

EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. EN *Gmelina arborea* DURANTE SU GERMINACIÓN Y MANEJO EN VIVERO

RESPONSE OF *Gmelina arborea* TO *Glomus* sp. AND *Azospirillum brasilense* INOCULATION IN GREENHOUSE CONDITIONS

Jhon Alexander Zambrano¹, Lucía Ana Díaz¹

1 Unidad de Biotecnología Vegetal. Departamento de Biología.
Pontificia Universidad Javeriana. Cra. 7 No. 40-62, Bogotá, Colombia.
luciaana@javeriana.edu.co

Recibido: 24-10-2007; Aceptado: 14-10-2008;

Resumen

Se realizó la inoculación de *Azospirillum brasilense* inmovilizado en microperlas de alginato y de los hongos *Glomus manihotis* y *Glomus occultum* en semillas de *Gmelina arborea* en tres grados de madurez. Las semillas inoculadas se sembraron en suelo y en turba compactada. Cuarenta y un días después de la siembra se determinó el efecto de los sistemas de siembra y de los microorganismos sobre la germinación. Cuarenta y siete días después del trasplante a bolsa se determinaron las variables de micorrización y altura de las plantas. El sustrato de siembra ($p < 0.01$) y la inoculación de *A. brasilense* ($p < 0.01$) influyeron en la germinación de las semillas de *G. arborea*. Se presentó correlación positiva entre micorrización y la altura de las plantas durante el establecimiento en vivero (0.61 $p = 0.03$). Además se presentó un efecto sinérgico de los microorganismos sobre la micorrización.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, *Gmelina arborea*, *Glomus manihotis*, *Glomus occultum*, Jiffy.

Abstract

Seeds of *Gmelina arborea* at three different maturity degrees were inoculated with *Glomus manihotis*, *Glomus occultum* and *Azospirillum brasilense* immobilized in alginate microbeads. Inoculated seeds were sown in two different growing systems: soil and compacted peat-Jiffy®. Forty-one days after sowing (das), the effects of growing system and microorganism application on seed germination were determined. Forty-seven das, mycorrhization percentages and plant height were evaluated. Results showed that the growing system and the inoculation of *A. brasilense* have a significant effect ($p < 0.01$) on the germination of *G. arborea* seeds. A positive correlation between mycorrhization and plant height was found during the initial stage of establishment in greenhouse conditions (0.61 $p = 0.03$). In addition, there is a synergic effect of both types of microorganisms on mycorrhization.

Key words: *Azospirillum brasilense*, *Gmelina arborea*, *Glomus manihotis*, *Glomus occultum*, Jiffy.

INTRODUCCIÓN

Las especies latifoliadas tropicales, como *Gmelina arborea*, son utilizadas en el establecimiento y manejo de bosques comerciales en los suelos de la Costa Norte de Colombia. Como alternativa en la propagación de esta especie se plantea la inoculación de bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal (PGPBs) y de hongos de micorriza arbuscular (HMA). Se conocen varias bacterias asociativas que fijan N_2 , con capacidad de producir fitohormonas como giberelinas y ácido indolacético (De Freitas y Germida, 1989; Muhammad y Frankenberger, 1991), lo que estimula la germinación, el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales y favorecen la absorción de nutrientes (Bashan y Holguin, 1994). Según Kloepper *et al.* (1991), algunas PGPBs productoras de auxinas pueden incrementar la emergencia de semillas vegetales por lo cual se conocen como bacterias promotoras de emergencia, dentro de ellas se encuentra *Azospirillum brasilense*. Estas bacterias pueden presentarse en sistemas radicales micorrizados. Dentro de los principales beneficios de la micorriza están la reducción del tiempo de manejo en vivero y el establecimiento exitoso en campo de las especies forestales (Quintos y Valdes, 1987), atribuidos a mayores valores en altura y biomasa de las plantas micorrizadas (Qiang-Sheng y Ren-Xue, 2006).

En este contexto, para la producción de *Gmelina arborea* en la zona norte del país, el uso de inoculantes biológicos

basados en hongos de micorriza arbuscular (HMA) y en PGPBs, podría representar una alternativa viable desde el punto de vista económico y ambiental para la propagación y el establecimiento de la especie. El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta de la germinación y del crecimiento de plántulas de *Gmelina arborea* a la inoculación de *Glomus* sp. y *Azospirillum brasilense* en dos sustratos de siembra: suelo y turba compactada (Jiffy®).

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental fue un diseño a dos vías completamente al azar con efectos fijos, se evaluaron dos sistemas de siembra y seis tratamientos (Tabla 1).

Se observaron diferentes fenotipos en las semillas de *G. arborea*: color amarillo, color pardo y color café oscuro, determinados por el grado de maduración del fruto (Kitajima y Fenner, 2000). Se determinó, con cloruro de trifeniltetrazolio 0.1g/l a 35°C y observación cada 0.5 h, el número de embriones viables que contenían las semillas de cada fenotipo. Se distribuyeron 5 semillas amarillas, 10 semillas pardas y 5 semillas café oscuro por repetición de cada uno de los tratamientos para los dos sistemas asegurando el mismo número de embriones viables en las unidades muestrales. En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de cada fenotipo de semilla y el número de embriones viables por semilla.

TABLA 1. Tratamientos aplicados a las semillas de *G. arborea* sembradas en suelo y Jiffy ®

Tratamiento	Microorganismo aplicado
1	<i>Glomus manihotis</i>
2	<i>Glomus occultum</i>
3	<i>Glomus manihotis</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 29710
4	<i>Glomus occultum</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 29710
5	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 29710
6	Control negativo

TABLA 2
Fenotipos de semillas de *G. arborea*

Fenotipo	Determinación	N. Semillas	Porcentaje	*N.E./semilla	**N. E. V./semilla
Amarillo	A	310	22,60%	3	3
Pardo	B	859	62,70%	2	2
Café oscuro	C	201	14,60%	2	1

* Número de embriones, ** Número de embriones viables por semilla.

Producción del inoculante bacteriano

Azospirillum brasilense ATCC 29710 fue cultivado en caldo nutritivo (Difco ®) e inmovilizado en microperlas de alginato (Bashan *et al.*, 2002). La inmovilización bacteriana se realizó a partir de un cultivo líquido en fase exponencial 22×10^7 UFC/ml. El cultivo se centrifugó a 2350 g, para obtener una concentración de 10^{15} UFC/ml, este concentrado se mezcló con alginato de sodio 0.2 g/l (1:4). La mezcla fue asperjada sobre una solución de CaCl_2 0.2 g/l adaptando el sistema de inmovilización para la producción de 100 g de inóculo. Se determinó su viabilidad por recuento directo en placa cada 30 días durante 3 meses para lo cual las microperlas se diluyeron en bicarbonato de sodio 0.4 g/l. *A. brasilense* presentó valores de producción de derivados indólicos asociados con AIA de 1.63 ppm en las microperlas.

Inoculación y siembra de semillas de *G. arborea*

Las semillas de *G. arborea* se peletizaron con una solución de CMC 0.04g/l y el inoculante. Se colectaron semillas peletizadas para realizar el conteo de microperlas adheridas usando índices de referencia (Bashan *et al.*, 2002).

Las semillas de *G. arborea* peletizadas se sembraron en bandejas para germinación de forestales, los pozos fueron llenados con suelo estéril (autoclavado durante tres ciclos a 121°C, 15 Lb presión durante 15 min.). Las características químicas del suelo se presentan en la Tabla 3. Se inocularon 276 esporas/pozo de *Glomus manihotis* Fuente 2326 (CIAT) y 246 esporas/pozo de *Glomus occultum* Fuente 2401 (CIAT). La inoculación de HMA en sistema de siembra Jiffy® (Ref. 335090L) se realizó con 17 esporas/planta.

TABLA 3

Caracterización fisicoquímica del sustrato suelo utilizado en la etapa de germinación de semillas de *G. arborea*

Textura	Franco arenosa
pH 1:1	5.5
C.O.%	3.5
N. total%	0.35
CIC	16.8
Calcio (meq/100 g)	6.7
Magnesio (meq/100 g)	0.67
Potasio (meq/100 g)	0.48
Sodio (meq/100 g)	0.15
Fósforo (ppm)	41.2

Las semillas se mantuvieron en un cuarto de germinación bajo condiciones de 28°C, 60% HR y fotoperíodo: 16 h luz, 8 h oscuridad. Se evaluó durante 41 días la germinación. El criterio para considerar una semilla germinada fue la formación del gancho del hipocótilo (ISTA, 1999). A partir de los datos registrados se establecieron los índices Germinación diaria media (GDM), Valor máximo germinación diaria media (VM) y Valor de germinación (VG) (Rodríguez, 2000):

$$1. GDM = \frac{\text{Porcentaje acumulado de semillas germinadas}}{\text{días desde la siembra hasta el final del ensayo}}$$

$$2. VM = \frac{\text{Porcentaje acumulado de semillas germinadas}}{\text{días desde la siembra hasta el momento de máxima germinación}}$$

$$3. VG = \frac{GDM}{VM}$$

Cuarenta y siete días después de la siembra se halló la altura y se determinó la micorrización de las plantas de *G. arborea*. Para el aclarado y tinción de las raíces se siguió el procedimiento de Phillips y Hayman (1970) con las modificaciones de Koske y Gemma (1983), y para la determinación de micorrización en los diferentes tratamientos se siguió la metodología propuesta por Trouvelot *et al.* (1986).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se trabajaron diferentes pruebas estadísticas a un nivel de significancia de 0.05. La base del análisis fue el análisis de varianza (ANOVA), para lo cual se determinaron los supuestos en los residuales del modelo, normalidad y homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evidenció disminución de la viabilidad de *A. brasilense* microinmovilizado en almacenamiento a partir del día 30. Bashan (1998), reporta viabilidad del microorganismo inmovilizado en macroperlas de alginato hasta por cinco años, mientras que Fravel *et al.* (1985) indican que la concentración de microorganismos inmovilizados se mantiene en tanto el polímero sea degradable por el microorganismo como es el caso del alginato de sodio.

El patrón sigmoidal de las curvas de germinación muestra tres fases de germinación bien definidas (Figura 1). La primera comprende el periodo entre la siembra y el inicio de la germinación (0-10 dds). La segunda fase corresponde al período en el cual germinan la mayoría de semillas de *G.*

arborea. Para todos los tratamientos sembrados, esta etapa presenta una múltiple producción de picos de germinación, lo cual según López y Caro (1996), se explica por diferencias de reserva energética para la germinación embrionaria y no directamente por la viabilidad de los embriones, debido a la heterogeneidad en la madurez de la semilla. Esta fase se produjo entre 9 y 33 días para siembra en suelo y 11 y 33 días para siembra en Jiffy®.

El factor sistema de siembra es significativo para la germinación de las semillas de *G. arborea* ($p < 0.001$). La siembra en Jiffy® no tuvo un efecto positivo en VG a pesar de presentar los mayores resultados en el porcentaje de germinación en todos los tratamientos. GDM y VM determinan el valor de germinación (VG) por lo cual el análisis estadístico de germinación se aplicó sobre éste. VG presentó diferencias altamente significativas entre los sistemas de siembra ($p < 0.0001$) y significativas entre los tratamientos ($p = 0.03$). No se presentó interacción entre los factores sistema de siembra y tratamiento. El mejor factor correspondió a suelo y el mejor tratamiento corresponde a la inoculación de *Azospirillum brasilense* (Figura 2-A).

La producción de enzimas y de fitohormonas por las PGPBs son dos de los mecanismos que favorecen la germinación de semillas vegetales (Kloepper 1986 citado por Kloepper et al., 1991; Schmidt, 2000; Bellis y Ercolani, 2001). Las bacterias productoras de fitohormonas pueden ser promotoras de la emergencia, como *A. brasilense* (Paredes-Cardona et al., 1988; Bashan, 1993; Bashan y Holguín, 1997). Chanway et al. (1993), evaluaron el efecto de la inoculación con nueve cepas de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia* en dos especies de leguminosas y encontraron efectos positivos significativos en la germinación de lenteja (*Lens esculenta*) causados por la inoculación de las cepas, con incrementos de hasta 38,9%.

Según De Freitas y Germida (1989) y Turner y Backman (1989), los aislamientos de estas bacterias favorecen la emergencia de las semillas en suelos con baja fertilidad y algunos aislamientos incrementan significativamente la emergencia en suelos con alta fertilidad. Lo anterior podría explicar el comportamiento de VG para los tratamientos 3, 4 y 5 en los dos sistemas de siembra e indicar la relación entre sustrato y efectividad de las PGPBs inoculadas en las semillas de *G. arborea*. El VG promedio para el sistema de siembra suelo fue 7.17 en relación con el valor promedio de VG en el sistema de siembra Jiffy® que fue de 0.77. Dentro de los factores que pueden afectar la germinación encontramos la clase textural, la materia orgánica y el pH de los sustratos (Tabla 3).

Según Kloepper et al. (1991), la colonización de la raíz por PGPBs inicia con la multiplicación en la espermósfera como respuesta a los exudados. Por tanto, si la colonización determina el efecto de la bacteria, se debe asegurar su permanencia por medio de la formulación de inoculantes como la microinmovilización, que favorece el establecimiento del microorganismo (Bashan, 1998).

Shishido et al. (1996), sugieren que la inoculación de PGPBs en semillas forestales puede ser una alternativa para aumentar la productividad de las plantaciones forestales. *Azospirillum* spp., es un género con amplia distribución en diferentes suelos y especies vegetales, además ha sido reportada en especies forestales (Deaza y Mesa, 1996; Jiménez, 1996), en frutales (Okon y Itzigsohn, 1995) y gramíneas (Bashan y Holguín, 1997), lo que indica que no hay especificidad en la asociación y por consiguiente un aislamiento de PGPBs de una especie forestal puede ser inoculada en otra especie forestal (García et al., 2003). Así, *Azospirillum brasilense* presenta una opción dentro de los inoculantes para especies forestales.

Respecto a las variables de micorrización evaluadas, se determinó que están altamente correlacionadas y muestran un comportamiento similar. Se presentaron diferencias altamente significativas ($p = 0.0001$) dentro de los factores sistemas de siembra y tratamiento. Además se presentó interacción de los factores (Figura 3). En el sistema de siembra Jiffy® no se presentó colonización en ninguno de los tratamientos aplicados, mientras que en el sistema de siembra suelo se presentó colonización en los tratamientos 1, 2, 3, 4. Se evidenció interacción altamente significativa entre los factores sistema de siembra y tratamiento en el caso de la inoculación con *G. manihotis* (Tratamientos 1 y 3; $p < 0.0001$) (Figura 3).

La efectividad de los HMA se relaciona con las características edáficas, la planta hospedera, la densidad de propágulos infectivos y la efectividad del ecotipo de HMA utilizado (Sieverding, 1991). Según Meyer y Linderman (1985), la coinoculación de bacterias y HMA, permite la micorrización temprana lo cual determina a su vez el establecimiento de las rizobacterias y la mejor absorción de elementos solubilizados por ellas. Esto se evidenció en el presente trabajo para los tratamientos que presentaron la inoculación de *G. manihotis* indicando la adaptabilidad de esta especie de HMA al sustrato suelo en relación a *G. occultum*. El tratamiento 3 (*G. manihotis*-*A. brasilense*) presentó diferencias significativas respecto al control. La regulación de la formación y papel de la asociación simbiótica mutualista planta-HMA está influenciada por

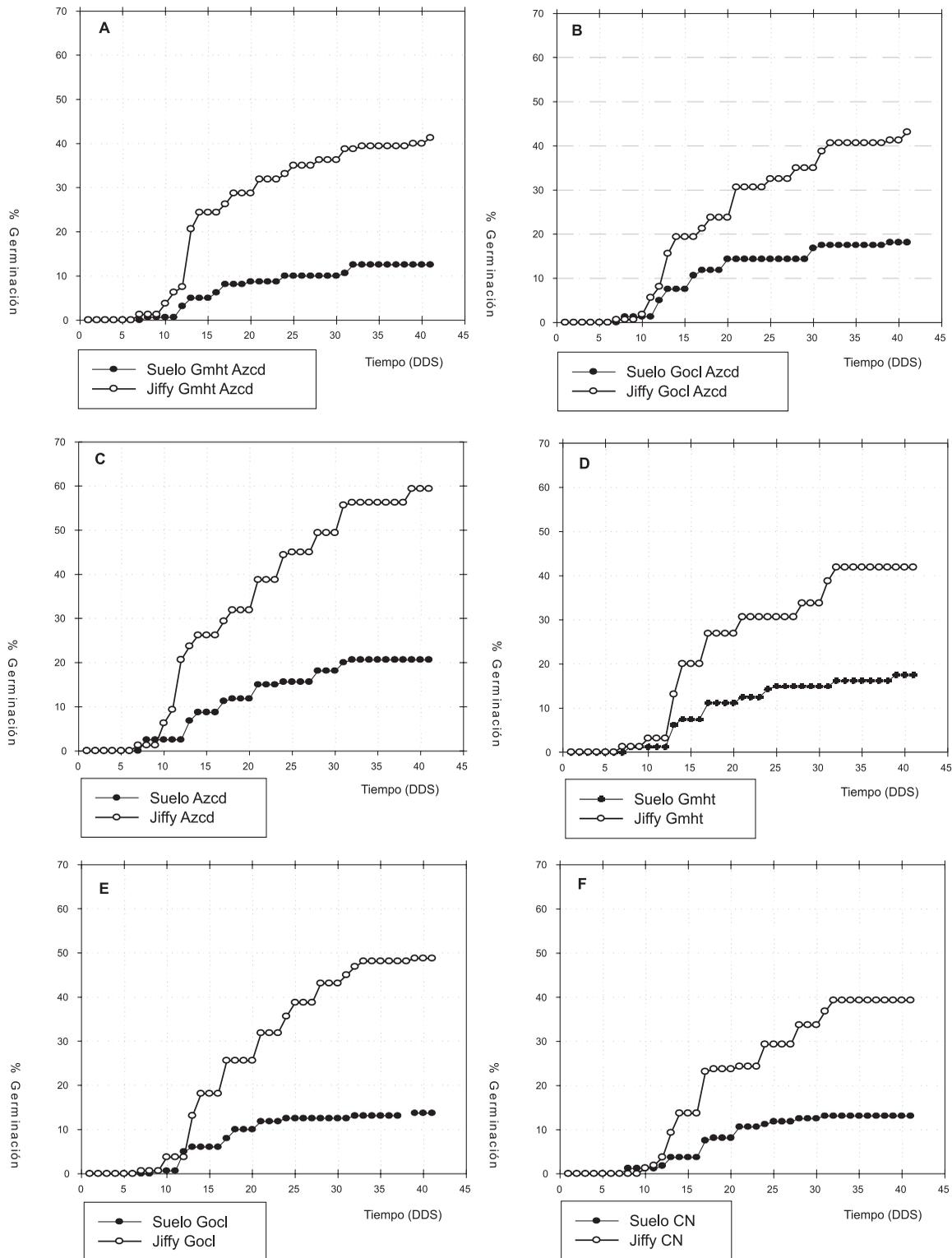


FIGURA 1. Germinación en el tiempo presentada por las semillas de *G. arborea* (DDS días después de la siembra). A: *Glomus manihotis* y *Azospirillum brasilense*; B: *Glomus ocutum* y *Azospirillum brasilense*; C: *Azospirillum brasilense*; D: *Glomus manihotis*; E: *Glomus ocutum*; F: Control Negativo.

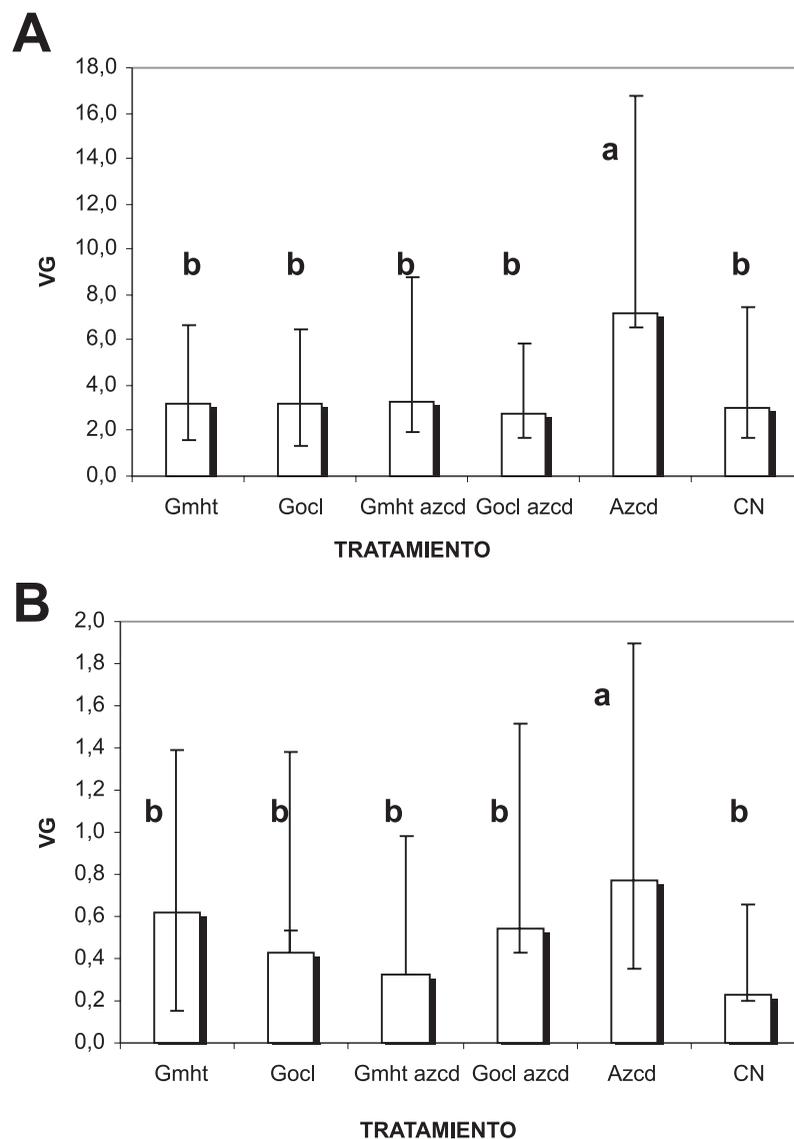


FIGURA 2. Valor de germinación de los diferentes tratamientos en sistema de siembra suelo (A) y sistema de siembra Jiffy (B). (Gmht: *G. manihotis*; Gocl: *G. occultum*; Gmht azcd: *G. manihotis*-*A. brasilense*; Gocl azcd: *G. occultum*-*A. brasilense*; Azcd: *A. brasilense*; CN: Control negativo).

bacterias ayudadoras de la simbiosis, como *Azospirillum* sp. (Barea y Azcon-Aguilar, 1992; Gryndler *et al.*, 1995; Azcón, 2000). Garbaye y Bowen (1989) determinaron que las bacterias asociadas con raíces micorrizadas y HMA promueven selectivamente, según la especie de HMA el establecimiento de la simbiosis, lo mismo ocurrió con la inoculación dual entre *A. brasilense*, *G. manihotis* y *G. occultum* con mejores resultados para *G. manihotis*.

El sistema de siembra produjo diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) en la altura de las plantas. La altura de

las plantas en suelo fue mayor (8.8 cm) que la de las plantas en Jiffy® (6.6 cm). Además, se presentó interacción del factor tratamiento-sistema de siembra ($p = 0.0520$) en los tratamientos 1, 2, 3, 4, y 5 (Figura 4).

García y Ocampo (2002), afirman que la expresión de diferentes respuestas de la planta a la colonización de HMA es determinada por el carácter genotípico del huésped y del hospedero, lo cual determinará la aparición y formación de la micorrización. Según Gerdemann (1968) y Qiang-Sheng

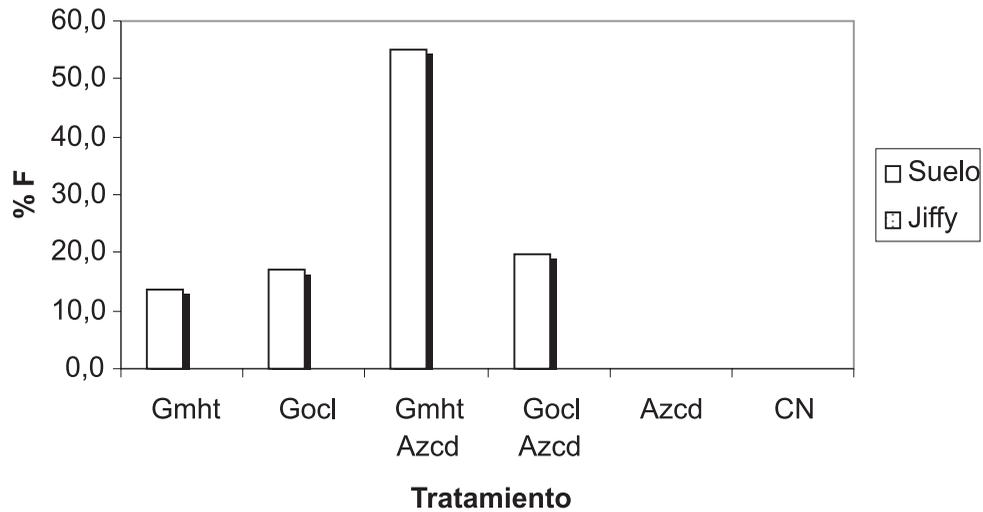


FIGURA 3. Frecuencia de la micorrización (%F) en plantas de *G. arborea* 47 dds, en sistema de siembra suelo y Jiffy. 1 (*G. manihotis*), 2 (*G. occultum*), 3 (*G. manihotis-A. brasilense*), 4 (*G. occultum-A. brasilense*), 5 (*A. brasilense*) y 6 (Control negativo).

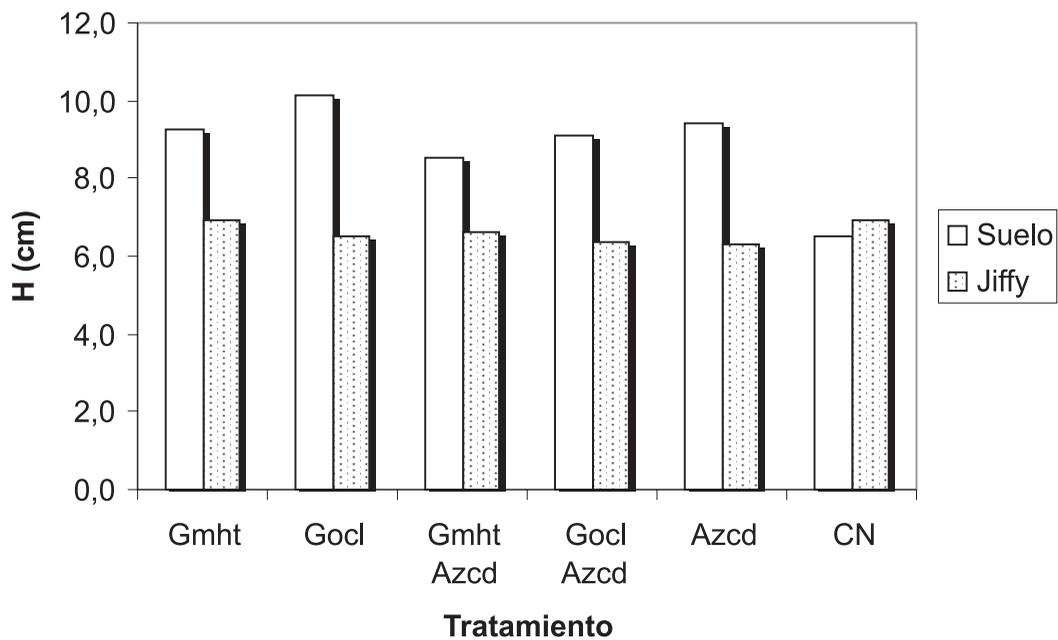


FIGURA 4. Altura (H) de plantas de *G. arborea*, 47 dds en sistemas de siembra suelo y Jiffy. 1 (*G. manihotis*), 2 (*G. occultum*), 3 (*G. manihotis-A. brasilense*), 4 (*G. occultum-A. brasilense*), 5 (*A. brasilense*) y 6 (Control negativo).

por Ren-Xue (2006), la inoculación de HMA presenta influencia significativa dentro de las variables de crecimiento vegetal entre ellas la altura de la planta, este efecto está relacionado con la edad de la planta y la especie inoculada. Además, de la presencia del hongo en la raíz, la funcionalidad de la simbiosis entre HMA-planta está determinada por la presencia de arbuscúlos (De Freitas y Germida, 1989; Salas y Blanco, 1999; Corbera y Nápoles, 2000; Burleigh et al., 2002; MacGonigle et al., 2003;). La presencia de arbuscúlos en las raíces de los tratamientos que presentaron los mayores valores para altura (Tratamientos 1-4) está entonces asociada a la eficiencia diferencial de la micorriza (Clapperton y Reid, 1992; Genney et al., 2001).

LITERATURA CITADA

- AZCÓN, R. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. En: *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. 2000, 1-15.
- BAREA, J.M. y AZCÓN-AGUILAR, C. Production of plant growth-regulating substances by vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 43, 810-813
- BASHAN, Y. Potencial use of *Azospirillum* as a biofertilizer. *Turrialba*, 1993; 43, 286-229.
- BASHAN, Y. Inoculant of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 1998, 16, 729-770.
- BASHAN, Y. y HOLGUIN, G. Root to root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, 60, 2120-2131.
- BASHAN, Y. y HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 1997, 43, 103-121.
- BASHAN, Y.; HERNÁNDEZ, J.; LEYVA, L. y BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 2002, 35, 359-368.
- BELLIS, P. y ERCOLANI, L. Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67, 1945-1948.
- BURLEIGHT, S.; CABAGNARO, T. y JACOBSEN, I. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53, 1593-1601.
- CHANWAY, C.P. y HOLL, F.B. Field performance of spruce seedlings after inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1993, 39, 1084-1088.
- CLAPPERTON, B. y RAID, N. A relation between plant growth and increasing VA mycorrhizal inoculum density. *New Phytologist*. 1992, 120, 227-234.
- CORBERA, J y NAPOLES, M. Evaluación agronómica de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos micorrizogenos arbusculares en el cultivo de la soja sobre suelo ferralítico rojo compactado. *Cultivos tropicales*. 2000, 21, 21-25.
- DEAZA, J. y MESA, C. *Aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas asociadas a la rizosfera de Nageia rospigliosii (Pilger) Laubenfels*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 1996.
- DE FREITAS, G. y GERMIDA, J. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 64, 362-368.
- FRAVEL, D.R., MAROIS, J.J., LUMSDEN, R.D. y CONNICK, W.J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matriz. *Phytopathology*. 1985, 75, 774-777.
- GARBAYE, J. y BOWEN, G.D. Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia*. 1991, 47, 370-375.
- GARCÍA, J. y OCAMPO, J. Regulation of plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53, 1377-1386.
- GARCÍA, L.; SCHLOTER, M.; DURKAYA, T.; HARTMAN, F. y GUTIÉRREZ, M. Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biology and Fertility of Soils*. 2003, 37, 381-385.
- GENNEY, D.; HARTLEY, S. y ALEXANDER, I. Arbuscular mycorrhizal colonization increases with host density in a heathland community. *New phytologist*. 2001, 152, 355-363.
- GERDEMAN, J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology*. 1968, 6, 397-418.
- GRYNDLER, M.; VEJSADOVA, H.; VOSATKA, M. y CATSKIA, V. Influence of bacteria on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of Maite. *Folia Microbiológica*. 1995, 40, 95-99.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION-ISTA. International Rules for Seed Testing. ISTA. Zurich, Switzerland. Supplement, Rules. 1999, 27, 333 págs.
- JIMÉNEZ, A. Aislamiento y caracterización de diazotrofos microaerófilos presentes en suelo rizosférico y raíces de *Cedrela montana* Turczaninow en dos ambientes diferentes. Trabajo de grado. Bogotá, 1996.
- KITAJIMA, K. y FENNER, M. Ecology of seedling regeneration. In: Fenner M. (ed.). *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*, 2nd edition. CAB Publishing, Wallingford UK, 2000, 331-359.
- KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; TIPPING, B. y LIFSHITZ, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D.L. KEISTER and P.B. CREGAN (eds.). Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. 1991, 315-326.
- KOSKE, R. y GEMA, J. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizal. *Mycological Research*. 1983, 92, 486-505.
- LÓPEZ, M. y CARO, L. Optimización de condiciones de laboratorio para la germinación de diferentes especies forestales. En: *Boletín de mejoramiento para semillas forestales*. CATIE, Costa Rica. 1996, 15, 15-19.
- MACGONIGLE, T.; YANO, K. y SHINHAMA, T. Mycorrhizal, phosphorus enhancement of plants in undisturbed soil differs from phosphorus uptake stimulation by arbuscular mycorrhizae over

- non-mycorrhizal controls. *Biology and Fertility of Soils*. 2003, 37, 268-273.
- MEYER, J. y LINDERMAN, R. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and Actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1985, 11, 223-228.
- MUHAMMAD, A. y FRANKENBERGER, J.R. Microbial production of plant hormones. In: *The rhizosphere and plant growth*, Kluwer Academic Publisher. Norwell. 1991, 327-334.
- OKON, Y. y ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances*. 1995, 13, 365-374.
- PAREDES-CARDONA, E.; CARCAÑO, M. MASCARUA, E. y CABALLERO, J. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1988, 30, 351-355.
- PHILIPS, J.M. y HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 1970, 55, 158-161.
- QIANG-SHENG, W. y REN-XUE X. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of plant physiology*. 2006, 163, 4: 417-425.
- QUINTOS, M. y VALDES, M. El desarrollo de micorriza y el crecimiento de plántulas de Pino real (*Pinus engelmannii*) al inocularse con *Pisolithus tinctorius*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1987, 29, 189-192.
- RODRÍGUEZ, J. *Protocolos de germinación para la certificación de semillas forestales*. Serie Técnica N° 46. 2000, 54 págs.
- SALAS, E. y BLANCO, F. Efecto de la inoculación con *Glomus manihotis* y de la fertilización con dos fuentes de fósforo sobre el rendimiento y la nodulación radical de fríjol en un ultisol no esterilizado, bajo condiciones de campo. *Agronomía Costarricense*. 1999, 23, 187-192.
- SCHMIDT, L. Guide to *Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*. Chapter X. Danida Forest Seed Centre. 2000, 625 págs.
- SHISHIDO, M.; MASSICOTTE, H y CHANWAY, C. Effect of plant growth promoting *Bacillus* strain on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. *Annals of Botany*. 1996, 77, 433-441.
- SIEVERDING, E. *Vesicular arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*. Technical cooperation. CTZ, Eschborn, Germany. 1991, 371.
- TROUVELOT, A.; KOUGH, J.L. y GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire fonctionnelle. In: *Physiological and Genetic Aspects of Mycorrhizae* (ed. V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi), INRA Press: Paris. 1986, 117-221.
- TURNER, J. y BACKMAN, P. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. *Plant disease*. 1989, 73, 347-353.