

Biofertilización con *Azospirillum brasilense* y *Rhizoglosum irregulare* en *Tithonia diversifolia* (Hemsl.)**Biofertilization with *Azospirillum brasilense* and *Rhizoglosum irregulare* in *Tithonia diversifolia* (Hemsl.)**

Sergio Méndez-Bonet¹ <https://orcid.org/0000-0002-0679-7802>, Pedro José González-Cañizares² <https://orcid.org/0000-0003-3206-0609>, Reynerio Reyes-Rouseaux³ <https://orcid.org/0000-0001-7526-8456>, Juan Francisco Ramírez-Pedroso³ <https://orcid.org/0000-0003-3384-3904>

¹Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. Carrera Tapaste y Autopista Nacional km 23 1/2, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP: 32700, Apartado Postal: 18-19. ²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Gaveta Postal No. 1. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ³Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. Avenida Independencia, km 8 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. Correo electrónico: sergio92@unah.edu.cu, pgonzalez@inca.edu.cu, ramirez@pastos.vclminag.cu

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto de la biofertilización simple y combinada de *Azospirillum brasilense* y *Rhizoglosum irregulare* en el estado nutricional y el rendimiento de biomasa de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.).

Materiales y Métodos: En un experimento de campo se estudiaron cuatro tratamientos, conformados por la inoculación simple y combinada de *A. brasilense* y *R. irregulare* más un testigo sin inocular, en un diseño cuadrado latino. El inóculo con *R. irregulare*, con una concentración de 30 esporas g⁻¹, se aplicó mediante el uso de *Canavalia ensiformis* (L.) DC como cultivo precedente y vía para la reproducción de los hongos micorrízicos en el suelo. *A. brasilense*, con una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹, se administró a razón de 20 L ha⁻¹, 15 días después de la plantación. Se evaluaron la frecuencia e intensidad de la colonización micorrízica, las concentraciones de NPK en la biomasa de la parte aérea y los rendimientos de masa seca.

Resultados: *R. irregulare* aumentó la frecuencia e intensidad de la colonización micorrízica, así como el número de esporas en la rizosfera. No obstante, los mayores efectos se alcanzaron cuando se aplicó de manera conjunta con *A. brasilense*. Los biofertilizantes por separado incrementaron las concentraciones de nitrógeno en la biomasa aérea y los rendimientos de masa seca, pero los mayores valores de estas variables, así como la mayor eficiencia de la biofertilización, se obtuvieron con la aplicación conjunta de ambos. El efecto de la biofertilización se mantuvo durante el año en que se condujo el experimento.

Conclusiones: La inoculación simple con *A. brasilense* y *R. irregulare* mejora la nutrición nitrogenada y los rendimientos de biomasa de *T. diversifolia*. Con la aplicación conjunta de ambos biofertilizantes, se logra mayor efectividad de la inoculación micorrízica. Se consiguen, además, valores superiores en estos indicadores con respecto a lo que se logra con cada uno por separado.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, crecimiento, estado nutricional, hongos, rendimiento

Abstract

Objective: To evaluate the effect of simple and combined biofertilization of *Azospirillum brasilense* and *Rhizoglosum irregulare* on the nutritional status and biomass yield of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.).

Materials and Methods: In a field experiment four treatments were studied, made up by the simple and combined inoculation of *A. brasilense* and *R. irregulare* plus a non-inoculated control, in a Latin square design. The inoculant with *R. irregulare*, with a concentration of 30 spores g⁻¹, was applied through the use of *Canavalia ensiformis* (L.) DC as preceding crop and a way for the reproduction of mycorrhizal fungi in the soil. *A. brasilense*, with a concentration of 10⁹ CFU mL⁻¹, was administered at a rate of 20 L ha⁻¹, 15 days after planting. The frequency and intensity of the mycorrhizal colonization, the concentrations of NPK in the biomass of the aerial part and dry matter yields, were evaluated.

Results: *R. irregulare* increased the frequency and intensity of mycorrhizal colonization, as well as the number of spores in the rhizosphere. Nevertheless, the highest effects were reached when it was applied jointly with *A. brasilense*. The biofertilizers separately increased the nitrogen concentrations in the aerial biomass and the dry matter yields, but the highest values of these variables, as well as the highest efficiency of biofertilization, were obtained with the joint application of both. The effect of biofertilization remained during the year in which the experiment was conducted.

Conclusions: The simple inoculation with *A. brasilense* and *R. irregulare* improves the nitrogen nutrition and biomass yields of *T. diversifolia*. With the joint application of both biofertilizers, higher effectiveness of the mycorrhizal inoculation is achieved. In addition, higher values are achieved in these indicators compared with the results reached with each one separately.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, growth, nutritional status, fungi, yield

Recibido: 09/08/2021

Aceptado: 23/12/2021

Como citar este artículo: Méndez-Bonet, Sergio; González-Cañizares, Pedro José; Reyes-Rouseaux, Reynerio & Ramírez-Pedroso, Juan Francisco. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* y *Rhizoglosum irregulare* en *Tithonia diversifolia* (Hemsl.). *Pastos y Forrajes*. 45:eE8, 2022.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>. El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

Introducción

Tithonia diversifolia (Hemsl.), conocida comúnmente como botón de oro, es una planta de la familia *Asteraceae*. Originaria de América Central, se adapta bien a regiones tropicales y se cultiva en diversos países como recurso forrajero, por su alta producción de biomasa, rápida recuperación después del corte y valor nutricional (Cerdas-Ramírez, 2018).

Esta especie extrae del suelo cantidades importantes de nutrientes para la producción de la biomasa (Botero-Londoño *et al.*, 2019), de modo que cuando se cultiva como forraje, necesita una adecuada fertilización para mantener su productividad y conservar la fertilidad del medio edáfico (López-Guzmán *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2021). Sin embargo, los altos precios de los fertilizantes y la necesidad de fomentar una agricultura amigable con el medio ambiente, sugieren la búsqueda de estrategias de fertilización que garanticen una nutrición adecuada de los cultivos, disminuyan el uso de insumos externos y, a la vez, aseguren la protección de los recursos naturales (Finkel *et al.*, 2017).

En los últimos años se ha prestado mucha atención al uso de los biofertilizantes, por su efecto directo en la mejora de las propiedades biológicas de los suelos, el aumento de los rendimientos de los cultivos y la reducción del uso de los fertilizantes sintéticos (Agarwal *et al.*, 2018).

Entre los microorganismos utilizados como biofertilizantes se encuentra la bacteria asociativa *Azospirillum brasilense*, capaz de fijar nitrógeno atmosférico y mejorar la productividad y calidad de los cultivos, además de otros beneficios como la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos y la protección de las plantas contra estreses abióticos (Fukami *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018). También la biofertilización con hongos formadores de micorrizas arbusculares, que aumentan el volumen de suelo, exploran las raíces y facilitan la absorción de los nutrientes y el agua, ha mostrado su efectividad en diferentes cultivos (Chandrasekaran, 2020; Simó-González *et al.*, 2020). Sin embargo,

pocos trabajos abordan el efecto de la utilización de ambos biofertilizantes en la producción de forraje de *T. diversifolia*.

A partir de estas premisas, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la biofertilización, simple y combinada de *Azospirillum brasilense* y *Rhizoglossomus irregulare*, en el estado nutricional y el rendimiento de biomasa de *T. diversifolia*.

Materiales y Métodos

Localización. El experimento se realizó en una vaquería de la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) Juan Oramas, ubicada en el municipio de Guanabacoa, provincia La Habana, a los 23°08' de latitud Norte y a los 82°11' de longitud Oeste.

Suelo. El estudio se realizó en un suelo pardo mullido carbonatado (Hernández-Jiménez *et al.*, 2015), cuyas características químicas principales se presentan en la tabla 1.

Para el análisis del suelo se utilizaron los siguientes métodos: pH en H₂O (potenciometría, relación suelo-agua 1:2.5), contenido 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 y 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).

Condiciones climáticas. El comportamiento de las precipitaciones durante el período en que se condujo el experimento (junio 2018-julio 2019) se presenta en la figura 1.

Tratamiento y diseño experimental. Se evaluaron cuatro tratamientos (biofertilización con *A. brasilense*, biofertilización con *R. irregulare*, biofertilización con *A. brasilense* + *R. irregulare* y un testigo sin inocular), distribuidos en un diseño cuadrado latino para evitar posibles variaciones en

Tabla 1. Características químicas del suelo (profundidad 0-20 cm).

pH H ₂ O	MO %	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	CIB
		mg kg ⁻¹	cmol kg ⁻¹				
7,6	4,49	125	51,3	5,5	0,22	0,91	57,93
(0,1)	(0,20)	(18)	(2,4)	(0,9)	(0,09)	(0,12)	(3,75)

MO: materia orgánica, CIB: capacidad de intercambio de bases, Valores entre paréntesis indican intervalos de confianza ($\alpha=0,05$)

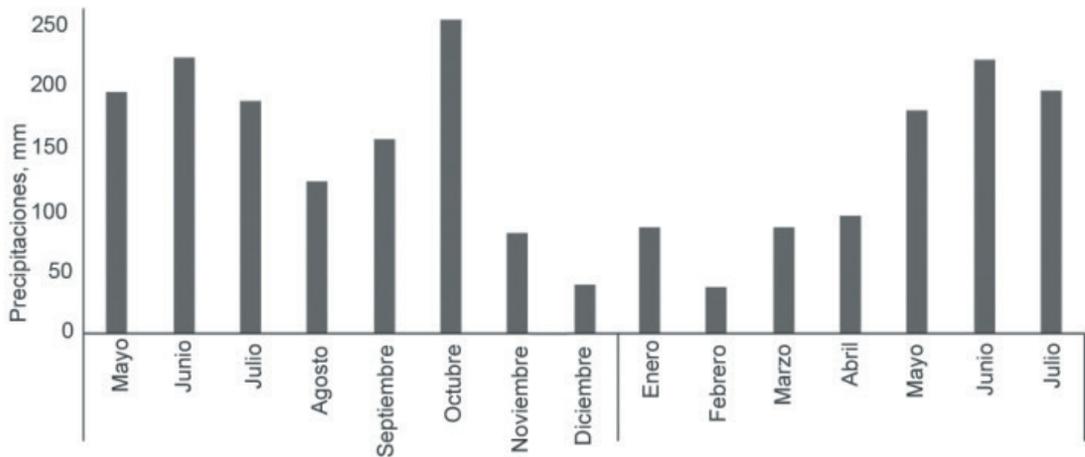


Figura 1. Comportamiento de las precipitaciones durante la ejecución del experimento.
Fuente: Datos tomados en el área experimental

la fertilidad del suelo y en las poblaciones residentes de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), originadas por la distribución espacial y el manejo agronómico que tuvieron las plantas cultivadas anteriormente en el área donde se realizó el experimento, y que pudieran aumentar el error experimental. Cada tratamiento se distribuyó una sola vez, en filas y columnas. Las parcelas constituyeron la unidad experimental, con una superficie total de 24 m² y un área de cálculo de 16 m².

Procedimiento experimental. El suelo se preparó mediante labores de roturación (arado), grada, cruce (arado) y grada, a intervalos aproximados de 25 días entre cada labor. Posteriormente se surcó, y en mayo de 2018, todas las parcelas se sembraron de *Canavalia ensiformis* (L.) DC, pero se inoculó con *R. irregulare* en el momento de la siembra en los dos tratamientos correspondientes a la biofertilización con HMA, como vía para reproducir en el suelo cantidades suficientes de propágulos micorrízicos de *R. irregulare* para la posterior inoculación de *T. diversifolia* (Rivera *et al.*, 2020).

C. ensiformis se sembró a 50 cm entre surcos y 20 cm entre plantas. En los tratamientos con

HMA, la inoculación se realizó por el método del recubrimiento de las semillas. Para ello se preparó una pasta fluida mediante la mezcla de inóculo sólido y agua, en proporción 1: 0.6 m v, donde se sumergieron las semillas. Se secaron a la sombra e inmediatamente se sembraron. El inóculo contenía 30 esporas por gramo de la cepa INCAM-11, de la especie de HMA *R. irregulare* (Sieverding *et al.*, 2014), procedente de la colección del INCA.

A su vez, *C. ensiformis* se cortó a los 60 días y su biomasa aérea se retiró del campo para la alimentación de los animales. La tabla 2 muestra la cantidad de esporas de HMA que quedaron en el suelo en las parcelas correspondientes a cada tratamiento, después del corte de *C. ensiformis* y al momento de la plantación de *T. diversifolia*.

Después del corte de *C. ensiformis*, se surcó y se procedió a la plantación de *T. diversifolia*, que se realizó con propágulos vegetativos de aproximadamente 30 cm de longitud, tomados de la parte superior y media de los tallos de un campo cultivado de esta especie, muy próximo al área experimental. Los propágulos se plantaron a 1,0 m entre surcos y 0,5 m entre plantas.

Tabla 2. Cantidades de esporas que quedaron en el suelo después del corte de *C. ensiformis*.

Tratamiento	Número de esporas (50 g ⁻¹ de suelo)
Testigo	87 (± 10)
<i>R. irregulare</i>	422 (± 15)
<i>A. brasilense</i>	93 (± 17)
<i>R. irregulare</i> + <i>A. brasilense</i>	431 (± 9)

Valores entre paréntesis indican intervalos de confianza ($\alpha=0,05$)

Al momento de la plantación de *T. diversifolia*, en cada parcela se tomaron muestras compuestas de suelo, a una profundidad de 0-20 cm, a las que se les determinó pH en H₂O y los contenidos de materia orgánica, P asimilable, bases intercambiables y determinación del Ca y Mg, Na y K, y la capacidad de intercambio de bases.

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 cepa 8I, con una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹. Se preparó una mezcla de inóculo líquido y agua en relación 1:10 v/v. Mediante una mochila manual se aplicó al suelo, 20 L ha⁻¹ del producto comercial. Se administró muy próximo a los surcos, a los quince días después de la brotación de *T. diversifolia*. El experimento se condujo en condiciones de secano y no se aplicó fertilización de fondo.

Mediciones. Se realizaron cuatro cortes. El primero a los 120 días después de la plantación (noviembre de 2018) y el resto, en febrero, mayo y julio de 2019, a una altura de 30 cm de la superficie del suelo. En cada corte se pesó la biomasa fresca de la parte aérea correspondiente al área de cálculo de las parcelas. Se tomaron muestras de 200 g, que se llevaron a una estufa de circulación de aire a 70 °C durante 72 h, para calcular el porcentaje de materia seca (MS) y estimar el rendimiento de MS. En el segundo y cuarto corte, se determinaron las concentraciones (g kg⁻¹ de MS) de N, P, K en la biomasa (Paneque *et al.*, 2011).

En el momento del segundo y cuarto corte, enmarcados en el período lluvioso y poco lluvioso, respectivamente, se tomaron tres sub-muestras de raíces y de suelo de la rizosfera de cada parcela, a profundidad de 0-20 cm. Se usó para ello 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 homogeneizaron para formar una muestra compuesta por parcela y se extrajo 1 g de raicillas para su tinción y clarificación (Rodríguez-Yon *et al.*, 2015). Se evaluaron la frecuencia de colonización micorrízica mediante el método de los interceptos (Giovanetti y Mosse, 1980) y la densidad visual o intensidad de la colonización, de acuerdo con Trouvelot *et al.* (1986), así como el número de esporas en la rizosfera a partir del tamizado y decantado por vía húmeda de dichas estructuras y de su observación en el microscopio (Herrera *et al.*, 1995).

Se determinó el índice de eficiencia (IE) de la biofertilización mediante la siguiente fórmula:

$$IE: [\text{Rendimiento acumulado de MS (t ha}^{-1}\text{) del tratamiento biofertilizado} - \text{Rendimiento acumulado de MS (t ha}^{-1}\text{) del tratamiento testigo} / \text{Rendimiento de MS (t ha}^{-1}\text{) del tratamiento testigo}] \times 100$$

Análisis matemático. Los datos, una vez que se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza, se procesaron mediante el análisis de varianza y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). En las variables correspondientes a las características químicas del suelo y al número de esporas de HMA que quedaron en el suelo después del corte de *C. ensiformis* (tablas 1 y 2), así como en aquellas cuyos resultados se muestran en las figuras, se utilizó el intervalo de confianza ($\alpha=0,05$) como estadígrafo de dispersión o como criterio para su comparación (Payton *et al.*, 2000). En todos los casos se utilizó el programa estadístico SPSS 25 (2017).

Resultados y Discusión

La inoculación con *R. irregulare* incrementó la frecuencia e intensidad de la colonización y el número de esporas en la rizosfera (fig. 2), lo que demostró la efectividad de esta cepa para colonizar las raíces de *T. diversifolia*. No obstante, los mayores valores se alcanzaron con la aplicación conjunta de ambos biofertilizantes. Este comportamiento se pudiera atribuir al aumento de los sitios de colonización del HMA a partir del efecto positivo que ejercen las fitohormonas producidas por *A. brasilense* en el incremento de la longitud y la ramificación de las raíces y, consecuentemente, en la formación y la multiplicación de las estructuras micorrízicas (Raklami *et al.*, 2019).

El efecto de *R. irregulare* se observó aun en el cuarto corte (julio 2019). Es decir, 12 meses después de la plantación de *T. diversifolia*. Incluso, los valores de frecuencia, intensidad de la colonización micorrízica y número de esporas en la rizosfera en este corte fueron mayores que los registrados en el segundo (febrero 2019). Este comportamiento se pudiera relacionar con las épocas en que se realizaron los muestreos. Durante el período lluvioso ocurre un rápido crecimiento de los cultivos, debido al incremento de los volúmenes de precipitación, temperatura y luminosidad. Ello implica la absorción de mayor cantidad de nutrientes para la formación de la biomasa y, consecuentemente, la formación de mayores cantidades de estructuras micorrízicas para garantizar el acceso de las plantas a los recursos del suelo (Bhardwaj y Chandra, 2018).

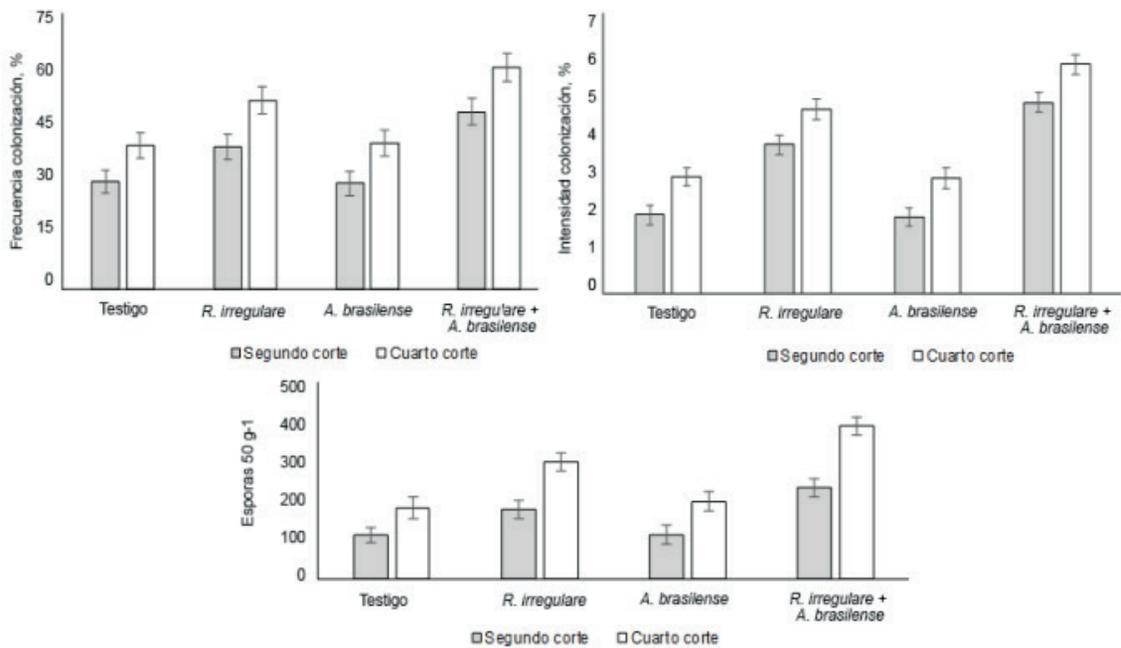


Figura 2. Efecto de los tratamientos en la frecuencia e intensidad de la colonización micorrízica y en el número de esporas en la rizosfera de *T. diversifolia*.

Las barras verticales muestran el intervalo de confianza. Medias con intervalos de confianza que se solapan entre sí no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).

El aumento de las variables fúngicas en los tratamientos inoculados con *R. irregulare* también confirma lo planteado por Rivera *et al.* (2020) acerca de la efectividad del uso de *C. ensiformis* como cultivo precedente y como vía para la inoculación micorrízica del cultivo posterior, lo que implica una reducción importante de las cantidades de inoculante a utilizar.

De acuerdo con el método de inoculación utilizado, en el que se usa una cantidad de inoculante equivalente al 10 % del peso de la semilla o propágulo, en *T. diversifolia* implicaría la utilización de 100 kg ha⁻¹ de inoculante. Sin embargo, con la utilización de *C. ensiformis* previamente inoculada, como vía para la

inoculación de *T. diversifolia* a partir de los propágulos micorrízicos que deja este cultivo en el suelo, la cantidad de inoculante se redujo a 6 kg ha⁻¹.

La tabla 3 muestra el efecto de la biofertilización en las concentraciones de N, P y K en la biomasa de la parte aérea, en el segundo y cuarto corte. *R. irregulare* y *A. brasilense* incrementaron las concentraciones de N con respecto al tratamiento no inoculado, aunque no se constataron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Sin embargo, los mayores efectos se obtuvieron con la aplicación conjunta de los biofertilizantes. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para las concentraciones de P y

Tabla 3. Efecto de los biofertilizantes en las concentraciones de N, P y K en la biomasa (g kg⁻¹).

Tratamiento	Segundo corte			Cuarto corte		
	N	P	K	N	P	K
Testigo	26,7 ^c	2,5	19,2	23,2 c	2,0	17,5
<i>R. irregulare</i>	32,1 ^b	2,2	20,3	28,9 b	2,2	18,3
<i>A. brasilense</i>	31,7 ^b	2,4	19,3	29,1 b	2,2	17,7
<i>R. irregulare</i> + <i>A. brasilense</i>	36,8 a	2,3	20,4	35,4 a	2,1	18,8
EE ±	0,501	0,213	0,416	0,419	0,107	0,311
Valor - P	0,002	0,347	0,256	0,001	0,301	0,415

Letras distintas en la misma columna difieren significativamente, según prueba de Tukey ($p < 0,05$)

K en la biomasa. Este comportamiento estuvo en correspondencia con los altos contenidos de ambos nutrientes en el suelo (Paneque y Calaña, 2001).

Los rendimientos de masa seca tuvieron un comportamiento similar al observado en las concentraciones de nutrientes en la biomasa (tabla 4). Es decir, con la aplicación por separado de uno u otro biofertilizante hubo aumento significativo en este indicador, y ambos mostraron valores similares. No obstante, el mayor efecto se obtuvo mediante la coinoculación con ambos microorganismos.

El efecto de los biofertilizantes en el incremento de los rendimientos de *T. diversifolia* parece estar relacionado con su influencia en el aumento de las concentraciones de N en la biomasa. Se conoce que este cultivo absorbe cantidades importantes de N (Santos *et al.*, 2021), y a juzgar por el contenido de materia orgánica del suelo donde se desarrolló el experimento, que clasifica como mediano (Paneque y Calaña, 2001), la disponibilidad de este elemento en el suelo pudo no ser suficiente para satisfacer la demanda del cultivo.

De este modo, los biofertilizantes pudieron haber contribuido a satisfacer estas necesidades y, consecuentemente, a la mejora de los rendimientos de biomasa.

Al analizar el índice de eficiencia de la biofertilización, que muestra en incremento porcentual los rendimientos de biomasa de cada tratamiento inoculado con respecto al testigo sin inocular, no hubo diferencias entre la aplicación de uno y otro biofertilizante por separado. Sin embargo, el mayor valor se obtuvo con la aplicación conjunta de ambos (fig. 3).

Los HMA participan activamente en la transferencia del N y otros nutrientes del suelo a la planta hospedera mediante la red de micelios que aumenta la capacidad de absorción de las raíces de las plantas (Yu *et al.*, 2020). *A. brasilense* puede fijar cantidades importantes de N atmosférico y transferirlo a la planta hospedera (Aguirre *et al.*, 2018). Ello se traduce en un incremento del rendimiento, incluso, en una reducción de las necesidades de este nutriente, vía fertilización (Leite *et al.*, 2019). Pero el hecho

Tabla 4. Efecto de biofertilizantes en el rendimiento de biomasa de *T. diversifolia* (t MS ha⁻¹).

Tratamiento	Primer corte (Noviembre, 2018)	Segundo corte (Febrero, 2019)	Tercer corte (Mayo, 2019)	Cuarto corte (Julio, 2019)
Control	3,7 ^c	3,5 ^c	3,3 ^c	5,9 ^c
<i>R. irregulare</i>	4,4 ^b	4,2 ^b	4,0 ^b	6,6 ^b
<i>A. brasilense</i>	4,4 ^b	4,3 ^b	4,0 ^b	6,7 ^b
<i>R. irregulare</i> + <i>A. brasilense</i>	5,1 ^a	5,0 ^a	4,6 ^a	7,5 ^a
ES ±	0,181	0,162	0,153	0,204
Valor -P	0,002	0,001	0,002	0,001

Letras distintas en la misma columna difieren significativamente, según prueba de Tukey ($p < 0,05$).

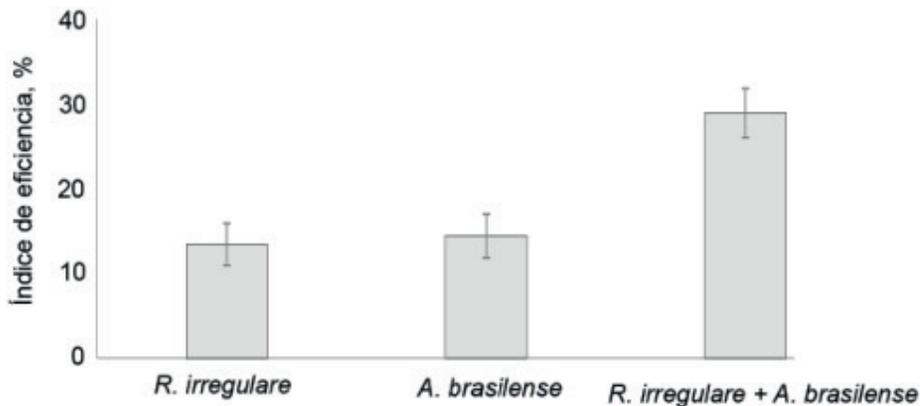


Fig. 3. Índice de eficiencia de la biofertilización. Medias con intervalos de confianza que se solapan entre sí no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).

de que los mayores efectos se hayan obtenido con la aplicación conjunta de ambos biofertilizantes, demuestra que sus beneficios se complementan, lo que da como resultado una respuesta agronómica superior que con la aplicación de uno u otro por separado.

Siddaram *et al.* (2017) y Kamali y Mehraban (2020), al evaluar los efectos de la coinoculación con *A. brasilense* y HMA observaron una interacción tripartita entre ambos microorganismos y la planta hospedera, cuyas relaciones sinérgicas dieron como resultado incremento en las concentraciones de nutrientes y en el crecimiento de las plantas, significativamente mayores que los alcanzados con la aplicación de cada microorganismo por separado.

Otro aspecto interesante fue la permanencia del efecto de los biofertilizantes en el sistema suelo-planta, que se observó aún a los doce meses de la plantación de *T. diversifolia*. Ello hace pensar que los beneficios de la biofertilización se pudieran extender más allá de ese período, y sugiere realizar estudios al respecto.

Se concluye que la inoculación simple con *A. brasilense* y *R. irregulare* mejora la nutrición nitrogenada y los rendimientos de biomasa de *Tithonia diversifolia*. Con la aplicación conjunta de ambos biofertilizantes, se logra mayor efectividad de la inoculación micorrizica y valores de estos indicadores superiores a los que se alcanzan con cada uno por separado. Se sugiere profundizar en los estudios sobre la coinoculación con *A. brasilense* y *R. irregulare* y su contribución a la reducción del uso de fertilizantes.

Agradecimientos

Se agradece al Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI) por el aporte al financiamiento para la ejecución del trabajo. También se expresa gratitud a las M. Sc. Ana N. San Juan Rodríguez y Daisy Dopico Ramírez, Especialistas del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, por la donación del biofertilizante Nitrofix® para la ejecución del experimento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos.

Contribución de los autores

- Sergio Méndez-Bonet. Participó en la ejecución del experimento que condujo a la elaboración del artículo. Participó en el procesamiento estadístico e interpretación de los resultados experimentales y en la escritura del trabajo.
- Pedro José González-Cañizares. Lideró la tarea de investigación que condujo a la elaboración del

artículo, participó en el diseño del experimento e interpretación de los resultados.

- Reynerio Reyes-Rouseaux. Participó en la ejecución del experimento que condujo a la elaboración del artículo y participó en la interpretación de los resultados.
- Juan Francisco Ramírez-Pedroso. Participó en la ejecución del experimento que condujo a la elaboración del artículo. Participó en el diseño y la interpretación de los resultados del experimento.

Referencias bibliográficas

- Agarwal, P.; Gupta, Ritika & Gill, Imneet Kaur. Importance of biofertilizers in agriculture biotechnology. *Ann. Biol. Res.* 9 (3):1-3. <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/importance-of-biofertilizers-in-agriculture-biotechnology-15125.html>, 2018.
- Aguirre, Priscila F.; Olivo, C. J.; Rodrigues, Patricia F.; Falk, Débora R.; Adams, Carine B. & Schiaffino, Helena P. Forage yield of Coastercross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Acta Sci., Anim. Sci.* 40:e36392, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.36392>.
- Bhardwaj, A. K. & Chandra, K. K. Soil moisture fluctuation influences AMF root colonization and spore population in tree species planted in degraded entisol soil. *Int. J. Biosci.* 13 (3):229-243, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/13.3.229-243>.
- Botero-Londoño, J. M.; Gómez-Carabalí, A. & Botero-Londoño, Mónica A. Yield, agronomic parameters and nutritional quality of *Tithonia diversifolia* in response to different fertilization levels. *Rev. mex. de cienc. pecuarias.* 10 (3):789-800, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4667>.
- Cerdas-Ramírez, R. Extracción de nutrientes y productividad del botón de oro (*Tithonia diversifolia*) con varias dosis fertilización nitrogenada. *InterSedes.* 19 (39):172-187, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15517/isucr.v19i39.34076>.
- Chandrasekaran, A. A meta-analytical approach on arbuscular mycorrhizal fungi inoculation efficiency on plant growth and nutrient uptake. *Agriculture.* 10:370, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture10090370>.
- Finkel, O. M.; Castrillo, G.; Herrera-Paredes, S.; Salas-González, I. & Dangl, J. L. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38:155-163, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.018>.
- Fukami, Josiane; Cerezini, Paula & Hungria, Mariangela. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.* 8:73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.

- Giovanetti, M. & Mosse, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84:489-500, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.
- Hernández-Jiménez, A.; Pérez-Jiménez, J. M.; Bosch-Infante, D. & Castro-Speck, N. *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*. Mayabeque, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Instituto de Suelos, Ediciones INCA, 2015.
- Herrera, A.; Ferrer, L.; Furrázola, E. & Orozco, M. O. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, evolución y procesos sociales. En: M. Monasterio, ed. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica. Mérida, México, 1995.
- Kamali, S. & Mehraban, A. Effects of Nitrokin and arbuscular mycorrhizal fungi on the agro-physiological traits and grain yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under drought stress conditions. *PlosOne.* 15 (12):e0243824, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243824>.
- Leite, R. da C.; Oliveira, D. dos S. de; Santos, A. C. dos; Leite, R. da C. & Hungria, Mariangela. Mitigation of Mombasa grass (*Megathyrsus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 43:e0180234, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20180234>.
- López-Guzmán, A. E.; Díaz-Jarquín, L. J. & Calero-Borge, W. A. Efecto de tres fertilizantes orgánicos en el crecimiento de botón de oro en condiciones de vivero, Nueva Guinea, RACCS. *Cienc. Intercult.* 24 (1):203-214, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5377/rci.v24i01.8016>.
- Oliveira, I.; Fontes, J. R. A.; Pereira, B. F. F. & Muñiz, A. W. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increases maize yield. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 5:6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0118-z>.
- Paneque, V. M. & Calaña, J. M. *La fertilización de los cultivos. Aspectos teórico prácticos para su recomendación*. San José de las Lajas, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. p. 28, 2001.
- Paneque, V. M.; Calaña, J. M.; Calderón, M.; Borges, Y.; Hernández, T. & Caruncho, M. *Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos*. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2011.
- Payton, M. E.; Miller, A. E. & Raun, W. R. Testing statistical hypotheses using standard error bars and confidence intervals. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31 (5-6):547-551, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103620009370458>.
- Raklami, A.; Bechtaoui, N.; Tahiri, A.; Anli, M.; Meddich, A. & Oufdou, K. Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility. *Front. Microbiol.* 10:1106, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01106>.
- Rivera, R.; Martín, Gloria; Simó, J.; Pentón, Gertrudis; García-Rubido, Milagros; Ramírez, J. et al. Benefits of joint management of green manure and mycorrhizal inoculants in crop production. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 23:97. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/3294/1497>, 2020.
- Rodríguez-Yon, Yaelin; Arias-Pérez, Lianne; Medina-Carmona, Aida; Mujica-Pérez, Yonaisy; Medina-García, Laura R.; Fernández-Suárez, Kalyanne et al. Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrizica. *Cult. Trop.* 36 (2):18-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000200003&lng=es&tlng=es, 2015.
- Santos, Márcia V.; Silva, L. D. da; Santos, J. B. dos; Ferreira, E. A. & Santos, L. D. T. Effects of irrigation and nitrogen fertilization rates on yield, agronomic efficiency and morphophysiology in *Tithonia diversifolia*. *Agric. Water Manag.* 248:106782, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106782>.
- Siddaram, M. D.; Santhosh, G. P.; Shubha, S.; Gundappagol, R. C. & Umesh, M. R. Field evaluation of consortium of *Azospirillum*, PSB and AM fungus on yield parameters of direct seeded rice. *Environ. Ecology.* 35 (2C):1364-1367. https://drive.google.com/file/d/1dFhKz4-gihuVNRAd-Lj-jH_iFy5blxal/view, 2017.
- Sieverding, E.; Silva, G. A. da; Berndt, R. & Oehl, F. *Rhizoglossum*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon.* 129 (2):373-386, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5248/129.373>.
- Simó-González, J.; Rivera-Espinosa, R.; Ruiz-Martínez, L. & Martín-Alonso, Gloria. La integración de inoculantes micorrizicos, abonos verdes y abonamiento orgánico-mineral en plantaciones de bananos en suelos pardos. *Trop. Subtrop. Agroecosystem.* 23 (8). <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2882/1367>, 2020.
- Trouvelot, A.; Kough, J. L. & Gianinazzi-Pearson, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st Symposium européen sur les mycorrhizes*. Paris: INRA. p. 217-221, 1986.
- Yu, Y.; Zhao, L.; Cui, M.; Xiao, Y.; Wang, C.; Miao, Y. et al. Exploring slope spatial heterogeneity by nitrogen transfer and arbuscular mycorrhizal community. *J. Soils Sediments.* 20:3569-3579, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02690-4>.