

BIOFERTILIZACIÓN DE CAFÉ ORGÁNICO EN ETAPA DE VIVERO EN CHIAPAS, MÉXICO*

BIOFERTILIZER OF ORGANIC COFFEE IN STAGE OF SEEDLINGS IN CHIAPAS, MEXICO

María de Lourdes Adriano Anaya¹, Ramón Jarquín Gálvez^{2§}, Carlos Hernández Ramos¹, Miguel Salvador Figueroa¹ y Clara Teresa Monreal Vargas²

¹Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera a Puerto Chiapas, km 1.5. Tapachula, Chiapas. C. P. 30700. Tel. 01 962 6427972. (rodalvas2000@yahoo.com.mx), (msalvad@hotmail.com). ²Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Carretera San Luis-Matehuala, km 14.5. Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P. Tel. 01 444 8524056. Ext. 6. [§]Autor para correspondencia: ramón.jarquin@uaslp.mx.

RESUMEN

En Chiapas, la producción de plántulas de café, se realiza convencionalmente con la aplicación de fertilizantes químicos. La producción de café orgánico, requiere la nutrición de plántulas con biofertilizantes y por ello el objetivo fue evaluar el efecto de algunos de éstos en el desarrollo de plántulas de café (*Coffe arábica*) variedad Bourbon en vivero. El experimento se realizó durante 2007 y 2008 en Cacahohatan, Chiapas. Los inoculantes fueron una cepa *Glomus intraradices* Schenck y Smith, cepas PACHAZ08 de *Azotobacter* y 11B de *Azospirillum*. Se utilizó el diseño factorial 2³ con ocho tratamientos y 100 repeticiones por tratamiento. En las plántulas inoculadas, se efectuaron 4 muestreos con intervalos de 28 días, midiéndose la altura, longitud de hojas, longitud de raíz, peso seco de hojas y raíces, contenido de clorofila y nitrógeno, y colonización de raíz por los inoculantes. Los datos se sometieron al análisis de varianza y comparación de medias por Tukey $p \leq 0.05$. Las mejores características morfológicas y bioquímicas de las plántulas, se obtuvieron con *Azospirillum* sólo o coinoculada con *Glomus* y *Azotobacter* y estadísticamente fueron los mejores tratamientos. *Azospirillum* modificó la arquitectura de la raíz y estimuló la micorrización. Los diazotrofos en conjunto fueron antagónicos pero esta fue inhibida por *Glomus*.

ABSTRACT

In Chiapas, coffee seedlings production is conventionally done with chemical fertilizers. Organic coffee production requires seedlings nutrition with biofertilizers and therefore the objective was to evaluate the effect of some of these in coffee seedlings development (*Coffee arabica*) Bourbon variety in a nursery. The experiment was conducted during 2007 and 2008 in Cacahohatan, Chiapas. Inoculants were a strain of *Glomus intraradices* Schenck and Smith and strains of PACHAZ08 of *Azotobacter* and *Azospirillum* 11B. Factorial designs 2³ were used with eight treatments and 100 repetitions per treatment. In inoculated seedlings, 4 samples were made at intervals of 28 days, measuring height, leaves length, root length, dried leaves and roots weight, chlorophyll and nitrogen content, and root colonization by inoculants. Data were subjected to variance analysis and means comparison by Tukey $p \leq 0.05$. Best morphological and biochemical characteristics of seedlings were obtained with *Azospirillum* alone or coinoculated with *Glomus* and *Azotobacter* and were statistically the best treatments. *Azospirillum* modified root architecture and stimulated mycorrhization. Diazotrophics were antagonistic, but it was inhibited by *Glomus*. The three organisms' interaction induced a

* Recibido: septiembre de 2010
Aceptado: mayo de 2011

La interacción de los tres microorganismos indujo en las plántulas un mejor aprovechamiento de nutrimentos, agua, capacidad fotosintética y mayor acumulación de biomasa carbonada.

Palabras claves: *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Coffea arabica* L., *Glomus intraradices* Schenck y Smith.

INTRODUCCIÓN

Chiapas es el principal productor de café en México, y uno de los primeros a nivel mundial en la producción orgánica, con aproximadamente 243 667 ha y un promedio de 175 000 productores (COMCAFE, 2007). El café es una planta que se puede propagar por semilla en viveros, estacas y por embriogénesis somática, siendo la primera la más usada en todo el mundo (PROCAFE, 2005). En Chiapas, la producción de plantas de cafeto en viveros, se realiza a partir de semilleros. El trasplante a bolsas de polietileno que contiene suelo del cafetal, se efectúa en la etapa de emergencia del primer par de cotiledones (mariposa), seleccionando las plántulas con una adecuada formación y calidad fitosanitaria. Las plantas se colocan a una distancia de 20*20 cm y permanecen de 4 a 6 meses en vivero antes de ser llevadas a campo. En esta etapa, las plántulas se fertilizan con productos químicos, aplicados periódicamente (ICAFE, 2004).

El café orgánico se cultiva mediante una estrategia productiva orientada a la obtención de café con calidad y protección del ambiente, sin la aplicación de insumos de síntesis química, que se rige por normas de producción y procesamiento, mismas que son vigiladas mediante un proceso de certificación, que garantiza al consumidor la adquisición de alimentos de calidad sin residuos químicos, como son fertilizantes y plaguicidas. México ha sido pionero en la exportación de café orgánico y es el líder mundial en comercio justo (Sosa *et al.*, 2004; Giovannucci y Juárez, 2006).

Para que el café de Soconusco se introduzca en los mercados orgánicos, se debe producir con prácticas agroecológicas desde el semillero hasta su cosecha. En la fase de producción de plantas en vivero se pueden utilizar biofertilizantes en sustitución de productos de síntesis química. Los biofertilizantes están constituidos por microorganismos vivos; los cuales, cuando se aplican a semillas, superficies de plantas o suelos, colonizan la rizósfera o el interior de la planta, y promueven el crecimiento al incrementar el

better use of nutrients, water, photosynthetic capacity and greater accumulation of carbon biomass in seedlings.

Key words: *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Coffea arabica* L., *Glomus intraradices* Schenck and Smith.

INTRODUCTION

Chiapas is the largest coffee producer in Mexico and globally one of the first in organic production, with approximately 243 667 ha and an average of 175 000 producers (COMCAFE, 2007). Coffee is a plant that can be spread by seed in nurseries, cuttings and somatic embryogenesis, the first one is the most worldwide used (PROCAFE, 2005). In Chiapas, coffee plants production in nurseries is made from seedbeds. Transplantation in polythene bags with plantation soil is performed in the emergence phase of the first pair of cotyledons (butterfly), selecting seedlings with adequate formation and phytosanitary quality. Plants are placed at a 20*20 cm distance, remaining from 4 to 6 months in the nursery before being taken to the field. At this stage, seedlings are fertilized with chemicals, periodically applied (ICAFE, 2004).

Organic coffee is grown through a production strategy aimed at obtaining quality coffee and environmental protection, without synthetic chemical application, governed by production and processing rules, which are monitored through a certification process, to ensure the purchase of quality food without chemical residues to consumer, such as fertilizers and pesticides. Mexico has pioneered the organic coffee export and is the world leader in fair trade (Sosa *et al.*, 2004; Giovannucci and Juárez, 2006).

In order to introduce the Soconusco coffee into the organic markets, it has to be produced under ecological practices from seedbed to harvesting. At the stage of nursery plant production, biofertilizers can be used instead of synthetic chemical products. Biofertilizers consist of live microorganisms, which, when applied to seeds, plants surfaces or soil, they colonize the rhizosphere or the plant interior and promote growth by increasing the supply or availability of primary nutrients to the host plant, they do not contaminate plant products nor soil; they

suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped, no contaminan los productos vegetales, ni el suelo; por el contrario, son regeneradores de éste, además algunos inducen el desarrollo de mecanismos de defensa de las plantas y generan ambientes adversos a patógenos (Vessey, 2003).

Entre los microorganismos de mayor importancia usados como biofertilizantes, destacan bacterias como los rizobios, *Azotobacter* y *Azospirillum*, hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y rizobacterias como *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Varios autores han obtenido resultados favorables con la aplicación individual o con la combinación de microorganismos benéficos. La aplicación de *Azotobacter chroococcum* y bacterias solubilizadoras de fósforo (Fosforina), tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento y desarrollo de posturas de cafeto hasta 33%, en un suelo ferralítico rojo lixiviado típico de montaña (Díaz-Medina *et al.*, 2004).

En suelos con baja fertilidad, los HMA y las bacterias promotores del crecimiento de plantas ejercen efectos benéficos en la nutrición, crecimiento y en la producción de granos de café (Rivera *et al.*, 1997). A pesar de esto, los HMA y los inóculos bacterianos no son comúnmente empleados por los viveristas de la región, por lo que se planteó como hipótesis que los cafecultores de la región de Soconusco utilizarán algunos inoculantes, debido a que éstos favorecen la nutrición de las plántulas de cafeto, lo que se expresa en un buen desarrollo de raíz, vigor y mayor tolerancia a trasplante. El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto de *Glomus intrarradices*, *Azospirillum* sp. (cepa 11B) y *Azotobacter* sp. (cepa PACHAZ 08), sólo y en combinación, sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de café (*Coffea arabica* variedad *Bourbon*) en etapa de vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio y material biológico

El trabajo se realizó en los terrenos del ejido “El Águila” del Municipio de Cacahoatán Chiapas, México, teniendo como antecedente los trabajos de capacitación desarrollados en años anteriores, a través del modelo de Escuelas de Campo y Experimentación para Agricultores (ECEA) en la localidad (Jarquín, 2005).

actually regenerates it, plus some of them induce plants defense mechanisms development and generate adverse environments for pathogens (Vessey, 2003).

Among the most important microorganisms used as biofertilizers, bacteria such as rhizobia, *Azotobacter*, *Azospirillum*, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobacteria such as *Pseudomonas* and *Bacillus* stands out.

Several authors have obtained favorable results with individual application or a combination of beneficial microorganisms. *Azotobacter chroococcum* application and phosphate solubilizing bacteria (Phosphorine) had a favorable effect on growth and development of the coffee seedlings up to 33% in a red ferralitic leachate typical mountain soil (Díaz-Medina *et al.*, 2004).

In low fertility soils, AMF and growth-promoting bacteria in plants have beneficial effects on nutrition, growth and production of coffee beans (Rivera *et al.*, 1997). Despite this, AMF and bacterial inoculants are not commonly used by regional producers, so it is hypothesized that Soconusco regional producers will use some inoculants, because they promote coffee seedlings nutrition, resulting in good root development, vigor and greater tolerance for transplantation. The project's objective was to evaluate the effect of *Glomus intrarradices*, *Azospirillum* sp. (11B strain) and *Azotobacter* sp. (PACHAZ08 strain), alone and in combination, on growth and development of coffee seedlings (*Coffea arabica Bourbon* variety) at nursery stage.

MATERIALS AND METHODS

Location of study area and biological material

The work was done at the “El Águila” ejido in Cacahoatán, Chiapas, Mexico, with background work developed in previous years, through the model of Farmer Field and Experimentation Schools (FFES) at the locality (Jarquín, 2005).

The nursery was built at Mr. Plutarco Munoz grounds, FFES promoter, using banana leaves as a roof. Bags of 17*23 cm were used, filled with coffee rhizosphere soil and compost made from wastes of coffee crop (3:1). 1 kg of coffee bean was selected (*Coffea arabica* L.), Bourbon variety from

El vivero se construyó en los terrenos del Sr. Plutarco Muñoz, promotor de la ECEA, usando hoja de plátano como techo. Se utilizaron bolsas de 17*23 cm que se llenaron con suelo procedente de la rizósfera del cafetal y composta hecha a partir de residuos de la cosecha del café (3:1). Se seleccionó 1 kg de semilla de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad Bourbon procedentes de parcelas del mismo lugar. La semilla se eligió tomando en consideración los criterios del promotor de la ECEA. Las semillas se pregerminaron en una cama de suelo del cafetal. Cuando las plántulas alcanzaron la etapa de mariposas, se retiraron y se lavaron con agua. Se seleccionaron plántulas de tamaño similar, sanas y bien formadas; y se sembraron en las bolsas de polietileno.

Inoculación microbiana y tratamientos

Se usó la cepa de *Glomus intrarradices* cultivada en raíces transformadas de zanahoria y dos cepas de bacterias diazotróficas, *Azospirillum* sp. (11B) y *Azotobacter* sp. (PACHAZ08), las cuales se cultivaron en medio nutritivo a 28 °C y 200 rpm por 12 h. Las plántulas seleccionadas fueron inoculadas con 1 ml del cultivo bacteriano que contenía 1×10^8 ufc y con 1 cm² de medio gelificado con raíces que contienen esporas y micelio de HMA.

Se utilizó un diseño factorial 2³ y la matriz respectiva se muestra en el Cuadro 1, considerando los niveles de ausencia y presencia de los microorganismos. Fueron ocho tratamientos que implicaron efectos simples de los inoculantes y las combinaciones de los mismos con 100 repeticiones, y la unidad experimental fue una planta.

Variables evaluadas

Se midieron los siguientes parámetros: altura total de la planta (cm), longitud de raíz (cm), longitud de hoja (cm), peso seco de la raíz (secado a 60 °C por 3 días), peso seco del área foliar (secado a 60 °C por 3 días), concentración de clorofila (unidades SPAD), nitrógeno total de la área foliar (método de micro kjendahl al inicio y al final del experimento). El porcentaje de colonización del HMA se realizó con el método de Giovannetti y Mosse (1980), previa tinción de las raíces mediante la técnica de Phillips y Hayman (1970). El nivel de colonización bacteriano interno de la raíz se efectuó con la técnica de Döbereiner (1992). Estos parámetros se evaluaron a 10 plantas por tratamiento y se repitió el proceso cada cuatro semanas hasta la 16 semana después de la inoculación.

the same plot. Seed was chosen taking into consideration FFES promoter criteria. Seeds were pregerminated on a soil bed from the coffee plantation. When the seedlings reached butterflies stage, they were removed and washed with water. We selected seedlings of similar size, healthy and well formed; and planted them in polyethylene bags.

Microbial inoculation and treatments

Glomus intrarradices strain was used, cultivated in carrot transformed roots and two strains of diazotrophic bacteria, *Azospirillum* sp. (11B) and *Azotobacter* sp. (PACHAZ08), which were grown in nutrient medium at 28 °C and 200 rpm for 12 h. Selected seedlings were inoculated with 1 ml of bacterial culture containing 1×10^8 ufc and 1 cm² of gelled medium with roots containing spores and mycelium of AMF.

We used a 2³ factorial design and respective matrix is shown in Table 1, considering absence and presence of microorganism's levels. There were eight treatments involving simple effects of inoculants and their combinations with 100 replicates, the experimental unit was a plant.

Cuadro 1. Matriz de experimentos para el diseño factorial completo 2³ para los tratamientos de plántulas de café.

Table 1. Matrix of experiments for 2³ full factorial design for coffee seedlings treatments.

Tratamientos (T)	HMA (A)	PACHAZ08 (B)	11B (C)
1 (testigo)	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+

HMA= hongos formadores de micorrizas arbusculares; PACHAZ08= *Azotobacter* sp.; 11B= *Azospirillum* sp.

Evaluated variables

We measured the following parameters: plant's total height (cm), root length (cm), leaf length (cm), dried roots weight (drying at 60 °C for 3 days), dried weight of leaf area (drying at 60 °C for 3 days), chlorophyll concentration (SPAD units), total nitrogen of leaf area

Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y cuando existieron diferencias en los tratamientos se efectuó comparación de medias por la prueba de Tukey con $p=0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables anatómicas de las plántulas

Las plantas biofertilizadas presentaron mejores características anatómicas después de 16 semanas de establecido el vivero. El análisis de varianza de los datos de altura de las plantas, longitud de las hojas y raíz (Cuadro 2), indicó que existe diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el tratamiento ocho (aplicación de los tres microorganismos) el mejor. Las plantas fueron en promedio 32.8% más altas que los testigos (Figura 1), y los mismos resultados se obtuvieron para las inoculadas con el diazotrofo 11B (tratamiento 2). La longitud de las hojas de las plantas testigo fueron 73% menores que las que recibieron el tratamiento ocho.

(micro kjendahl method at the experiment beginning and ending). The percentage of AMF colonization was performed with Giovannetti and Moss (1980) method, after roots staining with Phillips and Hayman (1970) technique. Bacterial colonization level inside the root was made with Döbereiner (1992) technique. These parameters were evaluated in 10 plants per treatment and the process was repeated every four weeks, until week 16th after inoculation.

Statistical analysis

Results were subjected to variance analysis (ANOVA) and when there were differences between treatments, means comparison was performed by the Tukey test with $p=0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Seedlings anatomic variables

Biofertilized plants showed better anatomical features after 16 weeks of nursery setting. Variance analysis of data from plant height, leaf and root length (Table 2) indicates that there is a significant difference between treatments,

Cuadro 2. Efecto de biofertilización en las variables anatómicas y colonización radicular por HMA y bacteriana en plántulas de cafeto, después de 16 semanas de la inoculación.

Table 2. Biofertilization effect in anatomic variables and AMF and bacterial root colonization in coffee seedlings after 16 weeks of inoculation.

T	LT (cm)	LH (cm)	LR (cm)	PSR (g)	PSF (g)	CRF (U SPAD)	N (%)	HMA (%)	BD (ufc g ⁻¹)
1	13.4c	4.1e	10.2bc	0.133c	0.265b	38.7c	1.35c	6.6c	4*10 ⁸ b
2	17.2a	6.3b	11.2ab	0.172b	0.301a	47.3b	1.88b	10.6b	9*10 ⁹ a
3	13.7bc	4.6d	10.4bc	0.14c	0.271b	42.1c	1.76bc	6.6c	4*10 ⁸ b
4	13.7bc	4.6d	10.1bc	0.135c	0.264b	38.5c	1.62bc	6.6c	4*10 ⁸ b
5	14bc	5.2c	9.9c	0.132c	0.263b	38.8c	1.58c	6.6c	7*10 ⁸ b
6	14.2 b	5.3c	10bc	0.131c	0.271b	37.6c	1.8bc	10.6b	6*10 ⁸ b
7	14.3 b	6.2b	11.3ab	0.132c	0.278b	49.6ab	2.09a	10.6b	7*10 ⁹ ab
8	17.8 a	7.1a	11.7a	0.188a	0.313a	53.4a	2.14a	16.3a	9*10 ⁹ a

T=tratamientos; LT= longitud del tallo; LH= longitud de hojas; LR= longitud de raíz; PSR= peso seco de la raíz; PSF= peso seco foliar; CRF= clorofila foliar; N= Nitrógeno foliar; HMA= hongo micorrizico arbuscular; BD= bacterias diazotróficas como unidades formadoras de colonia por gramo de suelo; los tratamientos con letras iguales no son estadísticamente diferentes a $p \geq 0.05$.

La longitud de la raíz fluctuó entre 14.7 y 18.2% más larga que la de las plantas testigo y las inoculadas exclusivamente con el HMA (Tratamiento 5). Los tratamientos ocho y dos además promovieron un cambio en la arquitectura de la raíz (Figura 2).

Peso seco de hojas y raíz

En relación al peso seco de hojas y raíces, únicamente las plantas con los tratamientos 8 y 2 fueron estadísticamente diferentes respecto a los demás (Cuadro 2). El incremento en promedio fue de 41.3 y 17.3% más peso de raíz y hojas, respectivamente.

Contenido de clorofila

La mayor cantidad de clorofila se registró en las hojas de las plántulas de café que fueron inoculadas con el tratamiento ocho, y el contenido fue 37.9% mayor que las plántulas de los tratamientos 1, 3, 4, 5 y 6 (Cuadro 2).

Contenido de nitrógeno

Las plantas inoculadas con los tratamientos T8, T5 (HMA) y T3 (PACHAZ08), tuvieron el mayor contenido de nitrógeno en las hojas. Este fue en promedio 58.5% mayor que el de las plantas con la menor concentración registrada (Cuadro 2).

being the eighth treatment the best one (application of three organisms). The plants were 32.8% higher than the controls (Figure 1), and the same results were obtained for those inoculated with diazotrophic 11B (treatment 2). Leaves length of control plants was 73% lower than those who received treatment eight.

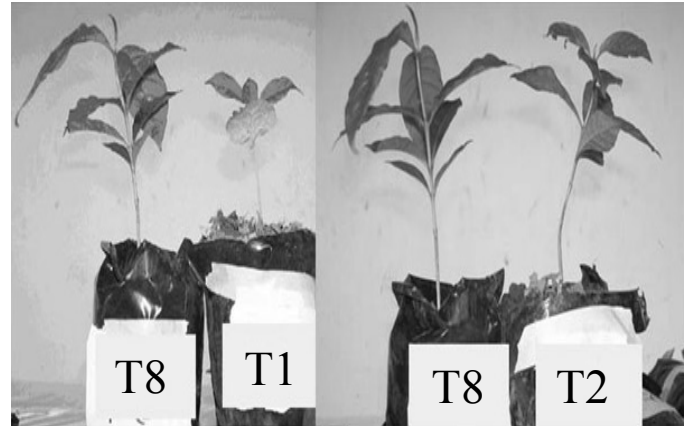


Figura 1. Comparación entre las plantas que respondieron mejor al efecto de la biofertilización vs testigo.

Figure 1. Comparison between plants that responded better to biofertilization effect vs control.

Root length ranged between 14.7 and 18.2% longer than control plants and those inoculated only with AMF (Treatment 5). 8th and 2nd treatments, also promoted a change in root architecture (Figure 2).

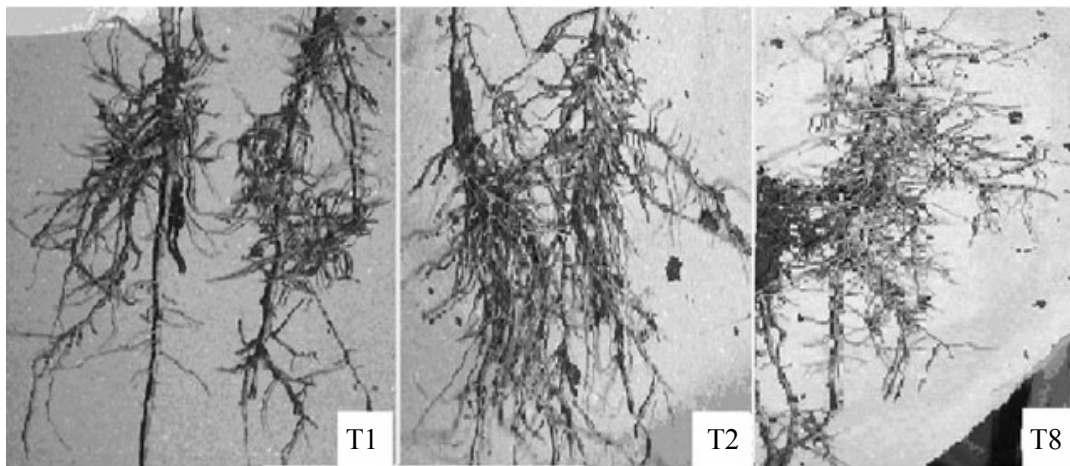


Figura 2. Crecimiento de la raíz de plántulas de café, T8 y T2 en comparación con el testigo T1.

Figure 2. Root growth of coffee seedlings, T8 and T2 compared with T1 control.

Colonización de la raíz por HMA y por bacterias diazotróficas

La colonización de las raíces de las plantas por HMA, con los diferentes tratamientos fluctuó de 6.6 a 16.3% (Cuadro 2). El mayor grado de colonización se encontró en las plántulas inoculadas con los tres microorganismos, y el menor en las plántulas de los tratamientos T1, T3, T4 y T5.

Respecto a la población de bacterias diazotróficas presentes en la raíz de las plántulas de café, la mayor población de éstas se encontró en aquellas que fueron inoculadas con el diazótrofo 11B y las inoculadas con los tres microorganismos. La menor población se encontró en las plántulas testigo y las que fueron inoculadas con la cepa PACHAZ08 y con ambos diazótrofos. La detección de HMA y diazótrofos en la raíz de las plantas testigo se debe que el suelo empleado en este trabajo no fue previamente esterilizado, por lo que las poblaciones microbianas cuantificadas representan las naturales.

En estudios previos, se ha comprobado que la aplicación de diversas combinaciones de hongos y bacterias utilizadas como biofertilizantes en diferentes plantas, generalmente tiene efecto sinérgico en la nutrición de la planta y su concomitante beneficio en el desarrollo vegetativo y reproductivo (Irizar-Garza *et al.*, 2003). Esto concuerda con el desarrollo de las mejores características anatómicas y los valores más altos de los diversos parámetros, que se midieron en las plantas de cafeto inoculadas simultáneamente con los tres biofertilizantes. También se obtuvieron resultados estadísticamente superiores al testigo únicamente en cinco parámetros de los nueve evaluados, con las combinaciones conformadas entre los HMA y cada diazótrofo. Sin embargo, esta situación no se presentó entre la interacción de las dos bacterias, la cual parece ser antagónica y por ello, los resultados fueron estadísticamente iguales al testigo.

El cafeto es un cultivo que de forma natural establece simbiosis con los HMA, lo cual se puso en evidencia en las plantas testigo; sin embargo, las cepas nativas no siempre pueden establecer una simbiosis eficiente; por ello para los cultivos que inicialmente se propagan en viveros, ésta es una fase adecuada para efectuar la inoculación con cepas de HMA que sean eficientes y altamente competitivas (Rivera *et al.*, 2003). Sánchez *et al.* (2006) encontraron que de 15 cepas de HMA inoculadas en plántulas de cafeto, las cepas más eficientes fueron *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae* ecotipo 1 y *Glomus intraradices*.

Dried leaves and roots' weight

About dried leaves and root's weight, only plants with 8th and 2nd treatments were statistically different (Table 2). The average increase was 41.3 and 17.3% of root and leaves, respectively.

Chlorophyll content

The highest recorded amount of chlorophyll in the leaves of coffee seedlings inoculated with the eighth treatment, the content was 37.9% higher than in seedlings from treatments 1st, 3th, 4th, 5th and 6th (Table 2).

Nitrogen content

Plants inoculated with the treatments T8, T5 (AMF) and T3 (PACHAZ08) had the highest content of nitrogen in the leaves. This was on average 58.5% higher than that of plants with the lowest measured concentration (Table 2).

Root colonization by AMF and diazotrophic bacteria

Colonization of plant roots by AMF, with different treatments ranged from 6.6 to 16.3% (Table 2). The highest colonization grade was found in seedlings inoculated with all three microorganisms and lowest one in seedlings of T1, T3, T4 and T5.

Regarding the diazotrophic bacteria population present in coffee seedlings roots, more of them were found in those inoculated with diazotrophic 11B and inoculated with three microorganisms. The smaller populations were found in control seedlings and those inoculated with PACHAZ08 strain and with both diazotrophs. Detection of AMF and diazotrophs in control seedlings root, is because the used soil was not previously sterilized, so microbial populations quantified represents natural soil flora.

In previous studies, it was found that application of combinations of fungi and bacteria used as biofertilizers in different plants, usually have synergistic effect on plant nutrition and its attendant benefits in vegetative and reproductive development (Irizar-Garza *et al.*, 2003). This accord with best anatomical features development and highest values of measured parameters in coffee plants inoculated simultaneously with the three biofertilizers.

Esta eficiencia micorrízica, según señalan Barea *et al.* (1991) se explica por el incremento del área de exploración radical de las plantas y sus consiguientes incrementos en la absorción de nutrimentos, lo que implica que en una misma condición de disponibilidad de éstos, se presenten mayores coeficientes de aprovechamiento y crecimiento de las plantas en el caso de una micorrización eficiente. En nuestro trabajo los resultados obtenidos únicamente con el inoculante HMA, son similares a los del testigo, lo cual indica que la cepa se comportó como la nativa y no estableció una simbiosis eficiente.

La cepa 11B de *Azospirillum* (T2) tuvo un efecto positivo en ocho de los nueve parámetros, con resultados semejantes a T8; fue el segundo mejor tratamiento y siempre superior al testigo. Además estimuló tanto la colonización micorrízica, como el incremento de la población de diazotrófos. *Azospirillum* es uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad, debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola. Se ha utilizado con éxito como biofertilizante en trigo, maíz, sorgo, arroz, cebada, avena, cítricos, y caña de azúcar entre otros (Bashan *et al.*, 2004).

Jiménez (2008) integró un cepario de 200 bacterias de *Azospirillum* aisladas del cultivo de café, provenientes de las principales regiones productoras de México y con las más eficientes formuló un biofertilizante. El producto tiene la propiedad de disminuir las etapas fenológicas del crecimiento del cultivo, produce una mayor densidad radicular de la planta, lo que significa un crecimiento más abundante de su raíz, hecho que le permite mejor capacidad para absorber los nutrientes disponibles en el suelo y lograr un mejor desarrollo. Este trabajo es acorde con los resultados obtenidos y señalan a *Azospirillum* como una buena opción para utilizarse como biofertilizante en cafeto, tanto en vivero como en campo abierto.

Los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal han sido relacionados con el metabolismo del nitrógeno, a través de la fijación biológica en condiciones de vida libre o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas. Sin embargo, en la actualidad se considera que la promoción del crecimiento vegetal, está relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, como ácido indolacético, citocianinas (Tien *et al.*, 1979); giberelinas (Bottini *et al.*,

Results were also statistically higher than control in five of nine studied parameters, with combinations formed with AMF and each diazotrophs. However, this situation did not show in the two bacteria interaction, which seems to be antagonistic and therefore results were statistically equal to control.

The coffee is a crop that naturally establishes symbiosis with AMF, which was evident in control plants, but native strains may not always establish an efficient symbiosis, that is why for nurseries crops, this is an appropriate stage to perform inoculation with AMF strains that are efficient and highly competitive (Rivera *et al.*, 2003). Sánchez *et al.* (2006) found that in 15 AMF strains inoculated on coffee seedlings, the most efficient strains were *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae* ecotipo1 and *Glomus intraradices*.

This mycorrhizal efficiency, indicated by Barea *et al.* (1991), is explained by the increase in radical exploration area of plants and their consequent increase in nutrients absorption, which means that in the same availability condition, there are greater utilization ratios and plants growth with an efficient mycorrhization. In our work, obtained results with AMF inoculant only, are similar to those from the control, indicating that strain behaved like the native and did not establish an efficient symbiosis.

Azospirillum 11B strain (T2) had a positive effect on eight out of nine parameters, with results similar to T8, it was the second best treatment and always superior to control. It also stimulated mycorrhizal colonization and diazotrophs population increasing. *Azospirillum* is one of growth promoting rhizobacteria genera most studied today, due to its ability to significantly improve growth, development and performance of numerous plant species of agricultural interest. It has been successfully used as biofertilizer in wheat, maize, sorghum, rice, barley, oats, citrus and sugarcane, among others (Bashan *et al.*, 2004).

Jiménez (2008), made a strain collection with 200 *Azospirillum* bacteria isolated from mexican coffee of the main producing regions and made a biofertilizer with the more efficient ones. The product has the ability to reduce phenological stages of the crop growth, producing a higher plant root density, which means an abundant growth of its root, a fact that allows a better capacity to absorb soil

1989) y etileno (Strzelczyk *et al.*, 1994), así como otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007) y la diamina cadaverina (CAD) (Cassán *et al.*, 2003).

Existe evidencia circunstancial de la interacción de fitohormonas producidas por el microorganismo con el background hormonal de las plantas inoculadas. Fulchieri *et al.* (1993) encontraron que plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con tres cepas de *Azospirillum lipoferum* mejoraron significativamente el crecimiento de la raíz y de la parte aérea. En estos ensayos GA3 fue identificada en la fracción ácida libre del extracto vegetal y estos resultados permitieron especular sobre la capacidad bacteriana de incrementar *in vivo* el pool de giberelinas con actividad biológica sobre el crecimiento vegetal en las raíces de plantas inoculadas.

Ross y O'Neill (2001) sugieren que las auxinas podrían promover, al menos en parte, la elongación del tallo por incrementar los niveles de endógenos de giberelinas 3 β -hidroxiladas, lo cual podría tener relación directa con los resultados obtenidos por Fulchieri *et al.* (1993). Otro factor a considerar sería que por lo menos dos de las cepas utilizadas para la inoculación (*A. lipoferum* Op 33, *A. lipoferum* iaa 320) eran productoras de AIA lo que permite especular, que al menos en parte, el aumento en el contenido endógeno de GA3 en la raíz puede deberse al cross-talk del AIA sobre el pool de GAs de la raíz y que parte de la respuesta del crecimiento observado en la porción aérea y subterránea se debería al efecto de las GAs producidas por las diferentes cepas de *Azospirillum lipoferum* o por las GAs producidas por las plántulas inducidas por el AIA bacteriano, como describen Yaxley *et al.* (2001) y Ford *et al.* (2002) para otras especies vegetales.

Krumpholz *et al.* (2006) evaluaron la respuesta de crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con *Azospirillum brasilense* FT326 (superproductora de IAA), correlacionando el fenotipo vegetal (incremento del peso fresco de la raíz, aumento en la longitud de los pelos radicales y aumento en el número de raíces laterales) con la producción vegetal de etileno, resultó que el aumento en la producción de etileno fue significativamente superior a los controles y los cambios morfológicos fueron acompañados de un aumento de actividad de la aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC)-sintasa tisular. De acuerdo con Peck y Kende (1995), el paso limitante para la biosíntesis de etileno es la conversión de la S adenosilmetionina

available nutrients and to achieve a better development. This work coincides with the results and marks *Azospirillum* as a good choice as biofertilizer for coffee, both in nursery and normal crop.

First proposed mechanisms for bacterial promotion of plant growth have been linked with nitrogen metabolism through biological fixation in free-living conditions or an increase in nitrate reductase activity in endophytic conditions. However, today it is considered that plant growth promotion is related to this organism ability to produce or metabolize phytohormones, such as indole acetic acid, cytokinins (Tien *et al.*, 1979), gibberellins (Bottini *et al.*, 1989) and ethylene (Strzelczyk *et al.*, 1994) and other plant growth regulatory molecules such as abscisic acid (ABA) (Perrig *et al.*, 2007) and diamine cadaverine (CAD) (Cassen *et al.*, 2003).

There is circumstantial evidence of phytohormones interaction produced by microorganism with the hormonal background of inoculated plants. Fulchieri *et al.* (1993) found that maize seedlings (*Zea mays* L.) inoculated with three strains of *Azospirillum lipoferum* significantly improved root and aerial part growth. In these trials, AG3 was identified in free acid fraction of plant extract and these results led to speculate on the bacterial ability to increase *in vivo* gibberellins pool with biological activity on plant growth in the roots of inoculated plants.

Ross and O'Neill (2001), suggest that auxins may promote, at least in part, stem elongation by increasing the levels of endogenous 3 β -hydroxy gibberellins, which may be directly related to the results obtained by Fulchieri *et al.* (1993). Another factor to consider is that at least two of the strains used for inoculation (*A. lipoferum* Op 33, *A. lipoferum* iaa 320) were AIA producers, allowing to speculate that root endogenous GA3 content increasing may be due to AIA cross-talk on the GAs pool of the root and that a part of growth response observed in the aerial and underground portion due to the effect of produced GAs by different strains of *Azospirillum lipoferum* or by produced GAs by the seedlings induced by bacterial AIA, as described by Yaxley *et al.* (2001) and Ford *et al.* (2002) for other plant species.

Krumpholz *et al.* (2006) evaluated growth response of tomato seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* FT326 (IAA superproducing), correlating plant phenotype (increased root fresh weight, increased length of root hairs

a ACC catalizada por la ACC sintasa; y la expresión como la actividad de esta enzima, así como la producción de etileno, se incrementa por la adición de AIA exógeno. Estos antecedentes indicarían que el aumento de etileno, al menos en parte se debería a un cross-talk entre el AIA producido por la bacteria en la vía de síntesis del etileno como sugieren Rahman *et al.* (2002). Podemos decir que un inoculante a base de *Azospirillum* sp. no debería sólo considerarse como un formulado a base de microorganismos, sino como un «complejo biológico» resultante de la biotransformación bacteriana de los componentes del medio (rizosfera o tejidos), en metabolitos con actividad sobre la planta, y que la actividad biológica de mucha de las fitohormonas producidas por este microorganismo, tiene influencia directa sobre procesos clave del desarrollo vegetal, tales como la germinación, crecimiento temprano de plántulas, colonización rizosférica y el establecimiento bacteriano en los tejidos.

En relación a la interacción *Azospirillum*-HMA, se obtuvo una respuesta positiva sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de café. A pesar de no ser el mejor tratamiento, la respuesta fue similar con Aguirre-Medina *et al.* (2007), en plántulas de cacao inoculadas con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*, quienes favorecieron el desarrollo y la asignación de materia seca de los componentes morfológico y fisiológicos del rendimiento de las plantas, y en general en los tejidos vegetales de estas plantas se cuantificaron los valores más altos de N₂, P y Ca.

Las plantas inoculadas con la cepa de *Azotobacter* PACHAZ08, se comportaron prácticamente igual que las testigos, y no tuvo efecto sobre las variables de colonización micorrizica y diazotrófica, además cuando se inoculó en conjunto con *Azospirillum* (tratamiento cuatro), ésta nulificó el efecto estimulador de la cepa 11B. *Azotobacter* es una bacteria cuya efectividad como biofertilizante depende de la capacidad de adaptación a distintos tipos de suelo. Los resultados obtenidos podrían inferir que la cepa PACHAZ08, no tuvo las condiciones adecuadas para establecerse, reproducirse, y tener un estado fisiológico óptimo (González y Lluch, 992); al igual que en los HMA, también se identifican cepas eficientes y cabría la posibilidad de que PACHAZ08 sea una cepa ineficiente.

Delgado *et al.* (2003) encontraron solamente dos cepas eficientes de las siete cepas de *Azotobacter* que evaluaron, y con ellas aceleraron el porcentaje de germinación de semillas de café entre 61.7 y 55% en los primeros 50 días; además de

and increased number of lateral roots) with plant ethylene production, resulting that ethylene production increase was significantly higher than controls and morphological changes were accompanied by increased activity of aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)-tissue synthase. According to Peck and Kende (1995), the limiting step for ethylene biosynthesis is the conversion of S-adenosylmethionine to ACC, catalyzed by ACC synthase and the expression as activity of this enzyme and ethylene production, is increased by exogenous AIA addition.

These facts indicate that ethylene increase might be due to a cross-talk between the AIA produced by bacteria in ethylene synthesis pathway, as suggested by Rahman *et al.* (2002). We can say that inoculants made with *Azospirillum* sp. should not only be regarded as a micro-organisms formulation, but as a «biological complex» resulting from bacterial biotransformation of the medium components (rhizosphere or tissues), in plant active metabolites and that biological activity of many phytohormones produced by this organism, directly influences key processes of plant development such as germination, seedlings early growth, rhizosphere colonization and bacterial tissue establishment.

Regarding to *Azospirillum*-AMF interaction, we obtained a positive response on growth and development of coffee seedlings. Despite it was not the best treatment, the response was similar to that of Aguirre-Medina *et al.* (2007), in cocoa seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices*, which favored development and allocation of dry matter of morphological and physiological components of plant performance and overall plant tissues of these plants quantified the highest values of N₂, P and Ca.

Plants inoculated with *Azotobacter* PACHAZ08 strain, behaved almost like the control and had no effect on mycorrhizal and diazotrophs colonization variables, also when they were inoculated also with *Azospirillum* (treatment four), it nullified the stimulatory effect of 11B strain. *Azotobacter* is a bacterium whose effectiveness as biofertilizer depends on the ability to adapt to different soil types. Results could infer that PACHAZ08 strain, did not have the right conditions to settle, reproduce, and have an optimum physiological state (González and Lluch, 992), as with HMA, we also identified efficient strains and that PACHAZ08 may be an inefficient strain.

producir los mayores valores morfológicos de las plántulas en vivero. Es indudable que *Azotobacter* ha sido el género de bacterias nitro fijadoras más estudiado hasta nuestros días. La inoculación de este diazotrófo ha sido positiva, observándose notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales.

Las especies más utilizadas ha sido *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, y su efecto en las plantas no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de N₂, sino también a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como, vitaminas (vitamina B-1, ácido nicotínico, ácido pantoténico) y hormonas vegetales que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas. La producción de estas sustancias por *Azotobacter*, se ve influenciada por el estado fisiológico de la bacteria y por la edad de los cultivos, habiéndose demostrado que la presencia de nitrógeno combinado modifica la producción de auxinas y giberelinas.

Concretamente la presencia de nitrato inhibe la liberación de auxinas, mientras que en sentido contrario incrementa la producción de giberelinas. La adición de exudados radicales de ciertos cereales colonizados por *Azotobacter*, determinan aumentos significativos en la producción de auxinas, giberelinas y citocininas, siendo este efecto más evidente cuando los exudados se obtienen de plantas de más de 30 días de crecimiento (González y Lluch, 1992).

Las interacciones microbianas en la rizósfera no siempre son mutualistas y por ende no se obtiene un efecto sinérgico que favorezca el crecimiento y desarrollo de las plantas. Existen investigaciones donde se ha podido comprobar la potenciación de la estimulación en el crecimiento y demás parámetros en las plantas, con la aplicación de *Azotobacter* conjuntamente con HMA, y de *Azospirillum* también con HMA (Miyasaka y Habte, 2003); pero en otras los resultados no han sido favorables debido que la coinoculación de los microorganismos necesita de condiciones adecuadas para su establecimiento e interacción positiva que conduzca a la efectividad de la simbiosis micorrízica; y a su vez que ésta garantice una absorción de nutrientes suficientes para satisfacer las exigencias de la estimulación. Estas condiciones pueden derivarse del microhabitat que implica tipo de suelo, influido por la especie y variedad del cultivo.

Fernández (1999) estudió la coinoculación de *Azotobacter chroococcum* con cepas eficientes de HMA en plántulas de café, en Acrisoles háplicos de muy baja fertilidad; los

Delgado *et al.* (2003) fundó sólo dos cepas eficientes de siete *Azotobacter* evaluadas, y aceleró con ellas la tasa de germinación del café entre 61.7 y 55% en los primeros 50 días, también produjeron los mayores valores morfológicos de las plántulas de vivero. *Azotobacter* es sin duda la bacteria fijadora de nitrógeno más estudiada hoy. Esta inoculación de diazotrofos ha sido positiva, mostrando incrementos significativos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales.

Las especies más utilizadas fueron *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, su efecto en las plantas no debe atribuirse sólo a la ganancia de N₂, sino también a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias que promueven el crecimiento vegetal, como vitaminas (vitamina B-1, ácido nicotínico, ácido pantoténico) y hormonas vegetales que intervienen directamente en el desarrollo de las plantas. La producción de estas sustancias por *Azotobacter*, se ve influenciada por el estado fisiológico de la bacteria y por la edad de los cultivos, habiéndose demostrado que la presencia de nitrógeno combinado modifica la producción de auxinas y giberelinas.

Específicamente, la presencia de nitrato inhibe la liberación de auxinas, mientras que en sentido contrario incrementa la producción de giberelinas. La adición de exudados radicales de ciertos cereales colonizados por *Azotobacter*, determinan aumentos significativos en la producción de auxinas, giberelinas y citocininas, siendo este efecto más evidente cuando los exudados se obtienen de plantas de más de 30 días de crecimiento (González y Lluch, 1992).

Las interacciones microbianas en la rizósfera no siempre son mutualistas y por ende no se obtiene un efecto sinérgico que favorezca el crecimiento y desarrollo de las plantas. Existen investigaciones donde se ha podido comprobar la potenciación de la estimulación en el crecimiento y demás parámetros en las plantas, con la aplicación de *Azotobacter* conjuntamente con HMA, y de *Azospirillum* también con HMA (Miyasaka y Habte, 2003); pero en otras los resultados no han sido favorables debido que la coinoculación de los microorganismos necesita de condiciones adecuadas para su establecimiento e interacción positiva que conduzca a la efectividad de la simbiosis micorrízica; y a su vez que ésta garantice una absorción de nutrientes suficientes para satisfacer las exigencias de la estimulación. Estas condiciones pueden derivarse del microhabitat que implica tipo de suelo, influido por la especie y variedad del cultivo.

Fernández (1999) estudió la coinoculación de *Azotobacter chroococcum* con cepas eficientes de HMA en plántulas de café, en Acrisoles háplicos de muy baja fertilidad; los

resultados fueron negativos y siempre inferiores a las aplicaciones simples de los microorganismos, explicable en base a una competencia por la baja disponibilidad de nutrientes en estos suelos, limitando incluso las estructuras fúngicas en las posturas micorrizadas.

Por otro lado, en la interacción de *Azospirillum*, *Azotobacter* y los HMA en la variedad de algodón Guazuncho 3, ambos tratamientos promovieron una mayor micorrización con respecto al testigo; sin embargo, en la variedad Guazuncho 2000, el testigo presentó mayor micorrización que los tratamientos con coinoculaciones (Cossoli e Iglesias, 2008). Contrario a estos resultados, en esta investigación, la interacción de los tres microorganismos fue mutualista y favoreció el mejor crecimiento y desarrollo de las plántulas de café.

Para explicar el efecto que tuvieron los tres inoculantes en las plántulas de cafeto, se puede asumir que la cepa de *Azospirillum* interactuó con la raíz de las plántulas y generó el desarrollo de raíces laterales, pelos absorbentes, y modificaron su fisiología, induciendo la secreción de exudados, mismos que a su vez favorecieron una simbiosis eficiente de la raíz con los HMA para desarrollar la micorrizosfera.

Esta condición posiblemente generó cambios cualitativos y cuantitativos en la liberación de exudados radicales y además promovió la secreción de exudados por las hifas del hongo, lo cual crea un nuevo espacio físico en la rizósfera de las plántulas de café; de tal manera, que se instauraron las condiciones favorables para el establecimiento de *Azotobacter*. Además es factible que los HMA impidieran la relación antagónica entre *Azospirillum* y *Azotobacter*, propiciando que ambos diazótrofos sumaran sus características de microorganismos promotores del crecimiento e incrementaron en la rizósfera la cantidad de fitohormonas y vitaminas; las que a su vez aumentaron el número de raíces laterales y el tamaño de los pelos absorbentes.

Los HMA mejoran el transporte de minerales, principalmente fósforo y agua, mientras que los diazótrofos participan en el ciclo del nitrógeno, incrementan el nivel endógeno de fitohormonas e inducen mecanismos de defensa contra patógenos radicales. Esto permitió que las plantas tuvieran un mejor aprovechamiento de los nutrimentos y agua, lo que se tradujo en una mejor capacidad fotosintética,

were negative and always less than simple applications of microorganisms, explicable due to a competition for low nutrient availability in these soils, even limiting fungal structures in mycorrhizal seedlings.

On the other hand, the interaction of *Azospirillum*, *Azotobacter* and AMF in Guazuncho 3 cotton variety, both treatments promoted greater mycorrhization compared with the control, but with Guazuncho 2000 variety, the control had higher mycorrhization than coinoculated treatments (Cossoli and Iglesias, 2008). In this research, all three organisms' interaction was mutual and favored a better growth and development of coffee seedlings.

To explain the effect of three inoculants in coffee seedlings, we can assume that *Azospirillum* strain interacted with the seedlings roots, resulting in development of lateral roots, root hairs, and altered physiology, inducing exudates secretion, which favored a very efficient symbiosis of roots with AMF for mycorrhizosphere development.

Maybe this condition generated qualitative and quantitative changes in radical exudates release and also promoted exuded secretion by fungus hyphae, which created a new physical space in coffee seedlings rhizosphere so there were favorable conditions for *Azotobacter* establishment. It is also possible that AMF prevented the antagonistic relationship between *Azospirillum* and *Azotobacter*, causing that both diazotrophs added their characteristics of promotional microorganisms of the growth and increased in the rhizosphere, plant hormones and vitamins amount, which in turn increased the lateral roots number and absorbing hairs size.

AMF improve minerals transportation, mainly phosphorus and water, while diazotrophs are involved in the nitrogen cycle, increasing endogenous phytohormones level and inducing defense mechanisms against root pathogens. This allowed plants to have a better use of nutrients and water, which resulted in a better photosynthetic capacity, greater accumulation of carbonated biomass, resulting in higher growth and shortening phenological nursery stages.

Terry and Leyva (2006) reported that plants coinoculated with AMF and rhizobacteria, have greater growth and total soluble protein content in the leaves. These proteins allow them a higher metabolic activity, an effect associated with better nutritional status and higher leaf nitrogen content and consequently plants have increased vigor.

acumulación de mayor biomasa carbonada, resultando un mayor crecimiento y acortamiento de las etapas fenológicas en vivero.

Terry y Leyva (2006) refieren que las plantas coinoculadas con HMA y rizobacterias tienen mayor crecimiento y contenido de proteínas totales solubles en las hojas. Estas proteínas les permiten una mayor actividad metabólica, efecto asociado a un mejor estado nutricional y a un contenido de nitrógeno foliar mayor, y como consecuencia las plantas tienen mayor vigor.

CONCLUSIONES

La aplicación de tres biofertilizantes en las plántulas de café en vivero, tuvieron un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de éstas, además de promover la síntesis de clorofila y de compuestos nitrogenados.

La cepa 11 B de *Azospirillum*, sola o en conjunción con el HMA y *Azotobacter* (PACHAZ08), fue el mejor inoculante. Asimismo, promueve interacciones mutualistas entre HMA, la raíz de las plántulas y *Azotobacter*.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Medina, F. A.; Mendoza-López, A.; Cadena-Iñiguez, J. y Avendaño-Arrazate, C. H. 2007. Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao* L.) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Kriegel et Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenck et Smith. *Interciencia*. 32(8):541-546.
- Barea, J. M.; Azcon-Aguilar, C. y Ocampo, J. A. 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. *In: fijación y movilización de nutrimentos II. Fijación de nitrógeno y micorrizas*. Madrid. 150-173 pp.
- Bashan, Y.; Holguin, G. and Bashan, L. 2004. *Azospirillum*-plant relationship: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50:521-577.
- Bottini, R.; Fulchieri, M.; Pearce, D. and Pharis, R. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiol.* 90:45-47.

CONCLUSIONS

Application of three biofertilizers in nursery coffee seedlings had a positive effect on growth and their development, and promote chlorophyll synthesis and nitrogen compounds.

Azospirillum 11B strain, either alone or with AMF and *Azotobacter* (PACHAZ08) was the best inoculant. It also promotes mutual interactions between AMF, seedlings root and *Azotobacter*.

End of the English version



- Cassán, F.; Piccoli, P. and Bottini, R. 2003. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. Through gibberellin production. An alternative model to increase crop yield? *Microbiología agrícola: un aporte de la Investigación Argentina para la Sociedad*. (2003) Editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero. 143-158 pp.
- Comisión para el Mejoramiento del Café de Chiapas (COMACAFE). 2007. *La cafeticultura chiapaneca*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. El campo en hechos. 2:28-29.
- Cossoli, M. R. e Iglesias, M. C. 2008. La biofertilización con *Azospirillum* y *Azotobacter*, su interacción con la infección de hongos micorrícicos en el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). XIII Jornadas Argentinas de Microbiología organizadas por la Asociación Argentina de Microbiología Filial. Rosario. 67 p.
- Díaz-Medina, A.; Almaguer-López, J.; Suárez-Pérez, C.; Albelo, N.; González-Reboso, A. y López, Y. 2004. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* y bacterias solubilizadoras de fósforo sobre el desarrollo de posturas de caféto (*Coffea arabica* L.). *Centro Agrícola*. 31(1):1-3.
- Delgado, Y.; Cupull, R.; Pérez, C.; Sánchez, A. y Vilchez, M. 2003. Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*. 30(1):26-31.
- Döbereiner, J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. *Symbiosis*. 13:1-13.

- Fernández, F. 1999. Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre la producción de posturas de cafeto (*C. arabica* L. var. Catuai) en algunos tipos de suelos. Tesis en Ciencias Agrícolas. INCA. 102 p.
- Ford, Y.; Taylor, J.; Blake, P. and Marks, P. 2002. Gibberellin A3 stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*). *J. Plant Growth Regul.* 37 (2):127-133.
- Fulchieri, M.; Lucangeli, C. and Bottini, R. 1993. Inoculation with *A. lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedlings roots. *Plant Cell Physiol.* 34:1305-1309.
- Giovanucci, D. y Juárez, C. R. 2006. Análisis prospectivo de política cafetalera. México, Proyecto Evaluación Alianza para el campo 2005. FAO. SAGARPA. 74 p.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular micorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84:489-500.
- González, J. y Lluch, C. 1992. Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo. Editorial Rueda. Madrid. España. 280 p.
- Instituto Costarricense del Café (ICAFE). 2004. El manejo de almacigales de café en bolsa. San José Costa Rica. Boletín informativo. 4(2):1-12.
- Irizar-Garza, M. B. G.; Vargas-Vázquez, P.; Garza-García, D.; Tut-Couoh, C.; Rojas-Martínez, I.; Trujillo-Campos, A.; García-Silva, R.; Aguirre-Montoya, D.; Martínez-González, J. C.; Alvarado-Mendoza, S.; Grajeda-Cabrera, O.; Valero-Garza, J. y Aguirre-Medina, J. F. 2003. Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. *Agr. Téc. Méx.* 29(2):213-225.
- Jarquín, G. R. 2005. Las escuelas de campo y experimentación para agricultores y su impacto en la formación de promotores comunitarios. *Trópico Rural.* 1(2):38-48.
- Jiménez, S. T. 2008. Crea BUAP biofertilizante, acelerador de crecimiento de la planta de café. Proyecto 5. URL: <http://www.proyectocinco.com>.
- Krumpholz, E.; Ribaud, C.; Cassán, F.; Bottini, R.; Cantore, M. and Curá, A. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant Growth Regul.* 25(2):175-185.
- Miyasaka, S. and Habte, M. 2003. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. College of tropical Agriculture and Human resources, Hawaii, Honolulu. *Journal Series.* Núm. 4468. 1101-1133 pp.
- Peck, S. and Kende, H. 1995. Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant. Mol. Biol.* 28:298-301.
- Perrig, D.; Boiero, L.; Masciarelli, O.; Penna, C.; Cassán, F. and Luna, V. 2007. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:1143-1150.
- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular micorrhizal fungi for assessment of infection. *Trans. Brit. Micol. Soc.* 5(1):158-160.
- Programa del Mejoramiento del Café (PROCAFE). 2005. Cultivo de tejidos vegetales. La libertad, República del Salvador. Hoja técnica. 13:1-3.
- Rahman, A.; Hosokawa, S.; Oono, Y.; Amakawa, T.; Goto, N. and Tsurumi, S. 2002. Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development diss. *Plant Physiol.* 130(4):1908-17.
- Rivera, R.; Fernández, F. y Hernández, A. 2003. El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible, estudio de caso. El Caribe, Ciudad de La Habana. 160 pp.
- Rivera, R.; Fernández, F.; Sánchez, C. y Bustamante, C. 1997. Efecto de la inoculación con HMA y bacterias rizosféricas sobre el crecimiento del cafeto. *Cultivos Tropicales.* 18(3):15-23.
- Ross, J. and O'Neill, D. 2001. New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci.* 6:2-4.
- Sánchez, C.; Montilla, E. y Rivera, R. 2005. Comportamiento de 15 cepas de hongo micorrizogénicos sobre el desarrollo de postura de cafeto en un suelo pardo gleyzoso. *Revista Forestal Latinoamericana.* 38:83-95.
- Sosa, M. L.; Escamilla, P. E. and Díaz, C. S. 2004. Organic Coffee. *In:* Wintgens, J. E. (ed.). *Coffee: growing, processing, sustainable production.* Weinheim, DE, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 339-354 pp.
- Strzelczyk, E.; Kamper, M. and Li, C. 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60.
- Terry, A. E. y Leyva, G. A. 2006. Evaluación de agrobiológica de la coinoculación micorrizas- Rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense.* 30(1):65-73.

- Tien, T. M.; Gaskins, M. H. and Hubbell, D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1016-1024.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* 255:571-586.
- Yaxley, J.; Ross, J.; Sherriff, L. and Reid, J. 2001. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiology.* 125:627-633.