

Productivity of *Zea mays* L., in drought stress, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*

Productividad de *Zea mays* L. en estrés de sequía, inoculado con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum*

C. J. Bécquer¹, J. A. Nápoles¹, T. Cancio¹, U. Ávila¹, Adelaida Puentes², F. Medinilla³ and Ivón Muir¹

¹Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spiritus, Apdo. 2255, ZP. 1, C. P. 62200, Sancti Spiritus, Cuba

²Universidad "José Martí Pérez", Avenida de los Mártires No. 360. Sancti Spiritus, Cuba

³Centro Meteorológico Provincial de Sancti Spiritus, Calle Comandante Fajardo S/N, Olivos 2. Provincia y Municipio Sancti Spiritus, Cuba.

Email: pastosp@enet.cu

A field experiment was developed under agricultural drought stress conditions to evaluate agroproductive variables of *Zea mays* L., to which inocula of *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum* were applied. The inocula preparation and the inoculation of the plants were carried out according to recognized rules. A randomized block experimental design with seven treatments was used: 1) *Bradyrhizobium* sp. (Ho13), when seed germinates; 2) *Trichoderma*, when seed germinates (*Trichoderma*); 3) *Bradyrhizobium* sp. + *Trichoderma*, when seed germinates (Ho13 + *Trichoderma*); 4) *Bradyrhizobium* sp., when seed germinates+ *Trichoderma* at 15 d of sowing (Ho13 + Trich. 15 d); 5) *Trichoderma*, when seed germinates + *Bradyrhizobium* sp. at 15 d of sowing (Trich. + Ho13.15d); 6) absolute control and 7) control fertilized with 150 kg N / ha and three replications. ANOVA analysis was performed. The differences between means were determined by LSD of Fisher. The values with digit count were transformed by $\sqrt{x}$. and the percentage data by $2\arccos\sqrt{P}$. The dry weight of the aerial part, the efficiency index of the inoculation on the basis of the DWAP, stem length, the dry weight of corncob, the grain yield, the efficiency index of the inoculation on the basis of grain yield and the weight of 1000 grains (P1000G) were evaluated. The state of the agricultural drought was determined. In the weight of the corncob, the treatments inoculated when germinating the seed with *Trichoderma* (120.30 g) and Ho13 + *Trichoderma* (118.25 g), as well as with *Trichoderma* when germinating the seed + Ho13 at 15 d of sowing (119.90 g) (Trich. + Ho13.15d) were superior to the rest of the treatments. The grain yield in the treatment inoculated with Ho13 (1.49 t/ha) and in the treatment inoculated with Trich. + Ho13.15d. (1.58 t/ha) exceeded the rest, except for the fertilized control. It is concluded that, in general, the productivity of the crop was increased when inoculated with the simple application of *Bradyrhizobium* sp. (Ho13) as combined with *Trichoderma harzianum*. The variables with the best response to the treatments inoculated were: dry weight of the corncob, stem length and grain yield. It was also observed that the fertilized treatment was inferior to the treatments inoculated in dry weight of the corncob and weight of 1000 G. The treatments with higher results in the studied variables were Ho13 and *Trichoderma* + Ho13.15 d., recommended to apply in agricultural practice.

Key words: *Bradyrhizobium*, *Trichoderma*, agricultural drought, corn

Occasionally, crop productivity is affected by several stressful environmental factors. It is known that water stress, caused by drought, limits growth and crop productivity, especially in arid and semi-arid areas (Yang *et al.* 2008).

Se desarrolló un experimento de campo en condiciones de estrés de sequía agrícola para evaluar variables agroproductivas de *Zea mays* L., al cual se le aplicaron inóculos de *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum*. La preparación de los inóculos y la inoculación de las plantas se realizaron según normas reconocidas. Se empleó un diseño experimental de bloques al azar con siete tratamientos: 1) *Bradyrhizobium* sp. (Ho13), al germinar la semilla; 2) *Trichoderma*, al germinar la semilla (*Trichoderma*); 3) *Bradyrhizobium* sp. + *Trichoderma*, al germinar la semilla (Ho13 + *Trichoderma*); 4) *Bradyrhizobium* sp., al germinar la semilla + *Trichoderma* a los 15 d de la siembra (Ho13 + Trich. 15 d); 5) *Trichoderma*, al germinar la semilla + *Bradyrhizobium* sp. a los 15 d de la siembra (Trich.+Ho13.15d); 6) control absoluto y 7) testigo fertilizado con 150 kg N/ha y tres réplicas. Se realizó análisis de ANOVA. Las diferencias entre medias se determinaron por LSD de Fisher. Los valores con conteo de dígitos se transformaron por $\sqrt{x}$. y los datos porcentuales por $2\arccos\sqrt{P}$. Se evaluó el peso seco de la parte aérea, el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del DWAP, la longitud del tallo, el peso seco de la mazorca, el rendimiento de grano, el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del rendimiento del grano y el peso de 1000 granos (P1000G). Se determinó el estado de la sequía agrícola. En el peso seco de la mazorca, los tratamientos inoculados al germinar la semilla con *Trichoderma* (120.30 g) y Ho13+*Trichoderma* (118.25 g), así como con *Trichoderma* al germinar la semilla+Ho13 a los 15 d de siembra (119.90 g) (Trich.+Ho13.15d) fueron superiores al resto de los tratamientos. El rendimiento del grano en el tratamiento inoculado con Ho13 (1.49 t/ha) y en el tratamiento inoculado con Trich.+Ho13.15d. (1.58 t/ha) superaron al resto, excepto al testigo fertilizado. Se concluye que, en general, se incrementó la productividad del cultivo al ser inoculado con la aplicación simple de *Bradyrhizobium* sp. (Ho13) como combinada con *Trichoderma harzianum*. Las variables con mejor respuesta a los tratamientos inoculados fueron: peso seco de la mazorca, longitud del tallo y rendimiento del grano. También se observó que el tratamiento fertilizado fue inferior a los tratamientos inoculados en peso seco de la mazorca y peso de 1000 G. Los tratamientos con resultados superiores en las variables estudiadas fueron Ho13 y *Trichoderma* + Ho13.15 d., recomendados para aplicar en la práctica agrícola.

Palabras clave: *Bradyrhizobium*, *Trichoderma*, sequía agrícola, maíz.

En ocasiones, la productividad de los cultivos se afecta por diversos factores ambientales estresantes. Se conoce que el estrés hídrico, provocado por la sequía, limita el crecimiento y la productividad de los cultivos, especialmente en áreas áridas y semiáridas (Yang *et al.*

Considering any abiotic stress, there is significant decrease in photosynthesis and consequently, reduction in the amount of metabolites and energy. It is very important for plants to use this small amount of resources to maximize their growth and reproductive potential (Timmusk *et al.* 2014). The rhizobacteria can contribute to plants tolerating the effects of drought better. Among rhizobacteria, rhizobia occupy an important place in the induction of stress tolerance in plants (Stiens *et al.* 2006).

The filamentous fungus *Trichoderma spp.*, is an effective antagonist against phytopathogens (Howell 1998). Other studies had showed the induction of defense mechanisms in plants by this fungus, as well as its plant growth promoting activity (Saber *et al.* 2009 and Shaban and El-Bramawy 2011). There is a history of the positive effect of *T. harzianum* on wheat, when combined with rhizobia (Bécquer *et al.* 2015) and in triticale under agricultural drought conditions (Bécquer *et al.* 2016b).

The objective of this study was to evaluate agroproductive variables of *Zea mays* L., to which inocula of *Bradyrhizobium sp.* and *Trichoderma harzianum* were applied in different combinations and in a simple way and thus select the best options for its practical application.

Materials and Methods

Location of the experiment. The experiment was carried out from February to May 2016, in an experimental plot belonging to the Estación Experimental de Pastos y Forrajes from Sancti Spíritus, located at 21°53'00" north latitude and 79°21'25" west longitude, at 40 m o.s.l.

Climate and soil. The temperature, precipitations and relative humidity data were taken from the Sancti Spíritus Meteorological Station (CMP 2016). The precipitations in the study area had an irregular performance (figure 1). During January and April they were higher than historical values, while February, March and May had lower values. The experimental period was characterized by the predominance of high temperatures, especially in April. There was high relative humidity in January, but relatively low in the remaining months, especially in February, March and April, which coincided with the sowing and development of the crop (table 1).

The soil of the experimental area corresponded to the soft brown carbonated type, of brown to brownish slightly dark clay, with a slight reaction to HCl. It has some gravels on the horizon A1, good superficial and internal drainage, moderately erodible (Hernández *et al.* 2015). The content of macronutrients was low in phosphorus and potassium (2.63 mg/100 g of P_2O_5 and 6.0 mg/100 g of K_2O), as well as in organic matter (1.51 %). The pH was slightly acid (5.9).

Plant material. Corn (*Zea mays* L.), TGH variety, from the Provincial Seed Enterprise of Sancti Spíritus

2008).

Ante cualquier estrés abiótico existe decrecimiento significativo en la fotosíntesis y, consecuentemente, reducción en la cantidad de metabolitos y energía. Es muy importante para las plantas usar esta reducida cantidad de recursos para maximizar su crecimiento y potencial reproductivo (Timmusk *et al.* 2014). Las rizobacterias pueden contribuir a que las plantas toleren mejor los efectos de la sequía. Entre las rizobacterias, los rizobios ocupan un lugar importante en la inducción de tolerancia a estrés en las plantas (Stiens *et al.* 2006).

El hongo filamentoso *Trichoderma spp.*, es un antagonista eficaz contra fitopatógenos (Howell 1998). Otros estudios han indicado la inducción de mecanismos de defensa en las plantas por este hongo, así como su actividad promotora del crecimiento vegetal (Saber *et al.* 2009 y Shaban y El-Bramawy 2011). Existen antecedentes del efecto positivo de *T. harzianum* en trigo, al combinarse con rizobios (Bécquer *et al.* 2015) y en triticale en condiciones de sequía agrícola (Bécquer *et al.* 2016b).

El objetivo de este trabajo fue evaluar variables agroproductivas de *Zea mays* L., al que se le aplicaron inóculos de *Bradyrhizobium sp.* y *Trichoderma harzianum* en diferentes combinaciones y de forma simple, y así seleccionar las mejores opciones para su aplicación práctica.

Materiales y Métodos

Localización del experimento. El experimento se realizó de febrero a mayo de 2016, en una parcela experimental perteneciente a la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus, situada a 21°53' 00" de latitud norte y a 79°21' 25" de longitud oeste, a 40 msnm.

Clima y suelo. Los datos de temperatura, precipitaciones y humedad relativa se tomaron de la Estación Meteorológica Sancti Spíritus (CMP 2016). Las precipitaciones en la zona de estudio tuvieron comportamiento irregular (figura 1). Durante enero y abril fueron superiores a los valores históricos, mientras que febrero, marzo y mayo tuvieron valores muy inferiores. El período experimental se caracterizó por el predominio de altas temperaturas, sobre todo en abril. Existió alta humedad relativa en enero, pero relativamente baja en los meses restantes, especialmente en febrero, marzo y abril, lo que coincidió con la siembra y desarrollo del cultivo (tabla 1).

El suelo del área experimental correspondió al tipo pardo mullido carbonatado, de arcilla parda a pardo ligeramente oscuro, con reacción ligera al HCl. Presenta algunas gravas en el horizonte A1, drenaje superficial e interno bueno, medianamente erosionable (Hernández *et al.* 2015). El contenido de macronutrientes fue bajo en fósforo y potasio (2.63 mg/100 g de P_2O_5 y 6.0 mg/100 g de K_2O), así como en materia orgánica (1.51 %). El pH fue ligeramente ácido (5.9).

Material vegetal. Se evaluó maíz (*Zea mays* L.),

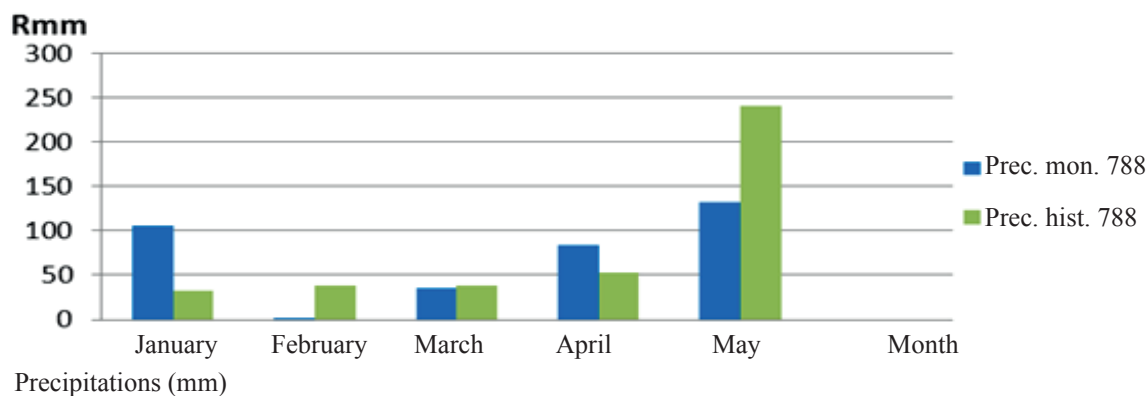


Figure 1. Distribution of precipitation by months and historical rainfall from January / 2016 to May / 2016

Table 1. Temperature and humidity data in the experimental area. Year 2016

Month	Average minimum temperature, °C	Average maximum temperature, °C	Average temperature, °C	Average relative humidity, %
January	16.8	30.5	23.2	83.9
February	16.3	27.4	21.3	77.6
March	19.0	30.6	24.2	76.2
April	19.3	31.6	25.9	73.0

was evaluated. In the province, this cereal has a history of high yields when inoculated with rhizobia (Bécquer *et al.* 2011) and constitutes, jointly with meadow grasses, one of the possible alternatives for animal feeding in Cuba.

Soil preparation, sowing, irrigation and control of pests and diseases. Conventional culture labors were carried out: plow, harrow, cross, cross again, harrow and furrow. The sowing of the experiment was carried out on the second third of January and harvested in the third ten of April. The sowing dose was of 12 kg/ha with drilling machine. The sowing frame was of 70 cm between furrows. Each plot measured 2.10 m x 4 m, with three furrows per plot. The samples were taken in the middle furrow (5 samples/plot/replication) and the remaining furrows were considered as border effect.

In the experiment, the irrigation was applied four times, twice during February, one in March, and another in April, at a rate of 100 m³/ha in each irrigation, in such a way that only favored the survival of the rhizospheric microorganisms that were introduced. This frequency of irrigation only constitutes 30 % of the average number of irrigation, as well as 22.8 % of the total volume (1775.4 m³/ha) used by Montero *et al.* (2012), in corn. At 95 days of sowing, the harvest was manually conducted.

Four applications of *Bacillus thuringiensis* biovar 26 were performed. from 15 days of sowing, every 7 days, at a rate of 6 L/ha. The biopreparation was applied with a sprinkler whose spout was directed to all parts of the plant, with emphasis on the leaf part, in a dilution with water of 1:15 until reaching 16 L of total volume with an initial titre of 10⁹ spores/mL (Central Pesticide

variedad TGH, procedente de la Empresa Provincial de Semillas de Sancti Spiritus. En la provincia, este cereal tiene antecedentes de altos rendimientos al inocularse con rizobios (Bécquer *et al.* 2011) y constituye, conjuntamente con las gramíneas pratenses, una de las alternativas posibles para la alimentación animal en Cuba.

Preparación del suelo, siembra, riego y control de plagas y enfermedades. Se realizaron labores convencionales de cultivo: roturación, grada, cruce, recrude, grada y surcado. La siembra del experimento se realizó en la segunda tercera decena de enero y se cosechó en la tercera decena de abril. La dosis de siembra fue de 12 kg/ha, a chorrillo espaciado. El marco de siembra fue de 70 cm entre surcos. Cada parcela midió 2.10 m x 4 m, con tres surcos por parcelas. Las muestras se tomaron en el surco del medio (5 muestras/parcela/réplica) y se consideraron los surcos restantes como efecto de borde.

En el experimento, el riego se aplicó cuatro veces, dos veces durante febrero; una en marzo y otra en abril, a razón de 100 m³/ha en cada riego, de forma tal que solo favoreciera la supervivencia de los microorganismos rizosféricos introducidos. Esta frecuencia de riego solo constituye 30 % del número promedio de riego, así como 22.8 % del volumen total (1775.4 m³/ha) utilizado por Montero *et al.* (2012) en maíz. A los 95 d de siembra, se realizó la cosecha de forma manual.

Se realizaron cuatro aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* biovar. 26, a partir de los 15 d de siembra, cada 7 d, a razón de 6 L/ha. El biopreparado se aplicó con un aspersor, cuyo surtidor fue dirigido a todas las partes de la planta, con énfasis en la parte foliar, en una dilución con agua de 1:15 hasta llegar a 16 L de volumen

Registry 2008).

Microorganisms. The strain Ho13 belonging to *Bradyrhizobium sp.* genus (Bécquer *et al.* 2016a) was applied which is microsimbion of *Centrosema virginianum*, legume from an arid livestock ecosystem of Holguín, Cuba. The product TRICHOSAVE 34 (LABIOFAM S.A.), composed of a shell and rice head substrate inoculated with sporulated mycelia of *Trichoderma harzianum* A-34, was also used.

Preparation of Bradyrhizobium inocula. The strains grew in solid yeast-mannitol medium (Vincent 1970) and they were re-suspended in liquid medium until reaching cell concentration of 10^6 – 10^8 UFC/mL. For the inoculation of plants, the inoculum was diluted in a 1:10 ratio in 0.9 % saline solution.

Preparation of Trichoderma inocula. The aforementioned product, by technical recommendation of the manufacturer, was added to water, at a rate of 35 g/L. It was filtered with gauze before inoculating the plants (1 – 2×10^9 conidia/g) and subsequently. The conidial suspensions were inoculated to the plants according to the treatment used, in a simple way, or in combination with the bacterial inocula. The final title of the suspension (10^6 – 10^8 conidia/mL) was used according to what was proposed by Wolffecheel and Funck-Jensen (1992).

Inoculation of plants with Bradyrhizobium. The inoculation was carried out when the seed germinates (6 d), for which a graduated burette was used, whose content was poured on the newly germinated plants, so that when regulating the spout each plant received approximately 8-10 mL of the liquid inoculum. The re-inoculation of the treatments was performed at 15 d of sowing.

Inoculation of plants with Trichoderma. The inoculation was carried out when germinating the seed (6 d), with a dose equivalent to 250 L/ha of that solution. The same procedure was used as for the *Bradyrhizobium* inoculum. The re-inoculation of the treatments was conducted at 15 d of sowing.

Fractional inoculation. It was carried out according to the treatment, 15 d after the initial inoculum of the microorganism was applied.

Determination of the agricultural drought state. It was performed using the aridity index or agricultural drought index (EI), according to Solano and Vázquez (1999). This was used to check if the experiment was carried out under water stress conditions:

$$EI = AET / PET$$

were:

E o AET: Estimated actual evapotranspiration, dependent on soil humidity state.

Eo o PET: Estimated potential evapotranspiration, dependent on atmospheric conditions.

When $AET = PET$, the water supply of the soil is adequate. When $AET < PET$ there is insufficient water.

It was observed that the highest losses of soil

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 51, Number 4, 2017.

total con un título inicial de 10^9 esporas/mL (Registro Central de Plaguicidas 2008).

Microorganismos. Se aplicó la cepa Ho13, perteneciente al género *Bradyrhizobium sp.* (Bécquer *et al.* 2016a) microsimbionte de *Centrosema virginianum*, leguminosa procedente de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Se utilizó también el producto TRICHOSAVE 34 (LABIOFAM S.A.), compuesto por un sustrato de cáscara y cabecilla de arroz, inoculado con micelios esporulados de *Trichoderma harzianum* A-34.

Preparación de los inóculos de Bradyrhizobium. Las cepas crecieron en medio sólido levadura-manitol (Vincent 1970) y se resuspendieron en medio líquido hasta lograr concentración celular de 10^6 – 10^8 UFC/mL. Para la inoculación de las plantas, se procedió a diluir el inóculo en proporción 1:10 en solución salina 0.9 %.

Preparación de los inóculos de Trichoderma. El producto antes mencionado, por recomendación técnica del fabricante, se añadió a agua corriente, a razón de 35 g/L. Se filtró con gasa antes de inocular las plantas (1 – 2×10^9 conidios/g) y posteriormente. Las suspensiones conidiales se inocularon a las plantas de acuerdo con el tratamiento utilizado, de forma simple, o en combinación con los inóculos bacterianos. El título final de la suspensión (10^6 – 10^8 conidios/mL) se utilizó de acuerdo con lo planteado por Wolffecheel y Funck-Jensen (1992).

Inoculación de las plantas con Bradyrhizobium. La inoculación se realizó al germinar la semilla (6 d), para lo cual se utilizó una bureta graduada, cuyo contenido se vertió sobre las plantas recién germinadas, de forma que al regular el surtidor cada planta recibió aproximadamente 8-10 mL del inóculo líquido. La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 15 d de siembra.

Inoculación de las plantas con Trichoderma. La inoculación se realizó al germinar la semilla (6 d), con una dosis equivalente a 250 L/ha de dicha solución. Se utilizó el mismo procedimiento que para el inóculo de *Bradyrhizobium*. La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 15 d de siembra.

Inoculación fraccionada. Se realizó de acuerdo con el tratamiento, a los 15 d de aplicado el inóculo inicial del microorganismo.

Determinación del estado de sequía agrícola. Se realizó mediante el índice de aridez o índice de sequía agrícola (IE), según Solano y Vázquez (1999). Este se utilizó para comprobar si el experimento se efectuaba en condiciones de estrés hídrico:

$$IE = ETR / ETP$$

donde:

E o ETR: Evapotranspiración real estimada, dependiente del estado de humedad del suelo.

Eo o ETP: Evapotranspiración potencial estimada, dependiente de las condiciones atmosféricas.

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

Se observó que las mayores pérdidas de humedad

humidity occurred in February and April (table 2), moment when the harvest was carried out. The state of agricultural drought, in January, March and April with an EI from regular to insufficient. In February, it reached the category of insufficient to critical (table 2). It is considered, therefore, that the crop was subjected to high water stress (CMP 2016).

Treatments, experimental design and statistical analysis.

del suelo ocurrieron en febrero y abril (tabla 2), momento en que se realizó la cosecha. El estado de la sequía agrícola, en enero, marzo y abril con un IE de regular a insuficiente. En febrero alcanzó la categoría de insuficiente a crítico (tabla 2). Se considera, por lo tanto, que el cultivo estuvo sometido a un alto estrés hídrico (CMP 2016).

Tratamientos, diseño experimental y análisis

Table 2. Humidity content in the soil and estimated values of PET and AET (2016)

Month	Initial humidity, %	Final humidity, %	PET	AET	EI
January	72.5	61.2	3.3	1.5	I
February	61.2	10.3	4.2	1.1	I - C
March	10.3	12.0	5.1	1.5	I
April	12.0	2.3	5.2	2.5	I

I: Insufficient I-C: Insufficient to Critical R: Regular

Table 3 shows the treatments used in the experiment.

A randomized block experimental design was used, with seven treatments and three replications. ANOVA analysis was performed. The differences between means were determined by LSD of Fisher (Fisher 1935).

The values with digit count were transformed by $\sqrt{x}$ and the percentage data by $2\arccos\sqrt{P}$ (Ruesga *et al.* 2005). The statistical program StatGraphics Centurion (Stat Point Technologies 2010) was used.

Variables evaluated. They were taken at the time of harvest by replication and treatment. It was determined

estadístico. La tabla 3 presenta los tratamientos utilizados en el experimento.

Se empleó un diseño experimental de bloques al azar, con siete tratamientos y tres réplicas. Se realizó análisis de ANOVA. Las diferencias entre medias se determinaron por LSD de Fisher (Fisher 1935). Los valores con conteo de dígitos se transformaron por $\sqrt{x}$ y los datos porcentuales por $2\arccos\sqrt{P}$ (Ruesga *et al.* 2005). Se utilizó el programa estadístico StatGraphics Centurion (Stat Point Technologies 2010).

Variables evaluadas. Se tomaron al momento de la

Table 3. Treatments used in the experiment

Nu.	Treatments
1	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (Ho13) when germinating the seed
2	Trichoderma when germinating the seed (Trichoderma)
3	<i>Bradyrhizobium sp.</i> +Trichoderma when germinating the seed (Ho13+Trichoderma)
4	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (when germinating the seed)+Trichoderma at 15 d of sowing (Ho13+Trich.15d.)
5	Trichoderma (when germinating the seed) + <i>Bradyrhizobium sp.</i> , at 15 d of sowing (Trich.+Ho13.15d.)
6	Absolute control (A.C)
7	Fertilized control (F.C) 150 kgN/ha

dry weight of the aerial part (foliage without corn cob, DWAP, g / m²); stem length (SL, m); number of leaves / plant (NL); grain yield (GY, kg / ha, extrapolated); corn cob length (CL, cm); dry weight of the corn cob (DWC, g); weight of 1000 grains (P1000G., g) and inoculation efficiency index (IEI, %) according to Santillana *et al.* (2012):

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

Results and Discussion

Stem length (m). Table 4 shows that the Ho13 + Trichoderma (2.03 m) treatment showed higher values

cosecha por réplica y tratamiento. Se determinó peso seco de la parte aérea (follaje sin mazorcas, PSPA, g/m²); longitud del tallo (LT, m); número de hojas/planta (NH); rendimiento de grano (RG, kg/ha, extrapolado); longitud de la mazorca (LM, cm); peso seco de la mazorca (PSM, g); peso de 1000 granos (P1000G., g) e índice de eficiencia de la inoculación (IEI, %) según Santillana *et al.* (2012):

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

Resultados y Discusión

Longitud del tallo (m). La tabla 4 muestra que el

($P < 0.05$) compared to the absolute control (1.84 m) and fertilized control (1.83 m), while shared common superscripts with the rest of treatments. According to Mia and Shamsuddin (2010), the synthesis of auxins by rhizobia has been widely showed, so it is not ruled out that in the Ho13 strain there was strong activity of these enzymes. It is possible that the Bradyrhizobium strain, which was applied in different variants, positively influenced on this variable by the emission of these plant growth stimulating substances, although Pecina-Quintero *et al.* (2005) considered that the response of the plant to inoculation depends on several factors, among which is the plant genotype. The Trichoderma performance is not obvious, since diverse authors (Tsavkelova *et al.* 2006) showed that molecules similar to cytokinin (substance that stimulates cell division in plants), possibly, kinetin, can be produced by *T. viride*. According to Stewart and Hill (2014), *T. harzianum* induces growth promotion in many commercial plant species.

Number of leaves/plant. The treatment inoculated with Ho13 (3.90) strain showed common superscripts in Trichoderma and Trich. + Ho13.15d. (3.84, respectively) in the number of leaves/plant, but it was higher ($P < 0.001$) than the rest of treatments (table 4). Cho *et al.* (2008) and Yang *et al.* (2008) considered that the response of plants to water stress includes an increase in abscisic acid (ABA), which causes the closure of stoma to minimize water loss. Due to the crop was subjected to this type of stress, it can be deduced that Bradyrhizobium, being in the rhizobacteria group with induction properties of systemic tolerance to environmental stress, produced cytokinins that counteracted the negative effect of abscisic acid in the leaves. It is known that the colonization by Trichoderma also frequently improves the growth of roots and influences on the crop productivity, as well as the resistance to abiotic stress and the intake and use of soil nutrients (Saba *et al.* 2012).

Dry weight aerial part (kg/m²). For this variable (table 4), inoculated treatments were inferior or shared common superscripts with absolute control (2.90 kg/m²) and fertilized control (2.80 kg/m²). The absolute control and the fertilized control shared common superscripts with two of the inoculated treatments and were superior to the rest, which suggests that there was no proven effect of the treatments inoculated in this variable. In addition, there was deficient absorption of mineral nitrogen by the plant in the fertilized control, perhaps caused by the lack of humidity necessary for this process, derived from the drought stress to which the experimental crop was submitted. The humidity values in the experimental period should have implied an increase in the evapotranspiration of plants, which increases the water demand and consequently, generates higher water stress in the crops (CMP 2016). Nisha *et*

tratamiento Ho13+Trichoderma (2.03 m) presentó valores superiores ($P < 0.05$) en comparación con el control absoluto (1.84 m) y testigo fertilizado (1.83 m), mientras que compartió superíndices comunes con el resto de los tratamientos. Según Mia y Shamsuddin (2010), la síntesis de auxinas por los rizobios ha sido ampliamente demostrada, por lo que no se descarta que en la cepa Ho13 existiera fuerte actividad de estas enzimas. Es posible que la cepa de Bradyrhizobium, que se aplicó en diferentes variantes, influyera positivamente en esta variable por la emisión de dichas sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, aunque Pecina-Quintero *et al.* (2005) consideraron que la respuesta de la planta a la inoculación depende de factores diversos, entre los que se encuentra el genotipo de la planta. No se obvia el desempeño de Trichoderma, ya que autores diversos (Tsavkelova *et al.* 2006) demostraron que moléculas similares a citoquinina (sustancia que estimula la división celular en las plantas), posiblemente, quinentina, pueden ser producidas por *T. viride*. Según Stewart y Hill (2014), *T. harzianum* induce la promoción del crecimiento en muchas especies comerciales de plantas.

Número de hojas/planta. El tratamiento inoculado con la cepa Ho13 (3.90) mostró superíndices comunes en Trichoderma y Trich.+Ho13.15d. (3.84, respectivamente) en el número de hojas/planta, pero resultó superior ($P < 0.001$) al resto de los tratamientos (tabla 4). Cho *et al.* (2008) y Yang *et al.* (2008) consideraron que la respuesta de las plantas al estrés hídrico incluye incremento en el ácido abscísico (ABA), que causa el cierre de los estomas para minimizar la pérdida de agua. Debido a que el cultivo se sometió a ese tipo de estrés, se deduce que Bradyrhizobium, al estar en el grupo de rizobacterias con propiedades de inducción de tolerancia sistémica al estrés ambiental, produjo citoquininas que contrarrestaron el efecto negativo del ácido abscísico en las hojas. Se conoce que la colonización que realiza Trichoderma también mejora, frecuentemente, el crecimiento de las raíces e influye en la productividad del cultivo, así como en la resistencia al estrés abiótico y a la toma y uso de los nutrientes del suelo (Saba *et al.* 2012).

Peso seco parte aérea (kg/m²). Para esta variable (tabla 4), los tratamientos inoculados fueron inferiores o compartieron superíndices comunes con el control absoluto (2.90 kg/m²) y testigo fertilizado (2.80 kg/m²). El control absoluto y el testigo fertilizado compartieron superíndices comunes con dos de los tratamientos inoculados y fueron superiores al resto, lo que sugiere que no hubo efecto probado de los tratamientos inoculados en dicha variable. Además hubo deficiente absorción de nitrógeno mineral por parte de la planta en el testigo fertilizado, quizás provocado por la falta de humedad necesaria para dicho proceso, derivada del estrés de sequía al que se sometió el cultivo experimental. Los valores de humedad en el período experimental debieron implicar incremento de la evapotranspiración de las plantas, lo que hace crecer la demanda de agua y por

al. (2007) commented that arid and semi-arid regions, as well as deserts, have physical properties in the soil that are very poor, as well as low fertility and water deficiency.

Inoculation efficiency index based on aerial dry weight (%). Although in the variable that was previously discussed, the values of treatments Trich. + Ho1315d. and Ho13 statistically equaled those of absolute control, the inoculation efficiency index (table 4) showed moderate increase of these values (2.76 and 3.45 %, respectively) in comparison with absolute control. However, these percentages are lower than those obtained by Antoun and Prévost (2000) with commercial strains of *Bradyrhizobium japonicum*, with increases in the ADW of the plant from 6.7 % to 8.7. Contradictorily, Cassán *et al.* (2009) reported about a strain of *Bradyrhizobium japonicum* that stimulated germination and incipient development of the aerial part of corn. This strain produced abundant indoleacetic acid, zeatin and gibberellic acid. It is inferred that the *Bradyrhizobium* strain used in this experiment did not exert the necessary effect on the aerial part of the plant, perhaps due to the insufficient production of hormones, since a negative increase of the treatments was observed with respect to absolute control.

Corn cob length (cm). In this variable (table 5), the

consecuente, genera mayor estrés hídrico en los cultivos (CMP 2016). Nisha *et al.* (2007) comentaron que las regiones áridas y semiáridas, así como los desiertos, tienen propiedades físicas en el suelo que resultan muy pobres, además de baja fertilidad y deficiencia de agua.

Índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco aéreo (%). Aunque en la variable que se discutió anteriormente, los valores de los tratamientos Trich.+Ho1315d. y Ho13 igualaron estadísticamente a los del control absoluto, el índice de eficiencia de la inoculación (tabla 4) mostró moderado incremento de estos valores (2.76 y 3.45 %, respectivamente) en comparación con el control absoluto. No obstante, estos porcentajes son inferiores a los que obtuvieron Antoun y Prévost (2000) con cepas comerciales de *Bradyrhizobium japonicum*, con incrementos en el PSA de la planta desde 6.7 % hasta 8.7. Contradictoriamente, Cassán *et al.* (2009) informaron sobre una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* que estimuló la germinación y el desarrollo incipiente de la parte aérea de maíz. Esta cepa produjo abundante ácido indolacético, zeatina y ácido giberélico. Se infiere que la cepa de *Bradyrhizobium* utilizada en este experimento no ejerció el efecto necesario en la parte aérea de la planta, quizás por la insuficiente producción de dichas hormonas, pues se observó incremento negativo de los tratamientos con respecto al control absoluto.

Table 4. Results obtained in stem length (SL), number of leaves NL/plant), dry weight of the aerial part (DWAP) and inoculation efficiency index based on the DWAP (IEIDWAP)

Treatments	SL, m	NL/plant		DWAP, kg/m ²	IEIDWAP, %
		Transformed data, $\sqrt{x}$	Not transformed data		
Ho13	1.97 ^{ab}	3.90 ^a	15	2.98 ^a	2.76
Trichoderma	1.90 ^{abc}	3.84 ^{ab}	15	2.10 ^c	-27.59
Ho13+Trichoderma	2.03 ^a	3.73 ^d	14	2.03 ^b	-30.00
Ho13+Trichod.15d.	1.95 ^{abc}	3.76 ^d	14	2.50 ^b	-13.79
Trich.+Ho13. 15d.	1.96 ^{abc}	3.84 ^{ab}	15	3.00 ^a	3.45
A.C	1.84 ^{bc}	3.83 ^{bc}	15	2.90 ^a	
F.C	1.83 ^c	3.77 ^{cd}	14	2.80 ^a	
Significance	p<0.05	p<0.001		p<0.001	
S.E.	0.05	0.03		0.12	
S.D.	0.15	0.01		0.43	

^{abcd} Different letters per column differ at P<0.001 (Duncan 1955)

treatments inoculated with Ho13 + Trich. 15d. (20.38 cm) and Trich. + Ho13 15d. (20.67 cm) showed superscripts higher (P<0.001) to absolute control (18.15 cm) and to the fertilized control (18.14 cm), as well as to the rest, except Ho13 (19.65 cm), with which shared common superscripts.

It is notable that these inoculated treatments were superior to the fertilized control, which was also achieved in stem length (table 4) with the Ho13 + Trichoderma treatment. Diverse can be the mechanisms by which the rhizobia can positively affect the crops. Ahmad *et*

Longitud de la mazorca (cm). En esta variable (tabla 5), los tratamientos inoculados con Ho13+Trich.15d. (20.38 cm) y Trich.+Ho1315d. (20.67 cm) mostraron superíndices superiores (P<0.001) al control absoluto (18.15 cm) y al testigo fertilizado (18.14 cm), así como al resto, excepto Ho13 (19.65 cm), con el que compartió superíndices comunes.

Es notable que estos tratamientos inoculados fueron superiores al testigo fertilizado, lo que se logró también en la longitud del tallo (tabla 4) con el tratamiento Ho13+Trichoderma. Diversos pueden ser

Table 5. Results obtained in corncob length, dry weight of the corncob, grain yield, inoculation efficiency index based on GY and weight of 1000 grains

Treatments	CL, cm	DWC, g	GY, t/ha	IEIGY, %	W1000G., g
Ho13	19.65 ^{ab}	101.37 ^c	1.49 ^{ab}	34.23	113.45 ^c
Trichoderma	18.73 ^{bc}	120.30 ^a	1.18 ^{cde}	6.31	118.27 ^c
Ho13+Trichoderma	18.90 ^{bc}	118.25 ^a	1.05 ^e	-5.41	118.47 ^c
Ho13+Trichod.15d.	20.38 ^a	110.50 ^b	1.27 ^{cd}	14.41	112.40 ^c
Trich.+Ho13.15d.	20.67 ^a	119.90 ^a	1.58 ^a	42.34	148.13 ^a
A.C	18.15 ^c	92.10 ^d	1.11 ^{de}		84.90 ^d
F. C	18.14 ^c	93.50 ^d	1.35 ^{bc}		132.65 ^b
Significance	p<0.001	p<0.001	p<0.001		p<0.001
S.E.	0.508	0.259	0.065		3.326
S.D.	1.735	13.182	0.209		19.071

^{abcd}Different letters per column differ at P<0.001 (Duncan 1955)

al. (2008) found that 80 % of dinitrogen fixing bacteria produce indoleacetic acid. This growth substance leads to the increase of total phenols, calcium content and the activity of the polyphenol oxidase enzyme, which protects the plant against pathogens and improves its growth by eliminating reactive oxygen species that are formed in the plant from a water stress (Chowdhury 2003).

It is obvious to note that the application of Trichoderma at the time of sowing and at 15 d led to statistically higher values, so it is inferred that this fungus exerted a stimulating effect on this variable. According to Gravel *et al.* (2006), *T. atroviride* can produce and degrade indoleacetic acid (IAA), the most common auxin phytohormone in plants, in addition to possessing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid diaminase activity, which can control the ethylene production of in the plant under water stress.

Dry weight of the corncob (g). For this variable, the treatments inoculated with Trichoderma (120.30 g), Ho13 + Trichoderma (118.25 g) and Trich. + Ho1315d. (119.90 g) were statistically higher (P<0.001) to absolute control (92.10 g) and to the rest of the treatments (table 5).

Bécquer *et al.* (2011) obtained promising results in this variable, when inoculating corn in a field experiment with *Bradyrhizobium sp.*, strains isolated in stressful livestock ecosystems from Sancti Spíritus, Cuba. The simple application of Trichoderma favored this variable, which may be linked to the fact that the production of organic acids by Trichoderma favors the solubilization of phosphates, micronutrients and mineral cations, such as iron, manganese and magnesium, which is why the plant absorbs them better (Harman *et al.* (2004).

The combination of *Bradyrhizobium sp.* strain with Trichoderma positively influenced on the variable that is described. If the water stress to which the experiment was subjected is taken into account, it is completely logical to infer that the Trichoderma strain, applied, especially, in synergy with *Bradyrhizobium*, exerted a

los mecanismos mediante los cuales los rizobios pueden incidir positivamente en los cultivos. Ahmad *et al.* (2008) encontraron que 80 % de las bacterias fijadoras de dinitrógeno producen ácido indolacético. Esta sustancia de crecimiento conlleva al aumento de fenoles totales, contenido de calcio y actividad de la enzima polifenol oxidasa, que protege la planta contra patógenos y mejora su crecimiento mediante la eliminación de las especies reactivas del oxígeno que se forman en la planta a partir de un estrés hídrico (Chowdhury 2003).

Es obvio notar que la aplicación de Trichoderma en el momento de la siembra y a los 15 d conllevó a valores estadísticamente superiores, por lo que se infiere que este hongo ejerció efecto estimulador en esta variable. Según Gravel *et al.* (2006), *T. atroviride* puede producir y degradar ácido indolacético (AIA), la fitohormona auxínica más común en las plantas, además de poseer actividad de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico diaminasa, que puede controlar la producción de etileno en la planta bajo estrés hídrico.

Peso seco de la mazorca (g). Para esta variable, los tratamientos inoculados con Trichoderma (120.30 g), Ho13+Trichoderma (118.25 g) y Trich. +Ho1315d. (119.90 g) fueron estadísticamente superiores (P<0.001) al control absoluto (92.10 g) y al resto de los tratamientos (tabla 5).

Bécquer *et al.* (2011) obtuvieron resultados promisorios en esta variable, al inocular maíz en un experimento de campo con cepas de *Bradyrhizobium sp.*, aisladas en ecosistemas ganaderos estresantes de Sancti Spíritus, Cuba. La aplicación simple de Trichoderma favoreció esta variable, lo que puede estar vinculado a que la producción de ácidos orgánicos por parte de Trichoderma favorece la solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes minerales, como hierro, manganeso y magnesio, por lo que la planta los absorbe mejor (Harman *et al.* (2004).

La combinación de la cepa de *Bradyrhizobium sp.* con Trichoderma influyó positivamente en la variable que se describe. Si se tiene en cuenta el estrés hídrico al cual se sometió el experimento, es completamente

positive effect on the plants based on these biochemical bases.

Grain yield (t/ha). This variable (table 5) showed that the treatment inoculated with Ho13 (1.49 t/ha) and the treatment inoculated with the combination Trich. + Ho13. 15d. (1.58 t/ha) were higher ($P < 0.001$) to the rest, in which the fertilized control is included (1.35 t/ha).

In the treatments where, at the same time, the *Bradyrhizobium* and *Trichoderma* strain, as well as *Bradyrhizobium*, were applied, in a simple way, they showed higher results, even with respect to the fertilized control. Many rhizobacteria contain the enzyme 1-aminociclopropano-1-carboxylic acid (CCA) diaminase, which cleaves the CCA precursor, ethylene, into α -ketobutyrate and ammonium. Therefore, it reduces the levels of ethylene in plants subjected to stress (van Loon 2007), which allows the root system can develop without the inhibition of this compound. This promotes higher absorption of nutrients by the plant.

The positive results of the treatment with *Trichoderma* at the time of sowing and *Bradyrhizobium sp.* at 15 d, it could be due to the cellulolytic effect of *Trichoderma* on the roots, which allowed effective infection by the bacteria.

Inoculation efficiency index based on GY (IEIGY, %). In this variable (table 5) the results in the grain yield were corroborated, since the treatments Ho13 (34.23 %) and Trich. + Ho13.15d. (42.34 %) showed higher increases than the rest. Cardoso *et al.* (2007), reported increases of 11 % in corn grain yield, when inoculated with rhizobia. According to Mia and Shamsuddin (2010), inoculation with rhizobia produced a 16 % increase in grain yield in the different varieties of rice. The combination Ho13 + *Trichoderma* showed negative results, which indicates no influence of this treatment on the grain yield. The fact that the microbial combination described above did not positively influence on this variable, despite its higher results in stem length and dry weight of the corncob, could indicate that the metabolites derived from these microorganisms in this combination did not intervene in the filling of grains. Salinas and Soriano (2014) observed that the coinoculation of *T. viride* and *Bradyrhizobium yuanmingense* in *Capsicum annuum* did not result in higher values for length of stem, leaf, number of lateral roots and dry weight of the aerial part, and it result for root length and dry weight of the radicular part. This could show some inconsistency of the effect of microbial combinations on plants.

Weight of 1000 grains (P1000G). It was state that the treatment inoculated with Trich. + Ho13.15d. (148.13 g) was statistically higher to the rest (table 5). In this variable it was also observed that this treatment showed higher results, so that grain quality was also influenced by the mechanisms described by Kumari *et al.* (2009) about the absorption of nutrients by the plant,

lógico inferir que la cepa de *Trichoderma*, aplicada, sobre todo, en sinergia con *Bradyrhizobium*, ejerció efecto positivo en las plantas sobre la base de estos fundamentos bioquímicos.

Rendimiento de grano (t/ha). Esta variable (tabla 5) mostró que el tratamiento inoculado con Ho13 (1.49 t/ha) y el tratamiento inoculado con la combinación Trich.+Ho13. 15d. (1.58 t/ha) fueron superiores ($P < 0.001$) al resto, en los que se incluye el testigo fertilizado (1.35 t/ha).

En los tratamientos donde se aplicó, al mismo tiempo, la cepa de *Bradyrhizobium* y *Trichoderma*, así como *Bradyrhizobium*, de forma simple, mostraron resultados superiores, incluso con respecto al testigo fertilizado. Muchas rizobacterias contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) diaminasa, la cual escinde el precursor del ACC, el etileno, en α -cetobutirato y amonio. Por lo tanto, reduce los niveles de etileno en las plantas sometidas a estrés (van Loon 2007), lo que permite que el sistema radical pueda desarrollarse sin la inhibición propia de este compuesto. Esto propicia una mayor absorción de nutrientes por la planta.

Los resultados positivos del tratamiento con *Trichoderma* en el momento de la siembra y *Bradyrhizobium sp.* a los 15 d se pudiera deber al efecto celulolítico de *Trichoderma* en las raíces, lo que permitió la infección efectiva por parte de la bacteria.

Índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del RG (IEIRG, %). En esta variable (tabla 5) se corroboraron los resultados en el rendimiento de grano, ya que los tratamientos Ho13 (34.23%) y Trich.+Ho13.15d. (42.34%) mostraron incrementos superiores al resto. Cardoso *et al.* (2007), informaron incrementos de 11% en el rendimiento de grano de maíz, al inocular con rizobios. Según Mia y Shamsuddin (2010), la inoculación con rizobios produjo incremento de 16 % en el rendimiento de grano en las diferentes variedades de arroz. La combinación Ho13+*Trichoderma* mostró resultados negativos, lo que indica nula influencia de dicho tratamiento en el rendimiento de grano. El hecho de que la combinación microbiana antes descrita no influyó positivamente en esta variable, a pesar de sus resultados superiores en longitud del tallo y peso seco de la mazorca, pudiera indicar que los metabolitos derivados de estos microorganismos en dicha combinación no intervinieron en el llenado de los granos. Salinas y Soriano (2014) observaron que la coinoculación de *T. viride* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en *Capsicum annuum* no resultó en valores superiores para longitud de tallo, hoja, número de raíces laterales y peso seco de la parte aérea, y sí para longitud de raíz y peso seco de la parte radicular. Esto pudiera indicar cierta inconsistencia del efecto de las combinaciones microbianas en las plantas.

Peso de 1000 granos (P1000G). Se constató que el tratamiento inoculado con Trich.+Ho13.15d. (148,13 g) fue estadísticamente superior al resto (tabla 5). En esta variable también se observó que dicho tratamiento presentó resultados superiores, por lo que

due to the stimulatory action on the root by the PGPRs. Mehboob (2010), when applying *Mesorhizobium ciceri* strains in corn under greenhouse conditions, obtained statistically higher values than the non-inoculated control. It is possible that the cellulolytic action of *Trichoderma* on the walls of the root system, or its biocontrol effect, allowed the survival of *Bradyrhizobium*, as well as its stimulating effect on the plant.

It is concluded that, in general, the productivity of the crop was increased when inoculated with the simple application of *Bradyrhizobium sp.* (Ho13), as in combination with *Trichoderma harzianum*. The variables with the best response to the treatments inoculated were: dry weight of the corn cob, corn cob length and grain yield. The fertilized treatment was inferior to the treatments inoculated in the variables dry weight of the corn cob and weight of 1000 grains. The treatments with higher results in the studied variables were Ho13 and Trich. + Ho13. 15 d., which are recommended to apply in agricultural practice under environmental conditions similar to those of this experiment.

la calidad del grano tuvo también la influencia de los mecanismos descritos por Kumari *et al.* (2009) acerca de la absorción de nutrientes por la planta, debido a la acción estimuladora sobre la raíz por los PGPRs. Mehboob (2010), al aplicar cepas de *Mesorhizobium ciceri* en maíz en condiciones de invernadero, obtuvo valores estadísticamente superiores al control no inoculado. Es posible que la acción celulolítica de *Trichoderma* en las paredes del sistema radical, o su efecto biocontrolador, permitiera la supervivencia de *Bradyrhizobium*, así como su efecto estimulador en la planta.

Se concluye que, en general, se incrementó la productividad del cultivo al ser inoculado con la aplicación simple de *Bradyrhizobium sp.* (Ho13), como en combinación con *Trichoderma harzianum*. Las variables con mejor respuesta a los tratamientos inoculados fueron: peso seco de la mazorca, longitud de la mazorca y rendimiento de grano. El tratamiento fertilizado fue inferior a los tratamientos inoculados en las variables peso seco de la mazorca y peso de 1000 granos. Los tratamientos con resultados superiores en las variables estudiadas fueron Ho13 y Trich.+Ho13. 15 d., los que se recomiendan aplicar en la práctica agrícola en condiciones ambientales similares a las de este experimento.

References

- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M. S. 2008. "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities". Microbiological Research, 163(2): 173–181, ISSN: 0944-5013, DOI: 10.1016/j.micres.2006.04.001.
- Antoun, H. & Prévost, D. 2000. "PGPR activity of Rhizobium with nonleguminous plants". In: V International PGPR workshop, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), p. 62, DOI: 10.13140/2.1.3093.7609, Available: <https://www.researchgate.net/publication/267041638_PGPR_ACTIVITY_OF_RHIZOBIUM_WITH_NONLEGUMINOUS_PLANTS>, [Consulted: October 25, 2017].
- Bécquer, C. J., Galdo, Y., Ramos, Y., Peña, M. D., Almaguer, N., Peña, Y. F., Mirabal, A., Quintana, M. & Puentes, A. 2016a. "Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Nodulación y evaluación morfofocultural (fase I)". Cuban Journal of Agricultural Science, 50(4): 607–617, ISSN: 2079-3480.
- Bécquer, C. J., Lazarovits, G., Nielsen, L., Quintana, M., Adesina, M., Quigley, L., Lalin, I. & Ibbotson, C. 2015. "Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas y *Trichoderma* en trigo (*Triticum aestivum* L.)". Pastos y Forrajes, 38(1): 29–37, ISSN: 0864-0394.
- Bécquer, C. J., Puentes, A. B., Ávila, U., Quintana, M., Galdo, Y., Medinilla, F. & Mirabales, A. 2016b. "Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium sp.* y *Trichoderma harzianum* en triticale (X. Triticosecale Wittmack), en condiciones de estrés por sequía". Pastos y Forrajes, 39(1): 19–26, ISSN: 0864-0394.
- Bécquer, C. J., Salas, B., Ávila, U., Palmero, L., Nápoles, J. A., Ulloa, L., Suarez, Y. & Colina, O. L. 2011. "Selección de cepas de rizobios aisladas de ecosistemas ganaderos de Sancti Spiritus, Cuba; inoculadas en maíz (*Zea mays* L.). Fase II: Ensayo de campo". Cuban Journal of Agricultural Science, 45(4): 445–449, ISSN: 2079-3480.
- Cardoso, E. J. B. N., Nogueira, M. A. & Ferraz, S. M. G. 2007. "Biological N₂ fixation and mineral N in common Bean-Maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil". Experimental Agriculture, 43(3): 319–330, ISSN: 1469-4441, 0014-4797, DOI: 10.1017/S0014479707005029.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. & Luna, V. 2009. "Azospirillum brasilense Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.)". European Journal of Soil Biology, 45(1): 28–35, ISSN: 1164-5563, DOI: 10.1016/j.ejsobi.2008.08.005.
- Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J.-Y., Lee, Y.-H., Cho, B. H., Yang, K.-Y., Ryu, C.-M. & Kim, Y. C. 2008. "2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*". Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 21(8): 1067–1075, ISSN: 0894-0282, DOI: 10.1094/MPMI-21-8-1067.
- Chowdhury, A. K. 2003. "Control of Sclerotium blight of groundnut by plant growth substances". Crop Research (Hisar), 25(2): 355–359, ISSN: 0970-4884.
- CMP (Centro Meteorológico Provincial) 2016. Resumen climático y estado de la sequía en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus. Período enero 2016 - mayo 2016. Sancti Spiritus, Cuba: Instituto de Meteorología (INSMET), 15 p., Available: <<http://www.cmpss.cu/>>, [Consulted: October 25, 2017].

- Fisher, R. A. 1935. The design of experiments. call no. OCLC: 2417943, Edinburgh: Oliver and Boyd.
- Gravel, V., Martinez, C., Antoun, H. & Tweddell, R. J. 2006. "Control of greenhouse tomato root rot (*Pythium ultimum*) in hydroponic systems, using plant-growth-promoting microorganisms". Canadian Journal of Plant Pathology, 28(3): 475–483, ISSN: 0706-0661, DOI: 10.1080/07060660609507322.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. "Trichoderma species--opportunistic, avirulent plant symbionts". Nature Reviews. Microbiology, 2(1): 43–56, ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/nrmicro797.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Howell, C. R. 1998. "The role of antibiosis in biocontrol". In: Harman, G. E. & Kubicek, C. P. (eds.), Trichoderma And Gliocladium: Enzymes, Biological Control and commercial applications, vol. 2, CRC Press, pp. 173–184, ISBN: 978-0-7484-0805-4, Available: <<https://www.crcpress.com/Trichoderma-And-Gliocladium-Volume-2-Enzymes-Biological-Control-and-commercial/Harman-Kubicek/p/book/9780748408054>>.
- Kumari, B. S., Ram, M. R. & Mallaiah, K. V. 2009. "Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by Rhizobium strains from Indigofera". African Journal of Microbiology Research, 3(1): 10–14, ISSN: 1996-0808.
- Mehboob, I. 2010. Plant growth promoting activities of rhizobium with non-legumes. Ph.D. Thesis, Institute of Soil and Environmental Sciences, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, 211 p.
- Mia, M. B. & Shamsuddin, Z. H. 2010. "Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production". African Journal of Biotechnology, 9(37): 6001–6009, ISSN: 1684-5315.
- Montero, L., Cun, R., Pérez, J., Ricardo, M. P. & Herrera, J. 2012. "Riego con aguas residuales en la producción sostenible de granos para alimento animal". Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias, 21(2): 48–52, ISSN: 2071-0054.
- Nisha, R., Kaushik, A. & Kaushik, C. P. 2007. "Effect of indigenous cyanobacterial application on structural stability and productivity of an organically poor semi-arid soil". Geoderma, 138(1): 49–56, ISSN: 0016-7061, DOI: 10.1016/j.geoderma.2006.10.007.
- Pecina-Quintero, V., Díaz-Franco, A., Williams-Alanís, H., Rosales-Robles, E. & Garza-Cano, I. 2005. "Influencia de fecha de siembra y de biofertilizantes en sorgo". Revista Fitotecnia Mexicana, 28(4): 389–392, ISSN: 0187-7380.
- Registro Central de Plaguicidas 2008. Lista oficial de plaguicidas autorizados 2008-2010. La Habana, Cuba, 421 p., Available: <<https://es.scribd.com/doc/144559417/Lista-Oficial-Plaguicidas-Autorizados>>, [Consulted: October 25, 2017].
- Ruesga, G. I., Peña, E., Expósito, I. & Gardon, D. 2005. Libro de experimentación agrícola. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria, 113 p., Google-Books-ID: nYxFnQAACAAJ, Available: <<https://books.google.com/cu/books?id=nYxFnQAACAAJ>>, [Consulted: October 25, 2017].
- Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M., Prashant, K. S., Farhan, H. & Tauseef, A. 2012. "Trichoderma—a promising plant growth stimulator and biocontrol agent". Mycosphere, 3(4): 524–531, ISSN: 2077-7019, DOI: 10.5943/mycosphere/3/4/14.
- Saber, W. I. A., El-Hai, K. M. A. & Ghoneem, K. M. 2009. "Synergistic effect of Trichoderma and Rhizobium on both biocontrol of chocolate spot disease and induction of nodulation, physiological activities and productivity of *Vicia faba*". Research Journal of Microbiology, 4(8): 286–300, ISSN: 1816-4935.
- Salinas, V. R. & Soriano, B. B. 2014. "Efecto de Trichoderma viride y Bradyrhizobium yuanmingense en el crecimiento de Capsicum annuum en condiciones de laboratorio". Revista REBIOLEST, 2(2): 20–32.
- Santillana, N., Zúñiga, D. & Arellano, C. 2012. "Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagónico de Rhizobium leguminosarum y Rhizobium etli". Agrociencia Uruguay, 16(2): 11–17, ISSN: 2301-1548.
- Shaban, W. I. & El-Bramawy, M. A. 2011. "Impact of dual inoculation with Rhizobium and Trichoderma on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions". International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science, 1(3): 98–108, ISSN: 2251-0044.
- Solano, O. & Vázquez, R. 1999. "Modelo Agrometeorológico de Evaluación de la Sequía Agrícola". In: Congreso de Meteorología Tropical: Convención Trópico'99, La Habana, Cuba: Instituto de Geografía Tropical - Instituto de Meteorología (INSMET), Referencia MT026.
- StatPoint Technologies 2010. Statgraphics Centurion. (ser. Centurion), version XVI, [Windows], Available: <<http://statgraphics-centurion.software.informer.com/download/>>.
- Stewart, A. & Hill, R. 2014. "Applications of Trichoderma in Plant Growth Promotion". In: Biotechnology and Biology of Trichoderma, Amsterdam: Elsevier, pp. 415–428, ISBN: 978-0-444-59576-8, DOI: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X, Available: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044459576800031X>>, [Consulted: October 25, 2017].
- Stiens, M., Schneiker, S., Keller, M., Kuhn, S., Pühler, A. & Schlüter, A. 2006. "Sequence Analysis of the 144-Kilobase Accessory Plasmid pSmeSM11a, Isolated from a Dominant Sinorhizobium meliloti Strain Identified during a Long-Term Field Release Experiment". Applied and Environmental Microbiology, 72(5): 3662–3672, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.72.5.3662-3672.2006.
- Timmusk, S., Abd El-Daim, I. A., Copolovici, L., Tanilas, T., Kännaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E. & Niinemets, Ü. 2014. "Drought-Tolerance of Wheat Improved by Rhizosphere Bacteria from Harsh Environments: Enhanced Biomass Production and Reduced Emissions of Stress Volatiles". PLoS ONE, 9(5): e96086, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0096086.
- Tsavelkova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdynseva, T. A. & Netrusov, A. I. 2006. "Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review". Applied Biochemistry and Microbiology, 42(2): 117–126, ISSN: 0003-6838, 1608-3024, DOI: 10.1134/S0003683806020013.
- van Loon, L. C. 2007. "Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria". European Journal of Plant Pathology, 119(3): 243–254, ISSN: 0929-1873, 1573-8469, DOI: 10.1007/s10658-007-9165-1.

- Vincent, J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. (ser. International Biology Program Handbook, no. ser. 15), Oxford - Edinburgh: Blackwell Scientific Publ., 164 p., Google-Books-ID: dcQcAQAAIAAJ, DOI: 10.1002/jobm.19720120524, Available: <<https://books.google.com.cu/books?id=dcQcAQAAIAAJ>>, [Consulted: October 25, 2017].
- Wolffhechel, H. & Funck-Jensen, D. 1992. "Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium vitiense* for the Biological Control of Post-emergence Damping-off and Root Rot of Cucumbers Caused by *Pythium ultimum*". Journal of Phytopathology, 136(3): 221–230, ISSN: 1439-0434, DOI: 10.1111/j.1439-0434.1992.tb01301.x.
- Yang, J., Kloepper, J. W. & Ryu, C.-M. 2008. "Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress". Trends in Plant Science, 14(1): 1–4, ISSN: 1360-1385, DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.004.

Received: June 21, 2017