

## Response of *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel cv. Formidable), inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*, under drought stress

### Respuesta de *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel cv. Formidable), inoculado con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum*, bajo estrés de sequía

C. J. Bécquer<sup>1</sup>, U. Ávila<sup>1</sup>, Adelaida Puentes<sup>2</sup>, J. A. Nápoles<sup>1</sup>, T. Cancio<sup>1</sup>, F. Medinilla<sup>3</sup>, Ivón Muir<sup>1</sup> and Yahima Madrigal<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Universidad "José Martí Pérez", Avenida de los Mártires 360 esq. Carretera Central, Sancti Spiritus, Cuba

<sup>3</sup>Centro Meteorológico Provincial de Sancti Spiritus. Comandante Fajardo final s/n Olivos I Sancti Spiritus, Cuba  
Email: pastosp@enet.cu

A field experiment under agricultural drought stress was carried out to evaluate the response of *Cenchrus ciliaris* L. to the inoculation of *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*. A random block design was applied, with seven treatments (Trichoderma in the establishment cut + *Bradyrhizobium* sp. at 15 d; *Bradyrhizobium* sp. in the establishment cut + Trichoderma at 15 d; *Bradyrhizobium* sp. + Trichoderma in the establishment cut; Trichoderma in the establishment cut; *Bradyrhizobium* sp. in the establishment cut; absolute control and fertilized control), with eight repetitions per treatment. ANOVA analysis was performed and differences between means were determined according to LSD of Fisher. Dry weight of the aerial part was evaluated, as well as the inoculation efficiency index based on the dry weight of the aerial part, stem length, ear length, dry weight of the ear and inoculation efficiency index based on dry weight of the ear. It is concluded that treatments with superior results in the variables studied were: Trich. + Ho13. 15 d., especially in the inoculation efficiency index based on dry weight of the aerial part (108.5 %) and dry weight of the ear (131.3 %); Ho13 + Trich.15d., in the inoculation efficiency index based on dry weight of the ear (112.4 %) and Trichoderma, with 122.2 % in the inoculation efficiency index based on dry weight of the ear. The treatment in which the two microorganisms were combined in the same period did not have a favorable effect on the plant, which suggests a possible antagonism between both. It is recommended to apply the treatment Trich. + Ho13.15 d. in agricultural practice under environmental conditions similar to those of this experiment.

Key words: *Bradyrhizobium*, *Trichoderma*, agricultural drought, *Cenchrus ciliaris* L.

*Cenchrus ciliaris* Linn (Buffel) is considered as an important forage species for the tropics (Hutton 1978). This grass is extensively cultivated in arid and semi-arid ecosystems of several countries and is used to stabilize soils and increase productivity of grasslands that have experienced the effect of drought combined with overgrazing (Lyons *et al.* 2013). Christie (1978) states that Buffel is more resistant to steam transfer, with good humidity as with drought, compared

Se llevó a cabo un experimento de campo bajo estrés de sequía agrícola para evaluar la respuesta de *Cenchrus ciliaris* L. a la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum*. Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, con siete tratamientos (Trichoderma en el corte de establecimiento + *Bradyrhizobium* sp. a los 15 d; *Bradyrhizobium* sp. en el corte de establecimiento + Trichoderma a los 15 d; *Bradyrhizobium* sp. + Trichoderma en el corte de establecimiento; Trichoderma en el corte de establecimiento; *Bradyrhizobium* sp en el corte de establecimiento; control absoluto y testigo fertilizado, con ocho repeticiones por tratamiento. Se realizó análisis de ANOVA. Las diferencias entre medias se determinaron según LSD de Fisher. Se evaluó el peso seco de la parte aérea, el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco de la parte aérea, la longitud del tallo, la longitud de la espiga, el peso seco de la espiga y el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco de la espiga. Se concluye que los tratamientos con resultados superiores en las variables estudiadas fueron: Trich.+ Ho13. 15 d., especialmente en el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco de la parte aérea (108.5 %) y del peso seco de la espiga (131.3 %); Ho13+Trich.15d., en el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco de la espiga (112.4%) y Trichoderma, con 122.2% en el índice de eficiencia de la inoculación sobre la base del peso seco de la espiga. Las variables que más se favorecieron con los tratamientos inoculados fueron el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la espiga. El tratamiento en el que se combinaron los dos microorganismos en el mismo espacio de tiempo no ejerció efecto favorable en la planta, lo que sugiere un posible antagonismo entre ambos. Se recomienda aplicar el tratamiento Trich.+Ho13.15 d. en la práctica agrícola en condiciones ambientales similares a las de este experimento.

Palabras clave: *Bradyrhizobium*, *Trichoderma*, sequía agrícola, *Cenchrus ciliaris* L.

*Cenchrus ciliaris* Linn (Buffel) se considera una especie forrajera importante para los trópicos (Hutton 1978). Esta gramínea pratense se cultiva de forma extensiva en ecosistemas áridos y semiáridos en varios países y se utiliza para estabilizar suelos e incrementar la productividad de praderas que han experimentado el efecto de la sequía combinado con el sobrepastoreo (Lyons *et al.* 2013). Christie (1978) afirma que Buffel es más resistente a la transferencia de vapor, con

to *Thyridolepis mitchelliana* and *Monachather paradoxa*.

According to Machado *et al.* (2013), to improve forage biomass production of cultivated grasses, in addition to the selection of rhizobia effective in nitrogen fixation, it is also necessary to select rhizobia, capable of promoting the growth of forage grasses. Interactions between plants and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere may improve crop yields, because rhizobacteria directly stimulate plant growth by producing phytohormones and increasing absorption of nutrients, microelements and nutritional substances such as K, P and atmospheric N (Hoitink *et al.*, 2006). Other microorganisms such as *Trichoderma* are not only able to control the pathogenic microbiota, but also to act as a source of plant growth promoting substances (Bécquer *et al.*, 2013).

Rhizobacteria can also help plants better tolerate drought effects. Rhizobia occupy an important place in stress tolerance induction in plants (Uchiumi *et al.*, 2004 and Stiens *et al.*, 2006). Recent studies indicate the plant growth promoting activity of *Trichoderma spp.* in plants (Saber *et al.* 2009 and Shaban and El-Bramawy 2011). There are studies of the positive effect of *T. harzianum* in triticale, when combined with rhizobia under agricultural drought conditions in Sancti Spíritus, Cuba (Bécquer *et al.*, 2016b).

The objective of this research was to evaluate the response of *Cenchrus ciliaris* L. to the inoculation of *Bradyrhizobium sp.* and *Trichoderma harzianum* under agricultural drought conditions and select the best microbial combinations for their practical application.

## Materials and Methods

**Experiment location.** The experiment was carried out from January to April 2016 in an experimental plot of the Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spíritus, located at 21° 53'00" North latitude and 79° 21'25" West longitude, at a height of 40 m o.s.l.

**Microorganisms.** Ho13 isolate, belonging to *Bradyrhizobium sp.* genus (Bécquer *et al.* 2016a), microsymbiont of *Centrosema virginianum*, was used, which is a legume from an arid livestock ecosystem of Holguín, Cuba.

**Trichoderma strain.** The product TRICHOSAVE 34 (LABIOFAM S.A.), composed of a rice head and husk substrate, inoculated with sporulated mycelia of *Trichoderma harzianum* A-34, was used.

**Preparation of the inoculum with Bradyrhizobium.** The isolate grew in solid yeast-mannitol medium (Vincent 1970) and was re-suspended in liquid medium to achieve cell concentration of 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> CFU/mL. For the inoculation of plants, the inoculum was diluted in a 1:10 proportion in 0.9 % saline solution.

**Preparation of the inoculum with Trichoderma.** By

buena humedad como con sequía, en comparación con *Thyridolepis mitchelliana* y *Monachather paradoxa*.

Según Machado *et al.* (2013), para mejorar la producción de biomasa forrajera de los pastos cultivados, además de la selección de rizobios efectivos en la fijación de nitrógeno, es también necesaria la selección de rizobios, capaces de promover el crecimiento de las gramíneas forrajeras. Las interacciones entre plantas y las llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) en la rizosfera pueden mejorar los rendimientos de los cultivos, ya que las rizobacterias estimulan directamente el crecimiento de plantas mediante la producción de fitohormonas y el aumento de la absorción de nutrientes, microelementos y sustancias nutritivas como K, P y N atmosférico (Hoitink *et al.* 2006). Otros microorganismos como *Trichoderma* son capaces, no solo de controlar la microbiota patógena, sino de actuar como fuente de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Bécquer *et al.* 2013).

Las rizobacterias también pueden contribuir a que las plantas toleren mejor los efectos de la sequía. Los rizobios ocupan un lugar importante en la inducción de tolerancia a estrés en las plantas (Uchiumi *et al.* 2004 y Stiens *et al.* 2006). Estudios recientes indican la actividad promotora del crecimiento vegetal de *Trichoderma spp.* en las plantas (Saber *et al.* 2009 y Shaban y El-Bramawy 2011). Existen estudios del efecto positivo de *T. harzianum* en triticale, al combinarse con rizobios en condiciones de sequía agrícola en Sancti Spíritus, Cuba (Bécquer *et al.* 2016b).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta de *Cenchrus ciliaris* L. a la inoculación de *Bradyrhizobium sp.* y *Trichoderma harzianum* en condiciones de sequía agrícola y seleccionar las mejores combinaciones microbianas para su aplicación práctica.

## Materiales y Métodos

**Localización del experimento.** El experimento se realizó de enero a abril de 2016 en una parcela experimental de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spíritus, situada a 21° 53' 00'' de latitud Norte y los 79° 21' 25'' de longitud Oeste, a una altura de 40 msnm.

**Microorganismos.** Se utilizó el aislado Ho13, perteneciente al género *Bradyrhizobium sp.* (Bécquer *et al.* 2016a) microsimbionte de *Centrosema virginianum*, leguminosa procedente de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba.

**Cepa de Trichoderma.** Se empleó 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 del inóculo con Bradyrhizobium.** El aislado creció en medio sólido levadura-manitol (Vincent 1970) y se resuspendió en medio líquido hasta lograr concentración celular de 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> UFC/mL. Para la inoculación de las plantas, se procedió a diluir el inóculo en proporción 1:10 en solución salina 0.9 %.

technical recommendation of the manufacturer, the product was added to running water, at a rate of 35 g/L. It was filtered with gauze before inoculating the plants ( $1-2 \times 10^9$  conidia/g). The conidial suspensions were inoculated according to the used treatment, either simple or in combination with the bacterial inocula. The final title of the suspension ( $10^6-10^8$  conidia/mL) was used according to Wolffhechel and Jensen (1992).

*Plant material.* The experiment was carried out on a plot of 10 m x 10 m, with Buffel cv. Formidable (*Cenchrus ciliaris* L.) from the seed bank of the Estación Experimental de Sancti Spíritus, destined for the production of seeds. An establishment cut was carried out to proceed with the inoculation and no irrigation was applied during the experimental period. It was harvested three months after the cut, when the ears matured.

*Inoculation of plants.* The inoculation with Bradyrhizobium was carried out after the establishment cut, with an inoculum with a cellular concentration of  $10^6-10^8$  CFU/mL. A graduated burette was used, and its content was poured over the freshly cut bunches. In this way, when regulating the pump, each bunch received 100 mL of the liquid inoculum (approximately 5 mL/plant). The re-inoculation of treatments was carried out at 15 d.

Trichoderma inoculation was similar to the previous, for which an inoculum with the title  $10^6-10^8$  conidia/mL was used. The re-inoculation of treatments was carried out at 15 d.

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

*Evaluation of climate variables in the experimental area and period.* Data of temperature, precipitations, relative humidity and wind, as well as their analysis, were collected at the Estación Meteorológica Sancti Spíritus (CMP 2016).

*Agricultural drought state determination.* The state of agricultural drought was determined with the aridity index or agricultural drought index (AI) (Solano and Vázquez 1999), used to verify that the experiment was conducted under water stress conditions:

$$AI = ETR / ETP$$

Where:

ERT – Estimated real evapotranspiration, depending on the state of soil humidity

ETP – Estimated potential evapotranspiration, depending on atmospheric conditions

When  $ETR=ETP$ , water supply of soil is appropriate. When  $ETR < ETP$ , water is insufficient.

*Basic agrochemical composition of experimental soil.* The soil from the experimental area was carbonated grey smooth, medium erosional (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 1.51 % of organic matter and pH of

*Preparación del inóculo con Trichoderma.* Por recomendación técnica del fabricante, el producto se añadió a agua corriente, a razón de 35 g/L. Se filtró con gasa antes de inocular las plantas ( $1-2 \times 10^9$  conidios/g). Las suspensiones conidiales se inocularon 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 Wolffhechel y Jensen (1992).

*Material vegetal.* El experimento se realizó en una parcela de 10 m x 10 m de Buffel cv. Formidable (*Cenchrus ciliaris* L.) del banco de germoplasma de la Estación Experimental de Sancti Spíritus, destinada a la producción de semillas. Se efectuó un corte de establecimiento para proceder a la inoculación y no se aplicó riego durante el período experimental. Se cosechó a los tres meses del corte, al madurarse las espigas.

*Inoculación de las plantas.* La inoculación con Bradyrhizobium se realizó después del corte de establecimiento, con un inóculo con concentración celular de  $10^6-10^8$  UFC/mL. Se utilizó una bureta graduada, cuyo contenido se vertió sobre las macollas recién cortadas. De esta forma, al regular el surtidor cada macolla recibió 100 mL del inóculo líquido (aproximadamente 5 mL/planta). La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 15 d.

La inoculación con Trichoderma se realizó de forma similar al anterior, para lo que se utilizó un inóculo de título  $10^6-10^8$  conidios/mL. La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 15 d.

La inoculación fraccionada se llevó a cabo de acuerdo con el tratamiento, a los 15 d de aplicado el inóculo inicial del microorganismo.

*Evaluación de las variables climáticas en el área y período experimental.* Los datos de temperatura, precipitaciones, humedad relativa y vientos, así como su análisis, se colectaron en la Estación Meteorológica Sancti Spíritus (CMP 2016).

*Determinación del estado de sequía agrícola.* El estado de la sequía agrícola se determinó mediante el índice de aridez o índice de sequía agrícola (IE) (Solano y Vázquez 1999), utilizado para comprobar si el experimento se efectuó en condiciones de estrés hídrico:

$$IE = ETR / ETP$$

donde:

ETR - Evapotranspiración real estimada, dependiente del estado de humedad del suelo.

ETP - Evapotranspiración potencial estimada, dependiente de las condiciones atmosféricas.

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

*Composición agroquímica básica del suelo experimental.* El suelo del área experimental correspondió al tipo Pardo mullido carbonatado 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

*Treatments, experimental design and statistical analysis.* A random block design was applied, with seven treatments and eight repetitions (table 1), so each bunch of the grass was considered as repetition per treatment. An ANOVA analysis was performed, applied to inoculation experiments (Caraux 1993). Differences among means were determined by LSD (Least Significant Difference) test of Fisher (Fisher 1935). The statistical program StatGraphics Centurion XV (Stat Point Technologies

como 1.51 % de materia orgánica y pH de 5.9.

*Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico.* Se aplicó diseño experimental de bloques al azar, con siete tratamientos y ocho repeticiones (tabla 1), para lo que se consideró cada macolla de la gramínea como repetición por tratamiento. Se realizó análisis de ANOVA, aplicado a experimentos de inoculación (Caraux 1993). Las diferencias entre medias se determinaron por la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Fisher 1935). Se utilizó el programa estadístico StatGraphics Centurion XV

Table 1. Treatments used for the experiment

No.	Treatments
1	Trichoderma in establishment cut + <i>Bradyrhizobium sp.</i> at 15 d (Trich.+Ho13.15d.)
2	<i>Bradyrhizobium sp.</i> in establishment cut + Trichoderma at 15 d (Ho13+Trich.15d.)
3	<i>Bradyrhizobium sp.</i> + Trichoderma in establishment cut , (Ho13+Trichoderma)
4	Trichoderma, in establishment cut (Trichoderma)
5	<i>Bradyrhizobium sp.</i> , in establishment cut (Ho13)
6	Absolute control (A. C.)
7	Fertilized control (F.T.)

2010) was used.

*Variables.* They were evaluated only once in each repetition in the harvest of mature ears (3 months).

Dry weight of the aerial part was determined when cutting bunches in the base of the stem. They were dried in a stove (MEMMERT) at 60 °C for 72 h. Later, they were weighed on a digital technical scale (OHAUS).

Stem length (SL, cm) was measured with a 1 m tape measure, from the base of the stem to the insertion.

Ear length (SpL, cm) was measured with a graduated rule of 15 cm, from the insertion to the apex of the ear.

Dry weight of the ear (DWE, mg) was determined after drying the samples in the oven at 60 °C for 72 h. Samples were weighed on a digital analytical balance (OHAUS).

The inoculation efficiency index (IEI, %) was calculated according to the formula IEI: [(Treatment inoculated - Absolute control) / Absolute control] x 100 (Santillana *et al.* 2012).

## Results and Discussion

The positive effect of the combined inoculation of *Bradyrhizobium sp.* and *Trichoderma harzianum* in Buffel was demonstrated, under agricultural drought conditions, at a time of year with complex characteristics that affected the good development of plants. The state of agricultural drought during January and March in the studied area finished with insufficient AI. In February, it reached the category of insufficient to critical (table 2). Under these conditions, it is inferred that the crop was subjected to great water stress.

(Stat Point Technologies 2010).

*Variables.* Se evaluaron solo una vez en cada repetición en el momento de cosecha de las espigas maduras (3 meses).

El peso seco de la parte aérea (PSPA, g/m<sup>2</sup>) se determinó al cortar las macollas en la base del tallo. Estas se secaron en una estufa (MEMMERT) a 60 °C durante 72 h. Posteriormente, se pesaron en una balanza técnica digital (OHAUS).

La longitud del tallo (LT, cm) se midió con una cinta métrica de 1 m, desde la base del tallo hasta la inserción.

La longitud de la espiga (LE, cm) se midió con una regla graduada de 15 cm, desde la inserción hasta el ápice de la espiga.

El peso seco de la espiga (PSE, mg) se determinó después de secar las muestras en la estufa a 60 °C durante 72 h. Las muestras se pesaron en una balanza analítica digital (OHAUS).

El índice de eficiencia de la inoculación (IEI, %) se calculó según la fórmula IEI: [(Tratamiento inoculado - Control absoluto) / Control absoluto] x 100 (Santillana *et al.* 2012).

## Resultados y Discusión

Se demostró el efecto positivo de la inoculación combinada de *Bradyrhizobium sp.* y *Trichoderma harzianum* en Buffel, en condiciones de sequía agrícola, en una época del año con características complejas que perjudicaron el buen desarrollo de las plantas. El estado de la sequía agrícola durante enero y marzo en el área de estudio culminó con un IE de Insuficiente. En febrero alcanzó la categoría de insuficiente a crítica (tabla 2). En estas condiciones se infiere que el cultivo se sometió a

Table 2. Humidity content in the soil, values of estimated potential evapotranspiration and estimated real evapotranspiration. Year 2016

Month	Initial humidity, %	Final humidity, %	Estimated potential evapotranspiration	Estimated real evapotranspiration	Drought or aridity index
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

: Insufficient I-C: Insufficient to Critical

Stem length (table 3) shows that Trich. + Ho13.15d and Ho13 + Trich 15d treatments were superior ( $p < 0.001$ ) to absolute control, and shared common indices with the fertilized control, with Trich + Ho13.15d and with Ho13. Similarity in the values of treatments with a combination of microorganisms indicates a positive influence of them on the studied

gran estrés hídrico.

La longitud del tallo (tabla 3) muestra que los tratamientos Trich.+Ho13.15d y Ho13+Trich 15d fueron superiores ( $p < 0.001$ ) al control absoluto y compartieron índices comunes con el testigo fertilizado, con Trich+Ho13.15d y con Ho13. La similitud en los valores de los tratamientos con combinación de microorganismos

Table 3: Results of stem length and ear length

Treatments	Stem length, cm	Ear length, cm
Ho13	71.1 <sup>bc</sup>	109.3 <sup>b</sup>
Trichoderma	67.5 <sup>c</sup>	9.1 <sup>b</sup>
Ho13+Trich.	71.9 <sup>abc</sup>	7.7 <sup>c</sup>
Ho13+Trich. 15d.	76.7 <sup>ab</sup>	8.1 <sup>c</sup>
Trich.+Ho13.15d.	77.6 <sup>ab</sup>	10.0 <sup>a</sup>
Fertilized control	78.6 <sup>a</sup>	9.5 <sup>ab</sup>
Absolute control	64.6 <sup>c</sup>	7.5 <sup>c</sup>
Standard deviation	12.4	1.7
Standard error	0.9	0.1
Significance	$p < 0.001$	$p < 0.001$

<sup>abc</sup> Values with different superscripts differ at  $P < 0.05$  by LSD of Fisher

variable.

The ability of rhizobia of promoting growth of plants that do not belong to the Leguminosae family through production of phytohormones and other mechanisms has been demonstrated by several authors (Chen *et al.* 2005 and Schlindwein *et al.* 2008). The synthesis of auxins by rhizobia, especially indoleacetic acid, promotes radical development and improves soil nutrients and water absorption and, therefore, the development of the plant (Caballero-Mellado *et al.* 2006).

However, Machado *et al.* (2013) found that rhizobia strains, which produce low levels of IAA, stimulated the growth of *Panicum maximum* and *Paspalum sauriae*. This is probably due to the production of other phytohormones, such as cytokinins (Persello-Cartieaux *et al.* 2003) and gibberellins (Erum and Bano 2008).

Tsavkelova *et al.* (2006) demonstrated that molecules similar to cytokinins, probably kinetin, may be produced by *Trichoderma viride*, so this fungus also has plant growth promoting properties. Chirino-Valle *et al.* (2016) showed that the application of *Trichoderma* species may

indica influencia positiva de estos en la variable estudiada.

La capacidad de los rizobios de promover el crecimiento de las plantas que no pertenecen a la familia Leguminosae mediante la producción de fitohormonas y de otros mecanismos ha sido demostrada por diversos autores (Chen *et al.* 2005 y Schlindwein *et al.* 2008). La síntesis de auxinas por los rizobios, especialmente el ácido indolacético, promueve el desarrollo radical y mejora la absorción de agua y nutrientes del suelo y por tanto, el desarrollo de la planta (Caballero-Mellado *et al.* 2006).

No obstante, Machado *et al.* (2013) encontraron que cepas de rizobios, que producen bajos niveles de AIA, estimularon el crecimiento de *Panicum maximum* y *Paspalum sauriae*. Probablemente, esto se deba a la producción de otras fitohormonas, como citoquininas (Persello-Cartieaux *et al.* 2003) y giberelinas (Erum y Bano 2008).

Tsavkelova *et al.* (2006) demostraron que moléculas similares a citoquinina, posiblemente quinetina, se pueden producir por *Trichoderma viride*, por lo que este hongo también posee propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Chirino-Valle *et al.* (2016)

increase the concentration of chlorophyll, dry weight of the aerial part and stem length in *Miscanthus x giganteus* grass.

For the ear length, Trich. + Ho13.15d treatment showed higher values ( $p < 0.001$ ) than the absolute control and the rest of the treatments, except for the fertilized control, with which shared common superscripts (table 3). These results indicate the marked influence of the fractional combination of these two microorganisms on the plant.

Many rhizobacteria contain 1-aminociclopropano-1-carboxylic acid (ACC) diaminase. This enzyme divides ethylene, precursor of ACC, into  $\alpha$ -ketobutyric and ammonia. Therefore, it reduces ethylene levels of plants under stress (van Loon 2007), which allows the radical system to develop without the inhibition of this compound. This favors a better absorption of nutrients by the plant.

Rhizobia isolate used in this study comes from arid ecosystems from Holguín, Cuba (Bécquer *et al.* 2016a). According to Kaplan *et al.* (2013), isolation of plant growth promoting bacteria in stressful ecosystems, like arid ecosystems or deserts, may provide inoculants that stimulate the development of crops in environments derived from climate change, which coincides with stressful environmental conditions of the experiment. Saba *et al.* (2012) assured that colonization of roots by *Trichoderma spp.* frequently improves growth and development, crop productivity, its resistance to abiotic stress, as well as absorption and use of soil nutrients.

Table 4 shows that there were superior values (Trich.+Ho1315d and Ho13+Trich.15 d) ( $P < 0.0001$ ) to absolute control for dry weight of the aerial part of inoculated treatments, but shared common superscripts with the fertilized control.

There are interrelationships among microorganisms in ecosystems, such as synergistic, antagonistic, physical and biochemical competence. Multifunctionality of these microorganisms in agricultural systems is expressed in accordance with biotic factors, such as competence with other microorganisms, biological composition of soil and plant-microorganism recognition, as well as edaphoclimatic factors (Salinas and Soriano 2014). Interaction of plant growth promoting rhizobacteria, such as *Bradyrhizobium sp.* and fungi of *Trichoderma* genus, depends on this type of factors to express their potential beneficial effects. Several authors report the increase in plant growth as a result of the association of *Trichoderma* strains with plants, but the effect is higher when plants are in suboptimal conditions or in biotic, abiotic or physiological stress (Bae *et al.*, 2009 and Mastouri and Harman 2009).

According to the CMP (2016), humidity levels detected in the experimental period should have implied an increase of plant evapotranspiration. This increases

demonstraron que la aplicación de especies de *Trichoderma* puede incrementar la concentración de clorofila, peso seco de la parte aérea y longitud del tallo en la gramínea *Miscanthus x giganteus*.

Para la longitud de la espiga, el tratamiento Trich.+Ho13.15d mostró valores superiores ( $p < 0,001$ ) al control absoluto y al resto de los tratamientos, excepto al testigo fertilizado, con el que compartió superíndices comunes (tabla 3). Estos resultados indican la influencia marcada de la combinación fraccionada de estos dos microorganismos sobre la planta.

Muchas rizobacterias contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) diaminasa. Esta enzima escinde el precursor del ACC, el etileno, en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio. Por tanto, reduce los niveles de etileno en las plantas sometidas a estrés (van Loon 2007), lo que permite que el sistema radical se pueda desarrollar sin la inhibición propia de este compuesto. Esto propicia mayor absorción de nutrientes por la planta.

El aislado de rizobio que se utilizó en este trabajo proviene de ecosistemas áridos de la provincia de Holguín, Cuba (Bécquer *et al.* 2016a). Según Kaplan *et al.* (2013), el aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en ecosistemas estresantes, como los ecosistemas áridos o de desiertos, puede proveer inoculantes que estimulen el desarrollo de los cultivos en ambientes derivados del cambio climático, lo que coincide con las condiciones ambientales estresantes presentes en el experimento. Saba *et al.* (2012) aseguraron que la colonización de raíces por *Trichoderma spp.* mejora frecuentemente el crecimiento y desarrollo, la productividad de los cultivos, su resistencia a estrés abiótico, así como la absorción y uso de nutrientes del suelo.

En la tabla 4 se muestra que para el peso seco de la parte aérea los tratamientos inoculados presentaron valores superiores (Trich.+Ho1315d y Ho13+Trich.15 d) ( $p < 0,0001$ ) al control absoluto, pero compartieron superíndices comunes con el testigo fertilizado.

Existen interrelaciones entre microorganismos en los ecosistemas, como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica. La multifuncionalidad de estos microorganismos en los sistemas agrícolas se expresa de acuerdo con factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo y el reconocimiento planta-microorganismo, así como los factores edafoclimáticos (Salinas y Soriano 2014). La interacción de las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas, como *Bradyrhizobium sp.* y hongos del género *Trichoderma*, depende de este tipo de factores para expresar sus potenciales efectos benéficos. Diversos autores informan acerca del aumento en el crecimiento vegetal como resultado de la asociación de cepas de *Trichoderma* con plantas, pero el efecto es mayor cuando las plantas se encuentran en condiciones subóptimas o en estrés biótico, abiótico o fisiológico (Bae *et al.* 2009 y Mastouri y Harman 2009).

Según el CMP (2016), los niveles de humedad

Table 4. Results of dry weight of aerial part (DWAP), inoculation efficiency index based on DWAP, dry weight of the ear (DWE) and inoculation efficiency index based on DWE.

Treatments	Dry weight of aerial part, g/m <sup>2</sup>	Inoculation efficiency index (DWAP), %	Dry weight of the ear, mg	Inoculation efficiency index (DWE), %
Ho13	114.0 <sup>b</sup>	-9.5	109.3 <sup>b</sup>	27.7
Trichoderma	136.2 <sup>b</sup>	9.0	190.2 <sup>a</sup>	122.2
Ho13+Trich.	121.0 <sup>b</sup>	-4.0	121.7 <sup>b</sup>	42.2
Ho13+Trich.15d.	267.6 <sup>a</sup>	112.4	105.8 <sup>b</sup>	23.6
Trich.+Ho13.15d.	262.7 <sup>a</sup>	108.5	198.0 <sup>a</sup>	131.3
Fertilized control	288.3 <sup>a</sup>	-	180.6 <sup>a</sup>	-
Absolute control	126.0 <sup>b</sup>	-	85.6 <sup>b</sup>	-
Standard deviation	80.6		75.6	
Standard error	10.8		6.0	
Significance	p<0.0001		p<0.0001	

<sup>ab</sup> Values with different superscripts differ at  $p < 0.05$  by LSD of Fisher

water demand and, consequently, generates higher water stress in crops. Based on these statements, it is logical to confirm the beneficial effect of treatments in which these two microorganisms were combined, in a fractionated manner, in the analyzed variables.

When calculating the IEI in the variable on the basis of dry weight of the aerial part (table 4), the high efficiency of treatments Trich. + Ho1315d and Ho13 + Trich.15 d was verified. Other inoculated treatments, such as Ho13 and Ho13 + Trich., despite sharing common superscripts in the ANOVA analysis for the corresponding variable, presented negative or very low IEI.

It is obvious to note that combined application in the same period of the rhizobium with the fungus did not positively influence the results of this variable and the other studied variables. This result could be linked to the possible antagonistic interaction between both microorganisms. The most well-known example of antagonism among microorganisms is the production of antibiotics, when some source of nutrients or space location is disputed.

In a chemical study of antibiotic metabolites secreted by Trichoderma, it was demonstrated that they segregate when there is true competition with other microorganisms to ensure their growth and survival in the soil (Cupull *et al.*, 2003). In this experiment, *T. harzianum* was able to produce antibiotic metabolites and prevent the growth and adaptation of *Bradyrhizobium sp.*, and, therefore, its stimulating effect. Bécquer *et al.* (2013), in an *in vitro* study, determined that a strain of *Sinorhizobium meliloti* inhibited the growth of *T. harzianum* colony.

The most important phenological stages for cultivation (from germination to grain filling) occurred in February, March and April, which coincided with the lowest occurrence of rainfall. However, dry weight of the ear (table 4) of treatments inoculated with Ho13

detectados en el período experimental debieron implicar incremento de la evapotranspiración de las plantas. Esto hace crecer la demanda de agua y por consiguiente, genera mayor estrés hídrico en los cultivos. Sobre la base de estas afirmaciones, es lógico constatar el efecto benéfico de los tratamientos en los que se combinaron, de manera fraccionada, estos dos microorganismos en las variables analizadas.

Al calcular el IEI en la variable sobre la base del PSPA (tabla 4), se constató la alta eficiencia de los tratamientos Trich.+Ho1315d y Ho13+Trich.15 d. Otros tratamientos inoculados, como Ho13 y Ho13+Trich., a pesar de compartir superíndices comunes en el análisis ANOVA para la variable correspondiente, presentaron IEI negativos o muy bajos.

Es obvio notar que la aplicación combinada en el mismo espacio de tiempo del rizobio con el hongo, no influyó positivamente en los resultados de esta variable y de las demás variables estudiadas. Este resultado pudiera estar vinculado a la posible interacción antagonista entre ambos microorganismos. El ejemplo más conocido de antagonismo entre microorganismos es la producción de antibióticos, al disputarse alguna fuente de nutrientes o ubicación espacial.

En un estudio químico de los metabolitos antibióticos segregados por Trichoderma se demostró que estos se segregan cuando existe una verdadera competencia con otros microorganismos para asegurar su crecimiento y supervivencia en el suelo (Cupull *et al.* 2003). En este experimento, *T. harzianum* pudo producir metabolitos antibióticos y evitar el crecimiento y adecuación de *Bradyrhizobium sp.*, y por tanto, su efecto estimulante. Bécquer *et al.* (2013), en un estudio *in vitro*, determinaron que una cepa de *Sinorhizobium meliloti* inhibió el crecimiento de la colonia de *T. harzianum*.

En febrero, marzo y abril transcurrieron las etapas fenológicas más importantes para el cultivo (desde germinación hasta el llenado de los granos), lo que coincidió con la menor ocurrencia de lluvias. No

+ Trichod.15d and Trichoderma showed superior superscripts ( $p < 0.0001$ ) to absolute control and to the rest of inoculated treatments, while they presented common superscripts with the fertilized control.

According to Saba *et al.* (2012), the stable response to several types of stress in plants inoculated with Trichoderma, suggests a common mechanism by which the plant-fungus association improves tolerance to a wide range of biotic and abiotic stress. According to Russo *et al.* (2012), the growth promotion and biocontrol may be caused by the same microorganism that positively influences the development of the plant through different mechanisms, such as increase of availability and mineral assimilation, release of growth factors and suppression of pathogenic microorganisms. This statement is consistent with the characteristics of Trichoderma and is evident in the results of this study. Harman *et al.* (2004) assure that production of organic acids by Trichoderma favors the solubilization of phosphates, micronutrients and mineral cations, such as iron, manganese and magnesium, so the plant absorbs them better.

Table 4 shows that superior IEI values corresponded to Trich. + Ho13.15d and Trichoderma treatments. The influence of this fungus on the studied variable is evident, as well as on other evaluated variables in this study.

Species of Trichoderma genus, according to Hoyos-Carvajal *et al.* (2009), produce diverse secondary metabolites that promote plant growth, including IAA and auxin analogues. According to Gravel *et al.* (2007), *T. atroviride* may produce and degrade indoleacetic acid (IAA), the most common auxin phytohormone in plants, in addition to possessing 1-aminociclopropane-1-carboxylic acid diaminase activity, which can control the production of ethylene in the plant in water stress. Lucero *et al.* (2006) consider that fungi observed in the stomatic complexes of grasses may have a direct function in the regulation of plant evapotranspiration, so it is not discarded that inoculation with Trichoderma has a positive influence in that sense, since the experiment showed high evapotranspiration that should have affected the plants (CMP 2016).

It is concluded that treatments with superior results in the studied variables were Trich. + Ho13.15 d, Ho13 + Trich.15d and Trichoderma, although the combination Trich. + Ho13.15 d was highlighted because of its superior values in the highest number of variables. Likewise, the variables that were the most favored with inoculated treatments were: dry weight of the aerial part and dry weight of the ear. The treatment with the combination of the two microorganisms in the same time did not exert a favorable effect on the plant, which suggests that there could be antagonism between both.

It is recommended to apply the treatment Trich. + Ho13. 15 d in agricultural practices, under environmental

obstante, el peso seo de la espiga (tabla 4) de los tratamientos inoculados con Ho13+Trichod.15d y Trichoderma mostró superíndices superiores ( $p < 0.0001$ ) al control absoluto y al resto de los tratamientos inoculados, mientras que presentaron superíndices comunes con el testigo fertilizado.

De acuerdo con Saba *et al.* (2012), la respuesta estable a varios tipos de estrés de plantas inoculadas con Trichoderma, sugiere un mecanismo común mediante el que la asociación planta-hongo mejora la tolerancia a un amplio rango de estrés biótico y abiótico. Según Russo *et al.* (2012), la promoción del crecimiento y el biocontrol se puede deber al mismo microorganismo que influye positivamente en el desarrollo de la planta mediante diferentes mecanismos, como el incremento de la disponibilidad y la asimilación de minerales, la liberación de factores de crecimiento y la supresión de microorganismos patógenos. Esta afirmación se ajusta a las características de Trichoderma y se evidencia en los resultados que se obtuvieron en este trabajo. Harman *et al.* (2004) aseguran que la producción de ácidos orgánicos por parte de Trichoderma favorece la solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes minerales, como el hierro, manganeso y magnesio, por lo que la planta los absorbe mejor.

En la tabla 4 se observa que los valores superiores de IEI correspondieron a los tratamientos Trich.+Ho13.15d y Trichoderma. Es evidente la influencia de este hongo en la variable estudiada, así como en otras variables evaluadas en este trabajo.

Las especies del género Trichoderma, según informes de Hoyos-Carvajal *et al.* (2009), producen metabolitos secundarios diversos que promueven el crecimiento vegetal, incluyendo AIA y análogos de las auxinas. Según Gravel *et al.* (2007), *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, la cual puede controlar la producción de etileno en la planta en estrés hídrico. Lucero *et al.* (2006) consideran que los hongos que se observan en los complejos estomáticos de gramíneas pratenses pueden desempeñar una función directa en la regulación de la evapotranspiración de las plantas, por lo que no se descarta que la inoculación con Trichoderma influye positivamente en ese sentido, ya que el experimento presentó alta evapotranspiración que debió afectar las plantas (CMP 2016).

Se concluye que los tratamientos con resultados superiores en las variables estudiadas fueron Trich.+Ho13.15 d, Ho13+Trich.15d y Trichoderma, aunque la combinación Trich.+Ho13.15 d se destacó por sus valores superiores en el mayor número de variables. Asimismo, las variables que más se favorecieron con los tratamientos inoculados fueron: peso seco de la parte aérea y peso seco de la espiga. El tratamiento donde se combinan los dos microorganismos en el mismo espacio de tiempo no ejerció efecto favorable para la planta, lo que sugiere que pudiera existir antagonismo entre ambos.

conditions, similar to those of the experiment.

Se recomienda aplicar el tratamiento Trich.+Ho13. 15 d en la práctica agrícola, en condiciones ambientales similares a las del experimento.

### References

- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L. & Bailey, B. A. 2009. "The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*". *Journal of Experimental Botany*, 60(11): 3279–3295, ISSN: 0022-0957, DOI: 10.1093/jxb/erp165.
- Bécquer, C. J., Galdo, Y., Ramos, Y., Peña, M. D., Almaguer, N., Peña, Y. F., Mirabal, A., Quintana, M. & Puentes, A. 2016a. "Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Morpho-cultural evaluation and nodulation (Phase I)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(4): 607–617, ISSN: 2079-3480.
- Bécquer, C. J., Lazarovits, G. & Lalin, I. 2013. "Interacción *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento vegetal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(1): 97–102, ISSN: 2079-3480.
- Bécquer, G. C. J., Puentes, P. A. B., Ávila, C. U., Quintana, S. M., Galdo, R. Y., Medinilla, N. F. & Mirabales, V. 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.
- Caballero-Mellado, J., Tenorio, S. S., Onofre, L. J., Castro, G. R., Estrada, de los S. P., Paredes, V. G., Peña, C. J. J., Díaz, M. R., Martínez, A. L., Bashan, Y., Puente, M. E., Salazar, B., Rivera, B. F., Aguilera, A. S., López, L. K., Hernández, F. J. L. & Álvarez, M. A. 2006. "Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2): 154–161, ISSN: 0034-9771.
- Caraux, G. 1993. "Statistical summary on the analysis of the variance". In: *Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation: legume/Rhizobium*, Rome, Italy: FAO, pp. 1–10, ISBN: 978-92-5-103199-5, Available: <<https://books.google.com/cu/books?id=tsl6MCV378kC>>, [Consulted: September 5, 2017].
- Chen, X.-C., Feng, J., Hou, B.-H., Li, F.-Q., Li, Q. & Hong, G.-F. 2005. "Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*". *Nucleic Acids Research*, 33(8): 2540–2548, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gki537.
- Chirino-Valle, I., Kandula, D., Littlejohn, C., Hill, R., Walker, M., Shields, M., Cummings, N., Hettiarachchi, D. & Wratten, S. 2016. "Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-service provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture". *Scientific Reports*, 6, ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep25109, Available: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846873/>>, [Consulted: September 5, 2017].
- Christie, E. K. 1978. "Ecosystem processes in semiarid grasslands. I. Primary production and water use of two communities possessing different photosynthetic pathways". *Australian Journal of Agricultural Research*, 29(4): 773–787, ISSN: 1444-9838, DOI: 10.1071/ar9780773.
- 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.
- Cupull, S. R., Andreu, R. C. M., Pérez, N. C., Delgado, P. Y. & Cupull, S. M. del C. 2003. "Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn". *Centro Agrícola*, 30(1): 21–25, ISSN: 0253-5785.
- Erum, S. & Bano, A. 2008. "Variation in phytohormone production in *Rhizobium* strains at different altitudes of northern areas of Pakistan". *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(5): 536–540, ISSN: 1560-8530.
- Fisher, R. A. 1935. *The design of experiments*. call no. OCLC: 2417943, Edinburgh: Oliver and Boyd.
- Gravel, V., Antoun, H. & Tweddell, R. J. 2007. "Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA)". *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8): 1968–1977, ISSN: 0038-0717, DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.02.015.
- 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, 1740-1534, 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.
- Hoitink, H. A. J., Madden, L. V. & Dorrance, A. E. 2006. "Systemic Resistance Induced by *Trichoderma spp.*: Interactions Between the Host, the Pathogen, the Biocontrol Agent, and Soil Organic Matter Quality". *Phytopathology*, 96(2): 186–189, ISSN: 0031-949X, DOI: 10.1094/PHTO-96-0186.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. & Bissett, J. 2009. "Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*". *Biological Control*, 51(3): 409–416, ISSN: 1049-9644, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.07.018.
- Hutton, E. M. 1978. "Humid tropics a sleeping giant". In: Hyder, D. M. (ed.), *I International rangeland congress*, Denver, Colorado, USA: Society for Range Management, pp. 137–139.
- Kaplan, D., Maymon, M., Agapakis, C. M., Lee, A., Wang, A., Prigge, B. A., Volkogon, M. & Hirsch, A. M. 2013. "A survey of the microbial community in the rhizosphere of two dominant shrubs of the Negev Desert highlands, *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) and *Atriplex halimus* (Amaranthaceae), using cultivation-dependent and cultivation-independent methods". *American Journal of Botany*, 100(9): 1713–1725, ISSN: 0002-9122, 1537-2197, DOI: 10.3732/ajb.1200615.
- Lucero, M. E., Barrow, J. R., Osuna, P. & Reyes, I. 2006. "Plant–fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes". *Journal of Arid Environments*, 65(2): 276–284, ISSN: 0140-1963, DOI:

- 10.1016/j.jaridenv.2005.08.014.
- Lyons, K. G., Maldonado-Leal, B. G. & Owen, G. 2013. "Community and Ecosystem Effects of Buffelgrass (*Pennisetum ciliare*) and Nitrogen Deposition in the Sonoran Desert". *Invasive Plant Science and Management*, 6(1): 65–78, ISSN: 1939-7291, DOI: 10.1614/IPSM-D-11-00071.1.
- Machado, R. G., de Sá, E. L. S., Bruxel, M., Giongo, A., Santos, N. da S. & Nunes, A. S. 2013. "Indoleacetic Acid Producing Rhizobia Promote Growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*)". *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(5): 827–834, ISSN: 1560–8530, 1814–9596.
- Mastouri, F. & Harman, G. E. 2009. "Beneficial microorganism *Trichoderma harzianum* induces tolerance to multiple environmental and physiological stresses during germination in seeds and seedlings". In: XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Quebec, Canada: Laval University, Available: <<http://www.ismpmi.org/Congress/Pages/XIV-International-Congress-on-MPMI.aspx>>, [Consulted: September 5, 2017].
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. & Robaglia, C. 2003. "Tales from the underground: molecular". *Plant, Cell & Environment*, 26(2): 189–199, ISSN: 1365-3040, DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x.
- Russo, A., Carrozza, G. P., Vettori, L., Felici, C., Cinelli, F. & Toffanin, A. 2012. "Plant Beneficial Microbes and Their Application in Plant Biotechnology". In: Agbo, E. C. (ed.), *Innovations in Biotechnology*, Shanghai, China: InTech, pp. 57–72, ISBN: 978-953-51-0096-6, Available: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs/28707.pdf>>, [Consulted: September 5, 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.
- Schindwein, G., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Azambuja, A. C., Granada, C. E., Gabiatti, N. C., Prates, F. & Stumpf, R. 2008. "Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface". *Ciência Rural*, 38(3): 658–664, ISSN: 0103-8478, DOI: 10.1590/S0103-84782008000300010.
- 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: *Convención Trópico'99. Congreso de Meteorología Tropical*, La Habana, Cuba, Referencia MT026.
- StatPoint Technologies 2010. Statgraphics Centurion. (ser. Centurion), version XV, [Windows], Available: <<http://statgraphics-centurion.software.informer.com/download/>>.
- 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, 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.72.5.3662-3672.2006.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, 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.
- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M. & Minamisawa, K. 2004. "Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome". *Journal of Bacteriology*, 186(8): 2439–2448, ISSN: 0021-9193, 1098-5530, DOI: 10.1128/JB.186.8.2439-2448.2004.
- 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. IBP handbook, no. ser. 15), Blackwell Scientific Publ., 164 p., Google-Books-ID: dcQcAQAIAAJ, Available: <<https://books.google.com/cu/books?id=dcQcAQAIAAJ>>, [Consulted: September 5, 2017].
- Wolffhechel, H. & Jensen, F. D. 1992. "Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium vites* 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.

Received: February 2, 2017