

# USO DE VERMICOMPOST PARA LA PROPAGACIÓN DE ESTACAS DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)

## PROPAGATION OF VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) CUTTINGS USING VERMICOMPOST

González-Chávez, M.C.<sup>1</sup>; Carrillo-González, R.<sup>1\*</sup>; Villegas-Monter, A.<sup>2</sup>; Delgado-Alvarado, A.<sup>2</sup>; Perea-Vélez, S.Y.<sup>1</sup>; Herrera-Cabrera, B.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla No. 25, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760

\*Autor de correspondencia: crogelio@colpos.mx

### RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una orquídea de importancia cultural y comercial, porque es fuente natural de vainilina. Sin embargo, su demanda nacional e internacional solo puede cubrirse si se cultiva a escala comercial. El objetivo de esta investigación fue evaluar la concentración de vermicompost en el sustrato de enraizamiento para producir plantas de calidad que favorezcan el establecimiento posterior en campo. Se realizaron dos experimentos para conocer la respuesta en el crecimiento y la nutrición de estacas de vainilla a diferentes niveles de vermicompost (VC). En el primer experimento se probaron cuatro niveles: 5%, 10%, 20% y 25% de VC, mientras que en el segundo fueron cinco niveles: 0%, 20%, 30%, 40% y 50%. Las estacas de vainilla respondieron a las dosis de VC evaluadas con efecto significativo en los pigmentos fotosintéticos (clorofila y xantofilas+carotenoides) y la nutrición de las estacas (N y P). Sin embargo, se requiere más de seis meses para observar incremento en las variables de crecimiento de la planta. Las dosis de VC que se recomiendan son entre 20% y 40%.

**Palabras claves:** Orchidaceae, fertilización orgánica, nutrición de vainilla.

### ABSTRACT

Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andreux), as source of natural vanillin, is an orchid with cultural and commercial importance. However, in order to cover its international demand it must be cultivated at high commercial scale. The objective of this research was to evaluate vermicompost doses on cutting rooting to produce quality plants and favor their establishment in the field. Two experiments were performed to study the effect of different doses of vermicompost (VC) on growth and nutrition of vanilla. The first one evaluated four doses of VC: 5%, 10%, 20% and 25%; while the second one tested five doses of VC: 0%, 20%, 30%, 40% and 50%. Pigments photosynthetic (chlorophyll and xanthophylls+carotenoids) and nutrition (N and P) were increased in vanilla cuttings by VC addition. However, these effects were only observed after six months of vanilla growth. VC doses in the range of 20% to 40% are highly recommended.

**Key words:** Orchidaceae, organic fertilization, vanilla nutrition.

**Agroproductividad:** Vol. 11, Núm. 3, marzo. 2018. pp: 22-28.

**Recibido:** enero, 2018. **Aceptado:** marzo, 2018.

## INTRODUCCIÓN

**La vainilla** es la única orquídea que produce fruto comestible. Es el ingrediente mundial que más se utiliza como saborizante con amplio atractivo y aplicación (Hoffman y Zapf, 2011). A escala comercial, la vainilla se propaga exclusivamente por estacas (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2009; Murthy *et al.*, 2010; Sasikumar, 2010; Hernández, 2011), pero para satisfacer la demanda de vainilla natural se requiere propagación masiva para la disponibilidad de estacas/plántulas sanas en el tiempo adecuado (Murthy *et al.*, 2010).

La propagación por estacas es una forma sencilla de multiplicación vegetativa (Hartmann *et al.* 2002), pero se conoce poco de los factores que determinan su éxito para mantener la calidad de las plantas de vainilla. La deficiencia nutrimental puede pasar desapercibida y repercutir negativamente en la productividad y en el tiempo de producción de la plantación. También se desconocen los requerimientos nutricionales de vainilla (Moreno y Díez, 2011) y factores que influyen su producción (Ordóñez *et al.* 2012).

El cultivo de la vainilla depende primariamente de fertilización orgánica. En general, los productores de vainilla utilizan residuos vegetales en descomposición o compost que ellos mismos producen. Sin embargo, no hay control de la calidad de la nutrición orgánica, ni de las dosis que deben manejarse para mantener las plantas adecuadamente nutridas.

Con base en lo anterior, se evaluó el efecto de la concentración de vermicompost (VC) en el sustrato de enraizamiento para producir plantas de calidad de vainilla que favorezca el establecimiento posterior en campo y productividad con fines comerciales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos para determinar la dosis de VC a utilizar en la propagación vegetativa de estacas de vainilla. El primer experimento consideró cuatro niveles de VC: 5%, 10% 20% y 25%. El experimento fue establecido el 18 de agosto de 2014 y se cosechó el 22 de enero de 2015 (cinco meses de evaluación). El segundo experimento, con base en los resultados del primero, se diseñó con dosis más altas de este fertilizante orgánico: 0%, 20%, 30%, 40% y 50%, y se estableció el 8 de marzo de 2015 y se evaluó el 9 de septiembre de 2015 (seis meses).

## Preparación de estacas de vainilla

Para el experimento 1, se obtuvieron estacas sanas con longitud promedio entre 75 y 85 cm. No se consideró el diámetro de las estacas. Para el experimento 2, la longitud promedio de las estacas fue de 1 m. Se utilizaron estacas con diámetro promedio de 1 cm. El establecimiento de las estacas en bolsas de plástico negro se hizo con base en la metodología propuesta por González-Chávez *et al.* (2015).

## Sustrato

Para el experimento 1, los sustratos empleados para la preparación de las mezclas fueron: tierra vega de río (TVR), fibra de coco (FC) y vermicompost (VC). Las mezclas se prepararon con base en volumen, TVR se usó al 50% en todos los tratamientos, mientras que VC y FC se utilizaron en las siguientes mezclas considerando TVR:FC:VC; T1 (50:45:5); T2 (50:40:10), T3 (50:30:20) y T4 (50:25:25). Para el experimento 2, los tratamientos fueron TVR:FC:VC; T1=50:50:0; T2=50:30:20; T3=50:20:30; T4=50:10:40 y T5=50:0:50.

Los sustratos se secaron a la sombra y tamizaron en una malla 10. Se determinó: pH y conductividad eléctrica (CE) por los procedimientos descritos en Rowell (1994). La materia orgánica (MO) por el procedimiento de oxidación humedad (Walkley y Black, 1965); el fósforo por el procedimiento de Olsen (1954) y la concentración de micronutrientes por el procedimiento de Lindsay y Norvell (1978). Las características de los sustratos se observan en el Cuadro 1.

## Evaluación

Se realizó la caracterización física y química de los sustratos. Se evaluó la longitud y número de hojas del brote de la estaca a los 2.5 meses y al final del establecimiento. Se determinó el contenido de nitrógeno en las hojas de las estacas. Se utilizaron la tercera a quinta hojas cercanas al ápice de crecimiento, para cuantificar los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y total, así como xantofilas+carotenoides) y azúcares solubles totales. Para cuantificación de clorofilas, de cada hoja se obtuvieron tres círculos de 1 cm de diámetro, por lo que por planta se tomaron 9 círculos. Se analizaron 10 plantas por tratamiento (90 círculos por tratamiento). Para azúcares solubles se obtuvo una mezcla compuesta de 1 g de estas tres hojas por planta y se determinaron por el método de Antrona, descrito por Montreuil *et al.* (1997). Para el análisis de macro y micronutrientes se utilizaron también las tres hojas por planta, que después de

**Cuadro 1.** Características químicas de los sustratos probados en el crecimiento de estacas de vainilla.

Mezcla (%)			pH	CE <sup>1</sup> μS cm <sup>-1</sup>	MO <sup>2</sup> g kg <sup>-1</sup>	N <sup>3</sup> g kg <sup>-1</sup>	K	P <sup>4</sup>	Fe	Cu	Zn	Mn
TVR <sup>5</sup>	FC <sup>6</sup>	VC <sup>7</sup>										
100	0	0	8.3±0.01	0.22±0.01	12±3.0	0.13±0.02	324±8	4±0.02	20±0.06	19.0±0.05	1.0±0.01	4±0.14
50	50	0	8.0±0.02	0.46±0.04	39±4.5	0.31±0.01	312±9	43±0.11	11±0.04	0.9±0.01	2.4±0.05	17±1.4
50	45	5	7.8±0.10	0.30±0.01	41±8.0	0.42±0.02	898±8	47±2.50	14±1.50	1.8±0.20	0.6±1.10	6±0.6
50	40	10	7.9±0.03	0.38±0.01	27±1.7	0.28±0.02	284±9	48±0.50	11±0.05	2.0±0.02	0.6±0.02	10±0.3
50	30	20	8.0±0.03	0.23±0.01	83±7.5	0.36±0.03	1215±10	54±0.80	14±1.30	1.5±0.01	0.48±0.03	17±0.4
50	25	25	7.6±0.30	0.30±0.01	64±2.0	0.44±0.02	1574±13	57±8.00	14±1.20	2.0±0.50	0.7±0.50	8±1.4
50	20	30	8.2±0.05	0.27±0.02	56±4.6	0.31±0.02	1736±98	55±0.80	10±0.07	1.6±0.03	0.5±0.03	13±0.3
50	10	40	8.0±0.07	0.27±0.02	55±3.0	0.32±0.03	2227±139	55±2.08	12±0.03	4.2±0.03	0.6±0.03	12±0.3
50	0	50	8.2±0.04	0.20±0.07	19±12.0	0.39±0.04	2593±80	67±0.11	11±0.04	7.6±0.40	1.5±0.10	16±0.5

<sup>1</sup>CE=Conductividad eléctrica, <sup>2</sup>MO=Materia orgánica, <sup>3</sup>N=nitrógeno total, <sup>4</sup>P=fósforo, <sup>5</sup>TVR=tierra vega de río, <sup>6</sup>FC=Fibra de coco, <sup>7</sup>VC=vermicompost.

lavarlas y secarlas hasta peso contante en una estufa de aire forzado a 65 °C, se trituraron en un molino de acero inoxidable. Se digirieron con 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HClO<sub>4</sub> en relación 4:1 y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Walinga *et al.*, 1995). En el digestado se determinó el contenido de N, P, K, Fe, Cu, Mn y Zn. También se evaluó el número y longitud de raíces primarias, secundarias y terciarias. La longitud total fue la suma de la longitud de todos los órdenes de raíz (Ordóñez *et al.*, 2012).

Para el experimento 2, a los 10 meses de haber realizado el trasplante en campo, se evaluó el contenido de nitrógeno foliar siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se establecieron en un arreglo completamente al azar y se analizó como factorial completo con diez repeticiones por cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza y cuando se observaron diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

## RESULTADOS

**Primer experimento.** El número de hojas, el número y longitud total de raíces primarias, secundarias o terciarias fue similar entre tratamientos. La mayor concentración de clorofila *a* (Fig. 1a) y de xantofilas+carotenoides (Fig. 1b) y clorofila total se observó en las estacas enraizadas en sustrato con 20% y 25% de VC. Sin embargo, la concentración de clorofila *b* fue similar en las hojas de las plantas en los tratamientos (Fig. 1a). El mayor porcentaje de azúcares totales de las hojas se observó en el nivel más bajo de VC (Fig. 2). El mayor contenido de nitró-

geno total de las hojas se obtuvo con los tratamientos de 20% y 25% de VC (Fig. 3a). La mayor concentración de P se observó en el tratamiento con 20% (Fig. 3b). La fertilización con VC no mostró efectos significativos en la concentración foliar de cobre, fierro, manganeso ni zinc (datos no mostrados). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la concentración de Ca y Mg (Fig. 3c, d).

**Segundo experimento.** La concentración de clorofila *a* y *b*, y de las xantofilas+carotenoides se incrementó significativamente al usar entre 20% y 50% de VC (Fig. 3). El mismo comportamiento se observó en la concentración de la clorofila total (datos no mostrados). El área foliar de las hojas se incrementó significativamente con la adición de VC (Fig. 4a). No se observó diferencia entre las tres hojas analizadas de cada estaca, ni entre niveles de VC utilizados (20%-50%). A los 10 meses de establecido el segundo experimento se realizó análisis foliar de nitrógeno adicional y se observó que las hojas mostraron diferencias significativas en el contenido de nitrógeno (Fig. 4b). Las estacas sin VC mostraron evidencias visuales de deficiencia (Figura 5).

## DISCUSIÓN

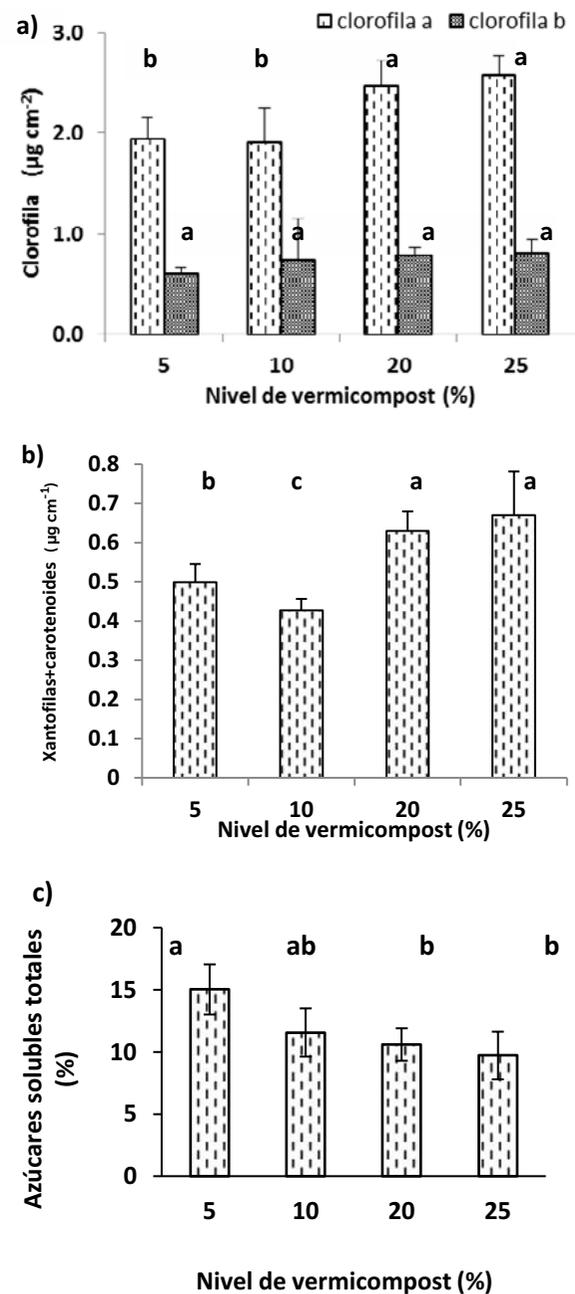
La vainilla (*Vanilla planifolia*) generalmente crece en terreno kárstico, lo que sugiere que es estrictamente calcícola. El pH de los sustratos que se usaron varió de ligero a moderadamente alcalino, lo que pudo favorecer el desarrollo de las raíces. La conductividad eléctrica (CE) fue baja aparentemente sin problema de sales, lo que es benéfico para la vainilla. El contenido de materia orgánica (MO) humificada (ácidos húmicos y fúlvicos) fue bajo, aunque la proporción de FC y VC incluida en la mezcla

es considerable. Esto implica la necesidad de un periodo de incubación para activar el proceso de humificación y que los materiales orgánicos contribuyan al aporte de nutrientes.

La nutrición de la vainilla se basa en la descomposición de los sustratos, por lo tanto la selección de éstos resulta crítica. La mayoría de los sustratos que se utilizan para el cultivo comercial de vainilla es hojarasca, corteza descompuesta de árboles, fibra de coco, aserrín y VC (Anilkumar, 2004; Hernandez y Lubinsky, 2010; Hernández, 2011).

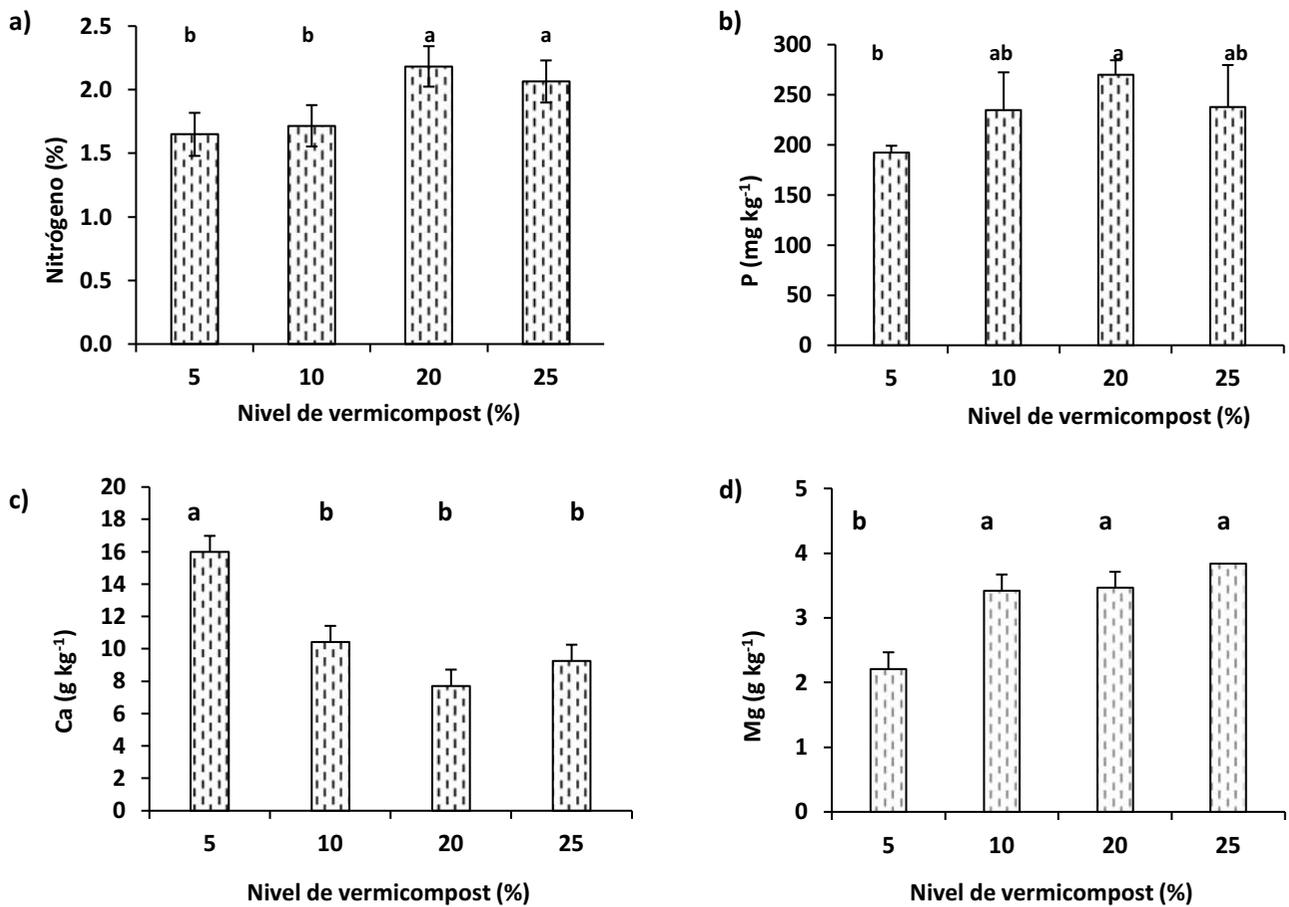
El contenido de P de los sustratos fue relativamente bajo, considerando la capacidad de algunos materiales orgánicos para adsorberlo, al menos por un periodo de estabilización. Sin embargo, el P aportado por VC fue positivo, 11.4 mg kg<sup>-1</sup> en la dosis más baja de VC (10%) y subió a 54.96 mg kg<sup>-1</sup> en la dosis más alta (50%). El contenido de microelementos extractables con DTPA se mantuvo relativamente bajo. Según la escala propuesta por Ankerman y Large (1974), la concentración de Fe extractable es media (10-16 mg kg<sup>-1</sup>), la del Cu es de media (0.8-1.2 mg kg<sup>-1</sup>) a muy alta (>2.5 mg kg<sup>-1</sup>). Mientras que la concentración de Zn y Mn es baja (1-1.5 mg kg<sup>-1</sup> y 5-14 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) con dosis bajas de VC. A medida que se incrementó la dosis, la concentración de estos elementos fue mayor (15-29 mg kg<sup>-1</sup>). Se asume que las formas orgánicas predominan en la mezcla y que conforme el VC y la FC se mineralicen estos elementos se liberan. Con base en lo anterior, se requiere de más tiempo para observar la respuesta, aspecto que debe ser considerado en próximas investigaciones.

Se sugiere que la adición de material orgánico en descomposición debe ser seis meses antes de la floración de vainilla; lo que permite lograr el vigor deseado (Damirom, 2004; Osorio *et al.*, 2011). En el presente experimento, la adición de VC no favoreció significativamente el crecimiento de las estacas en los primeros cinco meses de evaluación. De manera similar, Osorio *et al.* (2014) no observaron efecto con diferentes sustratos y fertilización durante un periodo de siete meses. Los autores sugirieron que los elementos se acumularon para una posterior inducción de crecimiento. Sin embargo, el sustrato que se utilizó en esta investigación si mostró efecto favorable en las variables fisiológicas como concentración de clorofila, xantofilas+carotenoides, azúcares solubles totales, contenido de nitrógeno y fósforo. En las hojas

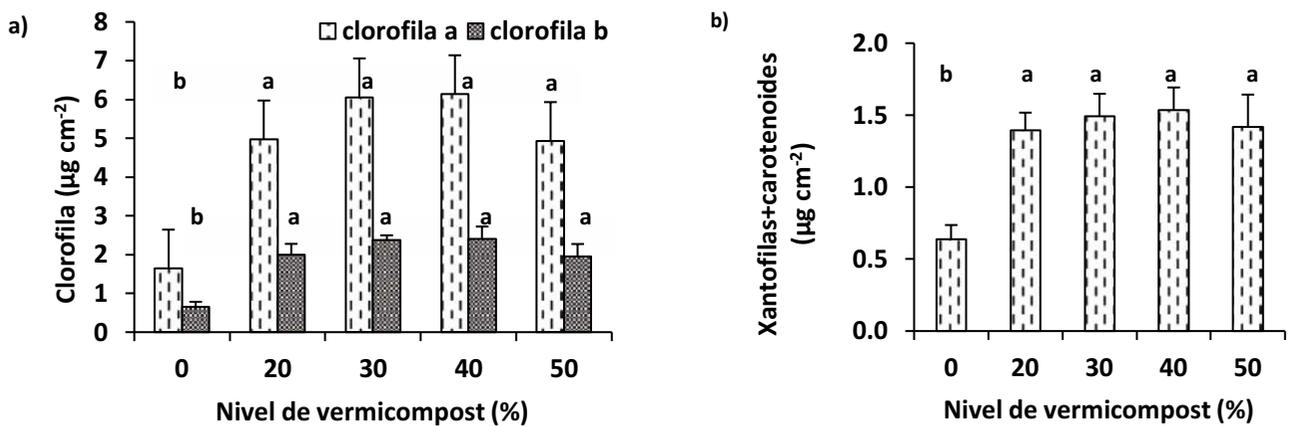


**Figura 1.** Pigmentos fotosintéticos (a,b) y azúcares solubles (c) en estacas de vainilla enraizadas en sustrato con cuatro dosis de vermicompost. Se muestran medias y desviación estándar, n=10. Letras diferentes muestran que hay diferencia estadística (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

de las estacas del primer experimento se observó que el contenido de nitrógeno estuvo dentro de la concentración crítica (2%; según Bennett, 1993). Sin embargo, en el segundo experimento, el contenido de nitrógeno fue bajo (0.5%) en el tratamiento sin VC. Mientras, que en las plantas fertilizadas con VC el nitrógeno fue de 1.8 a 2.0%. La concentración de P en todos los tratamientos fue mayor a la concentración crítica (0.1%) reportada por Bennett (1993). Cibes *et al.* (1947) sugirieron suficiencia de P entre 0.29% a 0.37%. El P de las hojas de vainilla de



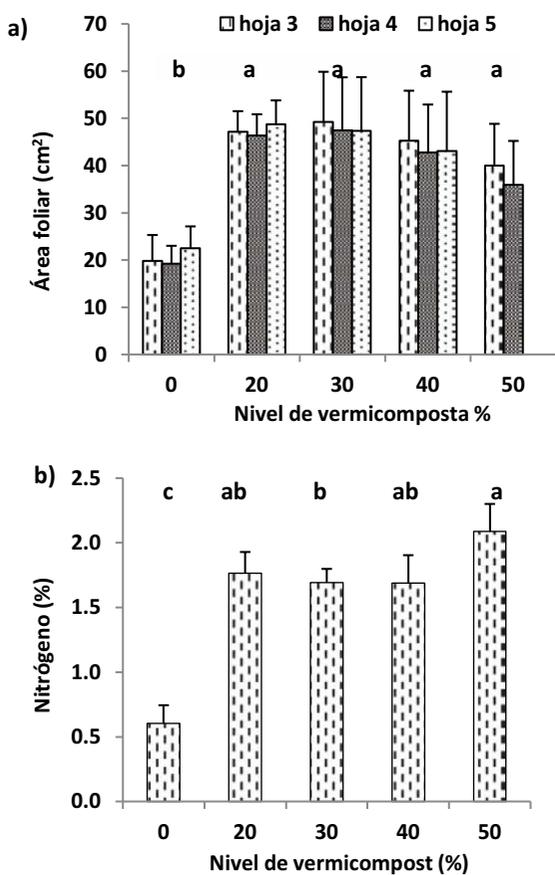
**Figura 2.** Nitrógeno (a), fósforo (b), calcio (c) y magnesio (d) en hojas de estacas fertilizadas con cuatro dosis de vermicompost. Se muestran promedio y desviación estándar, n=10. Letras diferentes muestran diferencia significativa (Tukey  $\alpha=0.05$ ).



**Figura 3.** Pigmentos fotosintéticos en hojas de estacas de vainilla enraizadas en sustrato con cinco dosis de vermicompost. Clorofilas (a), Xantofilas+carotenoides (b). Se muestran promedio y desviación estándar, n=10. Letras diferentes muestran diferencia significativa (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

todos los tratamientos fue mayor a estos valores; pero con la dosis de 20% se observó el mayor contenido de P. Se observó mejor nutrición (N y P) por VC. Bertoldo *et al.* (2015) mencionaron que la nutrición influye en la sanidad de las plantas y su productividad.

La disponibilidad de Ca y K es importante porque la planta los absorbe más que otros elementos (La *et al.*, 1998). Osorio *et al.* (2014) observaron que el contenido foliar de Ca, K, P y Fe se relacionó positivamente con diferentes variables de crecimiento de la planta. En el presente



**Figura 4.** Área foliar (a) y contenido de nitrógeno (b) de estacas de vainilla fertilizadas con cinco dosis de vermicompost. Se muestran promedio y desviación estándar, n=10. Letras diferentes muestran diferencia significativa por nivel de vermicompost (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

trabajo se observó que la concentración de Ca y Mg, en las hojas de las estacas de vainilla, fue opuesta. El incremento en la dosis de VC disminuyó la concentración de Ca, mientras que la de Mg aumentó. Osorio *et al.* (2014) y Cibes *et al.* (1947) observaron mayor absorción de N y Ca, pero menor de K.

Algunas estacas fertilizadas con 50% de VC respondieron de manera muy heterogénea, por tanto se sugieren como adecuadas las dosis entre 20% y 40% para utilizarse en el sustrato para enraizamiento de estacas de vainilla. Se recomienda evaluar el uso de VC en periodos más largos, en diferentes etapas (floración y fructificación) y en el rendimiento.

## CONCLUSIONES

Se analizó la respuesta de diferentes dosis de VC en el crecimiento y nutrición durante el enraizamiento de estacas y los primeros cinco meses de desarrollo de la



**Figura 5.** Comparación entre plantas de vainillas fertilizadas o no con vermicompost.

planta de vainilla. Las estacas respondieron lentamente a la fertilización orgánica y el VC no incrementó el crecimiento de los brotes o de las raíces de las estacas de vainilla. Pero si mejoró concentración clorofila y los pigmentos accesorios (xantofilas+carotenoides), evidencias de que internamente hay respuesta a los tratamientos evaluados. De igual manera, se observó incremento en el contenido de N y concentración de P en las hojas de las estacas. Las dosis de VC se recomiendan entre 20% al 40%.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT: 2012-04-190442 Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México (SP-03). También a la empresa PatroMex por el obsequio de la fibra de coco.

## REFERENCIAS

Anilkumar A.S. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise. Kerala call. 1: 26-30.

Ankerman D., Large R. 1974. Soil and plant analysis. Agricultural laboratories. Inc. USA.

Barrera-Rodríguez A.I., Herrera-Cabrera B.E., Jaramillo-Villanueva J.L., Escobedo-Garrido J.S., Bustamante-González Á. 2009. Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10: 199-212.

Bennett, W. F. 1993. Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants. 1st edition. APS Press. Minnesota, USA. 1-7.

Bertoldo C., Gilardi G., Spadaro D., Gullino M. L., Garibaldi A. 2015. Genetic diversity and virulence of Italian strains of *Fusarium oxysporum* isolated from *Eustoma grandiflorum*. European Journal of Plant Pathology 41: 83-97.

Cibes H.R., Childers N.F., Loustalot A.J. 1947. Influence of mineral deficiencies on growth and composition of vanilla vines. Plant Physiology 22: 291-299.

- Damiron R. 2004. La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura del Estado de Veracruz, México. 50 p.
- González-Chávez M.C., Carrillo González R., Villegas Monter A. 2015. Manual de propagación de vainilla por estacas. Colegio de Postgraduados. México. ISBN 978-607-715-278-1
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL. 2002. Plant propagation: Principles and practices. 7th Edition, Prentice Hall, USA. pp. 199-236.
- Hernández J. 2011. Mexican vanilla production. En: Havkin-Frenkel, D.; Belanger F.C. (eds.). Handbook of vanilla science and technology, Blackwell Publ. p. 3 – 25.
- Hoffman P.G., Zapf C.M. 2011. Flavor, quality and authentication. In: Handbook of vanilla Science and Technology. First edition. Havkin-Frenkel D, Belanger Fc. Blackwell Publishing Ltd. Pp. 162-182.
- La C., Dian L., Shumei T., Shaoruo Z. 1998. Nutritive characteristics of vanilla. Chinese Journal of Tropical Crops 2: 55-64.
- Lindsay W.L., Norvell W. A. 1978. Development of a DTPA Soil Test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42: 421-428.
- Montreuil J., Spik G., Fournet B., Toillier T. 1997. Nonenzymatic determinations of carbohydrates. In: Multon L (ed). Analysis of Food Constituents. Wiley. USA. pp: 112-114.
- Moreno F., Díez M.C. 2011. Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. p. 109.
- Murthy G., Umesha K., Smitha G.R., Krishnamanohar R. 2010. Effect of growth regulators and bio-inoculants on rooting and growth of vanilla stem cuttings. Indian Journal of Horticulture 67: 90-93.
- Olsen S.R., Dean. L. A. 1965. Phosphorus. In: Black (ed.), Methods of soil analysis.
- Ordóñez C.N.F., Tupac Otero J., Díez G.M.C. 2012. Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. Acta Agronómica 61: 282-290.
- Osorio I.A., Osorio Vega N.W., Díez M.C., Moreno F.H. 2014. Nutrient status and vegetative growth of *Vanilla planifolia* Jacks plants as affected by fertilization and organic substrate composition. Acta Agronómica 63: 326-334.
- Rowell D.L. 1994. Soil Science: Methods and Applications. Longman Scientific & Technical/John Wiley & Sons. ISBN: 0582087848, 9780582087842.
- Sasikumar B. 2010. Vanilla Breeding – A review. Agriculture Reviews. 31: 139-144.
- Walinga I., Van der Lee J.J, Novozamsky I. 1995. Plant analysis manual. Kluster Academic Publ. The Netherlands.
- Walkey A., Black T.A. 1934. An examination of the Degtjariff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37: 29-38.

