once during the transplanting of seedlings, and two immediately after inoculation). It was not irrigated in October because this month there was rainfalls that guaranteed sufficient soil moisture. However, it was irrigated three times in November, and twice in December, January, February, March, and April, respectively.

Evaluation of the climatic variables in the area and experimental period. The variables rainfalls (mm), temperature (°C) and relative humidity (%) were evaluated. The data were provided by the Delegación Provincial del Instituto de Meteorología (INSMET) in Sancti Spiritus.

Basic agrochemical composition of the experimental soil. The soil in the experimental area (table 2) corresponded to the loose brown carbonate type (Hernández *et al.* 2015), made of brown or slightly dark brown clay, with a slight reaction to HCL. It has some gravels on the A1 horizon, good superficial and internal drainage, moderately erodible.

Table 2. Basic characteristics of the experimental area soil

Type of soil	P ₂ O ₅ , mg/100g	K ₂ O mg/100g	OM,%	pH (KCl)
Loose brown carbonate	10.52	15.00	2.90	5.9

Experimental design and statistical analysis. An experimental design of control plots was used (Lerch 1977), with six treatments and ten replications (table

de Biofertilizantes y Nutrición del INCA. Se aplicó en forma sólida en el suelo alrededor de la planta (15-20 g/planta), inmediatamente después del trasplante de las posturas, con una dosis equivalente a 50 kg/ha.

Fertilización con materia orgánica. Se aplicó una mezcla de suelo y materia orgánica (proporción 3:1), en dosis equivalente a 30 t/ha, cuya composición se muestra en la tabla 1.

Fertilización química. Se aplicó portador fosfórico (P₂O₅) en dosis de 30 g/planta, equivalente a 100 kg/ha, cantidad recomendada para la morera (Cifuentes y Sohn 1998).

Agrotecnia del experimento. Se realizó desde el 19 de septiembre de 2019 hasta el 15 de abril del 2020, en un área de 40 x 40 m, destinada a la siembra de morera en posturas para la obtención de forraje verde. Se realizó una preparación convencional del suelo: roturación, grada mediana, grada ligera, cruce, recuce y surcado. Se empleó un marco de 1 x 0.5 m, con densidad de siembra de 20 000 pl/ha, para un total de 3 200 plantas en el área experimental. Se utilizaron posturas en cepellón, que se sembraron a una profundidad de 10 cm. Se aplicó riego (250 m³/ha) tres veces en septiembre (una vez durante el trasplante de las posturas, y dos inmediatamente después de la inoculación). No se regó en octubre porque en este mes se presentaron precipitaciones que garantizaron la suficiente humedad del suelo. No obstante, sí se regó tres veces en noviembre, y dos en diciembre, enero, febrero, marzo y abril, respectivamente.

Evaluación de las variables climáticas en el área y período experimental. Se evaluaron las variables precipitaciones (mm), temperatura (°C) y humedad relativa (%). Los datos fueron facilitados por la Delegación Provincial del Instituto de Meteorología (INSMET) en Sancti Spiritus.

Composición agroquímica básica del suelo experimental. El suelo del área experimental (tabla 2) correspondió al tipo pardo mullido carbonatado (Hernández *et al.* 2015), de arcilla parda o pardo ligeramente oscuro, con reacción ligera al HCL. Presenta algunas gravas en el horizonte A1, buen drenaje superficial e interno, medianamente erosionable.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño experimental de parcelas testigo (Lerch 1977), con seis tratamientos y diez réplicas (tabla 3). Las

3). The differences between means were determined by Fisher's LSD (Fernández *et al.* 2010). The digit count data were transformed by \sqrt{x} . The statistical program StatGraphics Centurion XV (Anon, 2007) was used.

diferencias entre medias se determinaron por LSD de Fisher (Fernández *et al.* 2010). Los datos de conteo de dígitos se transformaron por \sqrt{x} . Se utilizó el programa estadístico StatGraphics Centurion XV (Anon 2007).

Table 3. Treatments used in the experiment

No.	Treatments
1	EcoMic®
2	INICA-8
3	INICA-8+ EcoMic®
4	Absolute control (AC)
5	Fertilized control with organic matter (FCOM)
6	Chemically fertized control (P2O5FC)

Evaluated variables. The variables length and the main stem diameter, number of branches and leaves and dry weight of leaves were measured.

To determine the main stem length (MST, cm), it was measured from the stem base to the apex, using a tape measure. Six evaluation moments were taken into account, days after sowing (DAS) (45, 75, 105, 135 and 165 DAS).

The main stem diameter (MSD, cm) was measured at the cutting time, 20 cm from the stem base, with a vernier.

To determine the dry weight of leaves (DWL, g), they were placed in a MEMMERT oven, at a temperature of 70 °C, for seven days. Subsequently, the weighing was performed on an OHAUS technical digital scale, with 1 kg capacity.

The inoculation efficiency index (IEI, %) was determined, according to the Santillana *et al.* (2012) formula:

IEI: [(Inoculated treatment- Absolute control)/ Absolute control] x 100

Results and Discussion

Figure 1 shows the rainfalls during the period September/2019-April/2020. Abundant rainfalls characterized September and October 2019. However, in the period from December 2019 to April 2020 they were very low in December, January, February, March

Variables evaluadas. Se midieron las variables longitud y diámetro del tallo principal, número de ramas y hojas, y peso seco de las hojas.

Para determinar la longitud del tallo principal (LTP, cm) se midió desde la base del tallo hasta el ápice, utilizando una cinta métrica. Se tomaron en cuenta seis momentos de evaluación, días después de la siembra (DDS) (45, 75, 105, 135 y 165 DDS).

El diámetro del tallo principal (DTP, cm) se midió en el momento del corte, a 20 cm de la base del tallo, con un calibrador pie de rey.

Para determinar el peso seco de las hojas (PSH, g), estas se colocaron en una estufa MEMMERT, a 70 °C de temperatura, durante siete días. Posteriormente, se efectuó el pesaje en una balanza digital técnica OHAUS, de 1 kg de capacidad.

Se determinó el índice de eficiencia de la inoculación (IEI, %), según la fórmula de Santillana *et al.* (2012):

IEI: [(Tratamiento inoculado - Control absoluto)/ Control absoluto] x 100

Resultados y Discusión

La figura 1 muestra las precipitaciones durante el período septiembre/2019-abril/2020. Septiembre y octubre de 2019 se caracterizaron por ser de abundantes precipitaciones. Sin embargo, en el período de diciembre de 2019 a abril de 2020 fueron muy bajas en diciembre, enero, febrero, marzo y abril. En este intervalo

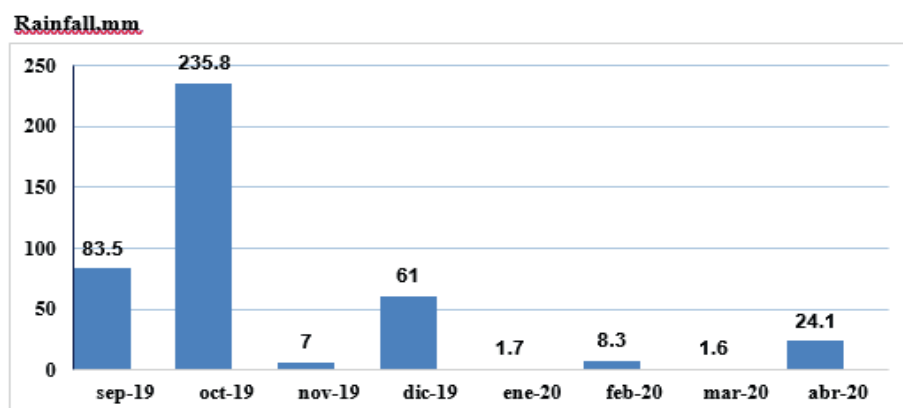


Figure 1. Rainfalls from September 2019 to April 2020

and April. In this interval, important phenological stages of the crop occurred, which coincided with a very low level of rainfalls.

As shown in figure 2, the highest average temperatures in the experimental period occurred in September 2019 and April 2020, months in which the sown and cut of the experiment was made. The maximum temperatures reached their highest values also in these intervals, while the minimum temperatures were recorded in December 2019 and January 2020.

acontecieron importantes etapas fenológicas del cultivo, que coincidieron con un nivel muy bajo de precipitaciones.

Como evidencia la figura 2, las temperaturas promedio más altas en el período experimental ocurrieron en septiembre de 2019 y abril de 2020, meses en los que se sembró y se realizó el corte del experimento, respectivamente. Las temperaturas máximas alcanzaron sus mayores valores también en estos intervalos, mientras que las temperaturas mínimas se registraron en diciembre de 2019 y enero de 2020.

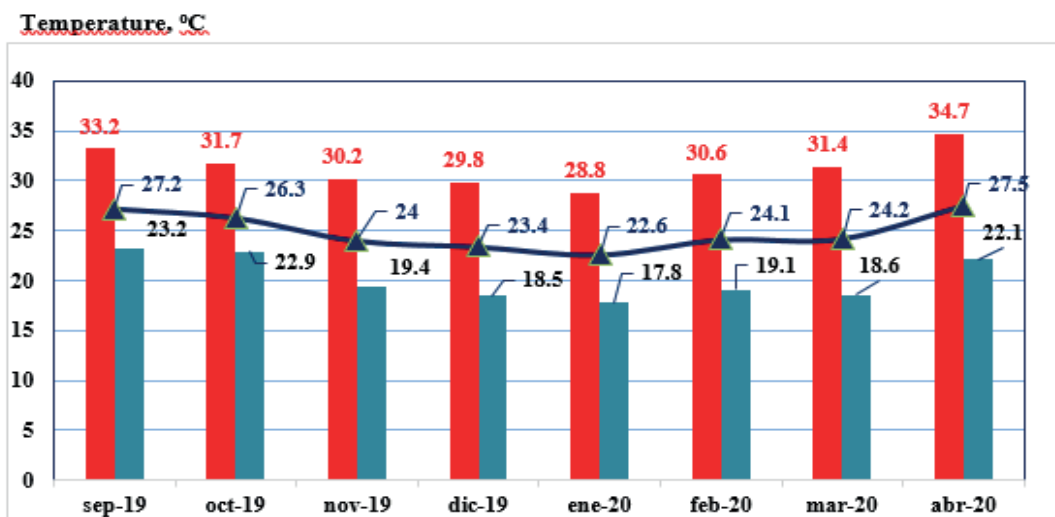


Figure 2. Average temperature from September 2019 to April 2020

Figure 3 shows that the highest value of relative humidity was registered in October 2019, while the lowest was in April 2020. In the latter, the experiment cut was made.

En la figura 3 se deja ver que el mayor valor de la humedad relativa se registró en octubre de 2019, mientras que el menor fue en abril de 2020. En este último se realizó el corte del experimento.

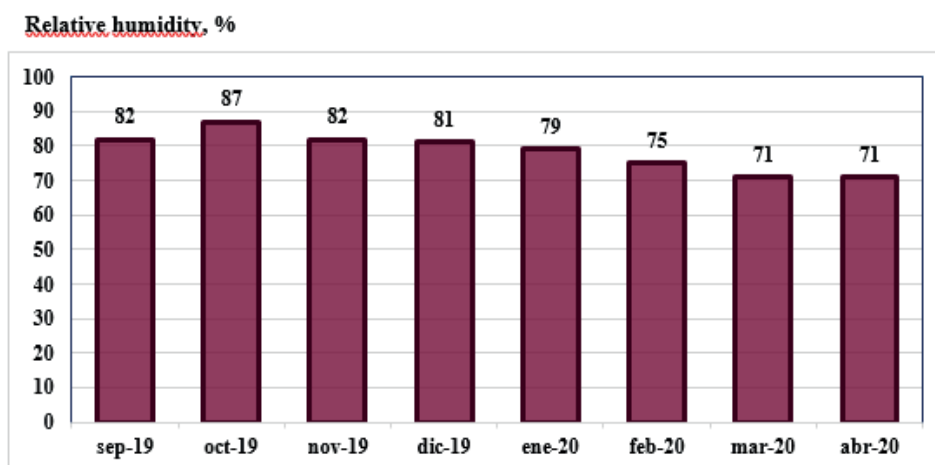


Figure 3. Relative humidity from September 2019 to April 2020

At 15 DAS, the INICA-8 treatment (51.90 cm) showed higher values ($P < 0.001$) than the AC (40.30 cm) and EcoMic® (44.40 cm), although it was equal to the FCOM (52.63 cm) and to EcoMic® + INICA-8 (47.80 cm). However, it was lower than P₂O₅FC (62.30 cm) (figure 4).

At 45 DAS, P₂O₅FC (86.12 cm), as well as FCOM (90.15 cm) were higher ($P < 0.001$) to the absolute control (67.06 cm), while they showed letters equal to the three

A los 15 DDS, el tratamiento INICA-8 (51.90 cm) presentó valores superiores ($P < 0.001$) al CA (40.30 cm) y a EcoMic® (44.40 cm), aunque se igualó al TFMO (52.63 cm) y a EcoMic®+INICA-8 (47.80 cm). No obstante, resultó inferior al TF P₂O₅ (62.30 cm) (figura 4).

A los 45 DDS, el TF P₂O₅ (86.12 cm), así como el TFMO (90.15 cm) fueron superiores ($P < 0.001$) al control absoluto (67.06 cm), mientras que mostraron

inoculated treatments. The latter showed statistically equal values among themselves and with respect to the absolute control (figure 4).

At 75 DAS, the P₂O₅FC (141.40 cm) reached higher values ($P < 0.001$) than the rest of the treatments, with the exception of FCOM (119.50 cm). EconoMic® (118.40 cm), INICIA-8 (111.05 cm) and EconoMic® + INICIA-8 (97.79 cm) were statistically equal, but only EconoMic® and INICIA-8 were higher to AC (figure 4).

At 105 DAS, P₂O₅FC (193.90 cm) showed higher values ($P < 0.001$) than the rest of the treatments, while EconoMic® + INICIA-8 (167.10 cm) and FCOM (158.50 cm), although they shared common letters with INICIA-8 (154.60 cm), were higher to EconoMic® (140.30 cm) and AC (130.60 cm) (figure 4).

At 135 DAS, P₂O₅FC (206.20 cm) showed higher values ($P < 0.001$) than the rest of the treatments, except for EconoMic® + INICIA-8 (190.40 cm), with it was statistically similar. The latter, in turn, shared common letters with EconoMic® (182.33 cm), and was higher to INICIA-8 (167.00 cm), FCOM (164.70 cm) and AC (156.33 cm) (figure 4).

At the time of cutting (165 DAS), EconoMic® + INICIA-8 (213.33 cm) showed superiority ($P < 0.001$) in relation to INICIA-8 (186.90 cm) and AC (174.90 cm), although it shared common letters with EconoMic® (196.00 cm) and with FCOM (195.90 cm), being only lower to the chemically fertilized control (257.69 cm) (figure 4).

letras iguales a los tres tratamientos inoculados. Estos últimos presentaron valores estadísticamente iguales entre sí y con respecto al control absoluto (figura 4).

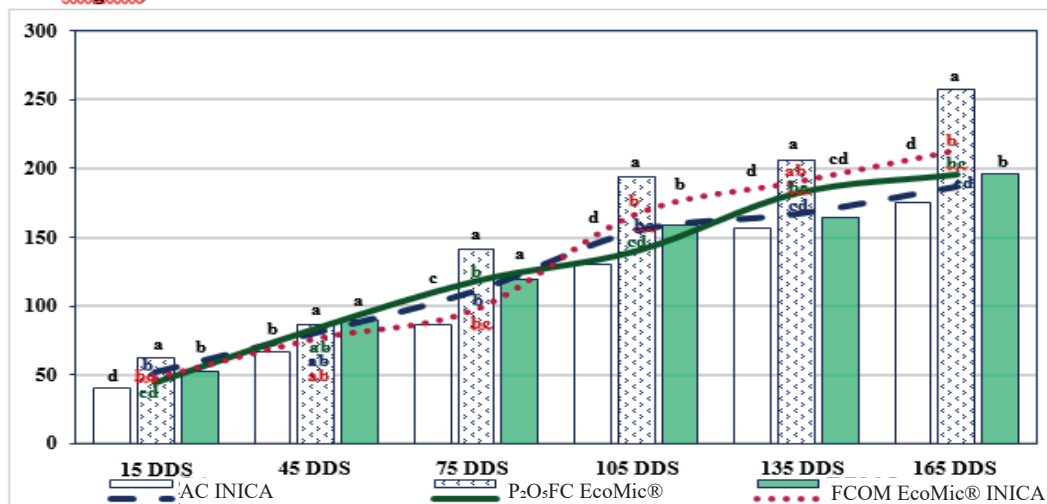
A los 75 DDS, el TF P₂O₅ (141.40 cm) alcanzó valores superiores ($P < 0.001$) al resto de los tratamientos, con excepción del TFMO (119.50 cm). EcoMic® (118.40 cm), INICIA-8 (111.05 cm) y EcoMic®+INICIA-8 (97.79 cm) se igualaron estadísticamente, pero solo EcoMic® e INICIA-8 resultaron superiores al CA (figura 4).

A los 105 DDS, el TF P₂O₅ (193.90 cm) mostró valores superiores ($P < 0.001$) al resto de los tratamientos, mientras que EcoMic®+INICIA-8 (167.10 cm) y TFMO (158.50 cm) aunque compartieron letras comunes con INICIA-8 (154.60 cm), fueron superiores a EcoMic® (140.30 cm) y al CA (130.60 cm) (figura 4).

A los 135 DDS, el TF P₂O₅ (206.20 cm) mostró valores superiores ($P < 0.001$) al resto de los tratamientos, excepto para EcoMic®+INICIA-8 (190.40 cm), con el que fue estadísticamente similar. Este último, a su vez, compartió letras comunes con EcoMic® (182.33 cm), y fue superior a INICIA-8 (167.00 cm), al TFMO (164.70 cm) y al CA (156.33 cm) (figura 4).

En el momento del corte (165 DDS), EcoMic®+INICIA-8 (213.33 cm) mostró superioridad ($P < 0.001$) con relación a INICIA-8 (186.90 cm) y al CA (174.90 cm), aunque compartió letras comunes con EcoMic® (196.00 cm) y con el TFMO (195.90 cm), siendo solo inferior al testigo fertilizado químicamente (257.69 cm) (figura 4).

Main stem length, cm



a, b, c Values with different superscript differ to $P < 0.01$.

Figure 4. Effect of microbial inoculants on the main stem length, at 15, 45, 75, 105, 135 and 165 DAS. Growth curves correspond to the treatments: INICIA-8 (discontinue lines), EcoMic® (continuous line) and EcoMic®+INICIA-8 (dotted line).

Standard deviation: 15 DAS: 9.22, 45 DAS: 20.06, 75 DAS: 29.43, 105 DAS: 27.35, 135 DAS: 25.29, 165 DAS: 31.18.

The results obtained in this experiment show the superiority of the inoculated treatments with respect to AC in all the stages that were evaluated, where the combination of *Glomus cubense* with *Azospirillum*

Los resultados que se obtuvieron en este experimento indican la superioridad de los tratamientos inoculados con respecto al CA en todas las etapas que se evaluaron, donde se destaca la combinación de *Glomus cubense*

highlighted in the last three measurements (105 DAS, 135 DAS and 165 DAS). This superiority of the inoculants with respect to the control in these phases could be due to the synergistic effect of the *Glomus cubense* strain, which was applied in combination with the INICA-8 strain of *Azospirillum brasilense*. However, there was also a higher effect with respect to AC by each of the inoculants that were applied in a simple way in the first three measurements (15 DAS, 45 DAS and 75 DAS). However, these treatments did not exceed the fertilized controls.

The association of AMF with different mulberry genotypes can facilitate the adsorption of nitrogen and phosphorus by the plant (Ambika *et al.* 1994). Likewise, the application of *Azospirillum brasilense* can reduce the requirements of nitrogen fertilizers, such as urea, which contributes to lower costs in mulberry (Das *et al.* 1994).

Sánchez de la Cruz *et al.* (2008) found that in greenhouse experiments the simple inoculation of *G. intraradices*, as well as *A. brasilense*, increased the plant height in wheat. However, the combination of these microorganisms did not exert a perceptible effect on the studied variables, despite there is a constant regulated humidity regime, which contradicts what was obtained in this experiment. It is possible that mechanisms specifically associated with the plant family, and not with the synergy of these microorganisms, influence on these divergent results. Shaimaa and Massoud (2017), when inoculating a combination of *Azotobacter* and AMF in orange, observed a synergism that was reflected in the plants growth, in the extraction of N, P and K in leaves, and in the yield.

In this experiment, the superior response of plants to the application of chemical fertilizer coincides with that reported by Baqual and Das (2006), who state that mulberry responds well to the application of nitrogen fertilizer as phosphoric.

Figure 5 shows the significantly higher effect of the treatment inoculated with EcoMic® (1.70 cm) with respect to the rest of the treatments ($P < 0.001$), although it shared common letters with the CFC (1.60 cm). In turn, the combination EcoMic® + INICA-8 (1.50 cm) was higher to INICA-8 (1.33 cm) and the absolute control (1.23 cm), and shared common letters with the two fertilized controls.

The results obtained in this variable show a marked influence of the inoculation with AMF, in a simple way as in combination with *Azospirillum*. However, the treatment inoculated only with AMF highlighted, which coincides with that reported by Pentón *et al.* (2011) in an experiment with mulberry cuttings in a nursery.

Through the symbiosis that is established between AMF and plants, the absorption of some nutrients that are difficult to move in the soil (P, Fe, among others) is increased, due to the action of the external mycelium of

con *Azospirillum* en las últimas tres mediciones (105 DDS, 135 DDS y 165 DDS). Esta superioridad de los inoculantes con respecto al control en esas fases, se podría deber al efecto sinérgico de la cepa de *Glomus cubense*, que se aplicó en combinación con la cepa INICA-8 de *Azospirillum brasilense*. No obstante, también se registró efecto superior con respecto al CA por parte de cada uno de los inoculantes que se aplicaron de forma simple en las tres primeras mediciones (15 DDS, 45 DDS y 75 DDS). Sin embargo, estos tratamientos no superaron a los testigos fertilizados.

La asociación de HMA con diferentes genotipos de morera puede facilitar la absorción de nitrógeno y fósforo por parte de la planta (Ambika *et al.* 1994). Asimismo, la aplicación de *Azospirillum brasilense* puede reducir los requerimientos de fertilizantes nitrogenados, como la urea, lo que contribuye a disminuir los costos en morera (Das *et al.* 1994).

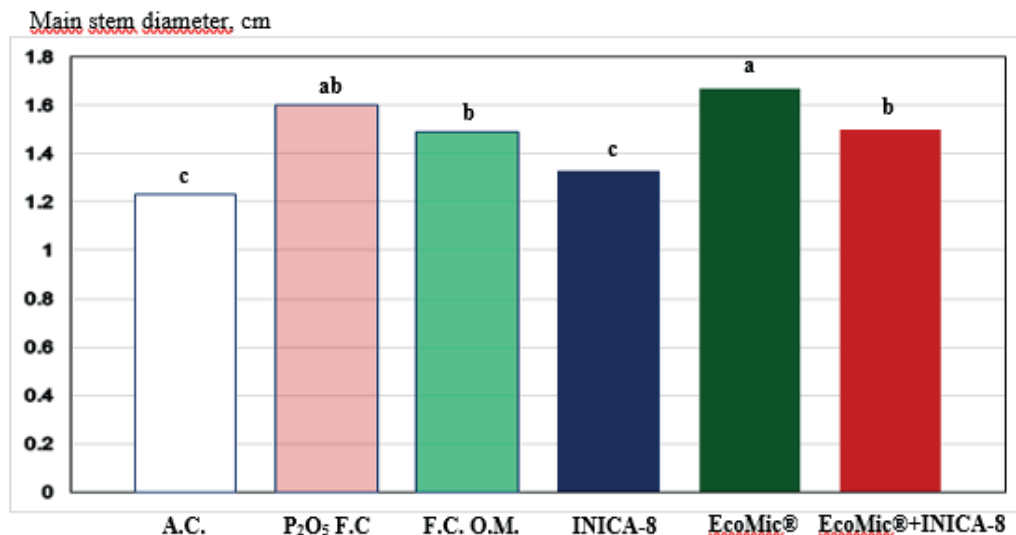
Sánchez de la Cruz *et al.* (2008) encontraron que en experimentos de invernadero la inoculación simple de *G. intraradices*, así como de *A. brasilense*, incrementó la altura de la planta en trigo. Sin embargo, la combinación de estos microorganismos no ejerció un efecto perceptible en las variables estudiadas, a pesar de existir un régimen de humedad regulado constante, lo que contradice lo obtenido en el presente experimento. Es posible que mecanismos asociados específicamente a la familia de plantas, y no a la sinergia de estos microorganismos, influyan en estos resultados divergentes. Shaimaa y Massoud (2017), al inocular una combinación de *Azotobacter* y HMA en naranja, observaron un sinergismo que se reflejó en el crecimiento de las plantas, en la extracción de N, P y K en hojas, y en el rendimiento.

En el presente experimento, la respuesta superior de las plantas a la aplicación de fertilizante químico coincide con lo informado por Baqual y Das (2006), quienes afirman que la morera responde bien a la aplicación de fertilizante nitrogenado como fosfórico.

En la figura 5 se muestra el efecto significativamente superior del tratamiento inoculado con EcoMic® (1.70 cm) con respecto al resto de los tratamientos ($P < 0.001$), aunque compartió letras comunes con el TFQ (1.60 cm). A su vez, la combinación EcoMic®+INICA-8 (1.50 cm) fue superior a INICA-8 (1.33 cm) y al control absoluto (1.23 cm), y compartió letras comunes con los dos testigos fertilizados.

Los resultados obtenidos en esta variable indican una marcada influencia de la inoculación con HMA, en forma simple como en combinación con *Azospirillum*. No obstante, se destacó el tratamiento inoculado solo con HMA, lo que coincide con lo informado por Pentón *et al.* (2011) en un experimento con estacas de morera en vivero.

Mediante la simbiosis que se establece entre los HMA y las plantas se incrementa la absorción de algunos nutrientes de difícil movilidad en el suelo (P, Fe, entre otros), debido a la acción del micelio externo de los HMA, ligado a los sistemas radicales



a, b, c Values with different superscript differ to $P < 0.01$

Figure 5. Effect of microbial inoculants on the main stem diameter
Standard deviation: 0.21.

AMF, linked to the plants root systems, and to the higher absorption of water, N, K and some micronutrients (Sancllemente *et al.* 2018). This type of root branching also benefits the absorption of nutrients by increasing the root surface (Ruiz-Lozano 2016). The AMFs improve the extraction of nutrients from the soil and their efficiency (Bitterlich and Franken 2016), which brings with it greater exports of these.

Padma *et al.* (2000), when referring to the mycorrhizal symbiotic fungi that colonize the bark of mulberry roots, highlighted their important role in the efficiency of phosphorus mobilization and in the availability of a group of micronutrients, as well as in growth and plant development.

Several studies show that communities of diverse bacteria associated with AMF enhance mycorrhization and plant growth (Agnolucci *et al.* 2015). This interaction between AMF-bacteria increases the colonization of both microorganisms in the host, because it increases the germination and growth of endophyte hyphae and increases the population of bacteria in the rhizosphere of plants in the presence of AMF (Fernández *et al.* 2016 and Long *et al.* 2017). However, the stimulation of plant growth in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi does not necessarily have to be associated with the solubilization of elements that are not very mobile in the soil or at low concentrations. Mechanisms such as the production of phytohormones, vitamins or amino acids can be linked to the effects of these microorganisms (Siqueira 2010).

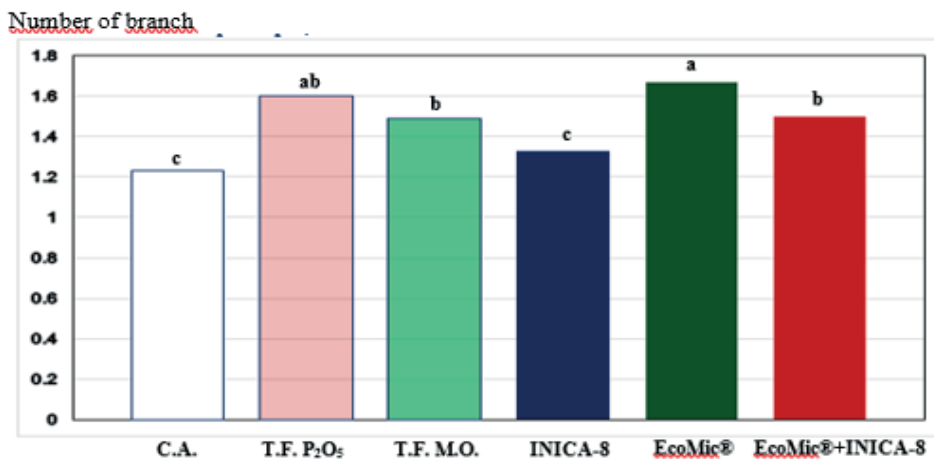
Figure 6 shows the significant superiority ($P < 0.001$) of the treatment inoculated with EcoMic® + INICA-8 (2.96) with respect to the rest, especially with AC (1.70). The treatments inoculated in a simple way (EcoMic® and INICA-8) shared common letters with the FCOM (2.42) and with the P₂O₅FC (2.25).

de las plantas, y a la mayor absorción de agua, N, K y algunos micronutrientes (Sancllemente *et al.* 2018). Este tipo de ramificaciones de las raíces también beneficia la absorción de nutrientes mediante el incremento de la superficie radical (Ruiz-Lozano 2016). Los HMA mejoran la extracción de nutrientes desde el suelo y su eficiencia (Bitterlich y Franken 2016), lo que trae consigo mayores exportaciones de estos.

Padma *et al.* (2000), al referirse a los hongos simbióticos micorrízicos que colonizan la corteza de las raíces de la morera, destacaron su importante función en la eficiencia de la movilización del fósforo y en la disponibilidad de un grupo de micronutrientes, así como en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Diversos estudios demuestran que comunidades de diversas bacterias asociadas a HMA potencian la micorrización y el crecimiento de las plantas (Agnolucci *et al.* 2015). Esta interacción entre HMA-bacteria incrementa la colonización de ambos microorganismos en el hospedero, debido a que aumenta la germinación y el crecimiento de las hifas de los endófitos y se acrecienta la población de bacterias en la rizosfera de las plantas en presencia de los HMA (Fernández *et al.* 2016 y Long *et al.* 2017). No obstante, la estimulación del crecimiento de las plantas en presencia de hongos micorrízicos arbusculares no tiene que estar asociada necesariamente con la solubilización de los elementos poco móviles en el suelo o presentes a bajas concentraciones. Mecanismos como la producción de fitohormonas, vitaminas o aminoácidos pueden estar ligados a los efectos de estos microorganismos (Siqueira 2010).

La figura 6 evidencia la superioridad significativa ($P < 0.001$) del tratamiento inoculado con EcoMic®+INICA-8 (2.96) con respecto al resto, sobre todo con el CA (1.70). Los tratamientos inoculados de forma simple (EcoMic® e INICA-8) compartieron letras comunes con el TFMO (2.42) y con el TF P₂O₅ (2.25).



a, b, c Values with different superscript differ to $P < 0.01$

Figure 6. Effect of microbial inoculants on the number of branches
Transformed values are shown with \sqrt{x} on the Y axis, and original values within bars.
Standard deviation: 0.57.

The role of beneficial microorganisms in the development of agrop productive variables in mulberry is also evident in the number of branches. It is known that *Azospirillum* can also solubilize phosphates, which offers to the plant an important nutrient that has a positive effect on different physiological parameters (Tahir *et al.* 2013). However, in this study, there was superiority in the results derived from the combination of the bacteria with respect to AMF. According to Aguirre-Medina (2008), the simultaneous combination of growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi induces synergism, which is reflected in an increase in growth, phosphorus content in plants, and yield with respect to the plants separately inoculated. Abd-Alla *et al.* (2014) and Bona *et al.* (2017) consider that the result of the tripartite mutualistic symbiosis between AMF-bacteria-host is the increase in the development of the plant, since it increases its capacity to absorb more water and nutrients from the soil, such as nitrogen, phosphorus, potassium and microelements.

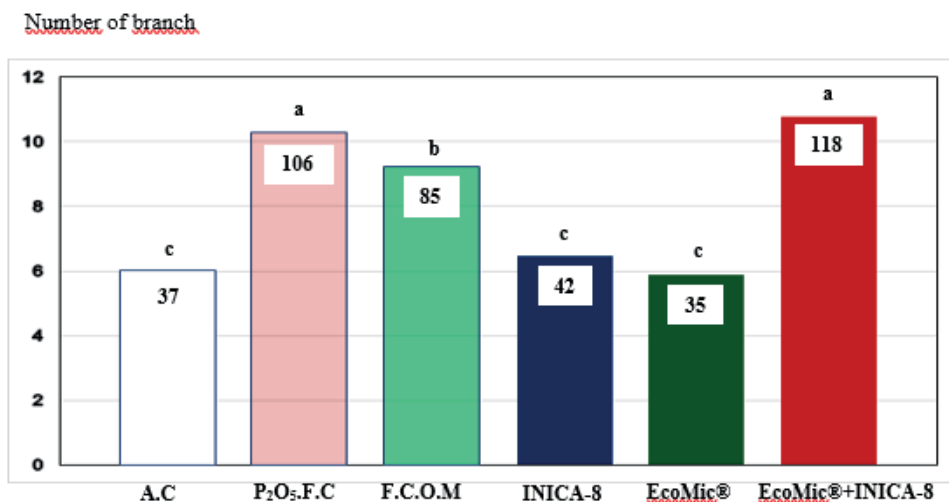
Various authors refer to results similar to that of this experiment, although with other beneficial microorganisms. Nithya *et al.* (2011) reported that in a study with mulberry, when inoculating the plants with a solubilizing phosphate bacteria and the beneficial fungus *Aspergillus* spp., the stem length was increased, as well as the number of branches and leaves. Abdel-Rahman *et al.* (2011) found that the effect of the co-inoculation of *G. irradicans* and *Bacillus subtilis* increased the height and number of branches of three varieties of basil, which surpassed the treatments where only each microorganism was inoculated.

Figure 7 highlights the significant superiority ($P < 0.001$) of the EcoMic® + INICA-8 (10.76) combined treatment with respect to the rest, with the exception of P₂O₅FC (10.28). The control fertilized with organic matter (9.22) was superior to INICA-8 (6.45), to AC

La función de los microorganismos benéficos en el desarrollo de variables agroproductivas en morera se pone también de manifiesto en el número de ramas. Se conoce que *Azospirillum* también puede solubilizar fosfatos, lo que ofrece a la planta un importante nutriente que tiene un efecto positivo en diferentes parámetros fisiológicos (Tahir *et al.* 2013). No obstante, en este estudio, hubo superioridad en los resultados derivados de la combinación de dicha bacteria con respecto a HMA. Según Aguirre-Medina (2008), la combinación simultánea de rizobacterias promotoras del crecimiento y hongos micorrízicos arbusculares induce sinergismo, que se refleja en un incremento del crecimiento, del contenido de fósforo en las plantas y del rendimiento con respecto a las plantas inoculadas por separado. Abd-Alla *et al.* (2014) y Bona *et al.* (2017) consideran que el resultado de la simbiosis mutualista tripartita entre HMA-bacteria-hospedero es el incremento del desarrollo de la planta, ya que aumenta su capacidad para absorber más agua y nutrientes del suelo, como nitrógeno, fósforo, potasio y microelementos.

Diversos autores hacen referencia a resultados similares al del presente experimento, aunque con otros microorganismos benéficos. Nithya *et al.* (2011) informaron que en un estudio con morera, al inocular las plantas con una bacteria fosfato solubilizadora y el hongo benéfico *Aspergillus* spp., se incrementó la longitud del tallo, así como el número de ramas y de hojas. Abdel-Rahman *et al.* (2011) encontraron que el efecto de la coinoculación de *G. irradicans* y *Bacillus subtilis* incrementó la altura y el número de ramas de tres variedades de albahaca, lo que superó a los tratamientos donde solo se inoculó cada microorganismo.

En la figura 7 se destaca la superioridad significativa ($P < 0.001$) del tratamiento combinado EcoMic®+INICA-8 (10.76) con respecto al resto, con excepción del TF P₂O₅ (10.28). El testigo fertilizado con materia orgánica (9.22)



^{a, b, c}Values with different superscript differ to $P < 0.01$

Figura 7. Effect of the microbial inoculants on the number of leaves

Transformed values are shown with \sqrt{x} in the Y axis, and original values within bars
Standard deviation: 2.19.

(6.03) and EcoMic® (5.90). These last three did not differ from each other.

In this study, the combined effect of *Glomus cubense* and *Azospirillum brasilense* was the inoculated treatment that had the most significant influence on the results of this variable, as it was statistically equal to P₂O₅FC. According to Fernández and Rodríguez (2005), the mycorrhizosphere is the rhizosphere of a mycorrhizal plant, and it is in it where interactions with beneficial microorganisms with specific functions and interactions with pathogens take place. In many cases, the established interactions are positive, in which a synergism effect is recorded, where the AMF and the other microorganism produce growth increased, vigor and protection of the plant.

It is also known that the availability of P in soils is important for nitrogen absorption and its use in plants (Vafadar *et al.* 2014). Therefore, more P available due to its solubilization by the inoculated AMF could lead to a better absorption of N or nitrogen fixation by *Azospirillum*, which would lead to an increase in the values of its variables as in the number of leaves. The co-inoculation of AMF-*Azospirillum* sp is an example of beneficial interaction, since the colonization of the roots by fungi stimulates the flow of carbohydrates from the canopy to the root, which can constitute sources of carbon for the bacteria growth (Costacurta 1995).

Figure 8 shows that both EcoMic® + INICA-8 (78.51g/plant) and FCOM (76.79 g/plant) were significantly higher to the rest of the treatments ($P < 0.001$) and statistically similar to each other. The P₂O₅FC (64.97 g/plant) was higher to EcoMic® (36.60 g/plant), the absolute control (30.10 g/plant) and INICA-8 (29.02 g/plant).

In this experiment, the DWL is the most important variable from the agronomic point of view, since it

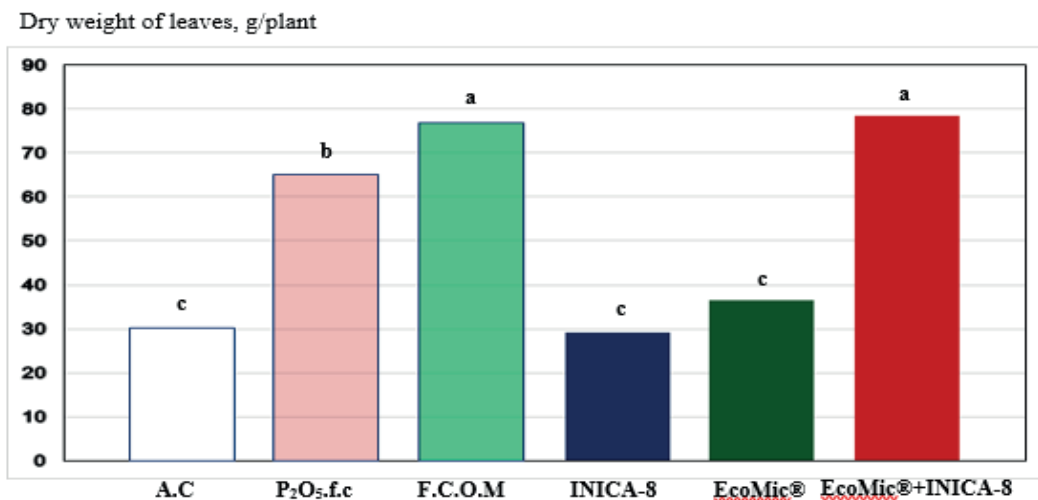
fue superior a INICA-8 (6.45), al CA (6.03) y EcoMic® (5.90). Estos tres últimos no difirieron entre sí.

En este estudio, el efecto combinado de *Glomus cubense* y *Azospirillum brasilense* fue el tratamiento inoculado que influyó de manera más significativa en los resultados de esta variable, al igualarse estadísticamente con el TFP₂O₅. Según Fernández y Rodríguez (2005), la micorrizosfera es la rizosfera de una planta micorrizada, y es en ella donde se producen las interacciones con microorganismos beneficiosos con funciones específicas y las interacciones con patógenos. En muchos casos, las interacciones establecidas son de tipo positivo, en las que se llega a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia de los HMA y del otro microorganismo produce incremento del crecimiento, vigor y protección de la planta.

También se sabe que la disponibilidad de P en los suelos es importante para la absorción de nitrógeno y su utilización en plantas (Vafadar *et al.* 2014). Por lo tanto, más P disponible debido a su solubilización por los HMA inoculados podría conducir a una mejor absorción de N o fijación de nitrógeno por *Azospirillum*, lo que conllevaría a un incremento de los valores en sus variables como en el número de hojas. La coinoculación HMA-*Azospirillum* sp es un ejemplo de interacción benéfica, ya que la colonización de las raíces por los hongos estimula el flujo de carbohidratos desde el follaje hasta la raíz, los que pueden constituir fuentes de carbono para el crecimiento de la bacteria (Costacurta 1995).

En la figura 8 se deja ver que tanto EcoMic®+INICA-8 (78.51g/planta) como el TFMO (76.79 g/planta) fueron superiores al resto de los tratamientos de forma significativa ($P < 0.001$) y estadísticamente similares entre sí. El TF P₂O₅ (64.97 g/planta) fue superior a EcoMic® (36.60 g/planta), al control absoluto (30.10 g/planta) y al INICA-8 (29.02 g/planta).

En este experimento, el PSH es la variable de mayor importancia desde el punto de vista agronómico, pues



a, b, c Values with different superscript differ to $P < 0.01$

Figure 8. Effect of microbial inoculants on the dry weight of leaves
Standard deviation: 24.82

constitutes the basis of the mulberry forage production potential. Sudhakar *et al.* (2000) reported on the advantages of the application of bacterial biofertilizers in the production of leaves in this crop. Baqual and Qayoom (2004), when applying *Azotobacter* and *Azospirillum* indistinctly to mulberry plants, observed an increase in the production of leaves and other variables. However, in this study, only the combination of *Glomus cubense* and *A. brasilense* led higher dry weight of leaves, with values similar to those of the application of organic fertilizer. Therefore, it is evident that the synergistic action of both microorganisms increased the number of leaves and other variables studied here.

The marked difference between the treatments in which the AMF and *Azospirillum* are combined with the control could be due to the amount of P absorbed by the plants due to the effect of the AMF applied. This hypothesis is supported by different authors who corroborate that mycorrhizae take up phosphates in the soil more efficiently through their hyphae that increase the volume of explored soil (Smith *et al.* 2011). Valerio (2016) confirmed that the inoculation of corn with *Claroideo glomus etunicatum* leads to a significant increase in leaf area and dry weight of leaves.

Umakanth and Bagyaraj (1998) observed that the double inoculation of S34 mulberry in nursery (suitable for dry areas) with *Glomus fasciculatum* and the diazotrophic bacterium *Azotobacter chroococcum* led to a considerable increase in plant growth and development. According to Bellone and de Bellone (2012), the combination with *Glomus* and *Azospirillum* helps sugarcane to improve nitrogen availability and absorption in plants, which increases its biomass.

According to Ram Rao *et al.* (2007), the combined inoculation of *G. mosseae* with *A. chroococcum* in mulberry showed its higher effect from the agronomic

constituye la base del potencial de producción de forraje de morera. Sudhakar *et al.* (2000) informaron acerca de las ventajas de la aplicación de biofertilizantes bacterianos en la producción de hojas en este cultivo. Baqual y Qayoom (2004), al aplicar indistintamente *Azotobacter* y *Azospirillum* a plantas de morera, observaron incremento en la producción de hojas y otras variables. No obstante, en este trabajo, solo la combinación de *Glomus cubense* y *A. brasilense* propició superior peso seco de las hojas, con valores similares al de la aplicación de fertilizante orgánico. Por lo tanto, es evidente que la acción sinérgica de ambos microorganismos, aumentó el número de hojas y otras variables aquí estudiadas.

La marcada diferencia entre los tratamientos en los que se combinan las HMA y *Azospirillum* con el control se pudo deber a la cantidad de P absorbido por las plantas por el efecto de las HMA aplicadas. Esta hipótesis se fundamenta por diferentes autores que corroboran que las micorrizas toman los fosfatos en el suelo de forma más eficiente mediante sus hifas que incrementan el volumen de suelo explorado (Smith *et al.* 2011). Valerio (2016) confirmó que la inoculación de maíz con *Claroideo glomus etunicatum* conlleva al aumento significativo del área foliar y del peso seco de las hojas.

Umakanth y Bagyaraj (1998) observaron que la inoculación doble de morera S34 en vivero (adecuada para áreas de secano) con *Glomus fasciculatum* y la bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum* condujo al aumento considerable del crecimiento y desarrollo de las plantas. Según Bellone y de Bellone (2012), la combinación con *Glomus* y *Azospirillum* ayuda a la caña de azúcar a mejorar la disponibilidad de nitrógeno y la absorción en las plantas, lo que incrementa su biomasa.

De acuerdo con Ram Rao *et al.* (2007), la inoculación combinada de *G. mosseae* con *A. chroococcum* en morera demostró su efecto superior desde el punto de

and economic point of view, with the improvement of soil fertility, quality of leaves, among other variables. Vafadar *et al.* (2014) reported that the dual inoculation of *G. intraradices* and *A. chroococcum* increased the dry weight of *Stevia rebaudiana* leaves. According to these authors, the ability of AMF to solubilize phosphorus in the roots ensures the bacteria a continuous fixation of atmospheric nitrogen, a process that could be one of the causes of the results obtained in this experiment.

The higher effect of organic fertilization on this variable is highlighted here. This result contradicts what was reported by Bello *et al.* (2011) about that the application of organic sources does not always benefit mulberry cultivation, especially when poor quality compost is used. This could show that the organic matter used in this experiment is of high quality.

Figure 9 shows that the IEI that predominated in this variable was the one obtained in the combined inoculation of EcoMic® + INICA-8 (160.8 %), while the inoculation with EcoMic® was lower, but with positive values (21.98 %). Also, the simple application of INICA-8 was not efficient.

vista agronómico y económico, con el mejoramiento de la fertilidad del suelo, la calidad de las hojas, entre otras variables. Vafadar *et al.* (2014) informaron que la inoculación dual de *G. intraradices* y *A. chroococcum* aumentó el peso seco de las hojas de *Stevia rebaudiana*. Según estos autores, la capacidad de las HMA de solubilizar fósforo en las raíces le asegura a la bacteria una continua fijación del nitrógeno atmosférico, proceso que pudiera ser una de las causas de los resultados obtenidos en este experimento.

Se destaca aquí el efecto superior de la fertilización orgánica en esta variable. Este resultado contradice lo informado por Bello *et al.* (2011) acerca de que la aplicación de fuentes orgánicas no siempre causa beneficio al cultivo de morera, especialmente cuando se usa compost de mala calidad. Esto pudiera indicar que la materia orgánica utilizada en el presente experimento es de gran calidad.

En la figura 9 se demuestra que el IEI que predominó en esta variable fue el que se obtuvo en la inoculación combinada de EcoMic®+INICA-8 (160.8%), mientras que la inoculación con EcoMic® resultó menor, pero con valores positivos (21.98 %). Además, la aplicación simple de INICA-8 no fue eficiente.

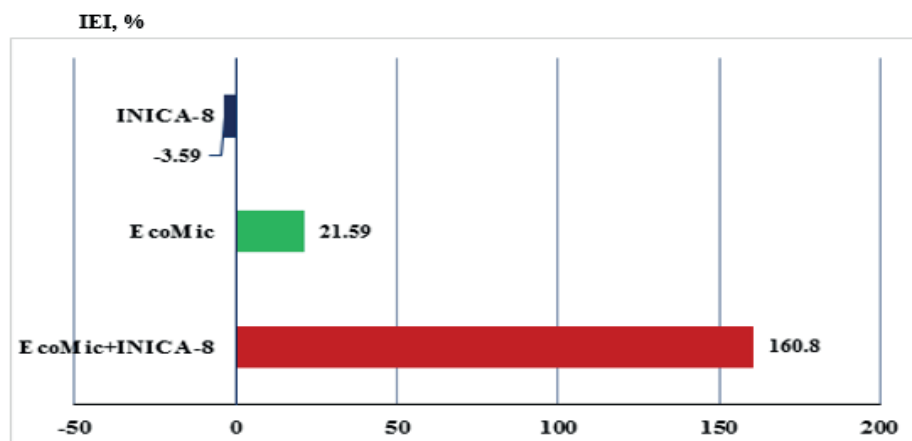


Figure 9. Inoculation efficiency index based on DWL

Note that the EcoMic®+INICA-8 combination was the one with the highest efficiency

From the results of the inoculation efficiency calculation, a higher effect of the combination of the applied microorganisms can be seen. The simple application of *Glomus cubense*, and especially that of *Azospirillum brasilense*, did not exert a positive effect on the weight of leaves. This inefficiency of *Azospirillum* could be due to antagonistic factors that could affect the survival of the bacteria or its capacity as PGPR. These factors include the physical-chemical conditions of the soil, the genotype of the host and the ability of the bacteria to establish and compete with the native microflora (Pecina-Quintero *et al.* 2005).

The interaction between AMF and bacteria increases the populations of both microorganisms in the rhizosphere of plants, which stimulates an increase in the volume of roots. This allows higher absorption of

Por los resultados del cálculo de la eficiencia en la inoculación se puede ver un mayor efecto de la combinación de los microorganismos aplicados. La aplicación simple de *Glomus cubense*, y sobre todo, la de *Azospirillum brasilense*, no ejerció un efecto positivo en el peso de las hojas. Esta ineficiencia de *Azospirillum* se pudiera deber a factores antagonistas que pudieron afectar la supervivencia de la bacteria o su capacidad como PGPR. Entre estos factores se encuentran las condiciones físico-químicas del suelo, el genotipo del hospedante y la capacidad de la bacteria para su establecimiento y para competir con la microflora nativa (Pecina-Quintero *et al.* 2005).

La interacción entre HMA y las bacterias incrementa las poblaciones de ambos microorganismos en la rizosfera de las plantas, lo que estimula un incremento en el volumen de

water and nutrients, in addition to increasing phosphorus solubilization, nitrogen fixation and resistance induction. In addition, tolerance to abiotic factors is improved, among others (Meng *et al.* 2015). Bécquer *et al.* (2019) reported that the combined inoculation of *G. cubense* and Bradyrhizobium sp. in mulatto grass II, it resulted in an IEI of the aerial biomass higher than that obtained with the other forms of simple inoculation of these microorganisms.

It is concluded that the combined inoculation of EcoMic® + INICA-8 exerted a higher effect on the studied variables. The variables that were most favored with the inoculation were the stem length and the number of branches. Simple inoculation of INICA-8 was inefficient in all variables.

It is recommended to evaluate the selected treatments in other field tests with *Morus alba* in different edaphoclimatic conditions and in various cuts, as well as to evaluate the inclusion of different levels of organic matter in the combinations of inoculants in *Morus alba*.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

Author's contribution

Carlos José Bécquer Granados: Original idea, design conducting the experiment, carried out statistical analysis, manuscript writing

Adelaida Benita Puentes Pérez: Participated in the experiment

Arachely Cabrera: Participated in the experiment

María Hernández Obregón: Participated in the experiment

Ana Luisa Sánchez Reina: Participated in the experiment

raíces. Esto permite mayor absorción de agua y nutrientes, además de aumentar la solubilización de fósforo, la fijación de nitrógeno y la inducción de resistencia. Además, se mejora la tolerancia a factores abióticos, entre otros (Meng *et al.* 2015). Bécquer *et al.* (2019) refirieron que la inoculación combinada de *G. cubense* y Bradyrhizobium sp. en el pasto mulato II derivó en un IEI de la biomasa aérea superior al obtenido con las demás formas de inoculación simple de estos microorganismos.

Se concluye que la inoculación combinada de EcoMic®+INICA-8 ejerció un efecto superior en las variables estudiadas. Las variables que más se favorecieron con la inoculación fueron la longitud del tallo y el número de ramas. La inoculación simple de INICA-8 fue ineficiente en todas las variables.

Se recomienda evaluar los tratamientos seleccionados en otros ensayos de campo con *Morus alba* en diferentes condiciones edafoclimáticas y en varios cortes, así como evaluar la inclusión de diferentes niveles de materia orgánica en las combinaciones de inoculantes en *Morus alba*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

Contribucion de los autores

Carlos José Bécquer Granados: Idea original, diseño y realizó el experimento, y los análisis estadísticos, redacción del manuscrito

Adelaida Benita Puentes Pérez: Participó en el experimento

Arachely Cabrera: Participó en el experimento

María Hernández Obregón: Participó en el experimento

Ana Luisa Sánchez Reina: Participó en el experimento

References

- Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.W.E., Nafady, N.A., Khalaf, D.M. & Morsy, F.M. 2014. "Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil". Microbiological Research, 169(1): 49-58, ISSN: 1618-0623, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.007>.
- Abdel-Rahman, S.S., Abdel-Kader, A.A. & Khalil, S.E. 2011. "Response of three sweet basil cultivars to inoculation with *Bacillus subtilis* and arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress conditions". Nature and Science, 9(6): 93-111, ISSN: 2375-7167.
- Agnolucci, M., Battini, F., Cristani, C. & Giovannetti, M. 2015. "Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates". Biology and Fertility of Soils, 51(3): 379-389, ISSN: 1432-0789, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0989-5>.
- Aguirre-Medina, F. 2008. Biofertilizantes microbianos: Antecedentes del programa y resultados de validación en México. In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible. 1st Ed. Díaz-Franco, A. & Mayek-Pérez, N. (eds). Ed. Plaza y Valdés, S.A. de C.V. México, D.F., México, p. 257, ISBN: 978-970-722-706-4.
- Ambika, P.K., Das, P.K., Katiyar, R.S. & Choudhury, P.C. 1994. "The influence of vesicular arbuscular mycorrhizal association on growth, yield and nutrient uptake in some mulberry genotypes (*Morus spp.*)". Indian Journal of Sericulture, 33: 166-169, ISSN: 0445-7722.
- Anon.2007. Statgraphics Centurion XV. Dyna 82(1):7.
- Baqual, M.F. & Das, P.K. 2006. "Influence of Biofertilizers on Macronutrient uptake by the Mulberry Plant and its Impact on Silkworm Bioassay". Caspian Journal of Environmental Sciences, 4(2): 98-109, ISSN: 1735-3033.
- Baqual, M.F. & Qayoom, S. 2004. "Biofertilizers and promises that they bold". Indian Silk, 43(3): 15-16, ISSN: 0019-6355.
- Bécquer, C.J., Reyes, R., Fernández, D., González, P.J. & Medinilla, F. 2019. "Rendimiento de pasto Mulato II inoculado con *Bradyrhizobium sp.* y *Glomus cubense*, en condiciones de sequía agrícola". Cuban Journal of Agricultural Science, 53(3):

- 319-330, ISSN: 2079-3480.
- Bello, R., García, M., Martínez, V. & Abeledo, C. 2011. "Effect of two organic fertilizers on the cultivation of mulberry (*Morus alba*) trees". *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 18(3): 203-206, ISSN: 1026-9053.
- Bellone C.H. & de Bellone, S.C. 2012. "Interaction of *Azospirillum brasilense* and *Glomus intrarradix* in Sugar Cane Roots". *Indian Journal of Microbiology*, 52(1): 70-75, ISSN: 0973-7715, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0208-0>.
- Benavides, J.E. 1994. La investigación en árboles forrajeros. In: *Árboles y arbustos forrajeros en América Central*. Benavides, J.E. (ed.). Ed. Serie Técnica. Informe Técnico (CATIE). NO. 236. Turrialba, Costa Rica, ISBN: 9789977571829.
- Bender, S.F., Conen, F. & Van der Heijden, M.G. 2015. "Mycorrhizal effects on nutrient cycling, nutriente leaching and N₂O production in experimental grassland". *Soil Biology and Biochemistry*, 80: 283-292, ISSN: 1879-3428, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.016>.
- Bitterlich, M. & Franken, P. 2016. "Connecting polyphosphate translocation and hyphal water transport points to a key of mycorrhizal functioning". *The New Phytologist*, 211(4): 1147-1149, ISSN: 1469-8137, Available: <https://www.jstor.org/stable/newphytologist.211.4.1147>.
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta, A., Lingua, G., D'Agostino, G., Gamalero, E. & Berta, G. 2017. "Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study". *Mycorrhiza*, 27(1): 1-11, ISSN: 1432-1890, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0727-y>.
- Cifuentes, C. A. & Sohn, K. W. 1998. Manual técnico de sericulture: cultivo de la morera y cría del gusano de seda en el trópico. Convenio SENA-CDTS. Colombia. 348p.
- Costacurta, A. 1995. "Genetic studies on the auxin hypothesis in the *Azospirillum*/plant inoculation". *Dissertationes de Agricultura*, 275: 34-39, ISSN: 0772-1285.
- Das, P.K., Choudhury, P.C., Ghosh, A., Katiyar, R.S., Rao, G.R.M., Mathur, V.B., Mazamder, M.K. & Madhava-Rao, Y.R. 1994. "Studies on the effect of bacterial biofertilizers in irrigated mulberry (*Morus alba* L.)". *Indian Journal of Sericulture*, 33(2): 170, ISSN: 0445-7722.
- Fernández, B.L., Colombo, R., Bompadre, J., Benavides, M., Scorza, V., Silvani, V., Pergola, M. & Godeas, A. 2016. "Cultivable bacteria associated with infective propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. Implications for mycorrhizal activity". *Applied Soil Ecology*, 105: 86-90, ISSN: 0929-1393, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.013>.
- Fernández, M.T. & Rodríguez, H. 2005. "El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos". *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39(3): 27-34, ISSN: 0138-6204.
- Fernández, R., Trapero, A. & Domínguez, J. 2010. Experimentación en agricultura. Consejería de Agricultura y Pesca. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Sevilla, Andalucía, España, ISBN: 978-84-8474-281-4.
- Hernández, A, Pérez, J.M., Bosh, D. & Castro, N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba. 1st Ed. Ed. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, González, O. (ed.). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 93, ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Lerch, G. 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba, p. 452.
- Long, L., Lin, Q., Yao, Q. & Zhu, H. 2017. "Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*". *3" Biotech*, 7(1): 8, ISSN: 2190-5738, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0612-1>.
- Martin, G.J. 2010. Estudio de comportamiento agronómico de la morera (*Morus alba* linn) en Cuba. In: *Morera un nuevo forraje para la alimentación del ganado*. Ed. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba, pp. 45-65, ISBN: 978-959-7138-04-4.
- Meng, L., Zhang, A., Wang, F., Han, X., Wang, D. & Li, S. 2015. "Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium facilitate nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system". *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-10, ISSN: 1664-462X, DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00339>.
- Nithya, D., Poornima, S.M., Pazhani-Murugan, R., Gopikrishnan, V., Radhakrishnan, M., Bhivi, D. & Balagurunathan, R. 2011. "Influence of biofertilizers and irrigation systems for the growth and yield of mulberry plants". *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(3): 93-99, ISSN: 2231-4490.
- Padma, S.D., Sukumar, J. & Nagendrakumar, T.D. 2000. "Mycorrhizal association in mulberry". *Bulletin of Materials Science*, 4(2): 18-25, ISSN: 0250-4707.
- Pecina-Quintero, V., Díaz-Franco, A., Williams-Alanis, H., Rosales-Robles, E. & Garza-Cano, I. 2005. "Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en sorgo". *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(4): 389-392, ISSN: 0187-7380.
- Pentón, G., Martín, G. J. y Rivera, R. 2014. "Efecto de la combinación de HMA y fertilización química en las extracciones de nitrógeno y potasio realizadas por *Morus alba*". *Pastos y Forrajes*, 37(1): 38-46, ISSN: 2078-8452.
- Pentón, G., Reynaldo, I., Martín, G.J., Rivera, R. & Oropesa, K. 2011. "Uso del EcoMic® y el producto bioactivo Pectimorf® en el establecimiento de dos especies forrajeras". *Pastos y Forrajes*, 34(3): 281-294, ISSN: 2078-8452.
- Plana, R.R., González, P.J. & Soto, F. 2016. "Combined use of EcoMic®, Fitomas-E® and mineral fertilizers in the forage production of animal food based in triticale (x. Triticosecale Wittmack), cv. INCA TT-7". *Cultivos Tropicales*, 37(4): 76-83, ISSN: 1819-4087, DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.34452.30087>.
- Ram-Rao, D.M., Kodandaramaiah, J., Reddy, M.P., Katiyar, R.S. & Rahmathulla, V.K. 2007. "Effect of VAM fungi and bacterial biofertilizers on mulberry leaf quality and silkworm cocoon characters under semiarid conditions". *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5(2): 111-117, ISSN: 1735-3033.
- Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R., Zamarreño, A.M., Molina, S., Andreo-Jiménez, B., Porcel, R., García-Mina, J.M., Ryter-Spira, C. & López-Ráez, J.A. 2016. "Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato". *Plant, Cell & Environment*, 39(2): 441-452, ISSN: 1365-3040, DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12631>.

- Sánchez de la Cruz, R., Díaz-Franco, A., Pecina-Quintero, V., Garza-Cano, I. & Loera-Gallardo, J. 2008. "Nota científica: Glomus intraradices y Azospirillum brasilense en trigo bajo dos regímenes de humedad en el suelo". Universidad y Ciencia, 24(3): 239-245, ISSN: 0186-2979.
- Sanclemente, O.E., Sánchez de Prager, M., Prager, M. 2018. "Prácticas agroecológicas, micorrización y productividad del intercultivo maíz-soya (*Zea mays* L.- *Glycine max* L.)". Idesia (Arica), 36(2): 217-224, ISSN: 0718-3429, DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292018005000301>.
- Santillana, N., Zúñiga, D. & Arellano, C. 2012. "Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagonístico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*". Agrociencia Uruguay, 16(2): 11-17, ISSN: 2301-1548.
- Shaimaa, A.M. & Massoud, O.N. 2017. "Impact of Inoculation with Mycorrhiza and Azotobacter under Different N and P Rates on Growth, Nutrient status, Yield and Some Soil Characteristics of Washington Navel Orange Trees". Middle East Journal of Agriculture, 6(3): 617-638, ISSN: 2706-7955.
- Singh, S.R., Zargar, M.Y., Najjar, G.R., Peer, F.A. & Ishaq, M.I. 2011. Integrated use of organic and inorganic fertilizers with bio-inoculants on yield, soil fertility and quality of apple (*Malus domestica*). Journal of the Indian society of Soil Science, 59(4): 362-367, ISSN: 0974-0228.
- Siqueira, J.O. 2010. Micorrizas: 30 años de pesquisas no Brasil. Ed. UFLA. Lavras, Minas Gerais, Brasil, p. 716.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Gronlund, M. & Smith, F.A. 2011. "Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition". Plant Physiology, 156(3): 1050-1057, ISSN: 1532-2548, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>.
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G.N., Gangwar, S.K. & Ghosh, J. K. 2000. "Effect of foliar application of Azotobacter, Azospirillum and Beijerinckia on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*)". The Journal of Agricultural Science, 134(2): 227-234, ISSN: 1469-5146, DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859699007376>.
- Tahir, M., Mirza, M.S., Zaheer, A., Dimitrov, M.R., Smidt, H. & Hameed, S. 2013. "Isolation and identification of phosphate solubilizer Azospirillum, Bacillus and Enterobacter strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.)". Australian Journal of Crop Science, 7(9): 1284-1292, ISSN: 1835-2693.
- Umakanth, C.G. & Bagyaraj, D.J. 1998. "Response of mulberry saplings to inoculation with VA Mycorrhizal Fungi and Azotobacter". Sericologia, 38(4): 669-675, ISSN: 0250-3980.
- Vafadar, F., Amooaghaie, R. & Otrushy, M. 2014. "Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*". Journal of Plant Interactions, 9(1): 128-136, ISSN: , DOI: <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>.
- Valerio, S.D. 2016. Respuesta morfofisiológica y expresión de genes Pht1 de cuatro cultivares de *Zea mays* L., inoculados con hongos micorrízicos arbusculares bajo dos concentraciones de fósforo inorgánico. MSc. Thesis. La Paz, Baja California Sur, México, p. 101.
- WingChing-Jones, R. & Uribe-Lidieth y Castro, L. 2016. "Uso de *Azospirillum spp.* como biofertilizante en la producción de estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*)". Cuadernos de Investigación UNED, 8(2): 259-265, ISSN: 1659-4266, DOI: <http://dx.doi.org/10.22458/urj.v8i2.1570>.

Received: July 18, 2020

Accepted: October 10, 2020