

EFECTO DEL BIOPREPARADO *RIZOBAC* SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE CAFETO (*Coffea canephora* P. var. Robusta)

María E. González[✉], Mireya Cabrera y Annia Hernández

ABSTRACT. This investigation was developed at the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), with the objective of evaluating the effect of *RIZOBAC* compound on some growth and development indicators in plants from three clones selected of *Coffea canephora* P. Robusta variety. The compound was applied in liquid and solid states at the concentrations of 20 mg.L⁻¹ for 30 min.; then, plants were sprayed at a concentration of 15 mg.L⁻¹ of the compound 20, 35 and 70 days after transplanting. The variables evaluated were plant height (cm), number of leaf pairs, dry matter (g), total proteins, phenol content (mg.g⁻¹ tissue) and survival percentage. Results showed that the compound is more effective in liquid form, and presented differences when answering to all clones evaluated. It demonstrated the feasibility of employing *RIZOBAC* during the adaptation phase as an efficient biofertilizer capable to induce vigorous plants with good physiological state.

Key words: *Coffea canephora*, Robusta coffee, *RIZOBAC*

RESUMEN. Esta investigación se desarrolló en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), con el objetivo de evaluar el efecto del biopreparado *RIZOBAC* sobre algunos indicadores del crecimiento y desarrollo de plántulas provenientes de tres clones seleccionados de *Coffea canephora* P. var. Robusta; el producto se aplicó en los estados sólido y líquido durante 30 minutos de exposición y la dosis del biopreparado utilizada fue de 20 mg.L⁻¹. Las plantas fueron asperjadas con una concentración igual a 15 mg.L⁻¹ del compuesto a los 20, 35 y 70 días de ser liberadas las plantas a condiciones *ex vitro*. Las variables evaluadas fueron altura de la planta (cm), número de pares de hojas, proteínas totales (mg.g⁻¹ de tejido), contenido de fenoles (mg.g⁻¹ de tejido), masa seca (g) y porcentaje de supervivencia. Los resultados mostraron que el biopreparado es más efectivo en estado líquido, que hubo diferencias en la respuesta de los clones evaluados, así como la factibilidad de emplear el *RIZOBAC* durante la fase de adaptación como biofertilizante, potencialmente eficiente, capaz de inducir la formación de plántulas vigorosas y en buen estado fitosanitario.

Palabras clave: *Coffea canephora*, café Robusta, *RIZOBAC*

INTRODUCCIÓN

La producción cafetalera representa una actividad económico-social importante para numerosas naciones de Asia, América Latina y África (1, 2). El éxito de la producción de este cultivo está condicionado, en gran medida, por la calidad de las posturas, ya que estas serán las responsables en el futuro de una mayor o menor producción.

Asimismo, la propagación masiva de plantas depende en gran medida de la capacidad de adaptación del material regenerado a las condiciones naturales del medio ambiente. La habilidad de las plantas para sobrevivir al período de transición del recipiente de cultivo a las condiciones *ex vitro* puede ser una limitante para el uso comercial de estas técnicas (3). A pesar de su reconocida importancia, esta etapa no ha recibido la atención re-

querida, especialmente por fitotecnistas y fisiólogos del cultivo, a fin de lograr un sistema eficiente que responda económicamente a los intereses de los productores.

Para lograr el desarrollo rápido y favorable de las plántulas de café durante esta etapa del crecimiento, es preciso tener presente el manejo de diversos factores como: la correcta selección y el tratamiento del material de plantación, el empleo del sustrato adecuado y la aplicación de microorganismos o compuestos obtenidos a partir de estos, que estimulen el crecimiento y desarrollo de los materiales evaluados (4).

Diversos autores señalan que varios compuestos de origen bacteriano tienen la particularidad de estimular el crecimiento vegetal (5, 6), así como influir significativamente en la adaptación de vitroplantas al medio externo, con altos índices de supervivencia en un corto período de tiempo y a bajos costos (7), dado el efecto sinérgico de varios mecanismos, entre ellos, el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de fitohormonas, el control biológico de fitopatógenos y la fijación de nitrógeno. De aquí que el presente trabajo tiene como objetivo la evaluación del efecto del *RIZOBAC*, biopreparado de origen bacteriano, sobre algunos indicadores del crecimiento y desarrollo de plántulas de café.

Ms.C. María E. González y Ms.C. Annia Hernández, Investigadores Agregados 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; Mireya Cabrera, Investigador Titular del Departamento de Genética, Estación Central de Café y Cacao, III Frente, Santiago de Cuba.

✉ esther@inca.edu.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en los Departamentos de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas y de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado en el municipio de San José de las Lajas, provincia La Habana.

El trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto del *RIZOBAC*, un biopreparado obtenido a partir de metabolitos activos de origen bacteriano, en el cual no se incluyen las células activas y que tiene entre sus componentes hormonas, sideróforos y alcaloides quinilósídnicos de naturaleza antibiótica, en el cultivo de plántulas de café de los clones M-229, K-234 y M-28 de *Coffea canephora* de la Estación Central de Café y Cacao, obtenidas por métodos biotecnológicos; para ello se aplicaron diferentes dosis de este compuesto durante la fase de aclimatización o endurecimiento del material vegetal.

Los tratamientos consistieron en la inmersión del sistema radical de las plantas en el biopreparado en los estados líquido y sólido, por un período de 30 minutos; la dosis utilizada fue de 20 mg.L⁻¹, teniendo en cuenta los resultados alcanzados con esta concentración en estudios precedentes.

En las plantas tratadas también se realizaron aspersiones foliares, teniendo en cuenta los resultados alcanzados en trabajos anteriores en relación con el efecto de la combinación de ambos tratamientos sobre algunos indicadores del crecimiento del cultivo; para ello se utilizó una concentración igual a 15 mg.L⁻¹ del compuesto a los 20, 35 y 70 días de ser liberadas las plantas a condiciones *ex vitro*.

La transferencia de las plántulas del frasco de cultivo a las bolsas de polietileno se efectuó cuando estas contaban con tres a cuatro pares de hojas y un adecuado desarrollo del sistema radical. En todos los casos se emplearon 30 plantas por tratamiento bajo un diseño completamente aleatorizado.

Para la aplicación del sustrato se siguieron las indicaciones recomendadas por el Normativo técnico aplicado al cultivo en los viveros tradicionales (8), modificado en cuanto a la manipulación y atención de las plántulas, dado su origen, particularmente en cuanto a la norma de riego que se incrementó acorde a los niveles de exigencias de las plántulas, así como la regulación gradual de la iluminación a la que fueron sometidas antes de su salida al campo.

A los 90 días de cultivo, se evaluaron en 15 plantas por tratamiento las variables altura de la planta (cm), número de pares de hojas, masa seca aérea (g) y proteínas totales (mg.g⁻¹ de tejido) por el método de Bradford (9); para esto se conformaron cinco muestras (≈0.5 g cada una), a partir de 15 plantas de cada uno de los tratamientos, se maceraron en un mortero con sílice a 0°C, luego se añadió 1 mL de *buffer* tris-125 Mm, pH 6.8, Na Cl-50 Mm y se centrifugó a 3 000 rpm durante 30 minutos. Poste-

riormente se tomó el sobrenadante y se guardó a -20°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad hasta el momento del análisis.

También se determinó el contenido de fenoles (mg.g⁻¹ de tejido) (10). Para ello se conformaron cinco muestras (0.5 g cada una), procedentes de 15 plantas de los tratamientos en estudio, se maceraron y fueron colocadas bajo iluminación por 18 horas; luego se realizó el filtrado y se procedió a la reacción colorimétrica.

Se realizaron evaluaciones visuales respecto al vigor y la coloración de las plántulas, así como se evaluó el porcentaje de supervivencia en 15 plantas por tratamiento, a los 150 días de haberse efectuado el trasplante.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización del biopreparado *RIZOBAC* permitió la estimulación del crecimiento vegetal en los tres clones pertenecientes a la especie en estudio. El hecho de emplear un compuesto con propiedades benéficas, debido a la presencia de elementos importantes en su composición, sobre el desarrollo de materiales de interés agrícola facilita que en las plantas tratadas se logre un incremento significativo para los indicadores evaluados. Estos resultados coinciden con estudios realizados por diversos investigadores en la aplicación de microorganismos o sus derivados en diferentes cultivos de importancia económica (12).

Los niveles obtenidos para la variable altura de la planta difieren significativamente para los clones en estudio, dependiendo de la forma de aplicación del biopreparado (Tabla I).

Tabla I. Comportamiento de algunos indicadores morfológicos durante la aclimatización

| Tratamientos | Altura de la planta (cm) | | | Número de pares de hojas | | |
|------------------------|--------------------------|--------|---------|--------------------------|---------|---------|
| | M-229 | K-234 | M-28 | M-229 | K-234 | M-28 |
| Control | 12.3 c | 12.1 c | 10.40 d | 6.70 b | 6.28 c | 5.41 d |
| Biopreparado líquido | 15.6 a | 15.3 a | 12.5 c | 8.01 a | 7.89 a | 6.59 bc |
| Biopreparado sólido | 14.2 b | 14.3 b | 11.6 c | 6.29 c | 6.30 c | 6.48 bc |
| ES \bar{x} (\pm) | | 0.69** | | | 0.39*** | |

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha=5\%$)

Se observó que el *RIZOBAC* en estado líquido resultó ser más efectivo, permitiendo obtener valores de 15.6 y 15.3 cm de altura de la planta para los clones M-229 y K-234, respectivamente (Tabla I, Figura 1); sin embargo, el valor obtenido en el clon M-28 no supera los 12.5 cm, difiriendo significativamente del comportamiento de los clones anteriores. Aunque el tratamiento con el

biopreparado en estado sólido arrojó resultados inferiores a los obtenidos con el líquido (11.6-14.3 cm), es importante destacar que estos superan en gran medida a los alcanzados con el tratamiento control para cada uno de los clones analizados. Resultados similares han sido informados, al observar que el tratamiento con este biopreparado produce un aumento en la altura de plantas de gladiolo con respecto al control sin inocular (13), lo que se atribuye fundamentalmente a la presencia de hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal, dentro de ellas el ácido indol acético (AIA) (7).

Al comparar los valores obtenidos para los tratamientos en estudio en relación con la variable número de pares de hojas, se observó que en los clones M-229 y K-234 cuando son tratados con el biopreparado en estado líquido se alcanzan los mayores valores, los que difieren estadísticamente del resto de los tratamientos; en este caso es válido destacar la dependencia de la respuesta en relación con la forma de aplicación del compuesto sobre el proceso de formación de nuevos pares de hojas, importante indicador morfológico del desarrollo y crecimiento de las plantas. Asimismo, se evidencia que el clon M-28 no responde con la misma potencialidad al tratamiento con el compuesto en el estado anteriormente referido, a pesar de pertenecer los tres clones a la misma variedad. Efectos similares fueron obtenidos en diferentes clones de café de la var. Robusta al evaluarse esta variable durante la fase de multiplicación *in vitro*, empleando un compuesto de origen bacteriano como sustituto de las auxinas (7).

En tal sentido, se han presentado en cultivares de trigo (*Triticum vulgare*) diferencias notables entre plantas tratadas y no tratadas con este biopreparado para algunas variables estudiadas y relacionadas con el crecimiento vegetal¹.



Figura 1. Comportamiento de plántulas de café (clon M-229), expuestas al tratamiento con RIZOBAC durante 30 minutos: A (control), B (líquido) y C (sólido)

Al analizar los valores de proteínas totales en las plántulas evaluadas (Tabla II), se evidenció un incremento en los tratamientos donde se aplicó el biopreparado en estudio, se alcanzaron valores que oscilaron entre 5.37

y 5.49 mg.g⁻¹ de tejido, los cuales difieren significativamente de los valores obtenidos con el tratamiento control y con el *RIZOBAC* en estado sólido para el clon M-28. Resultados similares han sido alcanzados en otros clones de interés de la variedad Robusta, al evaluar el efecto de la biofertilización (14). Mediante el estudio de las proteínas totales se puede conocer el efecto de la inoculación bacteriana o con compuestos derivados de estos microorganismos sobre la planta. En numerosos estudios se ha observado aumento de este indicador como respuesta a este tipo de tratamiento, lo que a su vez está relacionado con el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

Tabla II. Comportamiento de indicadores morfofisiológicos durante la aclimatización

| Tratamientos | Proteínas totales (mg.g ⁻¹ tejido) | | | Fenoles (mg.g ⁻¹ tejido) | | |
|------------------------|---|--------|--------|-------------------------------------|---------|--------|
| | M-229 | K-234 | M-28 | M-229 | K-234 | M-28 |
| Control | 4.30 b | 3.33 c | 3.28 c | 13.1 b | 12.2 c | 12.0 c |
| Biopreparado líquido | 5.45 a | 5.49 a | 5.37 a | 15.8 a | 14.9 ab | 13.1 b |
| Biopreparado sólido | 5.20 a | 5.27 a | 4.24 b | 7.70 d | 6.51 e | 4.78 f |
| ES \bar{x} (\pm) | | 0.72** | | | 0.82** | |

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha = 5\%$)

El tratamiento de las plántulas con el biopreparado líquido induce altos niveles en el contenido de fenoles, los que oscilan entre 13.1 y 15.8 mg.g⁻¹ de tejido, superando significativamente los resultados obtenidos en las plantas que no fueron tratadas para los clones K-234 y M-28; diversos autores señalan que la expresión de determinados niveles de fenoles se relaciona con la inducción de resistencia en plantas (15). Por otro lado, los resultados muestran una actividad fenólica baja en los tres clones en estudio, cuando se emplea el biopreparado sólido (4.78-7.70 mg.g⁻¹ de tejido), evidenciándose que los valores de fenoles en hojas también varían con la forma de aplicación del biopreparado, siendo en este caso el efecto más marcado, pues para otras variables evaluadas durante el desarrollo de este trabajo, el biopreparado sólido permitió obtener valores que superan al tratamiento control, aunque se diferencian de los índices obtenidos con el producto en su estado líquido. Considerando estos resultados es necesario profundizar en los mecanismos que conllevan a este efecto diferenciado, en dependencia del estado del compuesto, sobre los indicadores relacionados con el desarrollo de las plantas.

Es de destacar que las plantas que fueron tratadas con la inmersión del sistema radical en el biopreparado y asperjadas con dosis de 15 mg.L⁻¹ de *RIZOBAC* mostraron coloración verde intenso, gran vigor y resistencia o tolerancia ante el ataque de fitopatógenos que afectan al cultivo en las primeras etapas de desarrollo, aspecto que ha sido evaluado en otros cultivos por las potencialidades del biopreparado para el control biológico de patógenos; así pudiéramos citar la fusariosis en el gladiolo (*Gladiolus* sp.) (13) y afectaciones provocadas por *P. infestans* en la papa

¹ Hernández, 2001, comunicación personal

(*Solanum tuberosum*), resultados que evidencian la factibilidad del empleo del RIZOBAC, al originar plántulas con un mayor crecimiento y desarrollo, aspecto de significativa importancia, ya que pudiera conllevar a un menor período de aviveramiento.

En relación con la variable masa seca, se apreció en todos los clones una respuesta positiva a la aplicación de RIZOBAC en las plantas, con un comportamiento superior de los tratamientos tanto líquido como sólido en relación con el tratamiento control (Tabla III), demostrándose que en ausencia de la inoculación con el biopreparado no ocurre un aumento significativo de los niveles de masa seca, siendo de gran utilidad el efecto estimulador de este producto para garantizar un adecuado grado de crecimiento y desarrollo en las plántulas. Estos resultados son similares a informes realizados para el cultivo del café al emplear microorganismos rizosféricos en el cultivo de posturas pertenecientes a diferentes variedades.

Tabla III. Efecto del biopreparado en dos de los indicadores analizados

| Tratamientos | Masa seca (g) | | | Supervivencia (%) | | |
|------------------------|---------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|
| | M-229 | K-234 | M-28 | M-229 | K-234 | M-28 |
| Control | 3.88 b | 2.11 c | 2.16 c | 93.1 c | 92.2 d | 92.0 d |
| Biopreparado líquido | 4.49 a | 4.48 a | 4.21 a | 95.3 b | 96.9 a | 93.1 c |
| Biopreparado sólido | 4.15 a | 4.12 a | 4.05 a | 97.7 a | 96.5 a | 94.7 b |
| ES \bar{x} (\pm) | 0.27** | | | 0.40** | | |

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha=5\%$)

Como se observa en la Tabla III, la supervivencia fue superior al 92.0 %, obteniéndose valores que alcanzan el 96 %, lo que nos permite corroborar que la aclimatización, siempre que se cumplan los requisitos para su transferencia *ex vitro*, garantiza un desarrollo vertiginoso tanto del área foliar como del sistema radical de la planta, lo que propicia un nivel de crecimiento favorable para las etapas posteriores. Estos resultados coinciden con los criterios generales sobre la eficiencia del tratamiento de las vitroplantas durante la fase de adaptación, con sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y que ofrezcan bioprotección ante el ataque de diferentes plagas y enfermedades de importancia en el cultivo tipo (3, 4).

El uso indiscriminado de los productos químicos es una de las principales causas de los grandes trastornos ecológicos en los agroecosistemas, y por ello en los últimos años se ha incrementado el interés en el campo de la microbiología del suelo (16). En tal sentido, el efecto beneficioso del tratamiento con biopreparados de origen bacteriano ha sido corroborado en diferentes estados y utilizando diversas formas de aplicación, sobre los índices morfofisiológicos de las plántulas de café, apreciándose un mayor crecimiento y porcentaje de supervivencia en las plantas tratadas al ser comparadas con los controles.

REFERENCIAS

1. FAO. Boletín Trimestral de Estadísticas. 1997. no. 10. p. 126.
2. Anthony, F.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Charrier, A. La Biologie Moléculaire en appui a l' amélioration génétique du caféier Arabica. *Plantations, Recherche, Développement*, 1997, vol. 4, no. 6, p. 369.
3. Etienne, H.; Solano, W.; Pereira, A.; Bertrand, B. y Berthouly, M. Protocole d' acclimatation de plantules de cafés *in vitro*. *Plantation, Recherche, Développement*, 1997, vol. 4, no. 5, p. 304-311.
4. Ramírez, D.; Jiménez, F.; Agramonte, D.; Gutiérrez, O. y Pérez, M. Acción de microorganismos bioestimuladores en la aclimatización de vitroplantas. En: Resúmenes Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. (5:1999). 1999.
5. Bashan, Y. y Holguín, G. *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 1997, vol. 43, p. 103-121.
6. Fallik, E. y Okon, Y. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil. Biol. Biochem.*, 1996, vol. 28, p. 123-126.
7. González, M. E.; Santana, N.; Hernández, A. y Santander, J. L. Use of the bacterial compound BC-1 in the micropropagation of *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 21-24.
8. Cuba. Ministerio de la Agricultura. Instrucciones técnicas para el cultivo del café y el cacao. La Habana: CIDA. 1987, 208 p.
9. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 12, p. 248-254.
10. Palazón, Z. Variaciones en el contenido fenólico en plantas de maíz biofertilizadas y obtención de un antisuero anti- AIA. [Trabajo de Diploma], Facultad de Biología, 1991.
11. INCA. START: Sistema Automático para Análisis Estadístico, (Versión 4.10, 1998) INCA (Diskette. 1998).
12. Velázquez, M. Estudio de la interacción maíz-*B. cepacia*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1999. vol. 41, no. 1, p. 17-25.
13. Toledo, Y. Aplicación de un biopreparado de origen bacteriano en beneficio del cultivo del gladiolo (*Gladiolus sp.*). [Trabajo de Diploma], Facultad de Biología, 2001. 54 p.
14. González, M. E.; Cabrera, M.; Hernández, A.; Valcárcel, M. y López, C. Biofertilización de vitroplantas de *Coffea canephora* P. var. Robusta con el uso del biopreparado CB-1 y dos cepas de hongos micorrizógenos arbusculares. En: Resúmenes Encuentro de Agricultura Orgánica. (4:2001), 2001.
15. Ortiz, S. Estudios de las condiciones de crecimiento de *Burkholderia cepacia* 0057 para la producción de sideróforos. [Trabajo de Maestría]. Universidad de La Habana. 2001. 66 p.
16. Bashan, Y.; Holguín, G. y Ferrera-Cerrato, R. Interacciones plantas y microorganismos benéficos. I *Azospirillum TERRA*, 1996, vol. 14, no. 2, p. 159-195.

Recibido: 2 de julio del 2001

Aceptado: 17 de diciembre del 2001