

PRODUCCIÓN DE SOYA EN INVIERNO CON EL EMPLEO COMBINADO DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* – HONGOS MA Y LA APLICACIÓN DE UN BIOESTIMULADOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

Jorge Corbera y María C. Nápoles

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. MES. Cuba. Email: jcorbera@inca.edu.cu

INTRODUCCIÓN

La Biofertilización es una tecnología que está enraizada con este concepto, la inclusión de microorganismos en las semillas (Inoculación) “Hongos Micorrizas - Bacterias fijadoras de N₂” y/o solubilizadores de fósforo, producen efectos aditivos, de particular importancia, para el desarrollo de cultivos más rendidores, de mejor calidad fitosanitaria y para aumentar el contenido de materia orgánica del suelo. Estos microorganismos, básicamente trabajan sobre el abastecimiento de nitrógeno y fósforo hacia el vegetal; también se acotan otras funciones no menos importantes: desarrollo radicular más abundante y efecto protector contra enfermedades fúngicas de la raíz (Frontera, 2006).

Tomando en cuenta los resultados de las investigaciones a nivel mundial con estos productos biofertilizantes, se ha venido trabajando en el empleo de inoculaciones conjuntas de rizobios y hongos micorrízicos en los cultivos de leguminosas, lográndose incrementos en el crecimiento y rendimiento de las plantas y destacándose la importancia de esta práctica conjunta (Azis y habte, 1990; Valdéz et al., 1993; Hernández y Hernández, 1996; Corbera y Hernández, 1997; Corbera, 1998; Corbera y Núñez, 2004; Hernández, 2008).

En el INCA se trabaja desde 1992 en la obtención de oligosacarinas a partir de materias primas nacionales, desarrollando una metodología (Cabrera, 2003) para la obtención de una mezcla de oligogalacturonidos a partir de pectina cítrica (Pectimorf®), que ha sido utilizada satisfactoriamente en sustitución de reguladores del crecimiento tradicionales o en sinergia con determinadas fitohormonas (Montes et al., 2000; Nieves et al., 2006).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó este estudio, con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación combinada de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos MA, así como de la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal, sobre el crecimiento y rendimiento del cultivar de soya INCASoy 24 en época de invierno.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en las condiciones del área experimental Las Papas, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ubicado en el municipio San José de las Lajas, provincia La Habana, sobre un suelo Ferralítico Rojo Lixiviado (Hernández et al., 1999). (Tabla I).

Tabla I. Algunos componentes de la fertilidad química del suelo (0 – 20 cm).

| pH H ₂ O | P (ppm) | MO (%) | (cmol.kg ⁻¹) | | | |
|------------------------|------------|-----------|--------------------------|------|-------|------|
| | | | Na | K | Ca | Mg |
| 6,61 | 297,9 | 2,24 | 0,39 | 0,69 | 13,37 | 3,62 |

pH – Potenciometría MO – Walkley y Black P – Oniani
Cationes cambiables – Acetato de Amonio 1N, pH 7. Fotometría de llama.

Se utilizó el cultivar de soya INCASoy - 24, sembrado en época de invierno, en un área experimental alrededor de 0,15 ha, con 64 parcelas de 14 m² (4 surcos x 5 m de largo) y 7 m²

de área de cálculo (surcos centrales), empleándose 20 plantas por metro lineal y una distancia entre surcos de 0,70 m.

Fueron aplicados en soporte sólido, a través de la Tecnología de Recubrimiento de semilla (Fernández y Rodríguez, 1996), los productos *Bradyrhizobium japonicum*, cepa ICA 8001: **AzoFert® (B.jap.)** y Micorriza arbuscular, cepa *Glomus Hoi* like: **EcoMic® (MA)**, a razón de 10g.kg⁻¹ de semilla para la bacteria y del 10% del peso de la semilla para el hongo formador de micorriza arbuscular.

El bioestimulante **Pectimori® (Pmorf)**, se aplicó a una dosis de 10 mg.L⁻¹, en tres formas diferentes: imbibición y recubrimiento de la semilla y foliar al inicio de la floración.

Se empleó un diseño de Bloques al azar, con 4 repeticiones por tratamiento, evaluándose los resultados a través de un análisis de varianza (paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows), donde se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para discriminar la diferencia entre las medias.

Se realizaron las siguientes evaluaciones:

Etapas de floración: altura de las plantas en cm, masa seca en gramos (parte aérea y raíz), nodulación (No. de nódulos, masa seca de los nódulos en gramos y porcentaje de efectividad nodular según la coloración en el interior de los nódulos a través del corte transversal de estos), variables fúngicas (empleando la Técnica de Tinción de raíces, se evaluó: No. de esporas, porcentaje de colonización a través del método de los interceptos y la variable transformada como $2\arcsen\sqrt{\%}$ (Phillips y Hayman, 1970; Giovannetti y Mosse, 1980; Trouvelot et al., 1986).

Etapas de cosecha: altura de las plantas en cm, número de vainas por planta, peso de 1000 granos en gramos y rendimiento de granos expresado en t.ha⁻¹.

Las atenciones culturales se realizaron de acuerdo a lo establecido en las normas técnicas para el cultivo (Manual Técnico, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados para la variable altura de las plantas (Tabla 2), tanto en floración como en cosecha, manifestaron respuestas significativas entre tratamientos, destacándose aquellos donde se realizó la inoculación conjunta de los biofertilizantes, con o sin aplicación del estimulador del crecimiento vegetal, y sin diferencias significativas con el tratamiento de fertilización mineral NPK. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Hernández y Cuevas, 2003; Hernández, 2008).

La aplicación del bioestimulador del crecimiento, mostró ligeros incrementos con relación a sus controles donde no fue aplicado, independientemente de la forma en que fue empleado, principalmente al final del ciclo o etapa de cosecha, aunque las diferencias entre tratamientos de manera general no fueron significativas. Efectos de este producto bioestimulador en la altura de las plantas han sido reportados por otros investigadores (Costales et al., 2007; Benítez et al., 2008) en cultivos como el tomate y la palma areca.

En la tabla 2 además se observa el efecto de los tratamientos en la masa seca de la raíz y de la parte aérea de la planta el cual mostró respuestas diferentes. Para la masa seca de la raíz solo se encontraron diferencias de los tratamientos con el testigo absoluto, sin embargo para la masa seca de la parte aérea la respuesta fue superior cuando se aplicaron ambos biofertilizantes de manera conjunta, con incrementos ligeramente superiores cuando se le

adicionó el bioestimulador del crecimiento vegetal, pero sin diferencias entre ellos. Resultados similares para la masa seca han sido señalados (Costales et al., 2007) aplicando una mezcla de oligogalacturónidos en plántulas de tomate. La aplicación del bioestimulante imbibiendo las semillas, para ambas variables evaluadas, no mostró diferencias con el tratamiento testigo absoluto.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos en la altura y la masa seca de las plantas.

| Tratamientos | cv. INCAsoy - 24 | | | |
|-------------------------|------------------|-------------|---------------------------|-----------|
| | Floración | Cosecha | MS raíz | MS aérea |
| | (cm) | | (g.planta ⁻¹) | |
| Testigo absoluto | 35,53 d | 41,60 f | 8,22 b | 35,75 f |
| NPK | 42,73 abc | 49,70 abcd | 12,59 a | 67,25 bcd |
| PK + B.jap. | 40,15 abcd | 44,70 def | 12,87 a | 55,00 de |
| NK + MA | 37,25 cd | 42,15 ef | 12,87 a | 54,00 de |
| K + B.jap. + MA | 43,65 ab | 52,30 abc | 13,66 a | 71,75 abc |
| B.jap. | 39,43 abcd | 45,65 cdef | 12,55 a | 55,00 de |
| MA | 37,75 bcd | 42,50 ef | 12,72 a | 58,50 cde |
| B.jap. + MA | 44,60 a | 52,98 ab | 13,96 a | 79,75 ab |
| Pmorf (I) | 37,35 cd | 46,40 bcdef | 10,70 ab | 48,00 ef |
| B.jap. + MA + Pmorf (I) | 43,15 abc | 52,23 abc | 15,08 a | 80,50 ab |
| B.jap. + MA + Pmorf (R) | 44,05 a | 54,85 a | 15,19 a | 83,75 a |
| B.jap. + MA + Pmorf (F) | 43,48 ab | 54,40 a | 15,35 a | 83,75 a |
| B.jap. + Pmorf (F) | 40,93 abcd | 49,38 abcd | 13,02 a | 61,25 cde |
| B.jap. + Pmorf (I) | 41,65 abc | 49,30 abcd | 13,02 a | 58,50 cde |
| B.jap. + Pmorf (R) | 41,90 abc | 49,63 abcd | 13,02 a | 59,00 cde |
| MA + Pmorf (I) | 38,05 bcd | 48,35 abcde | 13,03 a | 56,25 cde |
| X | 40,73 | 48,51 | 12,99 | 63,00 |
| ES x | 1,78 * | 2,13 * | 1,35 * | 4,85 * |

Medias con letras comunes en una misma columna no difieren significativamente a $p < 0,05$.

El efecto de los tratamientos sobre la nodulación, se refleja en la tabla 3, donde se observaron, para las variables número de nódulos y masa seca de los mismos, respuestas significativas a los diferentes tratamientos evaluados, correspondiendo de igual manera las mayores respuestas a aquellos tratamientos donde se combinaron el *Bradyrhizobium japonicum* y los hongos micorrízicos arbusculares. Cuando se aplicó el bioestimulador del crecimiento vegetal los valores obtenidos para las variables manifiestan un ligero incremento pero sin diferencias con sus controles donde no fue aplicado.

De manera general la mayor efectividad de los nódulos estuvo relacionada con los tratamientos donde se aplicó el bradyrhizobium, con valores de 100 % de efectividad o cercanos a éste.

Los resultados de las variables micorrízicas, como respuesta a los diferentes tratamientos mostró que el número de esporas. 50g de suelo⁻¹ resultó superior en los tratamientos donde fue aplicado el producto a base del hongo formador de micorriza arbuscular, sin diferencias significativas entre ellos, presentando los mayores valores absolutos aquellos donde se empleó la coinoculación de los dos biofertilizantes (Tabla 3). Por otra parte, se aprecia que la colonización micorrízica resultó superior en los tratamientos con inoculación conjunta de los biofertilizantes, no apreciándose efecto del estimulador del crecimiento vegetal. Resultados

similares en el incremento de estas variables con el empleo de la coinoculación rizobio – micorriza han sido indicados (Tovar – Franco, 2006) en el cultivo de la alfalfa.

De manera general no se observó efecto de la aplicación del bioestimulante sobre las variables fúngicas. Se aprecia además que la micorriza nativa o presente en el suelo al inicio del estudio tuvo un buen comportamiento, dado por los valores encontrados en las variables evaluadas para los tratamientos en los que no fue aplicado el hongo formador de micorrizas arbusculares.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos en la nodulación y la micorrización.

| Tratamientos | cv. INCAsoy - 24 | | | | |
|-------------------------|------------------|--------------------------------------|--|--------------|-----------|
| | No. de nódulos | MS nódulos (g.planta ⁻¹) | No. Esporas (No. 50g suelo ⁻¹) | Colonización | |
| | | | | (%) | 2arcsen√% |
| Testigo absoluto | 6,50 ef | 0,16 def | 83,50 b | 18,50 | 0,89 i |
| NPK | 1,25 f | 0,02 f | 91,00 a | 25,15 | 1,05 h |
| PK + B.jap. | 17,25 def | 0,53 cdef | 84,00 b | 24,50 | 1,03 h |
| NK + MA | 7,50 ef | 0,18 def | 136,00 a | 32,00 | 1,20 f |
| K + B.jap. + MA | 36,75 abcd | 1,18 a | 141,00 a | 46,00 | 1,49 d |
| B.jap. | 17,00 def | 0,52 cdef | 84,25 b | 24,55 | 1,04 h |
| MA | 7,75 ef | 0,13 ef | 135,75 a | 35,00 | 1,27 e |
| B.jap. + MA | 37,00 abcd | 1,11 abc | 150,00 a | 56,00 | 1,69 a |
| Pmorf (I) | 8,25 ef | 0,19 def | 83,75 b | 26,75 | 1,09 gh |
| B.jap. + MA + Pmorf (I) | 40,75 abc | 1,10 abc | 141,00 a | 47,00 | 1,51 cd |
| B.jap. + MA + Pmorf (R) | 44,25 ab | 1,13 ab | 142,25 a | 49,00 | 1,55 bc |
| B.jap. + MA + Pmorf (F) | 48,50 a | 0,77 abcd | 145,25 a | 50,00 | 1,57 b |
| B.jap. + Pmorf (F) | 23,00 cde | 0,55 bcdef | 85,00 b | 28,00 | 1,11 g |
| B.jap. + Pmorf (I) | 25,75 bcde | 0,72 abcde | 83,50 b | 26,08 | 1,07 gh |
| B.jap. + Pmorf (R) | 22,00 cde | 0,51 cdef | 85,75 b | 28,50 | 1,13 g |
| MA + Pmorf (I) | 8,75 ef | 0,17 def | 135,75 a | 37,30 | 1,31 e |
| X | 22,02 | 0,56 | 112,98 | 34,65 | 1,25 |
| ES x | 6,15 * | 0,19 * | 12,14 * | | 0,02 * |

Medias con letras comunes en una misma columna no difieren significativamente a $p < 0,05$.

En cuanto a los componentes del rendimiento y el rendimiento de granos (Tabla 4), el número de vainas por planta mostró resultados similares a las variables anteriormente evaluadas, con diferencias significativas entre tratamientos, observándose resultados superiores en aquellos tratamientos donde se coinocularon las semillas con ambos biofertilizantes, con un incremento en los valores, pero sin diferencias significativas, cuando se empleó además el bioestimulador del crecimiento vegetal. Para la masa de 1000 granos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Al analizar los rendimientos de granos, como resultado del crecimiento y desarrollo del cultivo se observaron diferencias significativas entre tratamientos, destacándose el tratamiento donde se inoculó de manera conjunta el *Bradyrhizobium japonicum* y la cepa de hongo formador de

micorriza arbuscular *Glomus Hoi* like, el que presentó incrementos de los rendimientos de 31,2 % para el cultivar estudiado. Los incrementos fueron ligeramente superiores con la aplicación a dicho tratamiento del estimulador del crecimiento vegetal, recubriendo las semillas o con aplicación foliar, con valores que oscilaron entre 37,6 % y 34,4 % respectivamente, pero sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 4).

Para los tratamientos donde se efectuaron aplicaciones simples de los microorganismos, la aplicación del bioestimulador del crecimiento mostró diferencias significativas, lográndose rendimientos superiores a sus controles donde no fue aplicado el producto y con incrementos que oscilaron entre 2,44 % y 14,91 % de acuerdo al tratamiento evaluado.

Tabla 4. Efecto de los tratamientos sobre el rendimiento de grano y sus componentes.

| Tratamientos | cv. INCAsoy - 24 | | | | |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------|
| | No. Vainas por planta | Masa de 1000 granos (g) | Rend. (t.ha ⁻¹) | % de incremento con relación a: | |
| | | | | Bj. | Control |
| Testigo absoluto | 21,80 g | 165,00 | 1,14 f | - | - |
| NPK | 37,53 abcd | 175,00 | 1,50 abcde | 20,0 | - |
| PK + B.jap. | 29,55 ef | 160,00 | 1,26 ef | 0,8 | - |
| NK + MA | 29,60 ef | 167,50 | 1,28 ef | 2,4 | - |
| K + B.jap. + MA | 37,73 abcd | 172,50 | 1,62 abcd | 29,6 | - |
| B.jap. | 30,58 ef | 167,50 | 1,25 ef | - | - |
| MA | 29,98 ef | 165,00 | 1,33 def | 6,4 | - |
| B.jap. + MA | 39,08 ab | 177,50 | 1,64 abcd | 31,2 | - |
| Pmorf (I) | 28,55 f | 162,50 | 1,31 ef | 4,8 | 14,91 |
| B.jap. + MA + Pmorf (I) | 38,85 abc | 177,50 | 1,64 abc | 31,2 | - |
| B.jap.+ MA + Pmorf (R) | 40,40 a | 175,00 | 1,72 a | 37,6 | 4,88 |
| B.jap. + MA + Pmorf (F) | 40,50 a | 180,00 | 1,68 ab | 34,4 | 2,44 |
| B.jap. + Pmorf (F) | 34,65 bcde | 172,50 | 1,37 cdef | 9,6 | 9,6 |
| B.jap. + Pmorf (I) | 33,70 cdef | 167,50 | 1,38 bcdef | 10,4 | 10,4 |
| B.jap. + Pmorf (R) | 37,48 abcd | 175,00 | 1,39 bcdef | 11,2 | 11,2 |
| MA + Pmorf (I) | 33,08 def | 165,00 | 1,41 bcdef | 12,8 | 12,8 |
| X | 33,94 | 170,31 | 1,43 | - | - |
| ES x | 1,65 * | 7,00 ns | 0,09 * | - | - |

Medias con letras comunes en una misma columna no difieren significativamente a $p < 0,05$.

El rendimiento de grano, variable fundamental para evaluar el efecto que sobre este cultivo ejerce la aplicación conjunta de *Bradyrhizobium japonicum* y la micorriza arbuscular *Glomus Hoi* like, así como la aplicación del bioestimulador del crecimiento vegetal, mostró respuesta positiva para las condiciones de estudio y para el cultivar evaluado, manifestándose de forma general, incrementos del mismo, lo que posibilita un manejo más integral de estas aplicaciones en el cultivo de la soya.

Los resultados del estudio, como ha sido señalado anteriormente en la introducción, corroboran lo encontrado por diversos autores (Hernández y Hernández, 1996; Corbera y Hernández, 1997; Corbera, 1998; Corbera y Núñez, 2004; Hernández, 2008; Hernández y Cuevas, 2003)

con relación al efecto de inoculaciones mixtas de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos formadores de micorrizas arbusculares en cultivos de leguminosas, así como del efecto del bioestimulador en el crecimiento de las plantas (Chibu et al., 2002; Ohta et al., 2004; Falcón et al., 2005; Falcón y Cabrera, 2007), aspecto poco estudiado para condiciones de campo con este tipo de producto.

CONCLUSIONES

1. Se encontró efecto positivo de los tratamientos para las variables de crecimiento y rendimiento evaluadas, excepto para el peso de 1000 granos, donde las respuestas no fueron significativas.
2. Los mejores resultados se manifestaron con la aplicación conjunta del *Bradyrhizobium japonicum* y el hongo MA, con un incremento del rendimiento de 31,2 %. Los incrementos fueron ligeramente superiores con la aplicación a dicho tratamiento del estimulador del crecimiento vegetal, recubriendo las semillas o con aplicación foliar, con valores que oscilaron entre 37,6 % y 34,4 % respectivamente.
3. Los tratamientos con el bioestimulante produjeron rendimientos superiores a sus controles donde no se aplicó el producto, obteniéndose incrementos en la producción entre 2,44 % y 14,91 % de acuerdo al tratamiento evaluado.

REFERENCIAS

1. Azis, T. and M. Habte. Growth of transplanted *Sesbania grandiflora* as affected by preinfection of root with Rhizobia and VAM fungus. **Nitrogen fixing tree Research Reports** 8:159 – 160. 1990.
2. Benítez, Bárbara; Soto, F.; Núñez, Miriam y Yong, Annia. Crecimiento de plantas de Palma Areca (*Dypsis lutescens*, H. Wendel) con aspersiones foliares de una mezcla de oligogaracturónidos. **Cult. Trop.** 29 (3): 81 – 85. 2008.
3. Cabrera, J. C. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. **Patente Cubana** 22859/2003.
4. Chibu, H.; Shibayama, H. and Arima, S. Effects of chitosan application on the shoot growth of rice and soybean. **Japanese J. of Crop Sci.**, 71: 206 - 211. 2002.
5. Corbera, J. Coinoculación *Bradyrhizobium japonicum* – Micorriza Vesículo Arbuscular como fuente alternativa de fertilización para el cultivo de la soya. **Cult. Trop.** 19 (1): 17 – 20.1998.
6. Corbera, J. y Hernández, A. Evaluación de la asociación *Rhizobium* – MVA sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de la soya (*Glycine max* L. Merrill). **Cult. Trop.** 18 (1): 10 – 12.1997.
7. Corbera, J. y Núñez M. Evaluación agronómica del análogo de brasinoesteroides BB – 6 en soya, inoculada con *Bradyrhizobium japonicum* y HMA, cultivada en invierno sobre un suelo Ferralsol. **Cult. Trop.** 25 (3): 9 -13. 2004.

8. Costales, Daimy; Martínez, Lisbel y Núñez, Miriam. Efecto del tratamiento de semillas con una mezcla de oligogalacturónidos sobre el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Cult. Trop.** 28 (1): 85 – 91. 2007.
9. Frontera, G. Biofertilización: Aspectos Productivos y Consecuencias en el manejo y conservación de la fertilidad del suelo. Nota Técnica Crinigan S.A. 2006. En: <http://www.engormix.com/biofertilizacion aspectos productivos consecuenciasarticulos 10 59 AGR.htm>. Revisado: 28-9-09.
10. Falcón, A. B. y Cabrera, J. C. Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturónidos en pecíolos de violeta africana. **Cult. Trop.** 28 (2): 87 - 90. 2007.
11. Falcón, A. B.; Cabrera, J. C.; Reinaldo, I. M. y Nuñez, M. Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. **Informe Final del PNCT 00100191**, CITMA, Cuba. 2005.
12. Fernández, F. y Rodríguez, E. L. Estudios básicos de la tecnología de recubrimiento de semillas con inoculantes micorrizógenos V.A. En: **Programa y Resúmenes X Sem. Cient. Inst. Nac. Cienc. Agríc.** La Habana. 1996. p 87 – 88.
13. Giovannetti, M. and Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular–arbuscular infection in roots. **New Phytology**. 84: 489 - 500. 1980.
14. Hernández, A. La coinoculación *Glomus hoi* like – *Bradyrhizobium japonicum* en la producción de soya (*Glycine max*) variedad Verónica para semilla. **Cult. Trop.** 29 (4): 41 – 45. 2008.
15. Hernández, A., /et al./ Nueva versión de Clasificación Genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. MINAGRI. La Habana. **AGRINFOR**. 1999. 64 p.
16. Hernández, M. and Cuevas, F. The effect of inoculating with arbuscular mycorrhiza and *Bradyrhizobium* strains on soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) crop development. **Cult. Trop.** 24 (2): 19 – 21. 2003.
17. Hernández, A y Hernández, A. N. . Efecto de la interacción *Rhizobium* - MA en el cultivo de la soya (*Glycine max* (L) Merrill). **Cult. Trop.** 17 (1): 5 – 7. 1996.
18. Manual Técnico. Cultivo y utilización de la soya en Cuba. Holguín. 1998. 56 p.
19. Montes, S.; Aldaz, J. P.; Ceballos, M.; Cabrera, J. C. y López, M. Uso del biorregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. **Cult. Trop.** 21 (3): 29 – 31. 2000.
20. Nieves, N.; Pobrete, A.; Cid, M.; González-Olmedo, J. L.; Lezcano, Y. y Cabrera, J. C. Evaluación del Pectimorf como complemento del 2.4-D en el proceso de embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). **Cult. Trop.** 27 (1): 25 – 30. 2006.
21. Ohta, K.; Morishita, S.; Suda, K.; Kobayashi, N. and Hosoki, T. Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, 73: 66 - 68. 2004.

22. Phillips, J. M. and Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transfer. Britanic: Mycology Society*. 55: 158 – 161. 1970.
23. Tovar – Franco, J. Incrementos en invernadero de la cantidad y calidad de follage de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) variedad Florida 77 causado por la combinación de fertilización biológica y química en un suelo de la serie Bermeo de la Sabana de Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. *Universitas Scientiarum* 11 (Número especial): 61 – 71. 2006.
24. Trouvelot, A.; Kough, J. And Gianinazzi – Pearson, V. Mesure du taux de Mycorrhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation Ayantune Fonctionnelle. En: **Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae**: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae (1:1986 jul. 1 – 5: Paris). 1986. p. 217 – 222.
25. Valdéz, M.; Reza – Alemán F. and V. Furlán. World. **Journal of Microbiology and Biotecnology** 9: 93 – 99. 1993.