

Utilización de *Azotobacter* en *Coffea arabica* L y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Resultados de 13 años de investigaciones.

Carlos Bustamante González, Ciro Sánchez Esmoris, Maritza I. Rodríguez, René Cupull y Alberto Pérez².

**Institución: Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (MINAG).
²Centro de Desarrollo de la Montaña (CITMA).**

País: Cuba

Teléfono: (0225) 6231, 6229 y 6432.

Email: cbust@ecicc.ciges.inf.cu

Introducción

En la práctica de vivero de café la presencia de adecuados niveles de nitrógeno y fósforo en el sustrato juega un papel esencial para garantizar los requerimientos de estos nutrientes en esa fase del cultivo.

La utilización de los biofertilizantes en la agricultura mundial cobró auge en los últimos 20 años del pasado siglo. Entre ellos, merecieron especial atención, el *Azotobacter* y las micorrizas, por su papel en la nutrición nitrogenada y fosfórica de las plantas.

En las Normas Técnicas vigentes se contempla la aplicación de 40 g por bolso de la fórmula 10-8-4,5 al momento de la mezcla del suelo con el abono orgánico, por lo que el abastecimiento de estas necesidades se vio menguado.

Los estudios del efecto de los biofertilizantes en el cafeto en Cuba comenzaron en los inicios de la década de los 90 al acentuarse el déficit de fertilizantes minerales. Los resultados preliminares del uso del *Azotobacter* (producido a partir de una cepa del INIFAT) en la especie *Coffea arabica*, mostraron el efecto positivo de este biofertilizante en la germinación de las semillas y el desarrollo morfológico de las posturas en diferentes condiciones climáticas (Bustamante et al, 1992; Samón et al, 1999) por lo que su aplicación en las unidades productivas se generalizó rápidamente. Sin embargo desde el punto de vista científico eran necesarios estudios para aumentar la efectividad de este biofertilizante y conocer el efecto de su aplicación conjunta con otros biofertilizantes y biopreparados utilizados en la caficultura.

Objetivos.

1. Estudiar el efecto de la coinoculación del *Azotobacter* con las micorrizas y el *Trichoderma* en *Coffea arabica* L.
2. Desarrollar la búsqueda de cepas de *Azotobacter* autóctonas de áreas cafetaleras.
3. Estudiar el efecto del *Azotobacter* autóctono, su interrelación con las MVA y la fertilización mineral, en posturas de *Coffea canephora* propagadas vegetativamente.

Materiales y métodos.

Experimentos con Coffea arabica L.

Experimento 1. Interacción MVA y *Azotobacter* en suelo Pardo.

Se desarrolló en la Estación Central de Investigaciones de Café, en Tercer Frente provincia Santiago de Cuba, durante febrero – agosto de 1992. En un diseño

completamente aleatorizado método factorial se utilizaron como cepas de hongos se estudiaron las nativas concentradas y sin concentrar, *Glomus fasciculatum* y *Glomus manihotis*, con y sin aplicación de *Azotobacter* (BFN) y dos niveles de sustrato suelo / humus de lombriz (5/1 y 7/1). Se utilizaron 30 plantas por tratamiento.

El experimento se desarrolló en un suelo con contenidos bajos de materia orgánica (2,8 %), bajo a medios de fósforo disponible (17 mg/100 g de P_2O_5) y altos de potasio (52,8 mg / 100 g de K_2O) en presencia de un pH adecuado y altos contenidos de Ca y Mg. De forma general el suelo se puede considerar de fertilidad media a alta.

Experimento 2. Interacción MVA y BFN en suelo Fersialítico Pardo rojizo.

Se desarrolló en Jibacoa, provincia Villa Clara, durante febrero – septiembre de 1992. Se utilizaron semillas de “Caturra rojo” sembradas en canteros a 15 x 15 cm. Las cepas de hongos utilizadas fueron: *Glomus fasciculatum*, *Glomus manihotis*, *Glomus mosseae* y las cepas nativas sin concentrar (infección natural).

El suelo poseía un pH cercano la neutralidad, buen contenido de materia orgánica (3,5 %) y de cationes intercambiables, sin embargo los contenidos de fósforo (3,2 mg/100 g de P_2O_5) y potasio (12,9 mg / 100 g de K_2O) fueron bajos. De manera general la fertilidad se puede catalogar como media.

Experimento 3. Incidencia de *Rhizoctonia solani*.

Se desarrolló en el vivero de la Estación de Investigaciones de Café Jibacoa a 340 m s n m, durante noviembre 2000 hasta mayo del 2001.

Se realizó la siembra en bolsas de polietileno (14x22cm) a razón de dos semillas de *Coffea arabica* L. var. Caturra Rojo, utilizando un suelo Pardo Gleyzoso (Hernández et al, 1999), el que fue mezclado con humus de lombriz en la proporción 5:1 (v: v).

Se utilizó un diseño de bloques al azar con cuatro tratamientos y tres replicas, compuestas por 20 bolsas cada una.

Se estudiaron los siguientes tratamientos

- 1- Testigo
- 2- *Trichoderma viride* (semilla peletizada).
- 3- *Azotobacter chroococcum* (semilla peletizada)
- 4- *Glomus fasciculatum*

El suelo se inoculó con el hongo *Rhizoctonia solani* en dosis de 2.5 g de harina maíz y arena sílice colonizado por cada kg de suelo en el momento de la siembra.

La cepa de *Azotobacter chroococcum* utilizada fue aislada de la rizosfera de plantas de café por análisis microbiológico, utilizando el método de dilución seriada propuesto por Vinogradsky (1949), citado por Mayea et al (1982), multiplicándose en un biopreparado a partir de miel final, levadura de torula y $CaCO_3$, (Cupull y Pérez, 1992).

La cepa de micorriza ensayada se inoculó a razón de 10g por bolso debajo de las semillas.

Los tratamientos del peletizado de las semillas con *Trichoderma* y *Azotobacter*, consistieron en inocular previamente la materia orgánica con un título de 1×10^9 UFC/ml y 3×10^9 UFC/ml respectivamente, después se colocó al aire para su secado, las semillas fueron recubiertas con un gel de almidón de yuca al 8%.

A los cuatro meses de la siembra se realizó otra aplicación de *Azotobacter* al tratamiento 3 con una dilución de 1:10 y un título de 3×10^9 UFC/ml.

Se evaluaron los porcentajes de germinación a los 50 y 60 días, la incidencia de *Rhizoctonia solani* a los 60, 80 y 100 días después de la siembra. A los seis meses se tomaron 24 plantas por tratamientos para evaluar la altura el diámetro del tallo, el número de pares de hojas y la masa seca aérea. Los datos se procesaron mediante una análisis de varianza de clasificación doble para $P < 0.01$ y comparación de medias por el rango múltiple de Duncan previa transformación de los datos por la expresión arco seno \sqrt{x} , referidos por (Lerch, 1977).

Experimentos con *Coffea canephora* Pierre.

Aislamiento, selección, reproducción de cepas de Azotobacter.

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Desarrollo de la Montaña y el Laboratorio de Suelo de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC).

Las muestras de suelo se tomaron en diferentes fases fenológicas del cafeto, en la rizosfera de cinco plantas tomadas al azar de *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* en dos localidades montañosa, Tercer Frente, provincia Santiago de Cuba y Sabaneta, provincia Guantánamo a la profundidad de 0-30 cm. Las características de ambos agroecosistemas cafetaleros se recogen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Características de las áreas experimentales.

Condiciones	Sabaneta	Tercer Frente
Sombra	<i>Gliricidia sepium</i> Kuntz (Ex-walp)	<i>Samanea saman</i> Merr
Especie y edad de los cafetos	<i>Coffea arabica</i> 14 años <i>Coffea canephora</i> 8 años	<i>Coffea arabica</i> 14 años <i>Coffea canephora</i> 8 años
Altura, m.s.n.m.	350	150
Suelo	Pardo con carbonatos	Pardo sin carbonatos

Tabla 2. Propiedades físico - químicas de los suelos.

Tipo de suelo	pH H ₂ O	M.O., %	P ₂ O ₅ K ₂ O mg / kg.	
Pardo sin carbonatos	6.4	3.4	122.1	142.2
Pardo con carbonatos	6.8	3.1	4.85	10.25

El comportamiento de las poblaciones de *Azotobacter* presente en la rizosfera se realizó por el método clásico de las diluciones seriadas y conteo en 3 placas, con dilución 1/10000, empleándose el medio de cultivo Ashby. Las colonias más desarrolladas fueron sembradas en tubos para su aislamiento y caracterización mediante pruebas bioquímicas, tinción simple y de Gram.

Los valores de cada conteo fueron transformados mediante \sqrt{X} . Se utilizó un modelo de clasificación triple donde las causas de variación fueron: el tipo de suelo, la especie de café y fecha de muestreo. Las medias se compararon por la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$.

Elaboración del Biopreparado.

Para la activación de las cepas se prepararon tubos de cultivos con 5 ml del medio de multiplicación y con el asa de inoculación se tomo una porción de la bacteria aislada y se inoculó en tubos incubándose por 48 horas.

Se vertieron 500 ml del medio DIMARGON líquido en frascos de 1000 ml y se esterilizaron en autoclave a 121 °C (1.2 atmósfera) durante 15 minutos. Los frascos fueron inoculados con las cepas incubadas de cada zona por separado y colocados en zaranda durante 72 horas, luego se tomó 1 ml del contenido de cada frasco y se efectuó el conteo de *Azotobacter*, al alcanzar valores de 10^{-9} UFC/ml se distribuyeron 50 ml en frascos con 500 ml del medio DIMARGON estéril y colocados en zaranda para facilitar su multiplicación. La titulación del biopreparado se realizó por conteo en placa.

En los experimentos se empleó un suelo Pardo ócrico sin carbonato (Hernández et al., 1999) mezclado con estiércol vacuno en proporción de 3/1, cuyas características fueron: pH 6,72; M.O 4.33%; 17,3 mg de P_2O_5 y 52,2 mg de K_2O por 100 g de suelo seco.

En los tratamientos testigo de los experimentos se aplicó agua para garantizar la uniformidad de la experimentación. Todas las aplicaciones se realizaron con boquillas de bajo volumen.

El inoculo micorrízico (*Glomus fasciculatum* y *Glomus clarum*) provino del cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para la inoculación se utilizó la mezcla de propágulos de la micorrización del sorgo (*Sorghum vulgare* L.) en suelo estéril que contenía hifas, raicillas y 40 esporas / g suelo.

La cepa de *Azotobacter chroococcum* utilizada se aisló del mismo tipo de suelo empleado en el experimento. El inoculo se obtuvo en el medio DIMARGON líquido (Dibut y González, 1994) con una titulación de 10^{10} UFC / ml.

Se utilizaron esquejes de clones de *Coffea canephora* seleccionados por el Departamento de Mejoramiento Genético de la ECICC, que se multiplicaron vegetativamente en propagadores tipo túnel. Se utilizaron asimismo semillas provenientes de estos clones.

Las atenciones culturales en todos los experimentos se realizaron según las indicaciones del Instructivo Técnico de Café y Cacao (CUBA. MINAGRI, 1987)

Experimento 4. Respuesta de clones a la inoculación con *Azotobacter*.

Se realizó en 1997 en dos montajes con diferentes clones:

Clones	Tipo de experimento	Período de ejecución	Forma de inoculación
MZ-CC, MZ -1 y MZ-2	Bifactorial 2 x 3	Junio – Octubre 1997	Inmersión 10 min. en solución 1/10*
MZ-M y C- 107	Bifactorial 2 x 2	Julio – Noviembre 1997	Inmersión 10 min. en solución 1/10*

* Técnica propuesta por Acosta (1991) citada por Fernández (1999)

Se utilizó un diseño de bloque al azar y se evaluaron para la altura, diámetro del tallo, área foliar, pares de hojas y contenidos foliares seis plantas por parcela en 4 réplicas y de ella 4 plantas por tratamientos se utilizaron para evaluar la masa seca.

Experimento 5. Estudio de concentraciones de Azotobacter

El experimento comprendió el período de junio - octubre 97. Se utilizaron esquejes procedentes de una mezcla clonal. La técnica empleada fue inmersión por 10 minutos en concentraciones de 0, 10, 20 y 50 %.

Se realizó la segunda campaña de diciembre del 1997 a julio del 1998 utilizando semillas provenientes de una mezcla clonal. Se inoculó el Azotobacter en concentraciones de 0; 5; 10; 15 y 20 % mediante inmersión por 10 minutos.

Para los parámetros evaluados, en ambos experimentos se escogieron 6 plantas en 4 réplicas de cada tratamiento.

Experimento 6. Modos y momentos de aplicación de Azotobacter.

En la campaña Diciembre / 98 a Mayo / 99 se emplearon esquejes provenientes de una mezcla clonal.

Se evaluaron combinaciones de modos y momentos de aplicación del Azotobacter en combinación con la fertilización mineral (urea) en un total de 6 tratamientos en 4 réplicas con parcelas de 15 plantas. El diseño empleado fue un bloque al azar.

1. Testigo (3/1)
2. Inmersión 10 minutos en Azotobacter al 20 % (A)
3. Foliar al 20 % a los 40, 80, 120 y 160 días (B)
4. A + B
5. Urea foliar al 1 % a los 40, 80, 120 y 160 días
6. Aplicación alterna de urea y Azotobacter cada 40 días.

Experimento 7. Se realizó desde septiembre 1999 a marzo del 2000. En un diseño de bloques al azar arreglo bifactorial se estudió la interacción de tres concentraciones de Azotobacter al suelo (0, 10 y 20 %) y tres concentraciones de Azotobacter foliar (0, 10 y 20 %). Se utilizaron semillas pregerminadas de una mezcla clonal de *C canephora*.

Evaluaciones.

Crecimiento.

- Altura de la planta: Se midió con una regla graduada desde el cuello de la planta hasta el ápice (cm). En el caso de los esquejes se evaluó la altura desde el brote en la estaca.
- Diámetro del tallo: Se midió con un pie de rey a 1 cm del cuello (cm).
- Número de pares de hojas: Se determinó considerando un a hoja completamente formada cuando alcanzó más de 10 cm² de área foliar.
- Área foliar: Se estimó utilizando el método desarrollado por González et al (2000) para la especie *Coffea canephora* a partir de las dimensiones lineales de las hojas y de acuerdo a la siguiente fórmula $AF (cm^2) = \text{largo} \times \text{ancho} \times 0.67$.

- Masa seca: Posterior a la extracción de las plantas de las bolsas, estas se separaron por órganos (hojas, tallos y raíz) se evaluó la masa fresca y posteriormente se colocó en una estufa a 65 °C hasta alcanzar masa constante, determinándose su valor en cada órgano y total de la planta (g).

Análisis de la planta.

En los diferentes órganos de las plantas se determinaron los contenidos de N, P y K como porcentaje de la masa seca. Se realizó una digestión húmeda con H₂SO₄ + Se y se determinó el N por colorimétrica con el reactivo de Nessler, el fósforo (P): por colorimetría con el método del molibdovanadato y el potasio (K) con fotometría de llama.

La extracción se calculó a partir de los datos de la masa seca de cada órgano y el correspondiente contenido de cada elemento (% N, P, K).

Análisis estadístico.

Los datos se procesaron de acuerdo a los diseños experimentales utilizados. En los casos en que se encontraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se aplicó la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan referidos por Cochran y Cox (1990) para 0.05 y 0.01 como criterio comparativo entre estos.

Resultados.

Experimento 1.

Se encontró una respuesta positiva a la inoculación con *Glomus fasciculatum* y el concentrado de cepas nativas con un efecto (promedio para las dos proporciones de humus de lombriz) en la altura de 27.5 y 43 % con relación al tratamiento Normas Técnicas. En el indicador área foliar, estos valores fueron de 29 y 38 % respectivamente. La inoculación con *Glomus manihotis* provocó un fuerte efecto depresivo (- 3 % para la altura y -31 % para el área foliar), lo que demuestra que esta cepa infectó pero de forma ineficiente (Tabla 3).

La poca diferencia obtenida entre el crecimiento producto de la adición del concentrado nativo y la infección natural y el buen crecimiento de las posturas en este último tratamiento sugieren que este suelo posee una buena capacidad o potencialidad de micorrización.

La aplicación de *Azotobacter* presentó un efecto positivo solo sobre la altura y el área foliar en la proporción 5/1, incrementando la altura en 37 % y el área foliar en 26 %, sin embargo aplicado con las micorrizas incrementó con fuerza el efecto de estas últimas, siendo más nítido este efecto en la relación suelo / humus 5/1 que 7/1. Los mejores efectos de la combinación *Azotobacter* x MVA se observaron con *Glomus fasciculatum* y el concentrado nativo.

Tabla 3. Efecto de los biofertilizantes y su interacción en el desarrollo de posturas de *C. Arabica* L en dos sustratos. Experimento 1.

	Altura		Pares de hojas		Area foliar	
	5/1	7/1	5/1	7/1	5/1	7/1
C1 + BFN	20.22 c	17.56	6.47	6.47	402.11	396.13
C1 - BFN	21.50 c	18.81	6.87	6.80	422.91	407.43
C2 + BFN	22.50 bc	23.56	6.73	6.93	532.84	509.26
C2 - BFN	21.11 c	20.94	6.67	6.67	405.83	487.56
C3 + BFN	25.94 a	24.33	6.67	6.80	570.36	486.43
C3 - BFN	23.11 abc	25.33	6.73	6.67	482.82	533.17
C4 + BFN	25.44 ad	13.11	6.47	4.80	375.22	170.90
C4 - BFN	16.78 d	12.56	6.40	5.47	294.41	188.26
<i>E.S. trat</i>	1.04***	1.05 n.s.	0.14 n.s.	0.13 n.s.	21.73 n.s.	21.80 n.s.
C1	20.86 b	18.18 c	6.65 a	6.63 a	412.51 c	401.78 c
C2	21.80 b	22.25 b	6.70 a	6.80 a	469.34 b	498.41 b
C3	24.52 a	24.83 a	6.70 a	6.73 a	526.59 a	509.8 a
C4	21.11 b	12.83 d	6.43 b	5.13 b	334.82 d	179.58 d
<i>E.S. A</i>	0.52***	0.52***	0.07***	0.06***	10.86***	10.90***
+ BFN	23.52 a	19.64	6.58	6.25	470.13 a	390.68
- BFN	20.62 b	19.41	6.66	6.40	401.49 b	404.10
<i>E.S. B</i>	0.37***	0.37n.s.	0.05 n.s.	0.05 n.s.	7.68***	7.70 n.s.
<i>C.V. , %</i>	14.90	16.05	8.82	8.17	15.94	16.76
Normas técnicas	17.18		6.50		374.21	

*** Medias con letras desiguales difieren al 5% según dócima de Duncan.

C1 – cepas nativas sin concentrar; C 2 cepas nativas concentradas; C 3 *Glomus fasciculatum*; C 4 *Glomus manihotis*. BFN – bacteria fijadora de nitrógeno, *Azotobacter chroococcum*.

Experimento 2.

Se observó un marcado efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos, el cual se observa con nitidez cuando se compara con el tratamiento sin inocular (Tabla 4). Los mayores efectos se observan con la aplicación de *Glomus fasciculatum* y en menor cuantía con *Glomus manihotis*. Como promedio de ambos niveles de humus de lombriz del factor micorriza (A) *Glomus fasciculatum* incrementó la altura en 8 %, los pares de hojas en 5 % y el área foliar en 25 %. Por su parte el efecto depresivo de *Glomus manihotis* se tradujo en la disminución de la altura en 17 %, los pares de hojas en 4 % y el área foliar en 25 %.

La aplicación de *Azotobacter* presentó ligeros efectos positivos en las dos relaciones de sustrato, pero los mayores efectos se obtuvieron cuando se aplicó en la proporción 5/1. De esta manera al comparar el incremento de los indicadores con la media del suelo sin inocular (tratamiento C4) el aumento de la altura fue de 6 %, 5 % para los pares de hojas y 22 % para el área foliar.

Al aplicar el *Azotobacter* combinado con *Glomus fasciculatum* y con *Glomus mosseae* se obtuvo un buen efecto en la relación suelo / humus 5/1. Cuando se aplicó en la

relación 7/1 el efecto de Azotobacter no fue significativo originando para algunos indicadores un efecto depresivo (Tabla 4).

En estas condiciones de suelos con bajo contenidos de fósforo disponible, las aplicaciones de micorrizas y Azotobacter sobre sustratos suelo/humus de lombriz 7/1, siempre produjeron posturas con un crecimiento inferior a los obtenidos con la Norma Técnica, mientras que en la relación 5/1 se obtienen posturas con índices superiores a los obtenidos con la Norma Técnica.

Tabla 4. Efecto de los biofertilizantes y su interacción en el desarrollo de posturas de *C. Arabica* L en dos sustratos. Experimento 2.

	Altura		Pares de hojas		Area foliar	
	5/1	7/1	5/1	7/1	5/1	7/1
C1 - BFN	17.80 b	15,44 b	6.90 ab	6.50 ab	402.50 b	344.37 ab
C1 + BFN	19.47 a	16.77 ab	7.00 a	6.40 ab	467.10 a	311.75 b
C2 - BFN	17.72 b	16.56 ab	6.50 b	6.60 ab	354.30 bc	370.37 a
C2 + BFN	19.10 ab	18.12 a	7.00 a	6.70 a	425.80 ab	380.25 a
C3 - BFN	12.10 d	12.54 c	6.00 c	6.00 b	205.10 d	200.00 c
C3 + BFN	15.15 c	13.33 c	6.20 bc	6.30 ab	301.50 c	216.37 c
C4 - BFN	15.80 c	13.43 c	6.20 bc	6.20 ab	297.50 c	296.62 b
C4 + BFN	17.60 b	16.82 ab	6.50 b	6.40 ab	320.00 c	304.00 b
<i>E.S. trat</i>	0.46***	0.52***	0.13**	0.14*	18.64***	17.33**
C1	18.63 a	16.10 b	6.95 a	6.46 ab	434.81 a	328.06 b
C2	18.41 a	17.34 a	6.75 a	6.65 a	390.12 bc	365.31 a
C3	13.62 c	12.93 c	6.10 c	6.15 b	253.31 d	208.18 c
C4	16.70 b	15.12 b	6.35 b	6.30 b	308.18 c	300.30 b
<i>E.S. A</i>	0.32***	0.37***	0.09***	0.10**	13.18***	12.25***
- BFN	15.85 b	14.49 b	6.40 b	6.32	314.80 b	302.84
+ BFN	17.83 a	16.26 a	6.67 a	6.45	378.60 a	303.09
<i>E.S. B</i>	0.23***	0.26***	0.07***	0.07 n.s.	9.32 ***	8.66 n.s.
<i>C.V. , %</i>	16.99	10.70	6.40	7.10	14.92	15.93
Normas técnicas	19.10		6.80		401.00	

*** Medias con letras desiguales difieren al 5% según dócima de Duncan.

C1 – *Glomus fasciculatum*; C2 *Glomus moseae*; C3 *Glomus manihotis*; C 4 sin inocular. + BFN – aplicación de *Azotobacter chroococcum*

Experimento 3.

Se apreciaron los mayores porcentajes de germinación (entre el 71.4 y el 109. 7%, en los primeros 50 días) en los tratamientos inoculados con *Trichoderma* y *Azotobacter*, mostrando diferencia significativa con relación a los demás tratamientos (Tabla 5). Estos resultados coinciden con Sandoval et al (1995), quienes informaron que muchos aislados de *Trichoderma* spp inducen sustancias reguladoras del crecimiento que incrementan la germinación y el desarrollo de las plantas. Martínez y Hernández (1995) informaron que el *Azotobacter* estimula la germinación de las semillas debido a que segrega un grupo de sustancias fisiológicamente activas.

El *Azotobacter* y la *Trichoderma* controlaron a *Rhizoctonia solani* (Tabla 6). *Trichoderma* fue el más efectivo hasta los 80 días. A los 100 días la acción de ambos biopreparados fue similar y la incidencia de la *Rhizoctonia* se encontró en 5,1 y 9,7 % respectivamente, valores superiores estadísticamente a los del testigo y del tratamiento micorrizado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rincón (1992) quien informa de la efectividad de *Trichoderma* sobre el hongo *Rhizoctonia solani* en semilleros de café.

El efecto de *Trichoderma viride*, *Azotobacter chroococcum* y *Glomus fasciculatum* en los indicadores de desarrollo de las posturas fue similar y se diferenciaron solamente del testigo (Tabla 7). Estos resultados corroboran los obtenidos por (Rodríguez y Blanco 1992), quienes reportaron incrementos en el crecimiento y desarrollo de las plantas con la aplicación de biopreparados y bioestimulantes

Tabla 5. Efecto de *Trichoderma viride*, *Azotobacter chroococcum* y *Glomus fasciculatum* en la germinación de la semilla de café.

Tratamientos	50 días	(Incremento %)	60 días	(Incremento %)
Testigo	17.5 b	-	36.7 b	-
<i>Trichoderma</i>	30.0 a	71.4	67.5 a	83.9
<i>Azotobacter</i>	36.7 a	109.7	65.0 a	77.1
<i>Glomus fasciculatum</i>	18.3 b	4.6	50.0 a b	36.2
E. S ±	0.078 *		0.114 *	
C. V %	12.320		11.468	

* Medias con letras desiguales difieren al 5% según dócima de Duncan.

Tabla 6. Efecto de *Trichoderma*, *Azotobacter* y *Glomus* en el control de *Rhizoctonia solani*.

Tratamientos	60 días	80 días	100 días
Testigo	25.0 c	31.9 d	55.7 c
<i>Trichoderma</i>	4.9 a	2.6 a	5.1 a
<i>Azotobacter</i>	10.2 b	8.0 b	9.7 a
<i>Glomus fasciculatum</i>	30.0 c	18.7 c	31.2 b
E. S ±	0.058 **	0.033 **	0.062 **
C. V %	11.138	5.696	9.432

* Medias con letras desiguales difieren al 1% según dócima de Duncan.

Tabla 7. Efecto *Trichoderma*, *Azotobacter* y *Glomus* en la morfología de los cafetos.

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro del Tallo (cm)	Pares de Hojas	Masa seca Foliar (g)
Testigo	20.1 b	0.28 b	5.7 c	1.6 b
<i>Trichoderma</i>	27.0 a	0.35 a	6.7 a	2.9 a
<i>Azotobacter</i>	26.6 a	0.35 a	6.7 a	2.7 a
<i>Glomus fasciculatum</i>	25.4 a	0.33 a	6.7 a	2.7 a
E. S ±	0.896 **	0.010 *	0.038 **	0.115 **
C. V %	6.261	5.332	1.042	8.135

* Medias con letras desiguales difieren al 5% y 1 % según dócima de Duncan.

Experimentos con *Coffea canephora* Pierre ex Froehner.

De la rizosfera del cafeto se aislaron cepas que fueron identificadas como *Azotobacter chroococcum* debido a su crecimiento rápido en el medio Ashby; la producción de una pigmentación carmelita-oscuro. Se evidenció la presencia de flagelos, colonias redondeadas y que respondieron a ser Gram (-), lo que coincide con las características reportadas por Pelczar y Reid (1966) para esta especie. Las cepas se nombraron de acuerdo a la localidad donde fueron aisladas como:

- *Azotobacter chroococcum* cepa Tercer Frente Café-1 (TFC-1)
- *Azotobacter chroococcum* cepa Sabaneta Café-1 (SC-1).

El biopreparado obtenido de cada una de las cepas tuvo concentraciones por encima de 10^9 UFC/ ml y se empleó en el montaje de los experimentos con esquejes y semillas de *Coffea canephora*

Al comparar la población del *Azotobacter* en los dos agroecosistemas cafetaleros se encontraron las mayores poblaciones en el mes de Mayo en el suelo Pardo ócrico sin carbonato de III Frente cultivado con *Coffea arabica* L. (Tabla 8) lo que puede atribuirse a los altos contenidos de materia orgánica, fósforo y potasio, que crean las condiciones propicias para su desarrollo según señalan Mayea *et al* (1982).

Alexander (1980) indica que la microflora rizosférica varía cualitativa y cuantitativamente en los diferentes tipos de plantas, lo que justifica las diferencias encontradas entre las dos especies de café. Estos resultados, además pueden atribuirse al periodo de fructificación en que se encontraron los cafetos en el mes de mayo, etapa en la cual la planta requiere de una mayor demanda de nutrimentos, lo que aumenta la afluencia de microorganismos en su rizosfera.

Tabla 8. Comportamiento de las poblaciones de *Azotobacter* en las localidades. (104 UFC/ g).

Tratamientos	Datos transformados
Tercer Frente, <i>C. arabica</i> , enero	4.21 b
Tercer Frente, <i>C. arabica</i> , mayo	5.31 a
Tercer Frente, <i>C. canephora</i> , enero	3.50 c
Tercer Frente, <i>C. canephora</i> , mayo	3.39 cd
Sabaneta, <i>C. arabica</i> , enero	2.54 ef
Sabaneta, <i>C. arabica</i> , mayo	4.12 b
Sabaneta, <i>C. canephora</i> , enero	2.23 f
Sabaneta, <i>C. canephora</i> , mayo	2.87 de
<i>E.S.x A x B x C</i>	0.09**
C.V., %	5.23

**Medias con letras desiguales difieren al 1% según d'Arcy de Duncan.

Experimento 4. Relación *Azotobacter* / clon de *Coffea canephora*

La aplicación del biofertilizante en los esquejes incrementó el diámetro del tallo en un 11 %, la altura en un 12 %, los pares de hojas en 15 %, la masa seca en un 23 % y el área foliar en un 50 %. Este último indicador constituye de forma cuantitativa el que

mejor refleja el efecto de los tratamientos en la fase de vivero según consideraciones de Soto (1980).

El efecto estimulador del biofertilizante no se manifestó por igual entre los clones. Al inocular *Azotobacter* en el clon MZ – CC el incremento del área foliar fue de 75 % y 19 % para la masa seca con relación a la ausencia del biopreparado; mientras que para el MZ – 1 fue de 60 y 65 % para estos mismos indicadores. En el clon MZ – 2 el efecto fue menos intenso y hubo incrementos del 20 % para el área foliar y del 2 % para la masa seca (Tabla 9).

Estos resultados demuestran la respuesta positiva de los clones de *Coffea canephora* a la inoculación con *Azotobacter* y la dependencia de la respuesta al clon utilizado.

Bopaiah *et al* (1977) al estudiar el efecto de la aplicación de dos biopreparados a partir de cepas de *Azotobacter* aisladas de un suelo con café de la India encontraron incrementos del vigor de la planta, la altura, el número de hojas y su tamaño, el peso seco y el contenido de nitrógeno.

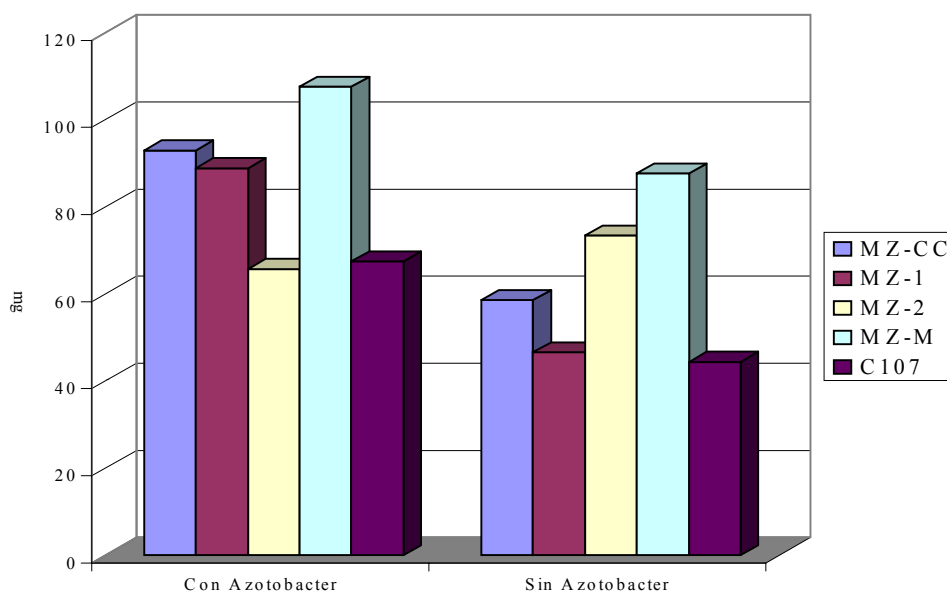
Con excepción del clon MZ 2 en el resto de los tratamientos la aplicación de *Azotobacter* incrementó la extracción de nitrógeno con relación al tratamiento sin biopreparado (Figura 1).

Tabla 9. Respuesta de clones de *C. canephora* a la inoculación con *Azotobacter*.

Tratamientos	Altura, cm	Diámetro, mm	Pares de hojas	Area foliar, cm ² .	Masa seca, gr
MZ-CC + BFN	14.28	0.32	3.75 a	104.58 a	3.11 a
MZ-CC – BFN	13.96	0.27	3.25 b	59.74 d	2.61 b
MZ-1 + BFN	15.28	0.29	3.75 a	86.01 b	3.38 a
MZ-1 – BFN	12.06	0.27	2.61 c	53.79 d	2.04 c
MZ-2 + BFN	13.97	0.30	3.50 ab	81.39 b	3.03 a
MZ-2 – BFN	12.73	0.26	2.75 c	67.69 c	2.96 b
<i>E.S.x</i>	<i>0.96 ns</i>	<i>0.01ns</i>	<i>0.17**</i>	<i>4.75**</i>	<i>0.20**</i>
MZ-M + BFN	14.37 a	0.28 a	4.54	139.4 a	4.54 a
MZ-M – BFN	10.57 b	0.25 b	3.75	64.65 c	3.61 b
C 107 + BFN	8.72 c	0.26 ab	3.20	83.24 b	3.28 bc
C 107 – BFN	5.91 d	0.23 c	3.12	54.91 c	2.36 d
<i>ES x</i>	<i>0.76 **</i>	<i>0.01 **</i>	<i>0.19 ns</i>	<i>3.79 **</i>	<i>0.38 **</i>

**Medias con letras desiguales difieren al 1% según dócima de Duncan. +; - BFN – Inoculación o no con *Azotobacter*

Figura 1 Efecto de la aplicación de Azotobacter en la extracción de N



Experimento 5. Efecto de las concentraciones.

En 1997 se encontró un incremento lineal del diámetro del tallo y el área foliar proporcional a las diferentes concentraciones y permitió ubicar el rango de respuesta al biopreparado en la concentración de 20% (Tabla 10).

En 1998 no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de 10, 15 y 20 % para la altura y el área foliar, mientras que para la masa seca las concentraciones de 15 y 20 % mostraron los mayores incrementos con respecto al testigo (48 y 67 % respectivamente). Se recomienda la utilización de la concentración del 20 % por ser la de más estable comportamiento agronómico (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de las concentraciones de Azotobacter en el crecimiento de posturas de *C. canephora*.

%	Altura, cm		Masa seca, gr		Area foliar, cm ²	
	1997	1998	1997	1998	1997	1998
0	13.38 b	21.25 c	2.53 b	1.45 b	66.90 c	208.80 b
5		21.92 bc		1.53 b		215.68 b
10	14.75 a	24.83 ab	3.10 a	1.48 b	93.03 b	240.83 a
15		24.33 ab		2.15 a		292.17 a
20	15.32 a	26.58 a	3.65 a	2.43 a	123.43 a	291.17 a
50	14.99 a		3.67 a		64.11 c	
ES	0.37**	0.98**	0.32**	0.11*	1.72**	14.42**

**Medias con letras desiguales difieren al 5% y 1% según dócima de Duncan.

Rodríguez et al (1999) al estudiar el efecto de 5 concentraciones de Azotobacter en el crecimiento de injertos de café encontraron como óptima la aplicación del biopreparado al 10 %.

Experimento 6. Modos y momentos de aplicación de Azotobacter

En 1999 la aplicación del Azotobacter incrementó los indicadores evaluados (Tabla 11) independientemente del modo y el momento de aplicación utilizada.

El tratamiento con un comportamiento agronómico más estable fue la inmersión de los esquejes en el biopreparado al 20 % ya que permitió incrementos de 35 % en la altura, 136 % en la masa seca y 65 % en el área foliar con respecto al testigo absoluto.

Se debe señalar que si bien las aplicaciones foliares propiciaron el mayor incremento en la altura de las posturas, no ocurrió lo mismo con respecto a la masa seca y al área foliar donde el incremento sólo representó 90 y 38 % respectivamente del testigo.

Tabla 11. Modos y momentos de aplicación de BFN en esquejes de *C. canephora*.

Tratamientos	Altura, cm	Diámetro del tallo, cm	Pares de hojas	Masa seca, g	Area foliar, cm ²
Testigo (3/1)	8.62 b	0.35	4.64	1.37 c	251.87 c
Inmersión 20 min. en Azotobacter al 20 % (A)	11.61 a	0.4	5.00	3.23 a	415.63 a
Foliar al 20 % a los 40, 80, 120 y 160 días (B)	13.05 a	0.35	4.43	2.60 ab	347.45 ab
A + B	11.46 a	0.33	4.21	2.43 ab	324.24 bc
Urea foliar al 1 % a los 40, 80, 120 y 160 días	11.72 a	0.33	4.57	2.33 ab	297.36 bc
Aplicación alterna de urea y Azotobacter cada 40 días.	10.54 ab	0.32	4.36	2.13 bc	269.96 bc
<i>E.S.</i>	0.86 *	0.02 ns	0.2 ns	0.27*	27.6 *

* Medias con letras desiguales difieren al 5% según d. de Duncan.

Experimento 7.

Al estudiar la combinación de vías de aplicación del Azotobacter se encontró que de manera general, los mayores valores de los indicadores se alcanzaron en el tratamiento que recibió el biopreparado aplicado al suelo al 20 % en el momento de siembra de la semilla más aplicaciones adicionales al 20 % a partir del tercer par de hojas (Tabla 12).

Díaz y Suárez (1999) en suelo Ferralítico Rojo de montaña informan del efecto positivo de la aplicación del Azotobacter al momento de la siembra y a los 110 días después de la germinación. Sánchez et al (1998) recomiendan la aplicación del biopreparado en el trasplante y en el primer par de hojas.

Tabla 12. Efecto de las aplicaciones de Azotobacter (BFN) al suelo y foliar en el crecimiento de posturas de *C. Canephora* producidas por semillas.

Tratamientos	Altura, cm	Masa seca, gr	Área foliar, cm ²
Testigo	23.85 f	1.68 b	344.23 bc
BFN 10 % foliar	24.48 ef	1.66 b	336.37 b
BFN 20 % foliar	28.42 ab	1.77 b	350.16 abc
BFN 10 % suelo	26.48 cd	2.64 a	343.59 bc
BFN 10 % suelo+ 10 % foliar	26.74 bc	1.73 b	416.84 a
BFN 10 % suelo+ 20 % foliar	28.55 a	1.87 b	387.66 abc
BFN 20 % suelo	24.90 def	2.39 a	396.63 abc
BFN 20 % suelo+ 10 % foliar	26.11 cde	1.17 c	363.11 abc
BFN 20 % suelo+ 20 % foliar	27.02 ab	2.66 a	414.43 ab
E.S. x	0.59 ***	0.15 ***	22.11**

* Medias con letras desiguales difieren al 0.1 % según d^ocima de Duncan.

Conclusiones.

- El efecto del Azotobacter estuvo condicionado por la fertilidad y características de los nutrientes existentes en el sustrato y mostró mayores efectos en los sustratos ricos en materia orgánica.
- La coinoculación Azotobacter – micorrizas condujo a la obtención de posturas con similar desarrollo morfológico que el alcanzado al utilizar fertilizantes minerales en la mezcla. La cepa de mejor resultado fue la *Glomus fasciculatum*, mientras *Glomus manihotis* tuvo un efecto depresivo en el desarrollo de las posturas.
- La acción del Azotobacter en el control de *Rhizoctonia solani* fue similar al logrado con *Trichoderma viride*.
- La inoculación de los esquejes de *C. canephora* con Azotobacter fue positiva e incrementó los índices morfológicos y mejoró la nutrición N de las posturas. Esta respuesta dependió de los clones utilizados, la concentración, el modo y el momento de aplicación del biopreparado.
- Los modos de inoculación que produjeron las respuestas más consistentes fueron: Inmersión en Azotobacter al 20% por 20 minutos y Aplicación 10% al suelo + aplicación foliar al 10% a partir del tercer par de hojas de los esquejes.

Referencias bibliográficas.

1. Alexander M. Introducción a la microbiología del suelo. México: Chapingo, 1980. 467 p.
2. Bopaiah B., M, Vittal – Ray P. and Khan N. A. The influence of leaf surface organisms on the vegetative growth of Coffea plant . Journal of Coffee Research 7(3): 65- 68, 1977.
3. Bustamante C., C. Sánchez; M. Ochoa; Maritza I. Rodríguez y C. González. Utilización de hongos micorrízicos, solubilizadores de fósforo y Azotobacter en la producción de posturas de cafetos. Informe parcial Resultado 04. Santiago de Cuba: ECICC, 1992. 30 p.
4. CUBA. MINAGRI. Instrucciones Técnicas para el cultivo del café y cacao. La Habana: CIDA, 1987. 174 p.

5. Cupull R. Y C. Pérez. Medio de cultivo y metodología para la producción de Azotobacter. VII Forum de Ciencia y Técnica. 1992. 6 p.
6. Díaz A y Claribel Suarez. Efecto de diferentes concentraciones de biofertilizantes y sustratos en la producción de posturas de cafeto (coffea arabica L.) En: Simposio Internacional de café y Cacao. Programa, Conferencias y Resúmenes. Santiago de Cuba: ECICC, 1999. p 61-62.
7. Dibut B et al DIMARGON nuevo medio de cultivo para la producción industrial de biopreparado a base de Azotobacter chroococcum. Cultivos Tropicales 15(1): 12 – 14, 1994
8. Fernández F. Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre la producción de posturas de cafeto (C arabica L. var Catuai) en algunos tipos de suelo. Resumen de tesis La Habana: INCA, 34 p.(1999
9. González J. A., Délira Navarro y otros. Estimación del área foliar en posturas de C canephora. Informe final proyecto nacional 007.03.016. Santiago de Cuba: ECICC, 2000. 30 p.
10. Hernández A. J et al Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana: Instituto de Suelos, 1999. 64 p.
11. Lerch G. La experimentación de las ciencias biológicas y agrícola. La Habana: Ciencia y Técnica, 1977. 469 p.
12. Martínez, R. y G. Hernández. Los biofertilizantes en la agricultura cubana. En: II Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. La Habana, 1995. 84p.
13. Mayea S, R. Novo y A. Baliño. Introducción a la microbiología del suelo. La Habana: Pueblo y Educación, 1997 p. 1982
14. Rincón, G. Control biológico de Rhizoctonia solani con Trichoderma spp en semilleros de café. Cenicafe. 43 (3): 73-83,1992
15. Rodríguez, V. y A. Blanco. Eficiencia del Azotobacter chroococcum en la producción de posturas de Coffea arabica Lin. Instituto Superior de Ciencias Agrícolas. La Habana: INCA, 1992. 40 p.
16. Rodríguez Maritza I, C. Bustamante, Adamelis Cambara, A. Pérez, G. Grave de Peralta y P. Caro. Efecto de la aplicación de Azotobacter chroococcum sobre el desarrollo morfológico de injertos de café. En: Simposio Internacional de café y Cacao. Programa, Conferencias y Resúmenes. Santiago de Cuba: ECICC, p 58. 1999.
17. Samón A, A. Pérez y R. Valladares. Efecto de la aplicación de diferentes estimuladores del crecimiento sobre esquejes de cafeto. En: Simposio Internacional de café y Cacao. Programa, Conferencias y Resúmenes. Santiago de Cuba: ECICC, p 59. 1999.
18. Sánchez C y otros. Efecto de la aplicación de Azotobacter sobre la germinación y el desarrollo de las posturas de cafeto. En: Resúmenes del XI Seminario Científico del INCA, La Habana, 1998. P. 182.
19. Sandoval Ileana, María Ofelia López; D. García e I. Mendoza: (1995). Trichoderma harzianum (cepa A-34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento. CID- INISAV, Boletín Informativo 3.
20. Soto F. Estimación del área foliar en C. Arabica L a partir de las medidas lineales de las hojas. Cultivos Tropicales 2(3): 115 – 128, 1980.