

Artículo original

Influencia de un sistema de abonado orgánico y *Azotobacter chroococcum* sobre posturas de cocotero

Karen Alvarado-Ruffo¹

Albaro Blanco-Imbert²

Gloria M. Martín-Alonso³

Yoania Ríos-Rocafull⁴

Ramón Capdesuñer-Rojas⁵

Keyler Matos-Thompson¹

Blanca M. de la Noval-Pons^{3*}

¹Centro de Desarrollo de la Montaña, Luz Caballero esquina 2 Sur, Guantánamo, Cuba

²Instituto de Suelos, Guantánamo, Cuba

³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

⁴Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), calle 2 y 1, No. 17200, Santiago de Las Vegas, La Habana, Cuba

⁵Empresa Agropecuaria y Coco Baracoa, Guantánamo, Cuba

*Autor para correspondencia. bdelanov@inca.edu.cu

RESUMEN

En el municipio Baracoa, de la provincia Guantánamo, los viveros de cocotero son afectados por los bajos índices de germinación y el poco vigor de las posturas. El humus de lombriz y las bacterias del género *Azotobacter* se han empleado en la producción de posturas, ya que promueven el crecimiento vegetal. En la investigación se estudió, en un diseño en bloques al azar, la combinación de tres niveles del sustrato S:HL:FC (10:1:1), (4:1:1), (2:1:1) con la inoculación de tres cepas de *A. chroococcum* (INIFAT-8, CDM-1, CDM-2) sobre la obtención de posturas de cocotero, pertenecientes al ecotipo domesticado “Indio Verde-1” en dos suelos, Arenosol háplico (ARh) y Gleysol Flúvico, háplico (GFLh). Como indicadores de desarrollo se evaluaron el índice de velocidad de

germinación de las semillas, la altura del vástago (cm), el diámetro en la base del vástago (cm) y la población de *Azotobacter* (UFC g⁻¹ de suelo). Se demostró que es posible disminuir los niveles de abonado orgánico empleados en un 50 %, mediante la inoculación de cepas de *A. chroococcum* aisladas de los suelos en estudio. La combinación suelo: humus de lombriz: fibra de Coco (S:HL:FC) (4:1:1) con *A. chroococcum* CDM-1 en el suelo ARh y *A. chroococcum* CDM-2 en el suelo GFLh favorecieron el incremento de las variables estudiadas, las que alcanzaron niveles superiores a los obtenidos con la dosis recomendada de fertilización mineral y el abonado orgánico.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, viveros, rizobacterias, suelo

Recibido: 09/07/2018

Aceptado: 09/10/2018

INTRODUCCIÓN

La palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un cultivo tropical perenne de gran utilidad, que crece en alrededor de 80 países. En Cuba, el cultivo ocupa aproximadamente 13 186 ha, con un rendimiento promedio de 4,5 t ha⁻¹ ⁽¹⁾, siendo de gran importancia la producción de posturas que garanticen el material necesario para la renovación y el fomento de nuevas áreas. Un estudio diagnóstico llevado a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña de la provincia Guantánamo mostró que en los viveros se obtienen bajos índices de germinación, así como posturas poco vigorosas que provocan alta mortalidad de las mismas, al ser trasladadas al campo. Esto pudiera estar asociado a diferentes factores como el empleo de semillas con embriones inmaduros, unido a factores limitantes de los suelos como aireación, retención de humedad y baja fertilidad ⁽²⁾.

El empleo de un sistema de abonado orgánico que tenga en cuenta el uso del humus de lombriz, combinado con biofertilizantes permitiría asegurar condiciones favorables para la germinación y posterior crecimiento de las plantas ⁽³⁾. Se conoce que la adición del humus de lombriz a los suelos y a los sustratos, incrementa considerablemente el crecimiento y la productividad de una gran cantidad de cultivos, mediante la mejora significativa en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los mismos ⁽⁴⁾.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) constituyen uno de los biofertilizantes de amplio uso por los mecanismos directos e indirectos de promoción del

crecimiento ^(5,6); siendo, *Azotobacter chroococcum* uno de los géneros bacterianos fijadores de nitrógeno, más empleados ^(7,8). El empleo de esta especie permite el acortamiento del período de permanencia de las plantas en los semilleros y favorece el incremento en los parámetros morfológicos de las plantas ⁽⁹⁾, lo que las convierte en una alternativa a evaluar en el crecimiento de las posturas de cocotero. En Cuba, desde 1990, se desarrolla un programa de producción y aplicación de *A. chroococcum* con cepas seleccionadas, dentro de las cuales se destaca la cepa INIFAT-8 ⁽¹⁰⁾. La presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar la influencia de un sistema de abonado orgánico e inoculación de *A. chroococcum* sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las posturas de cocotero en un vivero convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en los viveros “Playa Duaba” y “Cabacú”, ubicados en el municipio Baracoa, provincia Guantánamo, sobre los suelos Arenosol háplico (ARh) y Gleysol Flúvico háplico (GFLh), respectivamente ⁽¹¹⁾. El experimento se repitió durante dos años consecutivos, en el cual se estudiaron las combinaciones de tres niveles del sustrato Suelo: Humus de lombriz: Fibra de Coco (S:HL:FC) (10:1:1, 4:1:1, 2:1:1, v/v/v) ⁽¹²⁾ con tres cepas de *A. chroococcum* (CDM-1, CDM-2 e INIFAT-8).

Las cepas de *A. chroococcum*, procedieron de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). Las cepas CDM-1 y CDM-2, fueron aisladas de los suelos presentes en los viveros “Playa Duaba” y “Cabacú”, respectivamente. Los bioproductos confeccionados poseían una concentración de 9×10^{10} UFC por g de soporte ⁽¹³⁾ y se aplicaron por aspersión directa al suelo y la semilla a una dosis de 1 kg ha^{-1} ⁽¹⁴⁾.

Se utilizaron, adicionalmente, tres controles constituidos por fertilización mineral (NPK 100 %) para lo que se empleó la fórmula completa 9:13:17 a razón de 45 g por semilla fraccionado al 33 % a los 30 días posteriores a la siembra (dps) y el resto a los 90 dps ⁽¹⁵⁾, el sustrato S:H:FC 1:1:1 v/v/v y el suelo. En todos los casos para la elaboración del sustrato se utilizó el suelo presente en el vivero.

Las semillas fueron obtenidas de plantas madres sanas, pertenecientes al ecotipo domesticado de cocotero “Indio Verde-1” ⁽¹⁶⁾. Se empleó un diseño en bloques al azar con arreglo bifactorial (3x3) y tres réplicas. Cada parcela experimental dentro del bloque contenía 20 semillas, sembradas a una distancia de 0,05 x 0,20 m.

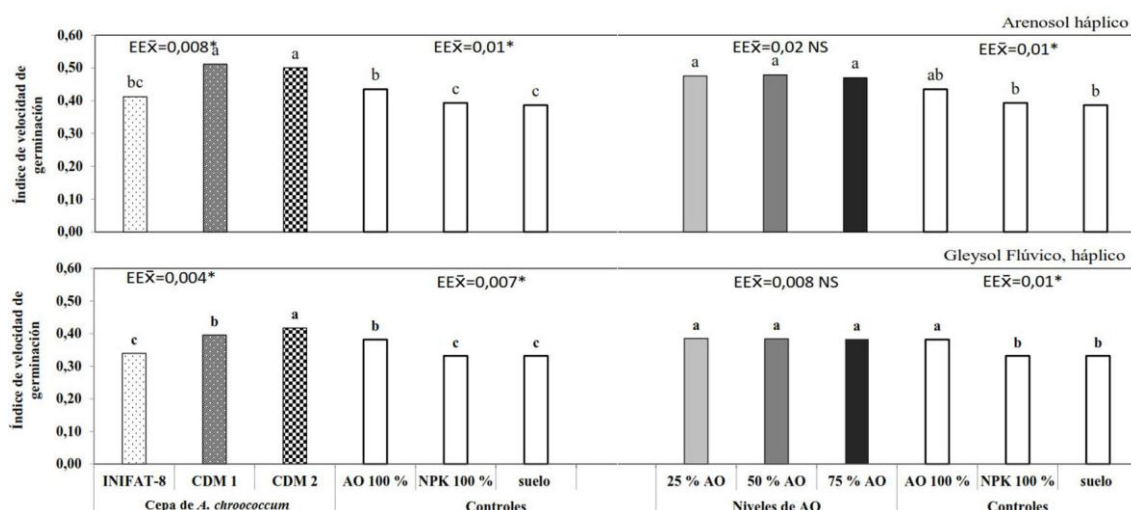
El experimento tuvo una duración de 180 días. A los 120 dps se calculó el índice de velocidad de germinación (IVG) mediante la fórmula $IVG = \sum(n_i / t_i)$ ⁽¹⁷⁾, donde n es el número de semillas germinadas y el intervalo de tiempo en que germinaron las semillas. Se evaluaron las semillas germinadas en los tiempos 30, 60, 90 y 120 días. A los 180 dps se muestrearon 15 plantas por réplica y se evaluó la altura del vástago (cm) y el diámetro en la base del vástago (cm) ⁽¹⁸⁾. Se realizó, además, el conteo de poblaciones de *A. chroococcum* en la rizosfera ⁽¹⁹⁾.

Los datos de la variable conteo de poblaciones de *A. chroococcum* en la rizosfera se transformaron por la fórmula $\log(x)$. Los resultados para todas las variables evaluadas mostraron un comportamiento similar en los dos años estudiados, por lo que se analizaron los datos correspondientes a la media de los dos años. Para el procesamiento estadístico de los tratamientos se utilizó el Análisis de Varianza factorial y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$). Para comparar los controles con cada uno de los tratamientos se realizó un ANOVA de clasificación doble, se determinó el EE, con el cual se calculó el intervalo de confianza (IC) para los controles con un nivel de significación del 95 % y se verificó si las medias de cada tratamiento estaban contenidas dentro del intervalo de confianza. Se empleó el paquete estadístico STATGRAPHIC versión 15.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis realizado mostró interacción de los factores en los dos suelos en estudio, para todas las variables evaluadas, excepto para el IVG. No se encontró efecto de los niveles de abono orgánico sobre el IVG, no siendo así para el factor cepas de *A. chroococcum*, el cual sí tuvo significación.

Se observó que en el suelo ARh las cepas aisladas de los suelos estudiados (CDM-1 y CDM-2) no mostraron diferencias entre sí y fueron superiores a la cepa INIFAT-8 y a los controles, con valores promedios entre 0,50 y 0,52, mientras que en el suelo GFLh los mejores valores correspondieron a la cepa CDM-2, con un valor de 0,42 (Figura 1). En los tratamientos inoculados con ambas cepas no se observó diferencias significativas entre los tres niveles de los abonos orgánicos y el control S:HL:FC (1:1:1).



No se encontró interacción entre los factores para ANOVA factorial. Medias con letras distintas para el mismo suelo difieren entre sí, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) realizada para la comparación de los tratamientos con los controles

IVG: índice de velocidad de germinación, EE \bar{x} : Error Estándar de la media

Figura 1. Índice de velocidad de germinación de semillas de cocotero ecotipo Indio Verde-1 hasta los 120 días posteriores a la siembra, sometidas a los tratamientos combinados de tres cepas de *A. chroococcum* y tres niveles de abono orgánico sobre los suelos Arenosol háplico y Gleysol Flúvico

Con respecto al control S:HL:FC (1:1:1), en el suelo ARh, el tratamiento donde se empleó la cepa CDM-1 con S:H:FC (4:1:1), mostró una reducción en cuatro días el inicio de la germinación, mientras en el suelo GFL, disminuyó en 12,8 días (datos no mostrados).

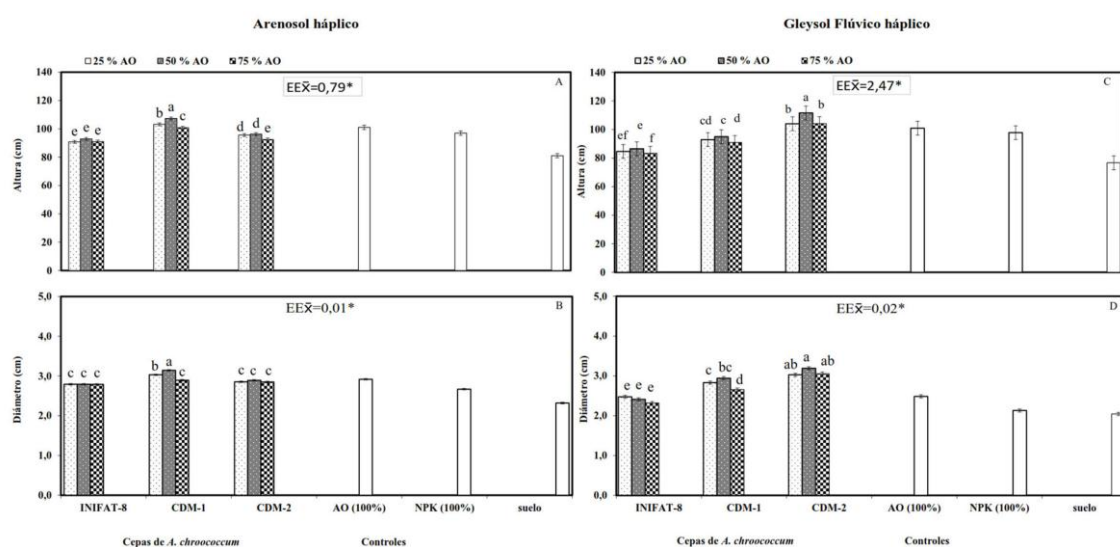
En la variable altura del vástago, el mejor comportamiento en el suelo ARh se observó, cuando se empleó la cepa CDM-1 con S:HL:FC (4:1:1), la cual difirió de los restantes tratamientos y de los controles de referencia (Figura 2A). De forma general, las variantes donde se inocularon las cepas de *A. chroococcum* combinadas con los tres niveles de los abonos orgánicos, resultaron superiores cuando fueron comparadas con el control suelo.

Al analizar los resultados en el suelo GFLh se encontró, que al combinarse *A. chroococcum* con los tres niveles de abono orgánico, la cepa CDM-2 influyó en la obtención de los mejores valores para la altura en la base del vástago (Figura 2C), seguida por CDM-1 y por INIFAT-8, con la cual se obtuvieron los valores más bajos. La cepa CDM-2, combinada con S:HL:FC (4:1:1), favoreció la mejor respuesta para esta variable, con diferencia del resto de los tratamientos y de los controles.

El análisis del diámetro en la base del vástago en el suelo ARh, mostró los mejores resultados al combinarse la cepa CDM-1 y S:HL:FC (4:1:1), con diferencia de los restantes tratamientos y los controles. Por otra parte, los tratamientos donde se empleó

CDM-2 con los tres niveles de abono orgánico, mostraron similitud al compararse con los tratamientos inoculados con la cepa INIFAT-8. Se obtuvo, además, que estas últimas variantes mencionadas mostraron similitud con el control S:HL:FC (1:1:1) y diferencias con los controles NPK 100 % y el suelo (Figura 2B).

Para los tratamientos realizados con el suelo GFLh (Figura 2D) los mejores resultados se obtuvieron, con la combinación de la cepa CDM-2 y los tres niveles de abono orgánico, los que mostraron diferencias con los controles.



Medias con letras distintas para el mismo suelo difieren entre sí, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) para los tratamientos factoriales. Líneas verticales sobre las barras indican los intervalos de confianza de sus medias para la comparación de los tratamientos con los controles

AO: abono orgánico, EE \bar{X} : Error Estándar de la media

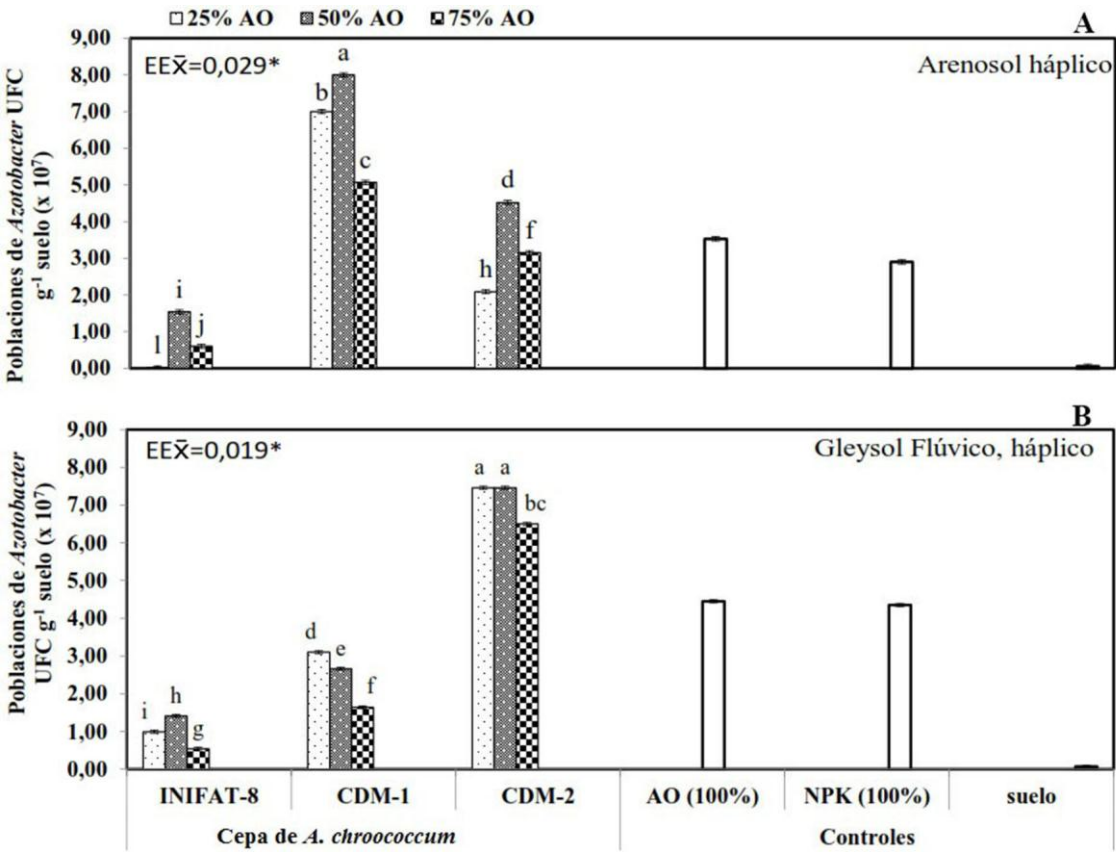
Figura 2. Altura y diámetro en la base del vástago a los 180 días posteriores a la siembra de plantas de cocotero ecotipo Indio Verde-1, sometidas a los tratamientos combinados de tres cepas de *A. chroococcum* y tres niveles de abono orgánico sobre los suelos Arenosol háplico y Gleysol Flúvico, háplico

En el análisis de la cuantificación de las poblaciones de *Azotobacter* en el suelo ARh (Figura 3A), los mejores resultados se encontraron en el tratamiento donde se combinó la cepa *A. chroococcum* CDM-1 y S:HL:FC (4:1:1) con diferencias significativas, respecto a los restantes tratamientos y los controles. Por otro lado, en las variantes donde se utilizó el suelo GFLh en la preparación del sustrato, el conteo de las poblaciones de *Azotobacter* en la rizosfera (Figura 3B), mostró las mejores respuestas con la inoculación de la cepa *A. chroococcum* CDM-2, combinada con los niveles de S:HL:FC 10:1:1 y 4:1:1, con

diferencias significativas del resto de los tratamientos y los controles. En ambos suelos los más bajos niveles se alcanzaron con la cepa INIFAT-8 y el control suelo.

La falta de respuesta en el tratamiento conformado por el suelo sin aplicación de *Azotobacter*, posiblemente esté relacionada con los factores limitantes de estos suelos, así como con las bajas poblaciones de *Azotobacter* presentes en los mismos.

Los bajos porcentajes de retención de humedad en el suelo Arenosol háplico pudo dificultar el flujo de masas y la difusión de nutrientes, limitando la absorción de nutrimentos por la planta ⁽²⁰⁾. Por otro lado, la disminución de los niveles de oxígeno en el suelo GLFh debido a sus propiedades gléyicas ⁽¹¹⁾, pudo haber impedido el normal desarrollo de las raíces, y con ello, una baja absorción de agua y nutrimentos. Estas propiedades pudieron haber sido mejoradas con el empleo del abonado orgánico, ya que el mismo permite la formación de agregados del suelo, los cuales mejoran el balance entre macros y microporos y, con ello, la retención de agua, además del incremento de los niveles materia orgánica y el estado de fertilidad del suelo ⁽²¹⁾.



Medias con letras distintas para el mismo suelo difieren entre sí, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) para los tratamientos factoriales. Líneas verticales sobre las barras indican los intervalos de confianza de sus medias para la comparación de los tratamientos con los controles

AO: abono orgánico, EE \bar{X} : Error Estándar de la media

Figura 3. Cuantificación a los 180 días posteriores a la siembra de las poblaciones de *Azotobacter* en la rizosfera de posturas de cocotero ecotipo Indio Verde-1 sometidas a los tratamientos combinados de tres cepas de *A. chroococcum* y tres niveles de abono orgánico sobre los suelos Arenosol háplico y Gleysol Flúvico, háplico

Los estudios presentados proporcionan evidencia de que las cepas de *Azotobacter* empleadas respondieron con más efectividad en los suelos de los cuales fueron aisladas. Se encontró la mejor respuesta con el empleo de S:HL:FC (4:1:1) al combinarse con la cepa CDM-1 en el ARh y con la cepa CDM-2 en el GFLh, lo que posibilita disminuir los niveles de abonado orgánico empleados en un 50 %, mediante el empleo de esta rizobacteria.

Se ha encontrado que a las concentraciones de estas bacterias presentes en los suelos cubanos (10^4 - 10^5 UFC g⁻¹ de suelo rizosférico), es difícil observar respuestas en el crecimiento de las plantas, por lo que la inoculación de las mismas permite incrementar los niveles existentes (hasta 10^9 UFC g⁻¹ de suelo rizosférico) favoreciendo una respuesta positiva de los cultivos ⁽¹³⁾.

Las cepas autóctonas, al estar mejor adaptadas a las condiciones estudiadas, fueron capaces de funcionar con mayor rapidez y efectividad que la cepa INIFAT-8, la que al parecer, pudo encontrar en estos suelos antagonismo con las poblaciones microbianas residentes. Se plantea que cuando se inoculan bacterias de vida libre, la variabilidad en las respuestas encontradas está sujeta a diferentes condiciones, entre las que se encuentran, la presencia de las comunidades microbianas residentes de la rizosfera, con las que se establecen interrelaciones de sinergismo y antagonismo ⁽²²⁾.

La respuesta observada para los diferentes niveles de abonado orgánico estuvo dada por el hecho de que al ser *Azotobacter* una bacteria heterótrofa, utiliza varias fuentes orgánicas de energía, que incluyen hemicelulosa, almidón, azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, que provienen de la materia orgánica presente en los suelos ⁽²³⁾, sin embargo, las actividades de este grupo bacteriano, en su relación con la planta, se verán favorecidas por los bajos niveles de nitrógeno en el suelo, a los cuales les favorece la fijación de este elemento. Por otra parte, su efectividad disminuye en la medida que los suelos tienen mayor contenido de materia orgánica. Cuando se aplica biofertilizante se debe fertilizar con enmiendas orgánicas, para evitar el empobrecimiento del suelo ⁽¹⁵⁾.

Los resultados positivos observados en la estimulación de la germinación de las semillas y en el crecimiento de las posturas de cocotero, pudieran estar asociados a la forma de

aplicación del inóculo de este biofertilizante. El mismo se aplicó por aspersión directa a la semilla en el momento de la siembra, lo que pudo favorecer la hidratación del mesocarpo y endocarpo y, de esta forma, lograr que se alcanzara con mayor rapidez la humedad óptima para que el embrión iniciara la germinación.

Este efecto, unido a la capacidad que tienen estas bacterias de producir sustancias reguladoras del crecimiento ^(24,25), propició que las mismas, al penetrar la corteza seminal, aceleraran la germinación y el desarrollo radicular. En el genoma de algunas cepas de rizobacterias aisladas de la rizosfera del cocotero, ha sido identificado el gen H_2S , el cual está involucrado en la síntesis de sulfito de hidrógeno, compuesto vinculado con el incremento de la germinación de semillas ⁽²⁶⁾.

Otro de los mecanismos propuestos, mediante el cual el *Azotobacter* pudo haber promovido el crecimiento vegetal, es la producción de la enzima ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa), la cual, además de prevenir la ocurrencia de enfermedades ⁽²⁷⁾, puede facilitar el crecimiento vegetal y favorecer el inicio del crecimiento del embrión, unido a la síntesis de ácido indol acético (AIA) y la regulación de los niveles de etileno ⁽²⁴⁾.

Diferentes autores sugieren la importancia del etileno en el proceso de germinación ^(26,28-30), en la disminución de la dormancia y la emisión de la radícula en diferentes especies ⁽²⁸⁻³⁰⁾. La producción de etileno comienza inmediatamente después de la imbibición y se incrementa con el tiempo durante la germinación ⁽²²⁾.

En cepas de rizobacterias aisladas del cultivo del coco, se ha demostrado que la producción de AIA, ácido giberélico, amonio, sideróforos, proteasas, catalasas, celulasas, la solubilización de los fosfatos ⁽²⁹⁾, la fijación de N_2 ⁽³¹⁾ así como la protección ante diferentes estrés bióticos ⁽³²⁻³⁵⁾ y abióticos ^(36,37) son los mecanismos mediante los cuales estas bacterias promueven el crecimiento vegetal, lo que las sitúa como potenciales para la producción de bioinoculantes en el manejo orgánico de este cultivo ^(26,30).

CONCLUSIONES

- Se demostró que es posible disminuir los niveles de abonado orgánico empleados en un 50 %, mediante la inoculación de cepas de *Azotobacter chroococcum* aisladas de los suelos en estudio.

- La combinación Suelo:Humus de lombriz:Fibra de Coco (S:HL:FC) (4:1:1) con *A. chroococcum* CDM-1 en el suelo ARh y *A. chroococcum* CDM-2 en el suelo GFLh, favorecieron el incremento de las variables estudiadas, las que alcanzaron niveles superiores a los obtenidos con la dosis recomendada de fertilización mineral y el abonado orgánico.

BIBLIOGRAFÍA

1. FAOSTAT. Agricultural data [Internet]. FAO, Roma; 2018 Sep. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
2. Blanco AI. Influencia de las características de la semilla, el riego y la fertilización orgánica en la calidad de las posturas de cocotero (*Cocos nucifera* L.). [Tesis de Maestría]. [Granma]: Universidad de Granma; 2007. 87 p.
3. Lok S, Suárez Y. Efecto de la aplicación de fertilizantes en la producción de biomasa de Moringa oleifera y en algunos indicadores del suelo durante el establecimiento. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 2014;48(4):399-403.
4. Broz AP, Verma PO, Appel C. Nitrogen dynamics of vermicompost use in sustainable agriculture. Journal of Soil Science and Environmental Management [Internet]. 2016;7(11):173–83. doi:10.5897/JSSEM2016.0587
5. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. Molecules. 2016;21(5):573. doi:10.3390/molecules21050573
6. Himaman W, Thamchaipenet A, Pathom-aree W, Duangmal K. Actinomycetes from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. Microbiological Research. 2016;188–189:42–52. doi:10.1016/j.micres.2016.04.011
7. Romero-Perdomo F, Abril J, Camelo M, Moreno-Galván A, Pastrana I, Rojas-Tapias D, et al. Azotobacter chroococcum as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. Revista Argentina de Microbiología. 2017;49(4):377–83. doi:10.1016/j.ram.2017.04.006
8. Beltrán ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2014;15(1):101–13.

9. León Y, Hernández JM, Rodríguez N, Martínez R. Aplicación de *Azotobacter chroococcum* en la producción de plántulas de tabaco negro. *Cultivos Tropicales*. 2012;33(2):29–32.
10. Martínez VR, Dibut AB. Biofertilizantes bacterianos. La Habana, Cuba: Científico Técnica; 2012. 279 p.
11. Hernández A, Pérez J, Bosch D, Castro N. Clasificación de los suelos de Cuba. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA; 2015. 93 p.
12. MINAG, ACTAF, IIFT. Instructivo técnico para el cultivo del coco [Internet]. 1st ed. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT); 2011. 15 p. Available from: http://www.actaf.co.cu/index.php?option=com_mtree&task=att_download&link_id=501&cf_id=24
13. Martínez VR, Dibut B. Practical applications of bacterial biofertilizers and bioestimulators. In: *Biological approaches to sustainable soil systems* [Internet]. New York: CRC/Taylor & Francis; 2006 [cited 07/01/2019 Jan 7]. p. 467–77. Available from: https://books.google.com.cu/books?id=lgbOBQAAQBAJ&pg=PA475&lpg=PA475&dq=Practical+applications+of+bacterial+biofertilizers+and+biostimulators&source=bl&ots=iIxnJ4st_&sig=fXJukP382VM6Jz3AhHIN9AlNmaE&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjfzJG_j9zfAhVBiFkKHSfOCWMQ6AEwAXoE
14. Dibut B. Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria; 2009. 113 p.
15. Ohler JG. Modern coconut management: palm cultivation and products [Internet]. London, England: Intermediate Technology Pub.; 1999. 458 p. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2000391409>
16. Alonso M, Cueto JR, Santos Y, Romero W, LLauger R, Rohde W. Variabilidad morfológica y molecular de una población de cocoteros verdes en la región de Baracoa. *Cultivos Tropicales*. 2007;28(3):69–75.
17. Valfré-Giorello T, Ashworth L, Renison D. Patrones de germinación de semillas de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae), árbol nativo del Chaco Serrano de interés en restauración. *Ecología austral*. 2012;22(2):92–100.
18. Peries R, Everard J. River sand as an alternative to top soil for raising coconut seedlings in polybags. *COCOS*. 1993;9:40–6.

19. Aquilanti L, Favilli F, Clementi F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*. 2004;36(9):1475–83. doi:10.1016/J.SOILBIO.2004.04.024
20. Borda-Molina D, Pardo-García JM, Montaña-Lara, José Salvador; Martínez-Salgado MM. Influencia de la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana* B. *Universitas Scientiarum*. 2011;16(3):282–93.
21. Duartel L, Horst C, Manfio CE, Yoshimitsu S, Prieto HE, Bruckner CH, et al. Substrate, lime, phosphorus and top dress fertilization in macaw palm seedling production. *Revista Árvore*. 2016;40(2):235–44. doi:10.1590/0100-67622016000200006
22. Valery A, Reyes I. Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad HIMECA-95. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2013;15(2):81–8.
23. Rodriguez M, Rivas F. Dinámica poblacional de *Azotobacter* spp., en relación al contenido de materia orgánica en una plantación de *E. grandis* Hill - Purumayo, Oxapampa – Pasco. *Ambiente*. 2017;1(1–2):38–47.
24. Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 2014;169(1):30–9. doi:10.1016/J.MICRES.2013.09.009
25. Hussain A, Srinivas P. Evaluation of plant growth promoting traits by *Pseudomonas* and *Azotobacter* isolated from Rhizotic Soils of two selected agroforestry tree species of Godavari Belt Region , India . 2013;4(3):431–6.
26. Gupta A, Gopal M, Thomas G V., Manikandan V, Gajewski J, Thomas G, et al. Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. Pellegrini M, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(8):1–14. doi:10.1371/journal.pone.0104259
27. García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*. 2015 2(3):183–205. doi:10.3934/bioeng.2015.3.183
28. El-Maarouf-Bouteau H, Sajjad Y, Bazin J, Langlade N, Cristescu SM, Balzergue S, et al. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant, Cell & Environment*. 2015;38(2):364–74. doi:10.1111/pce.12371
29. Ortega M, Shagarodsky T, Dibut B, Ríos Y, Tejeda G, Gómez L. Influencia de la interacción entre el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y la inoculación con cepas seleccionadas de *Mesorhizobium* spp. *Cultivos Tropicales*. 2016 [;37:20–7.

30. Sakthivel K, Subramani T, Manigundan K, Velmurugan A, Gautam RK. Characterization of coconut rhizobacteria for plant growth promoting traits. Journal Andaman Sciences Association. 2015;20(2):136–40.
31. Sahoo RK, Ansari MW, Dangar TK, Mohanty S, Tuteja N. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. Protoplasma. 2014;251(3):511–23. doi:10.1007/s00709-013-0547-2
32. Villa JA, Ray EE, Barney BM. *Azotobacter vinelandii* siderophore can provide nitrogen to support the culture of the green algae *Neochloris oleoabundans* and *Scenedesmus* sp. BA032. FEMS Microbiology Letters. 2014;351(1):70–7. doi:10.1111/1574-6968.12347
33. Khaitov B, Patiño-Ruiz JD, Pina T, Schausberger P. Interrelated effects of mycorrhiza and free-living nitrogen fixers cascade up to aboveground herbivores. Ecology and Evolution. 2015;5(17):3756–68. doi:10.1002/ece3.1654
34. Chennappa G, Naik M, Adkar-Purushothama C, Amaresh Y, Sreenivasa M. PGP potential, abiotic stress tolerance and antifungal activity of *Azotobacter* strains isolated from paddy soils. Indian Journal of Experimental Biology. 2016;54(5):322–31.
35. Baars O, Zhang X, Gibson MI, Stone AT, Morel FMM, Seyedsayamdost MR. Crochelins: Siderophores with an Unprecedented Iron-Chelating Moiety from the Nitrogen-Fixing Bacterium *Azotobacter chroococcum*. Angewandte Chemie. 2018;130(2):545–50. doi:10.1002/ange.201709720
36. Omer A, Emara H, Zaghloul R, Abdel M, Dawwam G. Potential of *Azotobacter salinestris* as plant growth promoting rhizobacteria under saline stress conditions. Research Journal Of Pharmaceutical Biological And Chemical Sciences. 2016;7(6):2572–83.
37. Rizvi A, Khan MS. Heavy metal induced oxidative damage and root morphology alterations of maize (*Zea mays* L.) plants and stress mitigation by metal tolerant nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018;157:9–20. doi:10.1016/J.ECOENV.2018.03.063

Influence of the organic matter system and *Azotobacter chroococcum* over seedlings of coconut

Karen Alvarado-Ruffo¹

Albaro Blanco-Imbert²

Gloria M. Martín-Alonso³

Yoania Ríos-Rocafull⁴

Ramón Capdesuñer-Rojas⁵

Keyler Matos-Thompson¹

Blanca M. de la Noval-Pons^{3*}

¹Centro de Desarrollo de la Montaña, Luz Caballero esquina 2 Sur, Guantánamo, Cuba

²Instituto de Suelos, Guantánamo, Cuba

³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

⁴Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), calle 2 y 1, No. 17200, Santiago de Las Vegas, La Habana, Cuba

⁵Empresa Agropecuaria y Coco Baracoa, Guantánamo, Cuba

*Author for correspondence. bdelanov@inca.edu.cu

ABSTRACT

In Baracoa, municipality of the Guantánamo province the coconut seedling nurseries are being affected by the index low of germination and the little vigor of the seedling. The worm casting and the bacteria of the genus *Azotobacter* has been of those more employees in the seedling production, since promote the vegetable growth. The investigation over Randomized Block Design the combination of three levels of the substrates S:HL:FC (10:1:1), (4:1:1), (2:1:1) was studied with the inoculation of three strain of *A. chroococcum* (INIFAT-8, CDM-1, CDM-2) on the obtaining of seedling coconut belonging to the domesticated ecotipo "Indio Verde-1" in two soil, Haplic Arenosol (ARh) and Haplic Fluvic Gleysol (GFLh). As development indicators they were evaluated the index of speed germination of the seeds, the plant height (cm), the diameter in the

stem base (cm) and the population of *Azotobacter* (UFC g⁻¹ of soil). The possibility to diminish the organic matter levels employed in 50 % by means of the inoculation of strain of *A. chroococcum* isolated of the soil in study was demonstrated. The combination soil: worm casting: fiber of Coconut (S:HL:FC) (4:1:1) with *A. chroococcum* CDM-1 in the soil ARh and *A. chroococcum* CDM-2 in the soil GFLh favored the increment of the studied variables, those that reached superior levels to which obtain higher levels to the recommended dose of mineral fertilization and to the organic matter.

Key words: *Cocos nucifera*, nursery, rhizobacteria, soil

Received: 09/07/2018

Accepted: 09/10/2018

INTRODUCTION

Coconut palm *nucifera* L is a perennial tropical crop of great uses, it grows in around 80 countries. In Cuba, the crop occupies approximately 13 186 ha with an average yield of 4.5 t ha⁻¹ ⁽¹⁾, being of great importance the production of postures that guarantee the necessary material for the renovation and promotion of new areas. A diagnostic study carried out in the Mountain Development Center of Guantánamo province showed that nurseries have low germination rates, as well as weak positions that cause high mortality when they are moved to the field. This could be associated to different factors such as the use of seeds with immature embryos, together with limiting factors of the soil such as aeration, moisture retention and low fertility ⁽²⁾.

The use of an organic fertilizer system that takes into account the use of earthworm humus combined with biofertilizers would ensure favorable conditions for the germination and subsequent growth of plants ⁽³⁾. It is known that the addition of earthworm humus to soils and substrates, considerably increases the growth and productivity of a large number of crops, through the significant improvement in their physical, chemical and biological properties ⁽⁴⁾.

Plant growth promoting rhizobacteria (RPCV) are one of the biofertilizers widely used by direct and indirect mechanisms of growth promotion ^(5,6), with *Azotobacter chroococcum* being one of the most used bacterial nitrogen-fixing genera ^(7,8). The use of this species allows the shortening of the permanence period of the plants in the nurseries, and favors the increase in the morphological parameters of the plants ⁽⁹⁾, which makes

them an alternative to evaluate in the growth of the postures of coconut tree in Cuba, since 1990, a program of production and application of *A. chroococcum* has been developed with selected strains, among which the strain INIFAT-8 ⁽¹⁰⁾ stands out. The present investigation was developed with the objective of determining the influence of an organic fertilization system and inoculation of *A. chroococcum* on the germination of seeds and the growth of coconut tree positions in a conventional nursery.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the “Playa Duaba” and “Cabacú” nurseries, located in the municipality of Baracoa, Guantanamo province, on the Arenosol haplic (ARh) and Gleysol Fluvic, haplic (GFLh) soils, respectively ⁽¹¹⁾. The experiment was repeated for two consecutive years, in which the combinations of three levels of the substrate were studied Soil: Earthworm Humus: Coconut Fiber (S: HL: FC) (10: 1: 1, 4: 1: 1, 2: 1: 1, v/v/v) ⁽¹²⁾ with three strains of *A. chroococcum* (CDM-1, CDM-2 and INIFAT-8).

The strains of *A. chroococcum*, came from the collection of the National Institute of Fundamental Investigations of Tropical Agriculture “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). Strains CDM-1 and CDM-2 were isolated from the soils present in the “Playa Duaba” and “Cabacú” nurseries, respectively. The bioproducts made had a concentration of 9×10^{10} CFU per g of support ⁽¹³⁾ and were applied by direct spray to the soil and the seed at a dose of 1 kg ha^{-1} ⁽¹⁴⁾.

Three controls constituted by mineral fertilization (NPK 100 %) were also used, for which the complete formula 9:13:17 was used at a rate of 45 g per seed fractioned to 33 % at 30 days after sowing (das) and the rest at 90 das ⁽¹⁵⁾, the substrate S: H: FC 1: 1: 1 v/v/v and the soil. In all the cases for the elaboration of the substrate, the soil present in the nursery was used.

The seeds were obtained from healthy mother plants, belonging to the coconut domesticated ecotype “Indio Verde-1” ⁽¹⁶⁾. A randomized block design with bifactorial arrangement (3x3) and three replications was used. Each experimental plot within the block contained 20 seeds sown at a distance of 0.05 x 0.20 m.

The experiment lasted 180 days. At 120 das the germination rate index (IVG) was calculated by the formula $IVG = \Sigma (ni/ti)$ ⁽¹⁷⁾, where n is the number of germinated seeds and the time interval in which the seeds germinated. Germinated seeds were evaluated at times 30, 60, 90 and 120 days. At 180 das, 15 plants were sampled per replica and stem

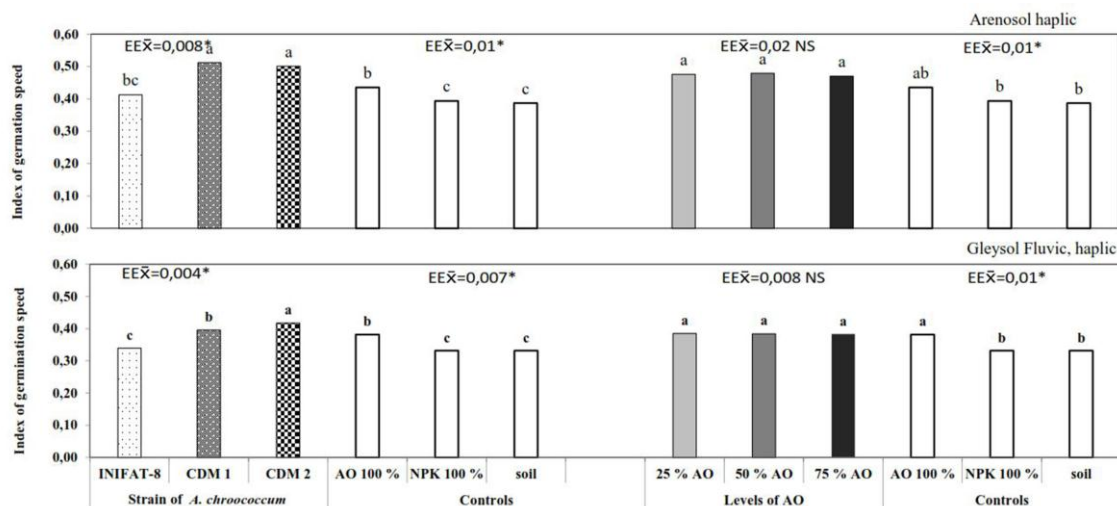
height (cm) and diameter at stem base (cm) ⁽¹⁸⁾ were evaluated. The counting of populations of *A. chroococcum* in the rhizosphere was also carried out ⁽¹⁹⁾.

The data of the variable counting populations of *A. chroococcum* in the rhizosphere were transformed by the formula $\log(x)$. The results for all the variables evaluated showed a similar behavior in the two years studied, so the data corresponding to the average of the two years were analyzed. The factorial variance analysis and the Duncan Multiple Range Test ($p \leq 0,05$) were used for the statistical processing of the treatments. To compare the controls with each of the treatments, a double classification ANOVA was performed, the EE was determined, with which the confidence interval (CI) was calculated for the controls with a level of significance of 95 % and verified if the means of each treatment were contained within the confidence interval. The statistical package STATGRAPHIC version 15.2 was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis carried out showed interaction of the factors in the two soils under study, for all the variables evaluated, except for the IVG. No effect of the levels of organic fertilizer on the IVG was found, not being so for the strains factor of *A. chroococcum*, which did have significance.

It was observed that in the soil ARh the strains isolated from the studied soils (CDM-1 and CDM-2) showed no differences between them and were superior to the strain INIFAT-8 and to the controls, with average values between 0.50 and 0,52, while in the GFLh soil, the best values corresponded to strain CDM-2, with a value of 0.42 (Figure 1). In the treatments inoculated with both strains, no significant differences were observed between the three levels of the organic fertilizers and the control S: HL: FC (1: 1: 1).



No interaction was found between the factors for factorial ANOVA. Means with different letters for the same soil differ from each other, according to the Duncan Multiple Range Test ($p \leq 0.05$) performed for the comparison of the treatments with the controls

IVG: germination rate index, $EE\bar{X}$: Standard error of the mean

Figure 1. Index of germination speed of coconut seeds ecotype Indio Verde-1 up to 120 days after sowing, subjected to the combined treatments of three strains of *A. chroococcum* and three levels of organic fertilizer on the soils Arenosol haplic and Gleysol Fluvic

With respect to the control S: HL: FC (1: 1: 1), in the ARh soil the treatment where the strain CDM-1 was used with S: H: FC (4: 1: 1) showed a reduction in four days the start of germination, while in the GFL soil it decreased in 12.8 days (data not shown).

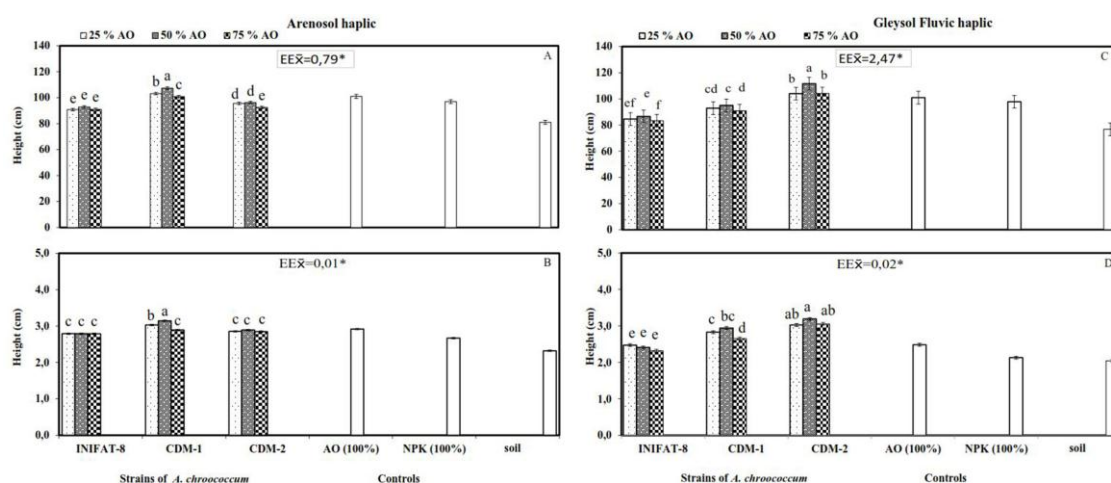
In the stem height variable, the best behavior in the soil ARh was observed, when the strain CDM-1 was used with S: HL: FC (4: 1: 1), which differed from the other treatments and controls of reference (Figure 2A). In general, the variants where the strains of *A. chroococcum* were inoculated combined with the three levels of the organic fertilizers, were higher when compared with the soil control.

When analyzing the results in the GFLh soil, it was found that when combining *A. chroococcum* with the three levels of organic fertilizer, the CDM-2 strain influenced the obtaining of the best values for the height at the base of the stem (Figure 2C), followed by CDM-1 and by INIFAT-8, with which the lowest values were obtained. The strain CDM-2 combined with S: HL: FC (4: 1: 1) favored the best response for this variable, unlike the rest of the treatments and the controls.

The analysis of the stem diameter in the ARh soil showed the best results when the strain CDM-1 and S: HL: FC (4: 1: 1) were combined, with difference from the other treatments and controls. On the other hand, the treatments where CDM-2 was used with the three levels of organic fertilizer showed similarity when compared with the treatments

inoculated with the INIFAT-8 strain. It was also obtained that these last mentioned variants showed similarity with the S: HL: FC control (1: 1: 1) and differences with the 100% NPK and soil controls (Figure 2B).

For the treatments performed with the GFLh soil (Figure 2D) the best results were obtained, with the combination of the strain CDM-2 and the three levels of organic fertilizer, which showed differences with the controls.



Means with different letters for the same soil differ according to multiple range test Duncan ($p \leq 0.05$) for factorial treatments.

Vertical lines on the bars indicate the confidence intervals of their means for the comparison of the treatments with the controls

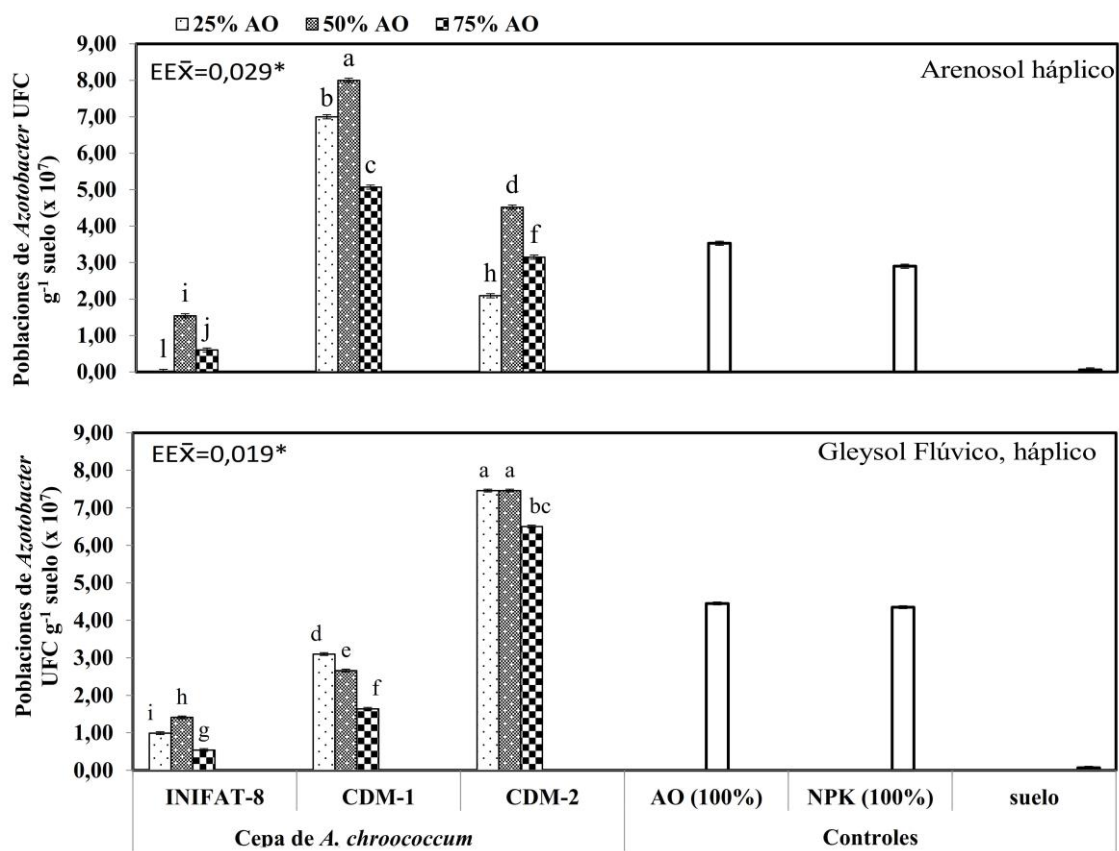
AO: organic fertilizer, EĒ: Standard Error of the average

Figure 2. Height and diameter at the base of the shoot 180 days after sowing of coconut plants ecotype Indio Verde-1, subjected to the combined treatments of three strains of *A. chroococcum* and three levels of organic fertilizer on the Arenosol and haplic soils. Gleysol Fluvic, haplic

In the analysis of the quantification of Azotobacter populations in the soil ARh (Figure 3A) the best results were found in the treatment where the strain *A. chroococcum* CDM-1 and S: HL: FC (4: 1: 1) was combined with significant differences with respect to the other treatments and controls. On the other hand, in the variants where the GFLh soil was used in the preparation of the substrate, the counting of the populations of Azotobacter in the rhizosphere (Figure 3B) showed the best responses with the inoculation of the strain *A. chroococcum* CDM-2 combined with the levels of S: HL: FC 10: 1: 1 and 4: 1: 1, with significant differences from the rest of the treatments and controls. In both soils the lowest levels were reached with the INIFAT-8 strain and the soil control.

The lack of response in the treatment formed by the soil without application of Azotobacter is possibly related to the limiting factors of these soils, as well as the low populations of Azotobacter present in them.

The low percentages of moisture retention in the Arenosol haplic soil could hinder the flow of masses and the diffusion of nutrients, limiting the absorption of nutrients by the plant ⁽²⁰⁾. On the other hand, the decrease of oxygen levels in the GLFh soil due to its gleyic properties ⁽¹¹⁾, could have prevented the normal development of the roots, and with it a low absorption of water and nutrients. These properties could have been improved with the use of organic fertilization since it allows the formation of soil aggregates, which improve the balance between macros and micropores and with it the retention of water, in addition to the increase of organic matter levels and the state of soil fertility ⁽²¹⁾.



Means with different letters for the same soil differ according to multiple range test Duncan ($p \leq 0,05$) for factorial treatments.
 Vertical lines on the bars indicate the confidence intervals of their means for the comparison of the treatments with the controls
 AO: organic fertilizer, $EE\bar{X}$: Standard Error of the Average

Figure 3. Quantification at 180 days after sowing of *Azotobacter* populations in the rhizosphere of ecotype Indio Verde-1 coconut poses submitted to the combined treatments of three strains of *A. chroococcum* and three levels of organic fertilizer on the soils Arenosol haplic and Gleysol Fluvic, haplic.

The studies presented provide evidence that the strains of *Azotobacter* used responded most effectively in the soils from which they were isolated. The best response was found

with the use of S: HL: FC (4:1:1) when combined with the strain CDM-1 in the ARh and with the CDM-2 strain in the GFLh, which makes it possible to reduce the levels of organic fertilizer employees by 50 %, by using this rhizobacteria.

It has been found that at the concentrations of these bacteria present in Cuban soils (104-105 CFU g⁻¹ rhizospheric soil), it is difficult to observe responses in the growth of plants, so the inoculation of them allows increasing the existing levels (up to 109 CFU g⁻¹ of rhizospheric soil) favoring a positive response of crops ⁽¹³⁾.

The autochthonous strains, being better adapted to the conditions studied, were able to function more quickly and effectively than the strain INIFAT-8, which apparently could find antagonism with resident microbial populations in these soils. It is proposed that when free-living bacteria are inoculated, the variability in the responses found is subject to different conditions, among which are the presence of resident microbial communities of the rhizosphere, with which interrelationships of synergism and antagonism are established ⁽²²⁾.

The response observed for the different levels of organic fertilization was given by the fact that being *Azotobacter* a heterotrophic bacterium, it uses several organic sources of energy, which include hemicellulose, starch, sugars, alcohols and organic acids, which come from organic matter present in soils ⁽²³⁾. However, the activities of this bacterial group in its relationship with the plant will be favored by the low levels of nitrogen in the soil, which favors the fixation of this element. On the other hand, its effectiveness decreases as the soils have a higher content of organic matter. When biofertilizer is applied, it must be fertilized with organic amendments to avoid soil impoverishment ⁽¹⁵⁾. The positive results observed in the stimulation of seed germination and in the growth of coconut tree postures could be associated to the application form of the inoculum of this biofertilizer. It was applied by direct spraying to the seed at the time of sowing, which could favor the hydration of the mesocarp and endocarp, and in this way achieve that optimum moisture was reached more quickly for the embryo to initiate germination.

This effect, together with the ability of these bacteria to produce growth regulating substances ^(24,25), caused them to penetrate the seminal cortex, accelerate germination and root development. In the genome of some strains of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of the coconut tree, the H2S gene has been identified, which is involved in the synthesis of hydrogen sulfide, a compound linked to the increase in seed germination ⁽²⁶⁾.

Another proposed mechanism through which *Azotobacter* may have promoted plant growth is the production of the enzyme 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase), which, in addition to preventing the occurrence of diseases ⁽²⁷⁾, it can facilitate plant growth and favor the initiation of embryo growth, together with the synthesis of indole acetic acid (AIA) and the regulation of ethylene levels ⁽²⁴⁾.

Different authors suggest the importance of ethylene in the germination process ^(26,28-30), in the decrease of dormancy and the emission of the radicle in different species ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Ethylene production begins immediately after imbibition and increases with time during germination ⁽²²⁾.

Strains of rhizobacteria isolated from coconut culture have been shown to produce AIA, gibberellic acid, ammonium, siderophores, proteases, catalases, cellulases, solubilization of phosphates ⁽²⁹⁾, N₂ fixation ⁽³¹⁾ as well as protection against different biotic ⁽³²⁻³⁵⁾ and abiotic ^(36,37) stresses are the mechanisms by which these bacteria promote plant growth, which places them as potential for the production of bio-inoculants in the organic management of this crop ^(26,30).

CONCLUSIONS

- It was shown that it is possible to reduce the levels of organic fertilization employed by 50 % by inoculating strains of *Azotobacter chroococcum* isolated from the soils under study.
- The combination Soil: Earthworm Humus: Coconut Fiber (S: HL: FC) (4: 1: 1) with *A. chroococcum* CDM-1 in the soil ARh and *A. chroococcum* CDM-2 in the soil GFLh favored the increase in the variables studied, which reached levels higher than those obtained with the recommended dose of mineral fertilization and organic fertilization.