

Biofertilization with *Azospirillum brasilense* and *Rhizoglosum irregulare* and reduction of nitrogen fertilization in *Urochloa* hybrid cv. Mulatto II

Biofertilización con *Azospirillum brasilense* y *Rhizoglosum irregulare* y reducción de la fertilización nitrogenada en *Urochloa* híbrido vc. Mulato II

R. Reyes Rouseaux¹, P. J. González Cañizares² and J. F. Ramírez Pedroso¹

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

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

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

¹Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. Avenida Independencia, km 8 ½ Boyeros, La Habana, Cuba

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Gaveta Postal No. 1 San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba

Email: reyneriorr@nauta.cu

An experiment was carried out to evaluate the contribution of biofertilization to the reduction of nitrogen fertilization in *Urochloa* hybrid cv. Mulatto II with the use of rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Rhizoglosum irregulare*. A total of three doses of nitrogen (0, 70 and 100 kg ha⁻¹) were evaluated, alone and combined with the application of both biofertilizers, in a random block design, with factorial arrangement and four replications. For biofertilization, inocula containing *A. brasilense* with a concentration of 10⁹ CFU mL⁻¹, and *R. irregulare*, with a concentration of 30 spores g⁻¹ were used. Both were applied by the seeds coating method at the time of sowing. In the case of *A. brasilense*, a second application was made, at a rate of 20 L ha⁻¹ after the first cut. The grass significantly responded (P < 0.01) to nitrogen fertilization. The highest yields (14.5 t ha⁻¹), concentrations of nitrogen in biomass (16.1 g kg⁻¹) and organic matter digestibility (64.7 %), as well as the lowest content of neutral detergent fiber (68.1 %) were obtained with the dose of 100 kg N ha⁻¹. With the biofertilization, without the application of nitrogen, these indicators reached similar values to those registered with the addition of 100 kg N ha⁻¹. The effect of biofertilizers was maintained for a year. It is concluded that biofertilization with *A. brasilense* and *R. irregulare* constitutes an effective alternative to reduce the use of nitrogen fertilizer in B. hybrid cv. Mulatto II.

Key words: *rhizobacteria*, *arbuscular mycorrhizal*, *nutritional state*, *forage yield*.

Fertilization constitutes a tool to increase the forage supply and consequently, animal production. In this way, not only the nutrients extracted from the soil are restored with the biomass intake by cattle, but the nutritional value and the persistence of grasses are also improved (Neves *et al.* 2019).

Of all the mineral nutrients that are applied with fertilization, nitrogen is, quantitatively, the most important for forage species, due to its immediate effect on increasing their productivity and quality (Franco *et al.* 2015). In the specific case of *Urochloa*, hybrid cv. Mulatto II, whose extension in tropical areas has increased due to its high potential of biomass production

Se realizó un experimento para evaluar la contribución de la biofertilización a la reducción de la fertilización nitrogenada en *Urochloa* híbrido cv. Mulatto II con el uso de la rizobacteria *Azospirillum brasilense* y el hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizoglosum irregulare*. Se evaluaron tres dosis de nitrógeno (0, 70 y 100 kg ha⁻¹), solas y combinadas con la aplicación de ambos biofertilizantes, en un diseño de bloques al azar, con arreglo factorial y cuatro réplicas. Para la biofertilización, se utilizaron inóculos que contenían *A. brasilense* con concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹, y *R. irregulare*, con concentración de 30 esporas g⁻¹. Ambos se aplicaron por el método del recubrimiento de las semillas en el momento de la siembra. En el caso de *A. brasilense*, se realizó una segunda aplicación, a razón de 20 L ha⁻¹ después del primer corte. El pasto respondió significativamente (P < 0.01) a la fertilización nitrogenada. Los mayores rendimientos (14.5 t ha⁻¹), concentraciones de nitrógeno en la biomasa (16.1 g kg⁻¹) y digestibilidad de la materia orgánica (64.7%), así como los menores contenidos de fibra detergente neutro (68,1 %) se obtuvieron con la dosis de 100 kg N ha⁻¹. Con la biofertilización, sin la aplicación de nitrógeno, estos indicadores alcanzaron valores similares a los registrados con la adición de 100 kg N ha⁻¹. El efecto los biofertilizantes se mantuvo durante un año. Se concluye que la biofertilización con *A. brasilense* y *R. irregulare* constituye una alternativa efectiva para reducir el uso de fertilizante nitrogenado en B. híbrido cv. Mulatto II.

Palabras clave: *rizobacterias*, *micorrizas arbusculares*, *estado nutricional*, *rendimiento de forraje*.

La fertilización constituye una herramienta para incrementar la oferta de forraje, y consecuentemente, la producción animal. Por esta vía no solo se restituyen los nutrientes que se extraen del suelo con la biomasa que consume el ganado, sino que se mejora el valor nutritivo y la persistencia de los pastos (Neves *et al.* 2019).

De todos los nutrientes minerales que se aplican con la fertilización, el nitrógeno es, cuantitativamente, el más importante para las especies forrajeras, debido a su efecto inmediato en el aumento de su productividad y calidad (Franco *et al.* 2015). En el caso específico de *Urochloa*, híbrido cv. Mulatto II, cuya extensión en las zonas tropicales se ha incrementado por su alto potencial de producción

and nutritional value, the requirements of this element are usually high (Marques *et al.* 2017).

In spite the mentioned, the growing increase in fertilizer prices, and the need for environmentally friendly technologies, have increased interest in designing fertilization strategies that guarantee adequate nutrition of grasses and forage crops, reduce the use of external supplies and, at the same time, ensure the protection of natural resources (Gupta *et al.* 2015).

Among these strategies is include biofertilization, due to its potential to increase crop productivity, improve the biological properties of soils and the efficiency of nutrients use (Mahanty *et al.* 2016 and Finkel *et al.* 2016). The use of associative bacteria, of the *Azospirillum* genus, has been shown to increase the performance of forage grasses, due to their ability to fix atmospheric nitrogen, as well as other benefits related to the phytohormones production and the protection of plants against abiotic stresses (Cassan and Diaz-Zorita 2016 and Basu *et al.* 2017).

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are integral components of the grasses rhizosphere, whose plants remain interconnected by a hyphal network that increase the soil volume, explore the roots and facilitate the absorption of nutrients and water (Motta *et al.* 2017 and Jach-Smith and Jackson 2018), in addition to other important services, such as the restoration of photosynthetic tissues after defoliation (Ambrosino 2018). In fact, the management of biofertilization with these microorganisms has also positive results in increasing yields and improving the absorption of N and other nutrients in grasses (Koziol and Bever 2017 and Teutscherova *et al.* 2019).

These premises, in addition to the information about the beneficial effects of co-inoculation with *A. brasilense* and AMF in other agricultural crops (Villarreal *et al.* 2016 and Lopes *et al.* 2019), suggest that biofertilization with both microorganisms could contribute significantly important to the reduction of nitrogen fertilization, especially in forage species that require high amounts of this nutrient to achieve higher yields.

The objective of this study was to evaluate the effect of the joint application of the rhizobacteria *A. brasilense* and the AMF *Rhizogloium irregulare* in the reduction of nitrogen fertilization in *Urochloa* hybrid cv. 36087 (Mulato II).

Materials and Methods

The experiment was carried out in the typical dairy 23, from Unidad Básica de Producción Cooperativa Juan Oramas, located in Guanabacoa municipality, Havana province. The facility is located at 23° 08' north latitude and 82°11' west longitude, on a soft brown carbonate soil (Hernández *et al.* 2015), which the main chemical characteristics are showed in table 1.

de biomasa y valor nutritivo, los requerimientos de este elemento suelen ser elevados (Marques *et al.* 2017).

No obstante a lo anterior, el aumento creciente de los precios de los fertilizantes, y la necesidad de disponer de tecnologías amigables con el medio ambiente, han acrecentado el interés en diseñar estrategias de fertilización que garanticen una nutrición adecuada de los pastos y cultivos forrajeros, disminuyan el uso de insumos externos y, a la vez, aseguren la protección de los recursos naturales (Gupta *et al.* 2015).

Entre estas estrategias se incluye la biofertilización, por sus potencialidades para aumentar la productividad de los cultivos, mejorar las propiedades biológicas de los suelos y la eficiencia del uso de los nutrientes (Mahanty *et al.* 2016 y Finkel *et al.* 2016). Se ha demostrado que el uso de bacterias asociativas, del género *Azospirillum*, incrementa el rendimiento de las gramíneas forrajeras, por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, como por otros beneficios relacionados con la producción de fitohormonas y la protección de las plantas contra estreses abióticos (Cassan y Diaz-Zorita 2016 y Basu *et al.* 2017).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) son componentes integrales de la rizosfera de los pastos, cuyas plantas permanecen interconectadas mediante una red de hifas que incrementan el volumen de suelo, exploran las raíces y facilitan la absorción de los nutrientes y el agua (Motta *et al.* 2017 y Jach-Smith y Jackson 2018), además de otros servicios importantes, como el restablecimiento de los tejidos fotosintéticos después de la defoliación (Ambrosino 2018). De hecho, el manejo de la biofertilización con estos microorganismos también ha arrojado resultados positivos en el aumento de los rendimientos y la mejora en la absorción del N y otros nutrientes en los pastos (Koziol y Bever 2017 y Teutscherova *et al.* 2019).

Estas premisas, además de la información acerca de los efectos benéficos de la coinoculación con *A. brasilense* y HMA en otros cultivos agrícolas (Villarreal *et al.* 2016 y Lopes *et al.* 2019), sugieren que la biofertilización con ambos microorganismos podría contribuir de manera importante a la reducción de la fertilización nitrogenada, sobre todo en especies forrajeras que requieren altas cantidades de este nutriente para alcanzar mayores rendimientos.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación conjunta de la rizobacteria *A. brasilense* y el HMA *Rhizogloium irregulare* en la reducción de la fertilización nitrogenada en *Urochloa* híbrido cv. 36087 (Mulato II).

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en la vaquería típica 23, de la Unidad Básica de Producción Cooperativa "Juan Oramas", ubicada en el municipio de Guanabacoa, provincia La Habana. La instalación se encuentra ubicada en los 23°08' de latitud norte y los 82°11' de longitud oeste, en un suelo pardo mullido carbonatado (Hernández *et al.* 2015), cuyas

During the time the experiment was conducted (May 2016-April 2017), the rainfall was 1250 mm. Of this, 75 % occurred during the rainy season (May-October 2016), and the rest between November 2016 and April 2017 (INSMET 2018).

principales características químicas se presentan en la tabla 1. Durante el tiempo en que se condujo el experimento (mayo 2016-abril 2017), la precipitación total fue de 1250 mm. De esta, 75 % ocurrió durante el período lluvioso (mayo-octubre de 2016), y el resto entre noviembre de

Table 1. Soil chemical characteristics, 0-20 cm deep

pH H ₂ O	OM (%)	P ₂ O ₅	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	BEC
		(mg 100 g ⁻¹)			(cmolc kg ⁻¹)		
7.7	3.85	122	50.8	5.0	0.32	0.99	59.09
(0.1)	(0.20)	(18)	(2.4)	(0.9)	(0.09)	(0.12)	(3.75)

OM: organic matter, BEC: base exchange capacity

Values in parentheses show confidence intervals ($\alpha = 0.05$)

Six treatments were evaluated, resulting from the combination of three nitrogen doses (0, 70 and 100 kg N ha⁻¹), alone and combined with the joint application of *A. brasilense* and *R. irregularis*, in a random block design with factorial arrangement and four replications. The plots constituted the experimental unit, and had a total area of 21 m² and a calculation area of 14 m².

The soil was prepared by plowing (plowing), harrowing, crossing (plowing) and harrowing, at approximately 25 d intervals between each one. The sowing of the grass was carried out in May 2016, in rows separated by 50 cm and in row seeding, with doses of 10 kg of total seed ha⁻¹ (1 kg of pure germinable seed ha⁻¹), at a depth of 1.5 cm.

Before sowing, 10 soil samples were taken with an earth drill, by the zigzag method, at a depth of 0-20 cm. It was determined the pH in H₂O (potentiometry, soil-water ratio 1: 2.5), the contents of organic matter (Walkley and Black), assimilable P (extraction with H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹ and colorimetric determination), interchangeable bases (extraction with NH₄Ac 1 mol L⁻¹ pH 7, determination by complexometry for Ca and Mg, flame photometry for Na and K) and base exchange capacity (sum of exchangeable bases), according to the analytical techniques established in the soil and plant laboratory of the Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), described by Paneque *et al.* (2011).

The doses of nitrogen fertilizer were divided. A 50 % was applied 30 days after sowing and the rest after the first cut, both during the rainy season. For this, small rows, 10 cm deep, were opened with a hoe, 10 cm from the rows of plants, and they were covered after placing the fertilizer. In the dry season, nitrogen fertilizer was not applied, since the experiment was conducted under dry conditions. As carrier of the nitrogen fertilizer, urea was used. Phosphoric and potassium fertilizers were not applied because it was considered that the contents of both nutrients in the soil were sufficient for the grass.

For biofertilization with *A. brasilense*, the commercial product Nitrofix® was used, from the Instituto Cubano

2016 y abril de 2017 (INSMET 2018).

Se evaluaron seis tratamientos, resultantes de la combinación de tres dosis de nitrógeno (0, 70 y 100 kg N ha⁻¹), solas y combinadas con la aplicación conjunta de *A. brasilense* y *R. irregularis*, en un diseño de bloques al azar con arreglo factorial y cuatro réplicas. Las parcelas constituyeron la unidad experimental, y tenían una superficie total de 21 m² y un área de cálculo de 14 m².

El suelo se preparó mediante labores de roturación (arado), grada, cruce (arado) y grada, a intervalos aproximados de 25 d entre cada una. La siembra del pasto se realizó en mayo de 2016, en surcos separados a 50 cm y a chorrillo, con dosis de 10 kg de semilla total ha⁻¹ (1 kg de semilla pura germinable ha⁻¹), a profundidad de 1.5 cm.

Previo a la siembra, se tomaron 10 muestras de suelo con una barrena, por el método del zigzag, a profundidad de 0-20 cm. Se les determinó el pH en H₂O (potenciometría, relación suelo-agua 1:2.5), los contenidos de materia orgánica (Walkley y Black), P asimilable (extracción con H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹ y determinación colorimétrica), bases intercambiables (extracción con NH₄Ac 1 mol L⁻¹ pH 7, determinación por complejometría para Ca y Mg, fotometría de llama para Na y K) y capacidad de intercambio de bases (suma de bases intercambiables), según las técnicas analíticas establecidas en el laboratorio de suelos y plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), descritas por Paneque *et al.* (2011).

Las dosis de fertilizante nitrogenado se fraccionaron. Se aplicó 50 % a los 30 días posteriores a la siembra y el resto después del primer corte, ambos durante el período lluvioso. Para ello se abrieron con una azada pequeños surcos, de 10 cm de profundidad, a 10 cm de las hileras de las plantas, y se taparon después de colocado el fertilizante. En el período poco lluvioso, no se aplicó fertilizante nitrogenado, ya que el experimento se condujo en condiciones de secano. Como portador del fertilizante nitrogenado se utilizó la urea. No se aplicó fertilizante fosfórico y potásico porque se consideró que los contenidos de ambos nutrientes en el suelo eran suficientes para el pasto.

Para la biofertilización con *A. brasilense* se utilizó el producto comercial Nitrofix®, procedente del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), que contenía la

de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), which contained strain 8I, with a concentration of 109 CFU mL⁻¹. For the application of the mycorrhizal biofertilizer, the INCAM-11 strain of the AMF species *Rhizoglyphus irregularis* (Sieverding *et al.* 2014), from the INCA collection, was used. The inoculum was multiplied on a clay substrate, sterilized in an autoclave at 120 °C for one hour for three days, with the use of *Urochloa decumbens* cv. Basilisk as a host plant. It contained 30 spores per gram of inoculant, as well as abundant fragments of roots and hyphal of the fungus.

The co-inoculation was carried out by the seed coating method. These were immersed in a fluid paste, made by mixing 1 kg of mycorrhizal inoculant, 6 mL of Nitrofix® and 600 mL of water. The seeds were dried in the shade and immediately sown. After the first cut, a mixture of Nitrofix® and water in a 1:10 ratio was prepared. Using a manual knapsack sprayer, it was applied to the soil, very close to the rows, at a rate of 20 L ha⁻¹ of the commercial product.

Four cuts were made, the first at 120 days after sowing and the rest every 60 and 90 days in the rainy and dry season, respectively, at a height of 10 cm with respect to the soil surface. In each cut, the fresh matter of the aerial part of the grass, which occupied the calculation area of the plots, was weighed and 200 g samples were taken. They were taken to an air circulation oven at 70 °C for 72 h, to determine the dry matter percentage, the dry matter yield, and the concentrations of N, P, K in the biomass (Paneque *et al.* 2011), as well as the crude protein contents (N x 6.25), organic matter digestibility (Kesting 1977) and NDF (van Soest *et al.* 1991).

At the time of the second and fourth cut, framed in the rainy and dry periods, respectively, in each plot three sub-samples of roots and soil of the rhizosphere were taken, at a depth of 0–20 cm by using a metal cylinder 5 cm in diameter and 20 cm in height. The sampling points were distributed equidistant and 10 cm separated from the rows.

The subsamples were homogenized to form a composite sample per plot, and 1 g of rootlets was extracted for staining and clarification (Rodríguez *et al.* 2015). The frequency of mycorrhizal colonization was evaluated using the intercepts method (Giovanetti and Mosseae 1980), the visual density or colonization intensity (Trouvelot *et al.* 1986), and the number of spores in the rhizosphere, from sieving and wet decanting of these structures and their observation under a microscope (Herrera *et al.* 1995).

The statistical processing of the data was carried out using the analysis of variance and Duncan (1955) multiple range test at P < 0.05. In the variables corresponding to the chemical characterization of the soil, as well as in those the results are shown in graphs, the confidence interval ($\alpha = 0.05$) was used, in that order,

cepa 8I, con concentración de 109 UFC mL⁻¹. Para la aplicación del biofertilizante micorrízico se empleó la cepa INCAM-11 de la especie de HMA *Rhizoglyphus irregularis* (Sieverding *et al.* 2014), procedente de la colección del INCA. El inóculo se multiplicó en un sustrato arcilloso, esterilizado en autoclave a 120 °C por una hora durante tres días, con el uso de *Urochloa decumbens* vc. Basilisk como planta hospedera. Contenía 30 esporas por gramo de inoculante, así como abundantes fragmentos de raicillas e hifas del hongo.

La coinoculación se realizó por el método del recubrimiento de las semillas. Estas se sumergieron en una pasta fluida, elaborada mediante la mezcla de 1 kg de inoculante micorrízico, 6 mL de Nitrofix® y 600 mL de agua. Las semillas se secaron a la sombra e inmediatamente se sembraron. Después del primer corte, se preparó una mezcla de Nitrofix® y agua en una relación 1:10. Mediante una mochila manual se aplicó al suelo, muy próximo a los surcos, a razón de 20 L ha⁻¹ del producto comercial.

Se realizaron cuatro cortes, el primero a los 120 días después de la siembra y el resto cada 60 y 90 días en período lluvioso y poco lluvioso, respectivamente, a una altura de 10 cm con respecto a la superficie del suelo. En cada corte, se pesó la masa fresca de la parte aérea del pasto, que ocupaba el área de cálculo de las parcelas y se tomaron muestras de 200 g. Se llevaron a una estufa de circulación de aire a 70 °C durante 72 h, para determinar el porcentaje de masa seca, el rendimiento de masa seca, y las concentraciones de N, P, K en la biomasa (Paneque *et al.* 2011), así como los contenidos de proteína bruta (N x 6.25), digestibilidad de la materia orgánica (Kesting 1977) y FDN (van Soest *et al.* 1991).

En el momento del segundo y cuarto corte, enmarcados en el período lluvioso y poco lluvioso, respectivamente en cada parcela se tomaron tres sub-muestras de raíces y de suelo de la rizosfera, a profundidad de 0–20 cm mediante el empleo de un cilindro metálico de 5 cm de diámetro y 20 cm de altura. Los puntos de muestreo se distribuyeron equidistantes, y separados a 10 cm de los surcos.

Las submuestras se homogenizaron para formar una muestra compuesta por parcela, y extraer 1 g de raicillas para su tinción y clarificación (Rodríguez *et al.* 2015). Se evaluaron la frecuencia de colonización micorrízica mediante el método de los interceptos (Giovanetti y Mosseae 1980), la densidad visual o intensidad de la colonización (Trouvelot *et al.* 1986), y el número de esporas en la rizosfera, a partir del tamizado y decantado por vía húmeda de dichas estructuras y su observación en microscopio (Herrera *et al.* 1995).

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan (1955) a P < 0.05. En las variables correspondientes a la caracterización química del suelo, así como en aquellas cuyos resultados se muestran en gráficos, se utilizó, en ese orden, el intervalo de confianza ($\alpha = 0.05$) para estimar la variabilidad de las medias y

to estimate the variability of means and as a criterion for their comparison (Payton *et al.* 2000). In all cases, the statistical program SPSS 25 (2017) was used.

Results and Discussion

Figure 1 shows the interaction between the application of biofertilizers and the doses of N in the fungal variables.

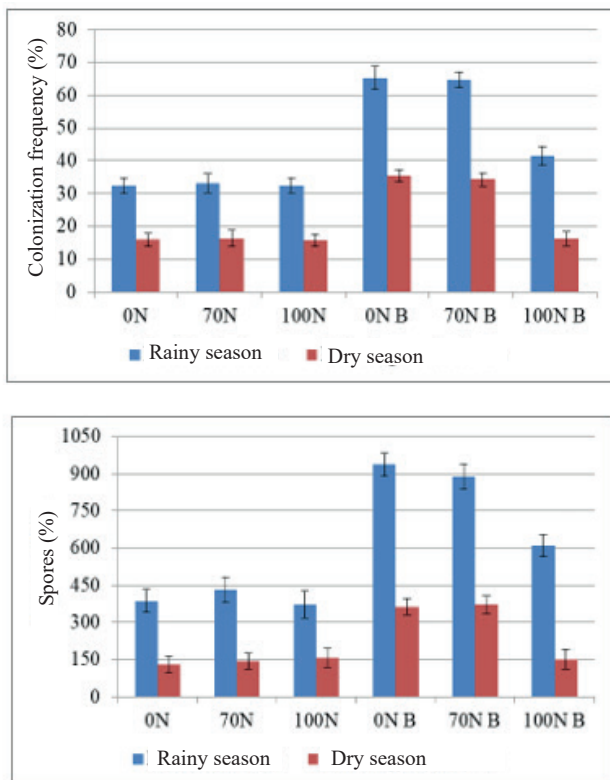


Figure 1. Effect of treatments on fungal variables

The highest values of the frequency and intensity of mycorrhizal colonization and number of spores in the rhizosphere were reached in the treatments with the application of *A. brasilense* and *R. irregularis* without N, or with the addition of 70 kg N ha⁻¹. This effect was maintained until the dry season. With the application of biofertilizers plus the addition of 100 kg N ha⁻¹, in the sampling carried out during the rainy season, there were values of these variables that, although they exceeded the non-inoculated treatments, which showed the level of radical occupation of the AMF residents, were significantly lower than those not biofertilized and accompanied by doses of 0 and 70 kg N ha⁻¹. In this treatment, the effect of biofertilizers in the increase of mycorrhizal structures disappeared in the season of lower rainfalls.

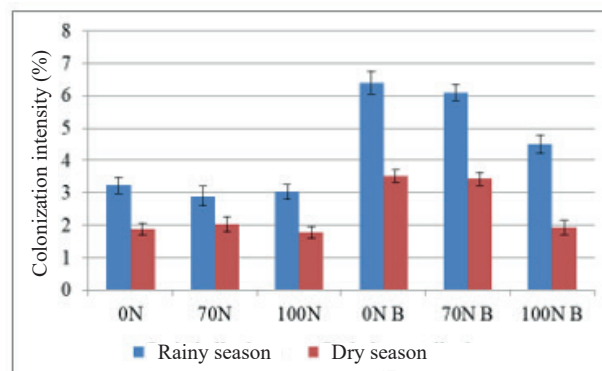
The lower figures of the fungal variables, as well as the lesser permanence of the inoculation effect, observed in the treatment where the biofertilizers and the dose of 100 kg N ha⁻¹ were applied, seem to indicate an ineffective mycorrhizal function, caused by the addition of an amount of nitrogen fertilizer, which could exceed the needs of the biofertilized grass.

It is known that the availability of nutrients in the soil

como criterio para su comparación (Payton *et al.* 2000). En todos los casos, se utilizó el programa estadístico SPSS 25 (2017).

Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra la interacción entre la aplicación de los biofertilizantes y las dosis de N en las variables fúngicas.



0 N: 0 kg ha⁻¹ of nitrogen; 70 N: 70 kg ha⁻¹;

100 N: 100 kg ha⁻¹

B: biofertilized with *A. brasilense* and *R. irregularis*

The vertical bars show the confidence interval of the mean. Confidence intervals that overlap each other do not significantly differ ($\alpha = 0.05$).

Los mayores valores de la frecuencia e intensidad de la colonización micorrízica y número de esporas en la rizosfera se alcanzaron en los tratamientos con la aplicación de *A. brasilense* y *R. irregularis* sin N, o con la adición de 70 kg N ha⁻¹. Este efecto se mantuvo hasta el período poco lluvioso. Con la aplicación de los biofertilizantes más la adición de 100 kg N ha⁻¹, en el muestreo realizado durante el período lluvioso, hubo valores de estas variables que, aunque superaron los tratamientos no inoculados, que mostraron el nivel de ocupación radical de los HMA residentes, fueron significativamente menores que los no biofertilizados y acompañados de dosis de 0 y 70 kg N ha⁻¹. En este tratamiento, el efecto de los biofertilizantes en el incremento de las estructuras micorrízicas desapareció en la época de menores precipitaciones.

Las menores cifras de las variables fúngicas, así como la menor permanencia del efecto de la inoculación, observado en el tratamiento donde se aplicaron los biofertilizantes y la dosis de 100 kg N ha⁻¹, parecen indicar un funcionamiento micorrízico no efectivo, provocado por la adición de una cantidad de fertilizante nitrogenado, que pudo exceder las necesidades del pasto biofertilizado.

Se conoce que la disponibilidad de nutrientes en

controls the growth of mycorrhizal structures, so that these are reduced when the grasses have been sufficiently fertilized, since the supply of these resources to the host plant through AMF loses importance (Baoming and Bever 2016).

The values of the fungal variables were lower in the dry season than in the rainy season, probably due to the fact that nitrogen fertilizer was not applied during that time, and to the seasonal performance of the biomass production of grasses. During the rains a rapid growth occurs, by virtue of the higher levels of rainfalls, temperature and luminosity, which increases the absorption of nutrients for the biomass formation (Bueno *et al.* 2019) and, consequently, leads to the formation of larger amounts of mycorrhizal structures to guarantee the plants access to soil resources (Adil *et al.* 2017).

Table 2 shows the effect of treatments on the macronutrients concentrations (N, P and K) in the aerial biomass of the grass. In the rainy season, there was an increasing response of N concentrations, which reached values of 17.1 g kg⁻¹ of dry matter, with the addition of 100 kg N ha⁻¹. However, with the co-inoculation of biofertilizers, even without the application of nitrogen fertilizer, similar values were obtained. This seems to show that the joint application of both can guarantee adequate nitrogen nutrition of the grass, at least during that time.

el suelo controla el crecimiento de las estructuras micorrízicas, de modo que estas se reducen cuando los pastos han sido suficientemente fertilizados, ya que la entrega de estos recursos a la planta hospedera a través de los HMA pierde importancia (Baoming y Bever 2016).

Los valores de las variables fúngicas fueron menores en el período poco lluvioso que en el lluvioso, debido, probablemente, a que no se aplicó fertilizante nitrogenado durante esa época, y al comportamiento estacional de la producción de biomasa de los pastos. Durante las lluvias ocurre un rápido crecimiento, en virtud de los mayores niveles de precipitaciones, temperatura y luminosidad, lo que incrementa la absorción de nutrientes para la formación de biomasa (Bueno *et al.* 2019) y, consecuentemente, lleva a la formación de mayores cantidades de estructuras micorrízicas para garantizar el acceso de las plantas a los recursos del suelo (Adil *et al.* 2017).

La tabla 2 muestra el efecto de los tratamientos en las concentraciones de macronutrientes (N, P y K) en la biomasa aérea del pasto. En el período lluvioso, hubo una respuesta creciente de las concentraciones de N, que alcanzaron valores de 17.1 g kg⁻¹ de masa seca, con la adición de 100 kg N ha⁻¹. Sin embargo, con la coinoculación de los biofertilizantes, incluso sin la aplicación de fertilizante nitrogenado, se obtuvieron valores similares. Ello parece indicar que la aplicación conjunta de ambos puede garantizar la adecuada nutrición nitrogenada del pasto, al menos durante esa época.

Table 2. Effect of treatments with nitrogen fertilization and biofertilization on the concentrations of macronutrients in the biomass of the aerial part

Treatments		Rainy season			Dry season		
(kg ha ⁻¹)	Biofertilization	N (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)
0	NB	11.6 ^c	2.1	17.5	12.5 ^b	2.2	18.5
70	NB	14.1 ^b	2.2	16.9	13.3 ^b	2.4	17.9
100	NB	17.1 ^a	2.0	16.7	12.9 ^b	2.3	17.8
0	<i>A. brasilense</i> + <i>R. irregulare</i>	16.7 ^a	2.2	17.2	15.5 ^a	2.2	18.4
70	<i>A. brasilense</i> + <i>R. irregulare</i>	15.8 ^a	2.1	17.0	16.9 ^a	2.3	17.1
100	<i>A. brasilense</i> + <i>R. irregulare</i>	16.3 ^a	2.2	16.7	12.3 ^b	2.4	18.3
SE	0.2**	0.1	0.3	0.3**	0.1	0.4	

NB: not biofertilized. *A. brasilense* + *R. irregulare*: biofertilized with *Azospirillum brasilense* and *R. irregulare*. Averages with not common letters in the same column significantly differ at P < 0.05, according to Duncan's test

In the less rainy period, although the effect of nitrogen fertilization on the concentrations of N in the biomass disappeared, due to this nutrient was not applied, the effect of biofertilizers remained, alone or accompanied by the addition of 70 kg N ha⁻¹ in the rainy season.

The treatments did not influence on the concentrations of P and K in the biomass, which join to the values that both elements showed, indicates that the grass was well supplied, based on its high content in the soil (table 1). In fact, this criterion was taken into account in order not to apply phosphoric and potassium fertilizers to the experiment.

En el período menos lluvioso, si bien desapareció el efecto de la fertilización nitrogenada en las concentraciones de N en la biomasa, debido a que no se aplicó este nutriente, permaneció el efecto de los biofertilizantes, solos o acompañados de la adición de 70 kg N ha⁻¹ en la época de lluvias.

Los tratamientos no influyeron en las concentraciones de P y K en la biomasa, lo que unido a los valores que mostraron ambos elementos, indica que el pasto estuvo bien abastecido, a partir sus altos contenidos en el suelo (tabla 1). De hecho, este criterio se tuvo en cuenta para no aplicar los fertilizantes fosfórico y potásico al experimento.

The performance of the grass yield was similar to that of the N concentrations in the biomass of the aerial part (table 3). That is, in the rainy season, there was a growing increase in biomass production per unit area, reaching the highest values with the application of 100 kg N ha⁻¹. However, with biofertilizers, the addition of nitrogen fertilizer was unnecessary to reach similar yields to those achieved with the highest dose of N.

El comportamiento del rendimiento del pasto fue similar al de las concentraciones de N en la biomasa de la parte aérea (tabla 3). Es decir, en el período lluvioso, hubo aumento creciente de la producción de biomasa por unidad de superficie, hasta alcanzar los valores más altos con la aplicación de 100 kg N ha⁻¹. Sin embargo, con los biofertilizantes, la adición de fertilizante nitrogenado resultó innecesaria para alcanzar rendimientos similares a los logrados con la dosis más alta de N.

Table 3. Effect of treatments on yield (t DM. ha⁻¹)

Treatments		Rainy season		Dry season	
N (kg ha ⁻¹)	Biofertilization	First cut	Second cut	Third cut	Fourth cut
0	NB	5.10 ^c	4.87 ^c	2.6 ^b	2.32 ^b
70	NB	6.29 ^b	6.03 ^b	2.72 ^b	2.28 ^b
100	NB	7.39 ^a	7.13 ^a	2.84 ^b	2.31 ^b
0	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	7.37 ^a	6.87 ^a	4.07 ^a	3.68 ^a
70	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	7.43 ^a	6.93 ^a	4.23 ^a	3.77 ^a
100	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	7.51 ^a	7.01 ^a	2.71 ^b	2.29 ^b
SE	0.19**	0.17**	0.15**	0.13**	

NB: not biofertilization

A. brasilense + *R. irregularis*: biofertilized with *Azospirillum brasilense* and *R. irregularis*.

DM: dry matter

Averages with not common letters in the same column significantly differ at P < 0.05, according to Duncan's test.

When analyzing the influence of the treatments on some variables of the nutritional value of grass (table 4), the applications of N without biofertilizers produced an increasing increase of crude protein content and organic matter digestibility, as well as a significant decrease of the neutral detergent fiber content. However, with the co-inoculation with *A. brasilense* and *R. irregularis*, alone or accompanied by nitrogen fertilizer, similar results were obtained to those achieved with the higher dose of N, in the absence of biofertilizers. This effect was more marked

Al analizar la influencia de los tratamientos en algunas variables del valor nutritivo del pasto (tabla 4), las aplicaciones de N sin biofertilizantes produjeron incremento de los tenores de proteína bruta y digestibilidad de la materia orgánica, así como disminución significativa del contenido de fibra detergente neutro. No obstante, con la coinoculación con *A. brasilense* y *R. irregularis*, sola o acompañada de fertilizante nitrogenado, se obtuvieron resultados similares a los alcanzados con la dosis mayor de N, en ausencia de los biofertilizantes. Este efecto fue más marcado durante el período lluvioso, aunque en la época

Table 4. Effect of nitrogen fertilization and biofertilization on indicators of the nutritional value of grass

Treatments		Rainy season			Dry season		
N (kg ha ⁻¹ cut ⁻¹)	Biofertilization	CP (%)	NDF (%)	OMD (%)	CP (%)	NDF (%)	OMD (%)
0	NB	7.23 ^c	70.3 ^a	62.5 ^b	7.8 ^b	71.7	61.7
70	NB	8.81 ^b	69.9 ^a	61.9 ^b	8.31 ^b	70.4	60.6
100	NB	9.95 ^a	68.1 ^b	64.7 ^a	8.06 ^b	69.9	60.8
0	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	10.07 ^a	67.9 ^b	65.2 ^a	9.94 ^a	71.5	61.3
75	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	9.86 ^a	68.3 ^b	65.0 ^a	10.13 ^a	70.2	60.0
100	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	10.19 ^a	67.7 ^b	64.7 ^a	7.69 ^b	69.5	61.7
SE	0.17**	0.28**	0.26**	0.16**	0.23	0.31	

NB: noT biofertilized. *A. brasilense* + *R. irregularis*: biofertilized with *Azospirillum brasilense* and *R. irregularis*.

CP: crude protein; NDF: neutral detergent fiber; OMD: organic matter digestibility

Averages with not common letters in the same column significantly differ at P < 0.05, according to Duncan's test.

during the rainy season, although in the dry season the effect of biofertilizers remained on the crude protein contents of the grass.

The CP, OMD and NDF values, obtained with the application of the highest dose of N, coincide with those reported by Leal *et al.* (2017) and Teixeira *et al.* (2018) in *Urochloa* hybrids, fertilized with a similar amount of N. These authors attribute this result to the fact that the addition of this element stimulates the plant growth and increases the use of available carbohydrates for the formation of cells and protoplasm, instead of causing the thickening of the cell wall, which results in the decrease of the fiber content of the grass.

However the above, the most outstanding thing was that co-inoculation with both microorganisms, without additional applications of N, made possible these variables to reach values similar to those obtained with the addition of 100 kg N ha⁻¹. In this way, the reduction of the N dose with the inclusion of biofertilization did not imply a reduction in the nutritional value of the biomass.

When analyzing the results, it was possible to verify the significant contribution of biofertilization to the nitrogen nutrition of the grass. This was evident in the levels of mycorrhizal colonization, which were the result of the effectiveness of the AMF strain *R. irregulare*, and the possible contribution of *A. brasilense* to the improvement of the levels of root occupation of the fungus. It has been shown that fungal structures can be used by bacteria as intermediaries to reach the epidermis of root tissue, and that their production of phytohormones stimulates roots growth and, in fact, mycorrhizal colonization (Villarreal *et al.* 2016). To this is added the contribution of *A. brasilense* to nitrogen nutrition, from the fixation of significant amounts of N.

In species from *Urochloa* genus, it has been found that the increase in biomass production, obtained with the inoculation with *A. brasilense*, can be equivalent to an additional application of 40 kg N ha⁻¹ (Hungria *et al.* 2016), without rule out other benefits no less important. This is the case of the production of phytohormones and other photosynthates, which could stimulate plants growth (Hanisch *et al.* 2017 and Oliveira *et al.* 2018).

The synergistic interaction between both microorganisms could have been favored by the characteristics of the soil where the experiment was carried out. This has a loose soil in the A horizon, with a granular structure, not less than 18 cm thick (Hernández *et al.* 2015) and organic matter content higher than 3.5 %, which favored the roots growth and the absorption of N from the soil.

The combination of these factors resulted in an effective biofertilization, which guaranteed adequate nitrogen nutrition and the obtaining of biomass yields, with nutritional value indicators similar to those achieved

poco lluviosa permaneció el efecto de los biofertilizantes en los contenidos de proteína bruta del pasto.

Los valores de PB, DMO y FDN, obtenidos con la aplicación de la dosis más alta de N, coinciden con los informados por Leal *et al.* (2017) y Teixeira *et al.* (2018) en híbridos de *Urochloa*, fertilizados con una cantidad de N similar. Estos autores atribuyen dicho resultado a que la adición de este elemento estimula el crecimiento de la planta y aumenta la utilización de los carbohidratos disponibles para la formación de células y de protoplasma, en vez de provocar el engrosamiento de la pared celular, que trae como resultado la disminución de los contenidos de fibra del pasto.

No obstante a lo anterior, lo más destacado fue que la coinoculación con ambos microorganismos, sin aplicaciones adicionales de N, hizo posible que estas variables alcanzaran valores similares a los obtenidos con la adición de 100 kg N ha⁻¹. De este modo, la disminución de la dosis de N con la inclusión de la biofertilización no implicó reducción del valor nutritivo de la biomasa.

Al analizar de forma integral los resultados, se pudo constatar la contribución significativa de la biofertilización a la nutrición nitrogenada del pasto. Ello se hizo evidente en los niveles de colonización micorrízica, que fueron el resultado de la efectividad de la cepa de HMA *R. irregulare*, y de la posible contribución de *A. brasilense* a la mejora de los niveles de ocupación radical del hongo. Se ha demostrado que las estructuras fúngicas pueden ser utilizadas por la bacteria como puentes para alcanzar la epidermis del tejido radical, y que su producción de fitohormonas estimula el crecimiento de las raíces y, de hecho, la colonización micorrízica (Villarreal *et al.* 2016). A esto se une el propio aporte de *A. brasilense* a la nutrición nitrogenada, a partir de la fijación de cantidades importantes de N.

En especies del género *Urochloa*, se ha encontrado que el incremento en la producción de biomasa, obtenido con la inoculación con *A. brasilense*, puede ser equivalente a una aplicación adicional de 40 kg N ha⁻¹ (Hungria *et al.* 2016), sin descartar otros beneficios no menos importantes. Este es el caso de la producción de fitohormonas y otros fotosintatos, que pudieron estimular el crecimiento de las plantas (Hanisch *et al.* 2017 y Oliveira *et al.* 2018).

La interacción sinérgica entre ambos microorganismos se pudo haber favorecido por las características del suelo donde se realizó el experimento. Este posee un horizonte A mullido, de estructura granular, con espesor no menor de 18 cm (Hernández *et al.* 2015) y contenido de materia orgánica superior a 3.5 %, que favoreció el crecimiento de las raíces y la absorción del N del suelo.

La conjunción de estos factores trajo como resultado una biofertilización efectiva, que garantizó una adecuada nutrición nitrogenada y la obtención de rendimientos de biomasa, con indicadores del valor nutritivo similares a los alcanzados con la aplicación de 100 kg N ha⁻¹

with the application of 100 kg N ha⁻¹ through mineral fertilization, at least during the rainy season. However, it is suggested to carry out longer-term studies to determine the permanence of the effect of biofertilization on the soil-grass system, and quantify its influence on the reduction of nitrogen fertilization over time.

Conclusions

The biofertilization with the rhizobacteria *Azospirillum brasilense* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizoglyphus irregulare* constitutes an effective alternative to reduce the application of nitrogen fertilizer in the hybrid *Urochloa* grass cv. 36087 (Mulato II).

Acknowledgments

Thanks to the Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI) for having provided the financing for the execution of the study. It is expressed gratitude to Ana N. San Juan Rodríguez and Daisy Dopico Ramírez, ICIDCA specialists, for their collaboration for the inclusion of the biofertilizer Nitrofix® in the experiment.

mediante la fertilización mineral, al menos durante el período lluvioso. No obstante, se sugiere realizar estudios a más largo plazo para determinar la permanencia del efecto de la biofertilización en el sistema suelo-pasto, y cuantificar en el tiempo su influencia en la reducción de la fertilización nitrogenada.

Conclusiones

La biofertilización con la rizobacteria *Azospirillum brasilense* y el hongo micorrízico arbuscular *Rhizoglyphus irregulare* constituye una alternativa efectiva para reducir la aplicación de fertilizante nitrogenado en el pasto *Urochloa* híbrido cv. 36087 (Mulato II).

Agradecimientos

Se agradece al Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI) por haber aportado el financiamiento para la ejecución del trabajo. Se expresa gratitud a Ana N. San Juan Rodríguez y Daisy Dopico Ramírez, especialistas del ICIDCA, por su colaboración para la inclusión del biofertilizante Nitrofix® en el experimento.

References

- Adil, S., Muneer, M.A., Imran, M., Munir, M.Z., Nisa, Z., Elahi, H., Gillani, S.M.N. & Wang, P. 2017. "Seasonality of arbuscular mycorrhiza and dark septate endophytes in grasses". *Journal of Agricultural Research*, 55(4): 601-610, ISSN: 0095-9758.
- Ambrosino, M.L., Busso, C.A., Cabello, M. N., Velázquez, M.S., Torre, Y.A., Ithurrart, L.S., Cardillo, D.S. & Palomo, I.R. 2018. "Total and structure colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in native, perennial grasses of different forage quality exposed to defoliation". *Journal of King Saud University-Science*, 32(1): 377-383, ISSN: 1018-3647, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.06.001>.
- Baoming, J. & Bever, J. D. 2016. "Plant preferential allocation and fungal reward decline with soil phosphorus: implications for mycorrhizal mutualism". *Ecosphere*, 7(5): e01256, ISSN: 2150-8925, DOI: <https://doi.org/10.1002/ecs2.1256>.
- Basu, S., Rabar, R. & Negi, S. 2017. "Towards a better greener future. I: Plant growth promoting bacteria". *Plant Gene*, 12: 43-49, ISSN: 2352-4073, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.004>.
- Bueno, J.I., do Prado, G., Tinos, A.C., Bruscajin, R.R. & Volpato, G.R. 2019. "Produção sazonal de duas espécies forrageiras irrigadas". *Irriga*, 24(2): 289-302, ISSN: 1808-8546, DOI: <http://dx.doi.org/10.15809/irriga.2019v24n2p289-302>.
- Cassan F. & Díaz-Zorita, M. 2016. "*Azospirillum sp.* in current agriculture: From the laboratory to the field". *Soil Biology & Biochemistry*, 103: 117-130, ISSN: 0038-0717, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Franco, M.Y., Neves, M.F., Sobrinho, C.D.J., Santos, S.R., Pereira, M.L. & Santos, J.M.A. 2015. Adubação nitrogenada em pastagem de *Urochloa brizantha* cv. Paiguás: Recuperação de nitrogênio e eficiência na produção de forragem. II Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, Universidade Estadual de Goiás, Goiás, Brasil.
- Finkel, O.M., Castrillo, G., Herrera, S., Salas, I., Jeffery, L. & Dangl, F.L. 2016. "Understanding and exploiting plant beneficial microbes". *Current Opinion in Plant Biology*, 38: 155-163, ISSN: 1369-5266, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.018>.
- Giovanetti, M. & Mosse, B. 1980. "An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots". *New Phytol*, 84(3): 489-500, ISSN: 1469-8137, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. & Sing, V. 2015. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture". *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2): 96-102, ISSN: 1948-5948, DOI: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>.
- Hanisch, A.L., Balbinot Jr, A.A. & Vogt, G.A. 2017. "Desempenho produtivo de *Urochloa brizantha* cv. Marandu em função da inoculação com *Azospirillum* e doses de nitrogênio". *Revista Agro@ambiente On-line*, 11(3): 200-208, ISSN: 1982-8470, DOI: <https://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i3.3916>.
- Hernández, J.A., Pérez, J.J.M., Bosch, I.D. & Castro, S.N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba. Ediciones INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 91, ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Herrera, R.A., Ferrer, R.L., Furrázola, E. & Orozco, M.O. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, Evolución y Procesos Sociales. Monasterio, M. (ed.). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida, México.
- Hungria, M., Nogueira, M.A. & Araujo, R.S. 2016. "Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics".

- Agriculture, Ecosystems & Environment, 221: 125-131, ISSN: , DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>.
- INSMET. Boletín Agrometeorológico Nacional. 2018. Instituto de Meteorología, Casablanca, La Habana, Cuba.
- Jach-Smith, L.C. & Jackson, R.D. 2018. "N addition undermines N supplied by arbuscular mycorrhizal fungi to native perennial grasses". *Soil Biology and Biochemistry*, 116: 148-157, ISSN: 0038-0717, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.009>.
- Kesting J. 1977. Über nevario Engobnisson sur Verdesserung der in vitro Methoden Zurshiihungder Varelanrickeit vort Ragstegen dar Gasells choft fur krnahrungder. DDR Sektion Tratreharung, Leipzig 1:306.
- Kozioł, L. & Bever, J.D. 2017. "The missing link in grassland restoration: arbuscular mycorrhizal fungi inoculation increases plant diversity and accelerates succession". *Journal of Applied Ecology*, 54(5): 1301-1309, ISSN: 1365-2664, DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12843>.
- Leal, D.M., França, A.F., Oliveira, L.G., Correa, D.S., Arnhold, E., Ferreira, R.N., Bastos, D.C. & Brunes, L.C. 2017. "Fracionamento de carboidratos e proteínas da *Brachiaria* híbrida 'Mulato II' sob adubação nitrogenada e regime de cortes". *Archivos de Zootecnia*, 66(254): 181-188, ISSN: 1885-4494, DOI: <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2320>.
- Lópes, E.A., da Silva, A.D.A., Cavalcanti, A., da Silva, E.V. Santiago, A.D. & Barreto, M.V. 2019. "Co-inoculation of growth promoting bacteria and *Glomus clarum* in micropropagated cassava plants". *Revista Caatinga*, 32(1): 152-166, ISSN: 1983-2125, DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n116rc>.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, Y. & Tribedi, P. 2016. "Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development". *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 3315-3335, ISSN: 1614-7499, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>.
- Marques, D.L., França, A.F.S., Oliveira, L.A., Correa, D.S., Bastos, D.C. & Brunes, L.C. 2017. "Production and chemical composition of hybrid *Brachiaria* cv. Mulato II under a system of cuts and nitrogen fertilization". *Bioscience Journal*, 33(3): 685-696, ISSN: 1981-3163, DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n3-32956>.
- Motta, P.E., Siqueira, J.O., Ribeiro, B.T., Silva, S.H., Poggere, G.C. & Curi, N. 2017. "*Urochloa decumbens* growth and P uptake as affected by long-term phosphate fertilization, mycorrhizal inoculation and historical land use in contrasting Oxisols of the Brazilian Cerrado". *Ciência e Agrotecnologia*, 41(2): 209-219, ISSN: 1413-7054, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542017412042516>.
- Neves, R.G., Freita, G.S., Deminicis, B.B., Mendonça, E.S., Peçanha, A.L., Dobbss, E.B., Neto, A.C. & Deminici, R.G. 2017. "Dry matter yield, growth index, chemical composition and digestibility of Marandu grass under nitrogen and organic fertilization". *Semina: Ciências Agrárias*, 40(5): 1901-1912, ISSN: 1679-0359, DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n5p1901>.
- Oliveira, I.J., Fontes, R.A., Faria, B.F. & Westphal, A. 2018. "Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increases maize yield". *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5, Article No. 6, ISSN: 2196-5641, DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0118-z>.
- Paneque, V.M., Calaña, J.M., Calderón, M., Borges, Y., Hernández, T. & Caruncho, M. 2011. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 153, ISBN: 978-959-7023-51-7.
- Payton, M.E., Miller, A.E. & Raun, W.R. 2000. "Testing statistical hypotheses using standard error bars and confidence intervals". *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(5-6): 547-551, ISSN: 1532-2416, DOI: <https://doi.org/10.1080/00103620009370458>.
- Rodríguez, Y., Arias, L., Medina, A., Mujica, Y., Medina, L.R., Fernández, K. & Mena, A. 2015. "Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrizica". *Cultivos Tropicales*, 36(2): 18-21, ISSN: 1819-4087.
- Sieverding, E., da Silva, G.A., Berndt, R. & Oehl, F. 2014. "Rhizoglomus, a new genus of the Glomeraceae". *Mycotaxon*, 129(2): 373-386, ISSN: 2154-8889, DOI: <http://dx.doi.org/10.5248/129.373>.
- SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Statistical Software (version 25). 2017. SPSS Institute, Chicago, Illinois, USA.
- Teutscherova, N., Vazquez, E., Arevalo, A., Pulleman, M., Rao, I. & Arango, J. 2019. "Differences in arbuscular mycorrhizal colonization and P acquisition between genotypes of the tropical *Brachiaria* grasses: is there a relation with BNI activity?" *Biology and Fertility of Soils*, 55: 325-337, ISSN: 1432-0789, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01353-y>.
- Teixeira, R.N.V., Pereira, C.E., Kikuti, H. & Deminicis, B.B. 2018. "*Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*) cv. Marandu sob diferentes doses de nitrogênio e fósforo em Humaitá-AM, Brazil". *Applied Research & Agrotechnology*, 11(2): 35-41, ISSN: 1983-6325, DOI: <https://doi.org/10.5935/PAeT.V11.N2.04>.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. & Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (eds). INRA, Paris, France, pp. 217-221.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583-3597, ISSN: 0022-0302, DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Villarreal, T.C., Medina, M.E., Ulloa, S.M., Darwin, R.O., Bangeppagari, M., Selvaraj, T. & Sikandar, I.M. 2016. "Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Azospirillum* on growth and nutrition of banana plantlets during acclimatization phase". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(06): 131-138, ISSN: 2231-3354, DOI: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60623>.