

# RESPUESTA DE PLANTAS DE *Coffea canephora* A LA INOCULACIÓN CON HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES DURANTE LA FASE DE ACLIMATIZACIÓN

María E. González<sup>✉</sup> y Yojana Rodríguez

**ABSTRACT.** The present study was carried out in the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), with the objective of determining the effect of two micorrhizal strains on the development of coffee vitroplants in Robusta variety, during the acclimatization phase. A randomized complete design was used with nine treatments; after 90 days of cultivation, some evaluations were performed to number of leaf pairs, plant height (cm), total dry matter (g), as well as fungal indicators, colonization percentage, mass of arbuscular endophyte (g/g soil), total spores and survival percentage after 150 days. Data was processed by means of a single classification variance analysis, obtaining differences in the effectiveness of AMF strains per clone and achieving in general increments in the analyzed indicators. The highest values were obtained with *Glomus clarum* strain for M-229 and K-234 clones. Percentages of survival ranged between 95.42 and 98.15 %. The feasibility of using micorrhizal inoculation was proved to increase the morphophysiological quality of vitroplants.

**Key words:** *Coffea canephora*, Robusta coffee, vitroplants, fungi, vesicular arbuscular mycorrhizae, adaptation

**RESUMEN.** El presente estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), con el objetivo de determinar el efecto de dos cepas de micorrizas sobre el desarrollo de vitroplantas de café de la variedad Robusta, durante la fase de aclimatización. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con nueve tratamientos, realizándose a los 90 días de cultivo evaluaciones de: número de pares de hojas, altura de la planta (cm), masa seca total (g), así como los indicadores fúngicos, porcentaje de colonización, masa del endófito arbuscular (g/g suelo) y esporas totales, y a los 150 días el porcentaje de sobrevivencia. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple, obteniéndose como resultado diferencias en la efectividad de las cepas de HMA por clon y alcanzándose de forma general incrementos en los indicadores analizados. Los mayores valores se obtuvieron con la cepa *Glomus clarum* para los clones M-229 y K-234. Se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia que oscilaron entre 95.42 y 98.15 %. Se comprobó la factibilidad de emplear la inoculación micorrízica para incrementar la calidad morfofisiológica de las vitroplantas.

**Palabras clave:** *Coffea canephora*, café Robusta, vitroplantas, hongos, micorrizas arbusculares vesiculares, adaptación

## INTRODUCCIÓN

El género *Coffea* es económicamente el más importante de la familia Rubiaceae. Dos especies, *Coffea arabica* L. (Arabica) y *Coffea canephora* P. (Robusta) son cultivadas en cerca de 80 países de América, África y Asia (1). La especie *Coffea canephora* ocupa el segundo lugar tanto por importancia en superficie plantada como por el volumen de producción. Actualmente, en muchos países europeos se está incrementando el mercado de café Robusta, debido al crecimiento de consumidores de café "expreso" (2). Esta especie en comparación con *C. arabica* presenta mayor grado de resistencia a plagas y enfermedades, al estrés hídrico y a las altas temperaturas (3), posee mayor rusticidad y alto potencial productivo (4).

Dra.C. María E. González, Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Yojana Rodríguez, Investigadora de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, III Frente, Santiago de Cuba.

✉ esther@inca.edu.cu

En Cuba, existen grandes áreas dedicadas al cultivo del café, produciéndose anualmente un número considerable de posturas para la reposición y el fomento de nuevas plantaciones (5). Teniendo en cuenta lo intensivo del trabajo en esta fase del cultivo, se impone la necesidad de buscar vías alternativas que conlleven a la disminución de los costos de producción sin afectar la calidad de las plántulas.

En tal sentido, la biotecnología ligada a la agricultura abre nuevas posibilidades en la búsqueda constante de la satisfacción de las necesidades del hombre (6, 7). En relación con ello, el uso de biofertilizantes ocupa un lugar significativo, ya que puede contribuir a elevar la calidad biológica de las plantas micropropagadas, al influir de forma directa o indirecta en la nutrición de ellas.

El café es considerado un cultivo micotrófico obligatorio (8), ya que de forma natural acepta la simbiosis con los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), necesitando de estos para su establecimiento. De aquí, la posible factibilidad de desarrollar esquemas de inoculación en fases tempranas del crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Es por ello que el presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar el efecto de dos cepas de hongos micorrizógenos arbusculares en el desarrollo de plántulas de café micropropagadas, pertenecientes a la variedad Robusta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado en el municipio de San José de las Lajas, provincia La Habana, durante el período comprendido entre noviembre del 2000 y junio del 2001 (Tabla I), con el objetivo de estudiar el efecto de las cepas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): *Glomus fasciculatum* y *Glomus clarum*, en vitroplantas de café durante la fase de aclimatización.

**Tabla I. Condiciones climáticas en el período experimental**

	Temperatura promedio (°C)	Precipitación (mm)	Humedad relativa (%)
<b>2000</b>			
Noviembre	22.3	80.21	81.14
Diciembre	21.2	244.6	85.60
<b>2001</b>			
Enero	17.6	14.2	79.8
Febrero	22.5	47.3	80.2
Marzo	22.1	7.4	76.6
Abril	23.8	465.9	77.6
Mayo	24.1	187.0	83.3
Junio	26.2	230.3	82.0

Se utilizaron plantas provenientes de los clones M-229, K-234 y M-28 de la variedad Robusta especie *Coffea canephora*, obtenidas por embriogénesis somática.

Las vitroplantas seleccionadas se caracterizaron por presentar adecuado vigor y coloración, así como buen desarrollo del sistema radical y de tres a cuatro pares de hojas como valor promedio. En todos los casos se emplearon 30 plantas por tratamiento.

Se utilizó la tecnología de siembra en bolsas de polietileno negro, para trasplante, empleándose un suelo Ferralítico Rojo compactado (9). En cada bolsa se aplicaron 3 g del inóculo al momento de la siembra. Las atenciones culturales a las plántulas se realizaron según las instrucciones técnicas para el cultivo del café y el cacao (10).

El experimento se realizó en casa de cultivo, en condiciones de sombra, bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x3. Se estudiaron tres niveles del factor clon (M-229, K-234 y M-28) y tres niveles del factor hongo micorrizógeno arbuscular (HMA), (*Glomus fasciculatum* y *Glomus clarum*), y un tratamiento sin inocular, utilizando un sustrato compuesto por la relación suelo: cachaza 3:1.

A los 90 días posteriores a la siembra se evaluaron el número de pares de hojas, la altura de la planta (cm) y masa seca (g). También fueron evaluados los indicadores fúngicos: porcentaje de colonización, masa del endófito

(g/g de suelo) y esporas totales. A los 150 días de cultivo se determinó el porcentaje de sobrevivencia en las plantas.

Los resultados experimentales se procesaron estadísticamente, realizándose un ANOVA bifactorial y docimándose las medias según Duncan en caso de significación al 5 %, para lo cual se empleó el procesador START (versión 4.10, 1998) (11).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del estudio realizado se observó que la micorrización produce efectos positivos sobre el establecimiento y ulterior desarrollo de las vitroplantas pertenecientes a los tres clones en estudio, lo que pudiera estar dado por el papel de los HMA en la nutrición vegetal y los efectos beneficiosos de la simbiosis en la adsorción de varios elementos minerales esenciales, tales como, N, P, Cu, Zn, B, Mo, Fe y en especial el ión fosfato (12).

Las cepas objeto de estudio indujeron mejores respuestas agronómicas que las alcanzadas en los tratamientos testigos, superando a la de los propágulos nativos, lo que sugiere que quizás las concentraciones y efectividad de estos resultaron bajos. En este sentido, sobresale la cepa *Glomus clarum*, con los máximos valores de altura de la planta, número de pares de hojas y masa seca para los clones M-229 y K-234 (Tabla II). Las plantas no micorrizadas presentan respuestas inferiores para los indicadores analizados.

**Tabla II. Comportamiento de indicadores morfológicos en las vitroplantas micorrizadas**

Tratamientos	Pares de hojas			Altura de la planta		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
Control	5.51 e	5.03 f	4.01 g	16.96 f	16.19 f	13.07 h
<i>G. fasciculatum</i>	6.93 c	6.01 d	5.53 e	21.94 c	19.59 d	14.96 g
<i>G. clarum</i>	7.79 b	8.12 a	4.59 f	25.29 b	26.47 a	18.02 e
ES X (±)		0.158**			0.139*	

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente, según Duncan para  $\alpha=0.5\%$

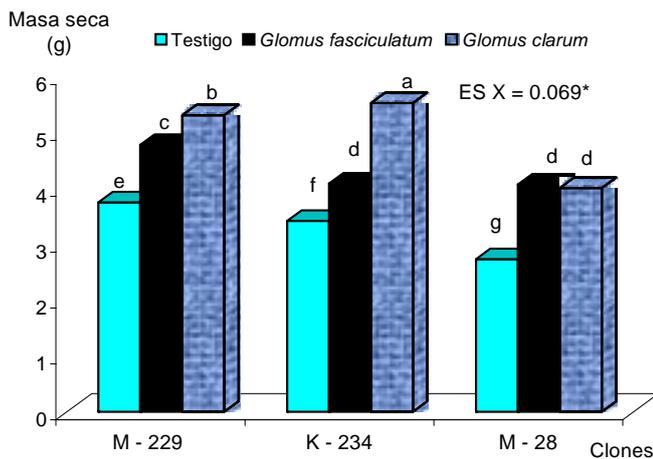
Los resultados obtenidos para la variable número de pares de hojas difieren significativamente entre los clones, dependiendo de la cepa utilizada. Se observó que *Glomus clarum* resultó ser más efectiva, arrojando valores entre 7.79 y 8.12 pares de hojas para M-229 y K-234, respectivamente. Sin embargo, a pesar de que en el tratamiento con *Glomus fasciculatum* estas cifras son inferiores para ambos clones (6.93 y 6.01), es preciso destacar que superan estadísticamente a los valores obtenidos en el tratamiento control.

Es válido señalar que el comportamiento de esta variable en el clon M-28, difiere del resto de los genotipos (Tabla II), obteniéndose los mayores efectos benéficos con la cepa *G. fasciculatum* (5.53 pares de hojas), valores que no superan a los alcanzados en este estudio para los materiales de mejor respuesta (M-229 y K-234) ante dicha cepa. Estos resultados corroboran lo informado por otros autores (13, 14), al utilizar a *G. fasciculatum*

como inóculo en cultivos de interés agrícola. Además, es de destacar el carácter diferenciado mostrado por el clon M-28 ante las diferentes cepas, evidenciándose en el desarrollo de vitroplántulas de café el grado de influencia del carácter genotípico sobre el efecto de las cepas evaluadas, factor indispensable para determinar qué cepa utilizar, con la finalidad de lograr una respuesta efectiva al proceso de micorrización en plantas micropropagadas.

En el análisis correspondiente al índice morfológico, altura de la planta, se alcanzaron los mayores valores promedio al utilizar la cepa *G. clarum*, los que oscilaron entre 26.47 y 18.02 cm (Tabla II), seguido por el tratamiento con *G. fasciculatum*, cuyos valores son inferiores pero superan en gran medida al tratamiento de referencia en los tres clones evaluados M-229 y K-234. Resultados similares han sido obtenidos en este cultivo al estudiar el comportamiento de cuatro cepas de HMA sobre el desarrollo de posturas de café en suelo Fersialítico Rojo lixiviado (15).

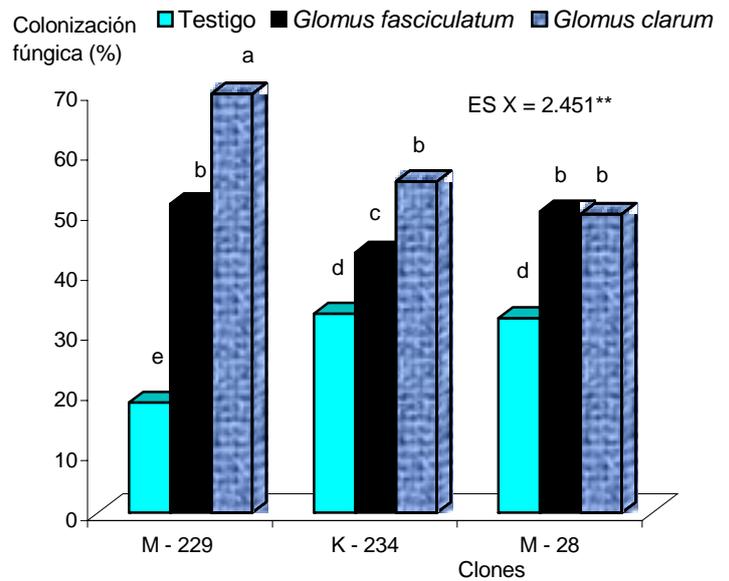
Con respecto al comportamiento de la variable masa seca total en las plantas inoculadas, se observó una respuesta favorable para los tres clones en estudio y las dos cepas evaluadas, lográndose valores superiores a los tratamientos testigo, los que se encuentran entre 5.53 y 4.01 g para *G. clarum* y 4.78 y 4.07 g para *G. fasciculatum* (Figura 1), lo que demuestra el efecto que ejerce la inoculación sobre la variable analizada.



**Figura 1. Efecto de la inoculación micorrizica sobre la producción de masa seca en las plántulas de café**

En tal sentido, queda demostrado el efecto beneficioso del proceso de inoculación micorrizica sobre los indicadores morfológicos evaluados en los cafetos, aspectos que coinciden con lo informado en investigaciones realizadas en otras variedades de café (*Coffea arabica* var. Colombia) (16).

Al analizar la colonización fúngica se observó que el proceso de inoculación incrementó los porcentajes de este indicador para todos los tratamientos estudiados, alcanzándose cifras entre 43.27 y 69.71 % (Figura 2); se observó que la cepa con una micorrización más efectiva y un efecto agrobiológico superior fue la de mayor porcentaje de colonización.



**Figura 2. Porcentajes de colonización fúngica en los diferentes tratamientos**

En relación con la variable masa del endófito, la que de mejor manera expresa los comportamientos micorrizicos de las plantas de café, ya que cuantifica la intensidad infectiva (17), se apreció que existieron en todos los casos diferencias significativas entre las distintas variantes (Tabla III); en la medida que se logró una inoculación más efectiva se lograron efectos superiores sobre la masa del endófito, siendo estos valores de 13.40 y 29.12 g/g suelo para *G. clarum* y de 11.13 y 20.15 g/g suelo para *G. fasciculatum*.

En las condiciones estudiadas, se obtienen valores de esporulación para las vitroplántulas inoculadas que oscilan entre 33.10 y 85.22 esporas totales/g suelo, expresando este indicador el desarrollo de la simbiosis.

**Tabla III. Valores fúngicos encontrados para las cepas evaluadas en los clones en estudio**

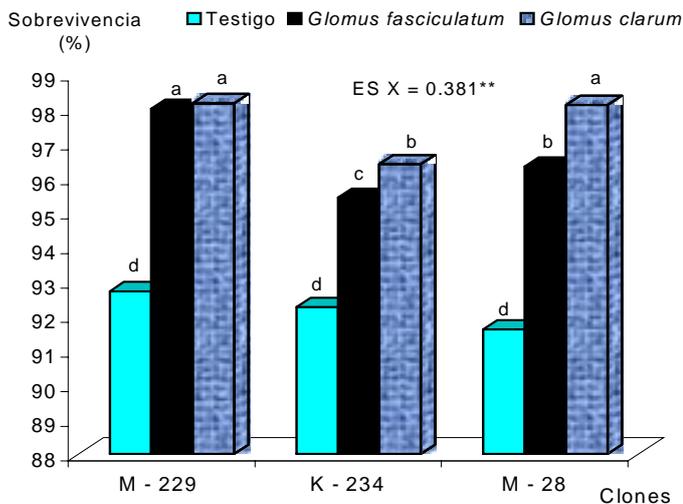
Tratamientos	Endófito arbuscular (g/g suelo)			Esporas totales/g suelo		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
Control	4.96 g	8.42 f	3.65 h	14.52 f	24.64 e	10.68 g
<i>G. fasciculatum</i>	11.13 e	14.38 c	20.15 b	33.10 d	42.08 c	58.97 b
<i>G. clarum</i>	21.34 b	29.12 a	13.40 d	62.63 b	85.22 a	39.21 c
ES X (±)		1.402**			1.831**	

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente, según Duncan para  $\alpha= 0.5\%$

Por último, se observa que los porcentajes de sobrevivencia en las plántulas tratadas con las cepas en estudio oscilaron entre 95.42 y 98.15 %, superando a los obtenidos en las plantas no micorrizadas (Figura 3), comportamiento que pudiera atribuirse a que las plantas adquieren una mayor preparación para continuar su ciclo de vida después de la transferencia a condiciones *ex vitro*, ya que la propias condiciones del laboratorio (alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, entre otras) en ocasiones introducen cambios anatómicos y fisiológicos (18),

que repercuten en la supervivencia de las plantas. Otros autores han obtenido resultados favorables al aplicar inoculantes procedentes de este mismo género fúngico en el cultivo de la Guayabita del Pinar (*Psidium salutare* H.B.K, Berg) y de la malanga (*Xanthosoma caracu*) (19, 20).

De forma general, el análisis de la respuesta a la inoculación con las dos cepas de HMA en los tres clones estudiados de la variedad Robusta, permite corroborar que existió una adecuada eficiencia de la micorrización en correspondencia con el suelo utilizado, lográndose incrementos significativos para los indicadores evaluados. De aquí que la aplicación de inoculantes a base de micorrizas arbusculares, de las cepas *G. clarum* y *G. fasciculatum*, pueden ser utilizados de forma satisfactoria en vitroplantas de café durante la fase de aclimatización, sobre un suelo Ferralítico Rojo compactado.



**Figura 3. Incrementos en los porcentajes de supervivencia en las plantas inoculadas**

Se corrobora que el empleo de HMA como fertilizante biológico puede resultar una de las prácticas más efectivas durante el período de aclimatización y contribuir a aumentar la calidad morfofisiológica de especies vegetales de interés agrícola.

## REFERENCIAS

- Rani, V. /et al./ Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high-frequency somatic embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Reports*, 2000, vol. 19, no. 10, p. 1013-1020.
- Kilcher, L. El mercado para café orgánico. *Rev. Café Cacao*, 2002, vol 33, no.1, p. 5-9.
- Bertrand, B.; Pena-Duran, M. X.; Anzueto A.; Cilas C.; Etienne, H. y Anthony, F. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. *Euphytica*, 2000, 113, p. 79-86.
- Grave de Peralta, G.; Díaz, W. y Rodríguez, M. Manejo de la poda y reducción gradual de los árboles de sombra en *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Rev. Café Cacao*, 1998, vol.1, no.1, p. 36-41.

- MINAGRI. Dirección Nacional de Café y Cacao. Informe anual sobre el cultivo de café, 1998, 19 p.
- Timmis, R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: Conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*, 1998, vol. 14, no. 1, p. 156-166.
- Madhava, M. y Sreenath, H. L. *In vitro* of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1999, 55, p. 227-230.
- Sieverding, E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in Tropical Agroecosystems Federal Republic of Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (Gtz) GMBH, 1991.-371 p.
- Hernández, A. /et al./ Sistema automático de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana : Ministerio de la Agricultura, 1999.
- Ministerio de la Agricultura. Instrucciones técnicas para el cultivo del café y el cacao. La Habana: CIDA. 1987, 208 p.
- INCA START: Sistema Automático para Análisis Estadístico (Versión 4.10, 1998) INCA (Diskette. 1998).
- Trimble, M. y Knowles, R. N. Influence of N and phosphorous on growth, carbohydrate partitioning and mineral nutrition of greenhouse (*Cucumis sativa* L.) plants during establishment. *Can. J. Plant Science*, 1995, vol. 75, p. 239-250.
- Ojeda, L. /et al./ Efectividad de las micorrizas en el desarrollo de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pasturas Tropicales*, 1995, vol. 17, p. 2.
- Fernández, F. Efecto del uso de las asociaciones micorrízicas arbusculares (va), diferentes sustratos y algunas rizobacterias sobre la producción de posturas de cafetos (*C. arabica* Lin). [Tesis de Doctorado], INCA. 1999.
- Sánchez, C. /et al./ Tecnología sostenible para la producción de posturas de café en el Escambray basada en el manejo de las asociaciones micorrízicas, el *Azotobacter* y los abonos verdes. En: Programa y Resúmenes del Seminario Científico Técnico del Escambray. Instituto de Suelos. Cienfuegos: Estación Experimental de Suelos Escambray (4:1997:Cienfuegos), 1997. 55 p.
- Estrada, M. G. y Sánchez-de-Prager, M. Dependencia del café (*Coffea arabica* L. var. Colombia) por la micorriza vesículo arbuscular. *Acta Agronómica*, 1995, vol. 45, no. 1, p.85-88.
- Herrera, R. A. /et al./ Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, evolución y procesos sociales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida, 1995.
- Pandey, A. Biological hardening: A promising technology for tissue culture industry, a role of plant tissue culture in biodiversity, conservation and economic development, p. 565-577, Gyanodaya Prakashan, India, 2002. 577 p.
- Paéz, A. y Abraham, Z. Eficiencia de diferentes cepas del género *Glomus* en la adaptación de vitroplantas de *Psidium salutare* (H.B.K.) Berg. En: Resúmenes Seminario Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (11:1998:La Habana), 1998, 215 p.
- Téllez, E. Adaptabilidad de vitroplantas de malanga bajo el efecto de concentrados de hongos micorrizógenos en condiciones de montaña. En: Resúmenes Seminario Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (11:1998:La Habana), 1998, 215 p.

Recibido: 19 de julio de 2002

Aceptado: 14 de mayo de 2003