

Biofertilization with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Funneliformis mosseae* in Guinea grass (*Megathyrsus maximus* cv. Likoni).

Technical note

Biofertilización con *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Funneliformis mosseae* en pasto guinea (*Megathyrsus maximus* vc. Likoni).

Nota técnica

Pedro J. González Cañizares¹, Juan F. Ramírez Pedroso², Reynerio Reyes Rouseaux²
and Ramón Rivera Espinosa¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba

²Instituto de Investigaciones en Pastos y Forrajes. Avenida Independencia, km 8 ½ Boyeros, La Habana. Cuba

Email: pgonzalez@inca.edu.cu

Pedro J. González Cañizares: <https://orcid.org/0000-0003-3206-0609>

Juan F. Ramírez Pedroso: <https://orcid.org/0000-0003-3384-3904>

Reynerio Reyes Rouseaux: <https://orcid.org/0000-0001-7526-8456>

Ramón Rivera Espinosa: <https://orcid.org/0000-0001-6621-7446>

An experiment was carried out under semi-controlled conditions to evaluate the effect of biofertilization with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Funneliformis mosseae* on Guinea grass (*Megathyrsus maximus* cv. Likoni). Five treatments (simple and combined inoculation with *G. diazotrophicus* and *F. mosseae*, fertilization with 25 mg N kg⁻¹ of soil and a control without biofertilizers or nitrogenous fertilizer) were studied in a completely random design with five repetitions. Biofertilization with *G. diazotrophicus* and *F. mosseae* separately produced higher effects than the control without biofertilizers. However, with the combined application of both, the highest frequency of mycorrhizal colonization was reached (52.4 %), as well as concentrations of N in aerial biomass (18.5 g kg⁻¹) and aerial biomass yields (7.45 g pot⁻¹) and radical (7.38 g pot⁻¹), similar to those obtained with nitrogen fertilization. It is concluded that the co-inoculation with *G. diazotrophicus* and *F. mosseae* is effective in improving nitrogenous nutrition and biomass yields of *Megathyrsus maximus* cv. Likoni.

Key words: *rhizobacteria*, *arbuscular mycorrhizae*, *nitrogen*, *growth*

In recent years, the inclusion of beneficial microorganisms in the fertilization strategies of agricultural crops has been of great interest, as an economically and ecologically viable alternative to improve the biological properties of soils, the efficiency of the use of nutrients and, consequently, reduce the use of mineral fertilizers (Sahgal and Srivastava 2020).

Among these microorganisms is *Gluconacetobacter diazotrophicus*, an endophytic bacterium, with the ability to fix atmospheric nitrogen, stimulate plant growth and induce response mechanisms to biotic and abiotic stresses (El-Shouny *et al.* 2020). They have also showed their potential as biofertilizers and as protectors against pathogenic agents, the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), whose

Se realizó un experimento en condiciones semicontroladas para evaluar el efecto de la biofertilización con *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Funneliformis mosseae* en pasto guinea (*Megathyrsus maximus* vc. Likoni). Se estudiaron cinco tratamientos (inoculación simple y combinada con *G. diazotrophicus* y *F. mosseae*, fertilización con 25 mg N kg⁻¹ de suelo y un testigo sin biofertilizantes ni fertilizante nitrogenado) en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. La biofertilización con *G. diazotrophicus* y *F. mosseae* por separado produjo efectos superiores al testigo sin biofertilizantes. Sin embargo, con la aplicación combinada de ambos se alcanzó la mayor frecuencia de colonización micorrizica (52.4 %), así como concentraciones de N en biomasa aérea (18.5 g kg⁻¹) y rendimientos de biomasa aérea (7.45 g maceta⁻¹) y radical (7.38 g maceta⁻¹), similares a los obtenidos con la fertilización nitrogenada. Se concluye que la coinoculación con *G. diazotrophicus* y *F. mosseae* resulta efectiva para mejorar la nutrición nitrogenada y los rendimientos de biomasa de *Megathyrsus maximus* vc. Likoni.

Palabras clave: *rizobacterias*, *micorrizas arbusculares*, *nitrógeno*, *crecimiento*

En los últimos años ha sido de gran interés la inclusión de microorganismos benéficos en las estrategias de fertilización de los cultivos agrícolas, como una alternativa económica y ecológicamente viable para mejorar las propiedades biológicas de los suelos, la eficiencia del uso de los nutrientes y, consecuentemente, reducir el uso de fertilizantes minerales (Sahgal y Srivastava 2020).

Entre estos microorganismos se encuentra *Gluconacetobacter diazotrophicus*, una bacteria endófitas, con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, estimular el crecimiento vegetal e inducir mecanismos de respuesta ante estreses bióticos y abióticos (El-Shouny *et al.* 2020). También han demostrado sus potencialidades como biofertilizantes y como protectores ante agentes patógenos, los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA),

structures facilitate the absorption of nutrients and water, in addition to other benefits such as the solubilization of elements that are in the soil poorly available to plants (Chandrasekaran 2020).

However to the previous, few studies deal with the effect of co-inoculation with both microorganisms, in terms of efficiency in the use of nutrients and crop yield, as well as in the reduction of mineral fertilizers. Studies on biofertilization with *G. diazotrophicus*, alone or combined with AMF, are also limited.

Based on these premises, this study makes a preliminary evaluation of the effect of simple and combined application of *G. diazotrophicus* bacterium and the AMF species *Funneliformis mosseae* on biomass production, the frequency of mycorrhizal colonization and the concentrations of N in the biomass of the aerial part of Guinea grass (*Megathyrsus maximus* cv. Likoni).

The study was carried out under semi-controlled conditions, at the Experimental Station of Pastures and Forages of Cascajal, located at 22° 39' North latitude and 80° 24' West longitude, in the Santo Domingo municipality, Villa Clara province, Cuba. Five treatments were studied, made up of simple and combined inoculation with *G. diazotrophicus* and *F. mosseae*, the application of nitrogenous fertilizer, at a rate of 25 mg N kg⁻¹ of soil, and a control without biofertilizers or nitrogenous fertilization, in a completely random design with five repetitions.

The treatments were placed in plastic pots with a capacity of 3.5 L, previously perforated at the bottom to facilitate drainage. They were filled with 3 kg of soil, from the Station, classified as petroferic ferruginous nodular gley (Hernández *et al.* 2015). To fill the pots, the soil was taken to a depth of 0-20 cm and sieved with a 5-mm mesh. The soil pH in H₂O was strongly acidic (4.8), with low organic matter content (2.50 %), and very low assimilable P (5 mg kg⁻¹) and exchangeable K (0.13 cmolc kg⁻¹).

For the application of *G. diazotrophicus*, the commercial inoculant ICIBIOP-GLU, produced by the Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) was used, with a concentration of 10⁹ CFU mL⁻¹. A solution composed of a mixture of the biofertilizer and water, in a 1:1 v/v ratio, was prepared, where the seeds were immersed for 15 min. Subsequently, they were dried in the shade and sowing was carried out.

For the application of the mycorrhizal biofertilizer, the INCAM-2 strain of *Funneliformis mosseae* species (C. Walker & A. Schüßler), from the INCA collection, was used. The inoculum contained 30 spores per gram of substrate, as well as abundant fragments of rootlets from the host plant used to produce the inoculum (*Urochloa decumbens*), and a rate of 5 g per pot was applied.

For sowing, 15 guinea grass seeds (*Megathyrsus maximus* cv. Likoni) with 50 % germination were

cuyas estructuras facilitan la absorción de los nutrientes y el agua, además de otros beneficios como la solubilización de elementos que se encuentran en el suelo en formas poco disponibles para las plantas (Chandrasekaran 2020).

No obstante a lo anterior, pocos trabajos abordan el efecto de la coinoculación con ambos microorganismos, en cuanto a la eficiencia en el uso de nutrientes y el rendimiento de los cultivos, así como en la reducción de los fertilizantes minerales. También son escasos los estudios acerca de la biofertilización con *G. diazotrophicus*, sola o combinada con HMA.

A partir de estas premisas, en este trabajo se hace una evaluación preliminar del efecto de la aplicación simple y combinada de la bacteria *G. diazotrophicus* y la especie de HMA *Funneliformis mosseae* en la producción de biomasa, la frecuencia de colonización micorrízica y las concentraciones de N en la biomasa de la parte aérea del pasto guinea (*Megathyrsus maximus* vc. Likoni).

El trabajo se realizó en condiciones semicontroladas, en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal, ubicada a los 22° 39' de latitud Norte y 80° 24' de longitud Oeste, en el municipio de Santo Domingo, provincia Villa Clara, Cuba. Se estudiaron cinco tratamientos, conformados por la inoculación simple y combinada con *G. diazotrophicus* y *F. mosseae*, la aplicación de fertilizante nitrogenado, a razón de 25 mg N kg⁻¹ de suelo, y un testigo sin biofertilizantes ni fertilización nitrogenada, en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones.

Los tratamientos se ubicaron en macetas de plástico de 3.5 L de capacidad, previamente perforadas en el fondo para facilitar el drenaje. Se llenaron con 3 kg de suelo, procedente de la propia Estación, clasificado como gley nodular ferruginoso petroférrico (Hernández *et al.* 2015). Para el llenado de las macetas, el suelo se tomó a una profundidad de 0-20 cm y se tamizó con malla de 5 mm. El pH del suelo en H₂O era fuertemente ácido (4.8), con bajo contenido de materia orgánica (2.50 %), y muy bajos de P asimilable (5 mg kg⁻¹) y K intercambiable (0.13 cmolc kg⁻¹).

Para la aplicación de *G. diazotrophicus*, se utilizó el inoculante comercial ICIBIOP-GLU, producido por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), con una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹. Se preparó una solución compuesta por una mezcla del biofertilizante y agua, en relación 1:1 v/v, donde se sumergieron las semillas durante 15 min. Posteriormente se secaron a la sombra y se procedió a la siembra.

Para la aplicación del biofertilizante micorrízico, se utilizó la cepa INCAM-2 de la especie *Funneliformis mosseae* (C. Walker & A. Schüßler), procedente de la colección del INCA. El inóculo contenía 30 esporas por gramo de sustrato, así como abundantes fragmentos de raicillas de la planta hospedera que se empleó para producir el inóculo (*Urochloa decumbens*), y se aplicó razón de 5 g por maceta.

Para la siembra, se colocaron 15 semillas de pasto guinea (*Megathyrsus maximus* vc. Likoni) con 50 % de

placed in holes 0.5 cm deep that were opened on the soil surface of each pot, close to the center, and later they were covered with the soil. In the treatments where *F. mosseae* was applied, the inoculant was deposited under the seeds at the time of sowing.

Eight days after sowing, a thinning was carried out and five plants per pot were left. Fertilization was immediately applied in all treatments, at a rate of 37 and 25 mg of P_2O_5 and K_2O kg^{-1} of soil, equivalent to 25 and 50 $kg\ ha^{-1}$ of one and another nutrient, respectively. Triple superphosphate and potassium chloride were used as carriers. In the treatment corresponding to nitrogen fertilization, 25 mg of N kg^{-1} of soil was applied, equivalent to 50 $kg\ N\ ha^{-1}$, using urea as a carrier. Fertilizers were administered in a 2 cm deep circle around the set of plants, and covered with soil. The pots were watered every three days to maintain the soil at 80 % of field capacity.

The harvest was carried out 45 d after sowing. The green mass of the aerial and root parts of the plants was weighed, and both, after washing the roots to remove the remains of soil, were taken to an air circulation oven at 70 °C for 72 h, to determine the yields of dry mass of the aerial part, roots and total dry mass ($g\ pot^{-1}$). The N concentrations in aerial biomass were calculated according to the manual of analytical techniques of Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (Paneque *et al.* 2010). Rootlets were sampled at harvest time to determine the frequency of mycorrhizal colonization (Giovanetti and Mosse 1980). For statistical processing, the normality of the data was checked using the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances using the Levene test. When fulfilling both requirements, the analysis of variance was carried out on the original data. The mean values of the treatments were compared according to Tukey's test ($P < 0.05$). In all cases, the statistical program SPSS 25 (SPSS 2017) was used.

G. diazotrophicus as well as *F. mosseae* increased the dry mass yields of the aerial, radical and total part of the grass. Among these treatments, the highest values corresponded to *G. diazotrophicus*. However, with the co-inoculation with both biofertilizers, values significantly higher than those reached for each one separately, and similar to those obtained with nitrogen fertilization, were recorded (table 1).

The frequency of mycorrhizal colonization significantly increased in the treatments inoculated with *F. mosseae*. However, the highest values were reached with the joint application of both biofertilizers (figure 1a). The rest of treatments showed similar values to the control, without nitrogen or biofertilizers, which reflected the root occupation level of the AMF resident in the soil used in the experiment.

Regarding the concentrations of N in the biomass of the aerial part (figure 1b), there was a similar effect to the biomass yields. That is: *G. diazotrophicus*

germinación, en orificios de 0.5 cm de profundidad que se abrieron en la superficie del suelo de cada maceta, próximos al centro, y que posteriormente se cubrieron con el propio suelo. En los tratamientos donde se aplicó *F. mosseae*, el inoculante se depositó debajo de las semillas en el momento de la siembra.

A los ocho días después de la siembra, se realizó un raleo y se dejaron cinco plantas por maceta. Inmediatamente se aplicó una fertilización en todos los tratamientos, a razón de 37 y 25 mg de P_2O_5 y K_2O kg^{-1} de suelo, equivalentes a 25 y 50 $kg\ ha^{-1}$ de uno y otro nutriente, respectivamente. Se utilizaron como portadores superfosfato triple y cloruro de potasio. En el tratamiento correspondiente a la fertilización nitrogenada, se aplicó 25 mg de N kg^{-1} de suelo, equivalente a 50 $kg\ N\ ha^{-1}$, mediante el uso de urea como portador. Los fertilizantes se administraron en un círculo de 2 cm de profundidad alrededor del conjunto de plantas, y se cubrieron con el suelo. Las macetas se regaron cada tres días para mantener el suelo a 80 % de la capacidad de campo.

La cosecha se realizó a los 45 d posteriores a la siembra. Se pesó la masa verde de la parte aérea y radical de las plantas, y ambas después de lavadas las raíces para retirar los restos del suelo, se llevaron a una estufa de circulación de aire a 70 °C durante 72 h, para determinar los rendimientos de masa seca de la parte aérea, de raíces y de masa seca total ($g\ maceta^{-1}$). Se calcularon las concentraciones de N en la biomasa aérea, según el manual de técnicas analíticas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (Paneque *et al.* 2010). En el momento de la cosecha, se tomaron muestras de raicillas para determinar la frecuencia de colonización micorrízica (Giovanetti y Mosse 1980). Para el procesamiento estadístico se comprobó la normalidad de los datos mediante la dística de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la dística de Levene. Al cumplir ambos requisitos, se procedió a realizar el análisis de varianza a los datos originales. Los valores medios de los tratamientos se compararon según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). En todos los casos, se utilizó el programa estadístico SPSS 25 (SPSS 2017).

G. diazotrophicus como *F. mosseae* incrementaron los rendimientos de masa seca de la parte aérea, radical y total del pasto. Entre estos tratamientos, los valores más altos correspondieron a *G. diazotrophicus*. No obstante, con la coinoculación con ambos biofertilizantes, se registraron valores significativamente mayores a los alcanzados para cada uno por separado, y similares a los que se obtuvieron con la fertilización nitrogenada (tabla 1).

La frecuencia de colonización micorrízica aumentó significativamente en los tratamientos inoculados con *F. mosseae*. Sin embargo, los valores más altos se alcanzaron con aplicación conjunta de ambos biofertilizantes (figura 1a). El resto de los tratamientos mostró valores similares al testigo, sin nitrógeno ni biofertilizantes, que reflejó el nivel de ocupación radical de los HMA residentes en el suelo utilizado en el experimento.

Con respecto a las concentraciones de N en la biomasa de la parte aérea (figura 1b), hubo efecto similar a los

Table 1. Effect of treatments on guinea Likoni yields

Treatments	Dry mass aerial part	Radical dry mass	Total dry mass
	(g/pot)		
Control	4.18 ^d	4.02 ^d	8.21 ^d
30 mg kg ⁻¹ N	7.32 ^a	7.13 ^a	14.45 ^a
<i>G. diazotrophicus</i>	6.52 ^a	6.40 ^a	12.92 ^a
<i>F. mosseae</i>	5.22 ^c	5.10 ^c	10.33 ^c
<i>G. diazotrophicus</i> + <i>F. mosseae</i>	7.45 ^a	7.38 ^a	14.83 ^a
ES ±	0.16	0.20	0.34
P	0.003	0.001	0.002

^{a,b,c,d} Means with different letters in the same column significantly differ, according to Tukey's test (P < 0.05)

as well as *F. mosseae* increased the values of this indicator. When comparing both treatments, the highest values corresponded to *G. diazotrophicus*. However, the joint application of biofertilizers produced significantly higher N concentrations than those obtained with the inoculation of one or the other separately, and similar to the treatment with nitrogenous fertilizer.

rendimientos de biomasa. Esto es: *G. diazotrophicus* como *F. mosseae* incrementaron los valores de este indicador. Al comparar ambos tratamientos, los mayores valores correspondieron a *G. diazotrophicus*. No obstante, la aplicación conjunta de los biofertilizantes produjo concentraciones de N significativamente mayores que las obtenidas con la inoculación de uno u otro por separado, y similares al tratamiento con fertilizante nitrogenado.

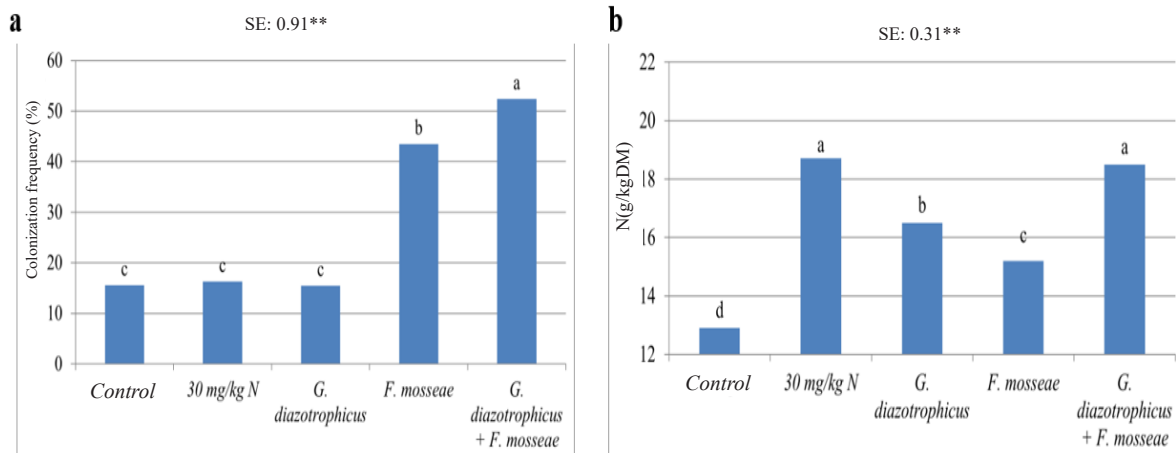


Figure 1. Effect of the treatments on the frequency of mycorrhizal colonization (1a) and the concentrations of N in the biomass of the aerial part of Guinea Likoni (1b).

Treatments with different letters significantly differ, according to Tukey's test (P < 0.05).

** P < 0.01.

The positive effect of the inoculation with *G. diazotrophicus* on the yields of different agricultural crops has been reported by several authors, and they attribute it to its ability to fix atmospheric nitrogen and produce growth-stimulating phytohormones (Padwar *et al.* 2020). The increase in the production of aerial and radical biomass, as well as the concentrations of N in the biomass, obtained in the biofertilization with this microorganism, seem to confirm such affirmations in the case of Guinea grass.

It has been shown that inoculation with effective strains of AMF increases mycorrhizal colonization levels, macronutrient concentrations and biomass yields in grasses, as a function of better use of soil nutrients and fertilizers (Silva *et al.* 2021). But the most

El efecto positivo de la inoculación con *G. diazotrophicus* en los rendimientos de diferentes cultivos agrícolas ha sido informado por varios autores, y lo atribuyen a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas estimuladoras del crecimiento (Padwar *et al.* 2020). El incremento de la producción de biomasa aérea y radical, así como de las concentraciones de N en la biomasa, obtenidas en la biofertilización con este microorganismo, parecen confirmar tales afirmaciones en el caso de la guinea.

Se ha demostrado que la inoculación con cepas efectivas de HMA incrementa los niveles de colonización micorrízica, las concentraciones de macronutrientes y los rendimientos de biomasa en los pastos, en función de un mejor aprovechamiento de los nutrientes del suelo

outstanding has been that with the joint application of both biofertilizers, guinea grass reached yields and N concentrations in the biomass of the aerial part, similar to those obtained with the application of nitrogenous fertilizer, especially in a soil with very low fertility and low organic matter content, indicative of a low availability of this nutrient.

This suggests an important contribution of *G. diazotrophicus* to the biological fixation of N, enhanced by co-inoculation with *F. mosseae*, from the synergistic effect of both microorganisms on plants. In this sense, Khan *et al.* (2020) argued that this synergy is reflected in an increase in root growth and, in fact, in mycorrhizal colonization of the inoculated strain, whose activity in plants is stimulated by the biological fixation of N and the production of phytohormones by the bacterium; in addition, in a greater effectiveness of the bacteria from the photosynthates produced by the fungus.

It is concluded that joint inoculation with *G. diazotrophicus* and *F. mosseae* is effective in improving nitrogenous nutrition and aerial and root biomass yields of *Megathyrsus maximus* cv. Likoni. However, it is suggested to continue the studies on the joint application of both biofertilizers and their contribution to the reduction of the use of nitrogenous fertilizers in grasses.

Acknowledgments

Thanks to the Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI) for financing the execution of the study. Gratitude is also expressed to M. Sc. Ana N. San Juan Rodríguez and Daisy Dopico Ramírez, ICIDCA Specialists, for the donation of the biofertilizer ICIBIOP-GLU for the execution of the experiment.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest for the publication of this technical note.

Author's contribution

Pedro José González Cañizares: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft.

Juan F. Ramírez Pedroso: Investigation, Methodology, Formal analysis.

Reynerio Reyes Rouseaux: Methodology, Data curation, Formal analysis.

Ramón Rivera Espinosa: Data curation, Formal analysis.

de los fertilizantes (Silva *et al.* 2021). Pero lo más destacado ha sido que con la aplicación conjunta de ambos biofertilizantes, la guinea alcanzó rendimientos y concentraciones de N en la biomasa de la parte aérea, similares a los que se obtuvieron con la aplicación del fertilizante nitrogenado, sobre todo en un suelo con muy baja fertilidad y bajo contenido de materia orgánica, indicativos de una baja disponibilidad de este nutriente.

Lo anterior sugiere una contribución importante de *G. diazotrophicus* a la fijación biológica de N, potenciada por la coinoculación con *F. mosseae*, a partir del efecto sinérgico de ambos microorganismos en las plantas. En este sentido, Khan *et al.* (2020) argumentaron que dicha sinergia se refleja en un incremento del crecimiento de las raíces y, de hecho, de la colonización micorrízica de la cepa inoculada, cuya actividad en las plantas se estimula por la fijación biológica del N y la producción de fitohormonas por parte de la bacteria; además, en una mayor efectividad de la bacteria a partir de los fotosintatos producidos por el hongo.

Se concluye que la inoculación conjunta con *G. diazotrophicus* y *F. mosseae* resulta efectiva para mejorar la nutrición nitrogenada y los rendimientos de biomasa aérea y radical de *Megathyrsus maximus* cv. Likoni. No obstante, se sugiere continuar los estudios acerca de la aplicación conjunta de ambos biofertilizantes y su contribución a la reducción del uso de fertilizantes nitrogenados en los pastos.

Agradecimientos

Se agradece al Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI) por el financiamiento para la ejecución del trabajo. También se expresa gratitud a las M.Sc. Ana N. San Juan Rodríguez y Daisy Dopico Ramírez, Especialistas del ICIDCA, por la donación del biofertilizante ICIBIOP-GLU para la ejecución del experimento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses para la publicación de esta nota técnica.

Contribución de los autores

Pedro José González Cañizares: Conceptualización, Investigación, Metodología, Análisis formal, Redacción – borrador original.

Juan F. Ramírez Pedroso: Investigación, Metodología, Análisis formal.

Reynerio Reyes Rouseaux: Metodología, Curación de datos, Análisis formal.

Ramón Rivera Espinosa: Curación de datos, Análisis formal.

References

- Chandrasekaran, M. 2020. "A meta-analytical approach on arbuscular mycorrhizal fungi inoculation efficiency on plant growth and nutrient uptake". *Agriculture*, 10 (9): 1-12, ISSN: 2077-0472. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090370>.
- El-Shouny, W. A., Shabanah, S., Fray, R. G., Narraidoo, N. & El-Ballat, E. M. 2020. "Endophytic colonization of tomato plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on crops improvement and yield promotion". *Delta Journal of Science*,

- 41: 92 -106, ISSN: 2735-5306.
- Giovanetti, M. & Mosse, B. 1980. "An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots". *New Phytologist*, 84: 489-500, ISSN: 1469-8137. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.
- Hernández, J. A., Pérez, J.J.M., Bosch, I.D. & Castro, S.N. *Clasificación de los suelos de Cuba*. Ediciones INCA, Cuba, 91 p. 2015. ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Khan, A., Ding, Z., Ishaq, M., Khan, I., Ahme, A. A., Khan, A. Q. & Guo, X. 2020. "Applications of beneficial plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizae in rhizosphere and plant growth: A review". *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 13(5): 199-208, ISSN: 1934-6352.
- Padwar, G., Mitra, N.G., Chand, T., Sahu, R.K. & Padwar, G. 2020. "Effect of microbial consortia as basal application and foliar spray of *Gluconacetobacter diazotrophicus* on growth, yield and nutrient uptake by maize". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9 (6): 2900-2912, ISSN: 2319-7706. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.906.350>.
- Paneque, V.M., Calaña, J.M., Calderón, M., Borges, Y., Hernández, T. & Caruncho, M. 2010. *Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque: Ediciones INCA. 153 pp, ISBN: 978-959-7023-51-7. <https://docplayer.es/13119861-Manual-de-tecnicas-analiticas-para-analisis-de-suelo-foliar-abonos-organicos-y-fertilizantes-quimicos.html>
- Sahgal, S. & Srivastava, D. 2020. "Utilization of Microbial Diversity as Biofertilizers". *International Journal of Plant and Environment*, 6(3): 218-221, ISSN: 2455-202X.
- Silva A., Mogollón, A.M. & Delgado, H. 2021. "Response of arbuscular mycorrhizal fungi and soil chemical properties to *Brachiaria decumbens* grass production technologies". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, (64): 1-12, ISSN: 1678-4324. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021190323>

