

***Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner INOCULADO CON MICORRIZA Y BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO EN VIVERO**

José Carlos Ibarra-Puón¹; Juan Francisco Aguirre-Medina^{1*}; Alejandro Ley-De Coss¹; Jorge Cadena-Iñiguez²; Guillermo Armando Zavala-Mata¹

¹Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán. Huehuetán, Chiapas, MÉXICO. C.P. 30660.

Correo-e: juanf56@prodigy.net.mx (*Autor para correspondencia)

²Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* o *Azospirillum brasilense* a *C. canephora* en algunos componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en dos sustratos en vivero e identificar la cantidad de fósforo en el tejido vegetal y la colonización micorrízica, se condujo el presente estudio de noviembre de 2012 a mayo de 2013. Se utilizó un Andosol-mólico y se prepararon dos sustratos: suelo y arena de río (1:1 v/v) y suelo más 30 % de pulpa de café en bolsas de plástico con capacidad de 5 kg. Los tratamientos fueron testigo, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* y la combinación de ambos en cada sustrato. Se obtuvieron ocho tratamientos distribuidos en parcelas divididas en bloques al azar con cinco repeticiones. Se realizaron muestreos cada 28 días para medir variables morfológicas, fisiológicas y colonización micorrízica, además de la concentración de fósforo a 140 días después del trasplante (ddt). Los resultados muestran que la inoculación del *C. canephora* en vivero con alguno de los microorganismos inoculados individualmente favoreció el crecimiento y la acumulación de materia seca de los componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en comparación con el testigo sin inocular. *A. brasilense* promovió mayor acumulación de biomasa durante la evaluación mientras que *R. intraradices* al final del estudio. Con *R. intraradices* se incrementó la concentración de fósforo en el tejido vegetal de las plantas y la mayor colonización micorrízica se presentó en el primer tercio de la raíz cuando se inoculó *R. intraradices*.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Café robusta, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, componentes del rendimiento, fósforo, colonización micorrízica.

***Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner INOCULATED WITH MYCORRHIZAE AND NITROGEN FIXING BACTERIA IN NURSERY**

ABSTRACT

This study was conducted from November 2012 to May 2013 to evaluate the effect of inoculating *C. canephora* with *Rhizophagus intraradices* and / or *Azospirillum brasilense* in two substrates in nursery on some morphological and physiological yield components and to determine the amount of phosphorus in plant tissue and quantify mycorrhizal colonization. Soil used was mollic Andosol and two prepared substrates: one was soil and river sand and the other was soil plus 30% coffee pulp (1:1 v / v) in five-kg capacity plastic bags. Treatments were the control, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* and a combination of the two on each substrate, giving a total of eight treatments in a split plot in randomized block design with five replications. Samples were taken every 28 days to assess morphological and physiological variables and mycorrhizal colonization and phosphorus content during 140 days after transplant (dat). The results show that inoculation of *C. canephora* in nursery with either of the microorganisms individually favored growth and dry matter accumulation in morphological and physiological yield components relative to the control. *A. brasilense* promoted greater biomass accumulation during the evaluation and *R. intraradices* at the end of the study. *R. intraradices* increased phosphorus content in the tissue of plants, and higher mycorrhizal colonization was found in the first third of the root when inoculated with *R. intraradices*.

ADDITIONAL KEYWORDS: Robusta coffee, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, yield components, phosphorus, mycorrhizal colonization.

INTRODUCCIÓN

El café robusta *Coffea canephora* (P.) ex Froehner es una especie que está siendo establecida en las áreas bajas del trópico mexicano, especialmente en Chiapas y Veracruz. La expansión de la actividad ha ocasionado el desarrollo de viveros para el establecimiento de nuevas plantaciones, que tradicionalmente utilizan suelos o sustratos de las regiones productoras de café. En la región del Soconusco Chiapas, dominan los andosoles que se caracterizan por tener reacción ácida y la baja disponibilidad del fósforo (P); en estas condiciones la producción de plantas requiere de hasta 12 meses para su establecimiento y posterior traslado a campo. El crecimiento inicial es lento y con frecuencia se fertiliza para mejorarlo, o bien, se agrega materia orgánica que mejora la textura del sustrato.

El sistema radical del cafeto se asocia a diversos microorganismos del suelo, como el caso de los hongos micorrízicos. El cafeto es un cultivo micótrofo obligado y en consecuencia con alta dependencia micorrízica (Tristao *et al.*, 2006), y su principal beneficio a la planta es el transporte de nutrientes, especialmente P (Andrade *et al.*, 2009). Si el P no está disponible para el desarrollo inicial de las plántulas se convierte en un nutriente limitante (Grant *et al.*, 2005; Tristao *et al.*, 2006) y al ser un ion de baja movilidad, cuando se desarrolla la zona de agotamiento cerca de la raíz, la hifa puede ser el puente para la suplementación de fósforo (Sylvia, 2005) y al suministrarlo, se influye significativamente su crecimiento (Andrade *et al.*, 2009). También tiene efecto positivo en condiciones de sequía (Auge, 2004), puede proteger contra nematodos (Dong y Zhang 2006) y diversos patógenos (Harrier y Watson 2004). La colonización radical por los hongos micorrízicos permite a la planta ampliar la exploración del sustrato a través del micelio y transportar nutrientes a la raíz y el incremento de la superficie de absorción de la planta (Sylvia, 2005).

En cultivos anuales la respuesta agronómica de las micorizas se ha documentado, y se han encontrado incrementos del crecimiento y de la producción (Aguirre-Medina, 2006), mientras que se mejora el estado físico del suelo (Sylvia, 2005), mediante la producción de glomalina, que es una proteína que actúa como adherente y aglutinante de las partículas del suelo para formar agregados más estables (Rillig y Mummey, 2006). Se ha determinado que el comportamiento de las poblaciones micorrízicas es modulado por diversos factores ambientales y existe evidencia de que estas asociaciones presentan especificidad ecológica (Serralde y Ramírez, 2004), y preferencia por el hospedero (Daniell *et al.*, 2001), ya sea con diferentes variedades de *C. arabica* (Lebron *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2002) o con hongos micorrizicos aplicados a *C. canephora* (Pérez *et al.*, 2002). Las plantas micorrizadas con frecuencia son más competitivas y tolerantes del estrés ambiental en comparación con las plantas no micorrizadas (Sylvia, 2005). En otros cultivos perennes se consigna incremento en el crecimiento de la planta hués-

INTRODUCTION

Coffee (*Coffea canephora* (P.) ex Froehner) is a species that is being established in the low areas of the Mexican tropics, especially in Chiapas and Veracruz. Expansion of its cultivation has motivated the development of nurseries to grow plants for the new plantations. These nurseries traditionally used soils or substrates from coffee-growing regions. In the Soconusco region in Chiapas andosols dominate; this soil is characterized by having acid reaction and low availability of phosphorus (P). With these conditions, plant production requires up to 12 months before transplanting to the field. Initial growth is slow and fertilization is frequently done to improve soil fertility, or organic matter is added to improve substrate texture.

The root system of the coffee tree is associated with diverse soil microorganisms, such as mycorrhizal fungi. Coffee is a mycotrophic crop and consequently highly dependent on mycorrhizae (Tristao *et al.*, 2006), which mainly benefit the plant in the transport of nutrients, especially P (Andrade *et al.*, 2009). If P is not available for initial development of the saplings, growth becomes limited (Grant *et al.*, 2005; Tristao *et al.*, 2006). Because P is an ion with low mobility, the area close to the root becomes depleted of P. In this case, hyphae can act as a bridge to provide phosphorus supplementation (Sylvia, 2005), significantly influencing growth (Andrade *et al.*, 2009). There is also a positive effect under conditions of drought (Auge, 2004), as well as protection from nematodes (Dong and Zhang, 2006) and other pathogens (Harrier and Watson, 2004). Colonization of roots by mycorrhizal fungi enables the plant to expand its exploration of the substrate through mycelia, which help transport nutrients to the root and increase the root absorption area (Sylvia, 2005).

Agronomic response to mycorrhizae has been documented in annual crops. Increases in growth and production have been found (Aguirre-Medina, 2006), and the physical state of the soil has been improved (Sylvia, 2005) because of mycorrhizal production of glomalin, which is a protein that adheres to and binds soil particles to form more stable aggregates (Rillig and Mummey, 2006). It has been determined that the behavior of mycorrhizal populations is modulated by diverse environmental factors, and there is evidence that these associations are ecologically specific (Serralde and Ramírez, 2004) with preference for certain hosts (Daniell *et al.*, 2001), either with different varieties of *C. arabica* (Lebron *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2002) or mycorrhizal fungi applied to *C. canephora* (Pérez *et al.*, 2002). The plants colonized by mycorrhizae are often more competitive and tolerant to environmental stress, compared with plants that are not (Sylvia, 2005). In other perennial crops, increases in host plant growth have been documented in the nursery after inoculation with *R. intraradices* and another microorganism, as well as by co-inoculation of *Theobroma cacao* L. with *A. brasilense* (Aguirre-Medina *et al.*, 2007). *Azospirillum* was found to increase host plant root development by producing hormones and fixing nitrogen (Bashan and Bashan, 2010), consequently favoring plant growth.

ped en vivero con la inoculación de *R. intraradices* y otro microorganismo, como la coinoculación con *A. brasilense* en *Theobroma cacao* L. (Aguirre-Medina et al., 2007). Con *Azospirillum* se incrementa el desarrollo radical de la planta huésped mediante la producción de hormonas y la fijación de nitrógeno (Bashan y Bashan, 2010), y en consecuencia se favorece el crecimiento vegetal. En la actualidad los microorganismos del suelo son considerados organismos esenciales para el manejo sustentable de la agricultura. La adición de microorganismos como los hongos endomicorrízicos o las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden incrementar el crecimiento de la planta huésped en menor tiempo y en consecuencia, disminuir el lapso necesario en vivero antes de ser llevadas al campo. En cafetos se mejora su sobrevivencia en condiciones ambientales adversas cuando es inoculado con hongos micorrízicos (Andrade et al., 2009), y de esta manera pueden tolerar el trasplante y la sobrevivencia en condiciones de campo (Sieverding, 1989).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto sobre el crecimiento y la absorción de fósforo de *Coffea canephora* P. Ex. al inocular la semilla con los microorganismos *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense*, utilizando dos sustratos bajo condiciones de vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicada en el municipio de Huehuetán, Chiapas, localizado a 15° 00' 25.02" latitud norte y 92° 23' 59.06" longitud oeste, a 32 msnm, de noviembre de 2012 a mayo del 2013 en condiciones de vivero.

En el sitio la precipitación media anual es de 2,500 mm; la temperatura media máxima, de 34 °C; la mínima, de 17 °C; con una humedad relativa del 85 %. El suelo utilizado no tuvo tratamiento previo y pertenece al gran grupo de los andosoles mólicos, típicos de la región cafetalera del Soconusco, Chiapas, México. Con el suelo se formaron dos sustratos. Uno de ellos con suelo más arena de río lavada en proporción 1:1(v/v), y presentó las siguientes características físico-químicas: textura arena-migajosa, (82.40 % de arena, 13.36 % de limo, 4.24 % de arcilla), pH de 6.13, 0.09 % de nitrógeno, 30.30 ppm de P y 4.42 % de (MO). El otro sustrato elaborado con el suelo regional más la adición de 30 % de pulpa de café (v/v) presentó textura migajón-arenosa (62.40 % de arena, 34.36 % de limo, 3.24 % de arcilla), pH de 6.35, 0.28 % de nitrógeno, 83.80 ppm de P y 9.16 % de (MO) materia orgánica. Con los sustratos se llenaron bolsas de plástico negro, con una capacidad de 5 kg.

Se sembraron semillas de *C. canephora* y se impregnaron con el adherente carboximetil celulosa y, sobre éste, se integraron los microorganismos *A. brasilense* y *Rhizophagus intraradices* individualmente o juntos en la etapa de semillero. *A. brasilense* fue elaborado en la Universidad Autónoma

Today, soil microorganisms are considered essential in sustainable agricultural management. The addition of microorganisms such as endomycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria can increase host plant growth in a shorter time and, consequently, decrease the time needed in the nursery before transplanting to the field. In coffee, survival is improved under adverse environmental conditions by inoculation with mycorrhizal fungi (Andrade et al., 2009), and tolerance to transplant and field conditions is increased (Sieverding, 1989).

The objective of this study was to determine the effect of inoculating *Coffea canephora* P. Ex. seed with the microorganisms *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* on growth and phosphorus absorption in a nursery using two substrates.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted on the experimental farm of the Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV, of the Universidad Autónoma de Chiapas, located in the municipality of Huehuetán, Chiapas (15° 00' 25.02" N and 92° 23' 59.06" W, at 32 masl) from November 2012 to May 2013 under nursery conditions. Mean annual precipitation at the site is 2,500 mm; mean maximum temperature is 34 °C, minimum is 17 °C, and relative humidity is 85 %. The soil used was not treated previously and belongs to the large group of mollic andosols, typical of the coffee-producing region of Soconusco, Chiapas, Mexico. With this soil, two substrates were prepared. One was soil plus washed river sand in a 1:1 proportion (v/v). It had the following physical-chemical characteristics: sandy-crumb texture (82.40 % sand, 13.36 % silt, 4.24 % clay), pH 6.13, nitrogen 0.09 %, 30.30 ppm P and 4.42 % OM. The other substrate made with soil from the region plus 30 % coffee pulp (v/v) had a sandy crumb texture (62.4 % sand, 34.36 % silt, 3.24 % clay), pH 6.35, 0.28 % nitrogen, 83.80 ppm P, and 9.16 OM. Five-kg black plastic bags were filled with these substrates.

C. canephora seeds were impregnated with carboxymethyl cellulose adherent on which the microorganisms *A. brasilense* and *Rhizophagus intraradices* were integrated, alone or together, and planted in a seedbed. The *A. brasilense* inoculant was prepared at the Universidad Autónoma de Puebla at a concentration of 10⁹ bacteria per g of peat. The *R. intraradices* inoculant was prepared at the Rosario Izapá Experimental Station, Chiapas, with less than 40 spores per gram of soil and 95% root colonization of the host plant *Brachiaria decumbens* L. Plants in the "soldier" stage, before the cotyledons open, were transplanted to the bags. In each bag, 5 g of each inoculant was placed at a depth of 3 to 4 cm in the hole together with the seeds. The treatments were microorganisms alone and combined in interaction with two substrates (soil + sand and soil + coffee pulp) for a total of eight treatments with five replications distributed in a completely randomized design arranged in divided plots (substrates were the large plot; substrates and microorganisms were the small plot). A plant was considered as the expe-

de Puebla con una concentración de 10^9 bacterias por (g) de turba. *R. intraradices* se desarrolló en el Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas con al menos 40 esporas por gramo de suelo y 95 % de colonización radical en la planta huésped de *Brachiaria decumbens* L. Las plantas en etapa de “soldado” antes de abrir los cotiledones se trasplantaron a la bolsa. En cada bolsa se aplicaron 5 g de cada inoculante y se colocaron a una profundidad de tres a cuatro centímetros en un orificio donde también se colocaron las semillas. Los tratamientos fueron los dos microorganismos solos y combinados en interacción con los dos sustratos (suelo-arena y suelo-pulpa), en total, ocho tratamientos con cinco repeticiones distribuidas en un diseño completamente al azar con arreglo de parcelas divididas (teniendo como parcela mayor, los sustratos y parcela menor, los microorganismos). Se consideró como unidad experimental una planta. Se realizaron cinco muestreos destructivos cada 28 días. Las plantas se regaron con aproximadamente 100 ml de agua cada tercer día. Los datos se analizaron estadísticamente por medio del programa SAS versión 8, y las comparaciones entre medias de tratamientos por Tukey ($P \leq 0.05$).

Variables de respuesta

Altura de planta. Se registró la altura de las plantas a partir de la corona radical hasta la yema apical.

Diámetro del tallo. El diámetro del tallo se determinó con vernier digital a 5 cm de distancia de la corona radical hacia el ápice de la planta después de la deshidratación.

Número de hojas. Se cuantificó el número de hojas totales por planta a partir de los 56 días de establecido el experimento. Antes de este tiempo se exhiben solamente las hojas cotiledonales.

Área foliar, en cm^2 . Se registró con un integrador de área foliar (LI-COR, LI 3100).

Peso seco de parte aérea y radical. La biomasa seca expresada en g, se obtuvo mediante el peso de los componentes fisiológicos en una báscula analítica (Ohaus) después de secarse en estufa de aire forzado a 75-80 °C hasta peso constante.

Concentración de fósforo en tejido vegetal. El fósforo se determinó por colorimetría.

Colonización micorrízica. Se cuantificó el porcentaje de colonización con la técnica de Phillips y Hayman (1970), observando al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x) en 100 segmentos de raíz con longitud aproximada de 1.5-1.6 cm.

Número de esporas. Se utilizó el método del tamizado húmedo y decantado (Gerdemann y Nicholson, 1963) y bajo el estereoscopio se contaron las esporas presentes por cada 100 g de sustrato.

perimental unit. Five destructive samplings were done every 28 days. The plants were irrigated with approximately 100 mL water every other day. The data were analyzed statistically with SAS software, version 8, and means were compared with Tukey ($P \leq 0.05$).

Response variables

Plant height. Plant height was measured from the root crown to the apical bud.

Stem diameter. Stem diameter was determined after dehydration with a digital Vernier 5 cm from the root crown toward the plant apex.

Number of leaves. Total number of leaves was quantified 56 days after the experiment was established. Before this time, only cotyledon leaves are exhibited.

Leaf area (cm^2). Leaf area was determined with a leaf area integrator (LI-COR, LI 3100).

Aerial and radical dry weight. Dry biomass weight, expressed in g, was obtained by weighing the physiological components on an analytical scale (Ohaus) after drying them in a forced air oven at 75 to 80 °C until constant weight.

Phosphorus concentration in plant tissue. Phosphorus was determined by colorimetry.

Mycorrhizal colonization. Percentage of colonization was calculated with the Phillips and Hayman (1979) technique. One hundred root segments approximately 1.5-1.6 cm long were observed with an optical microscope equipped with an immersion lens (100x).

Number of spores. The method of wet sieving and decanting (Gerdemann and Nicholson, 1963) was used. The number of spores present in each 100 g of substrate was counted under a stereoscopic microscope.

Statistical analysis. Statistical analyses consisted of an ANOVA (PROC ANOVA) and the Tukey comparison of means test ($\alpha \leq 0.05$) using SAS version 8.1 software (Anónimo, 2000). Data were graphed with the software Sigma plot, ver. 5.0 for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

The coffee plants responded positively to inoculation with *R. intraradices* and *A. brasilense* in the two substrates (Tables 1 and 2). The statistical differences ($P \leq 0.05$) between the morphological components appeared at the third sampling, 84 days after transplant (dat), and those of physiological components occurred from the first sampling 28 day.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó por el procedimiento PROC ANOVA, posteriormente se aplicó una comparación de medias de Tukey con un $\alpha \leq 0.05$ con el programa SAS versión 8.1 (Anónimo, 2000) y se graficaron con el programa Sigma plot ver. 5.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de café tuvieron respuesta positiva a la inoculación de *R. intraradices* y *A. brasilense* en los dos sustratos (Cuadro 1 y 2). Las diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los componentes morfológicos se presentaron a partir del tercer muestreo a los 84 ddt y en los componentes fisiológicos desde el primer muestreo a los 28 ddt.

Componentes morfológicos

La altura de las plantas no presentó diferencias estadísticas al inicio de la evaluación y durante los dos primeros muestreos las diferencias numéricas fueron inferiores a un centímetro en los tratamientos con microorganismos en comparación con el testigo. En el cuarto muestreo, las plantas inoculadas con *R. intraradices* alcanzaron la mayor altura y en el quinto, además de *R. intraradices* se logró con *A. brasilense* en los dos sustratos (Cuadro 1). Las diferencias ($P \leq 0.05$) al final del estudio fueron de 6 cm entre los tratamientos con los microorganismos inoculados individualmente y el testigo en el sustrato suelo y arena, y de 5 cm en el sustrato de suelo con pulpa de café. Resultados semejantes citan Aguirre-Medina *et al.* (2007) en *Theobroma cacao* L., quienes encontraron diferencias promedio en altura de planta de 9 cm cuando se inoculó *R. intraradices* en comparación con el testigo sin inocular a partir de los 120 dds.

El diámetro del tallo no presentó diferencias entre sustratos y entre tratamientos a partir de los 112 dds ($P \leq 0.05$). A este tiempo, las plantas inoculadas con *R. intraradices* registraron el valor más alto en el sustrato con pulpa de café. En la evaluación final, el mayor diámetro del tallo se presentó cuando se inocularon las plantas con *R. intraradices* en suelo y arena, y en el suelo con pulpa de café con *A. brasilense*, además de la coinoculación de los dos microorganismos en el mismo sustrato. En otros cultivos perennes se ha conseguido este mismo efecto con *G. intraradices* (Chattopadhyay *et al.*, 2006; Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011), *G. fasciculatum* (Hernández y Salas, 2009) y con *Gigaspora margarita* en plantas de *C. canephora* (Tristao *et al.*, 2006).

El número de hojas inició con diferencias numéricas después de los 84 ddt y fueron significativas estadísticamente ($P \leq 0.05$) de los 112 a los 140 ddt entre tratamientos y también entre sustratos (Cuadro 1). *A. brasilense* indujo mayor número de hojas en el sustrato con pulpa de café. En *C. canephora* inoculando con *A. brasilense* y *A. chroococcum* en condiciones de campo, Chattopadhyay *et al.* (2006), encontraron este mismo resultado y en *C. arabica* var. oro azteca, Aguirre-Medina *et al.* (2011) citan esta misma respuesta. *A.*

Morphological components

There were no statistical differences in plant height at the beginning of assessment, and during the first two samplings, the numerical differences were less than a centimeter in the treatments with microorganisms, relative to the control. In the fourth sampling, the plants inoculated with *R. intraradices* were the tallest, and in the fifth sampling, besides *R. intraradices*, the tallest height was achieved with *A. brasilense* in the two substrates (Table 1). At the end of the study, the difference ($P \leq 0.05$) between the treatments inoculated with one microorganism and the control in soil-sand was 6 cm, while in soil-coffee pulp the difference was 5 cm. Similar results were obtained by Aguirre-Medina *et al.* (2007) in *Theobroma cacao* L.; they found an average difference in plant height of 9 cm between plants inoculated with *R. intraradices* and the uninoculated control as of 120 d after sowing.

Stem diameter was not different between substrates or between treatments 112 dat ($P \leq 0.05$). At this time, the plants inoculated with *R. intraradices* in the substrate with coffee pulp were the tallest. In the final assessment, the largest stem diameter was found on plants in soil-sand substrate inoculated with *R. intraradices*, and in soil-coffee pulp with *A. brasilense* as well as co-inoculation with the two microorganisms in the same substrate. In other perennial crops the same effect has been documented with *G. intraradices* (Chattopadhyay *et al.*, 2006; Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011), *G. fasciculatum* (Hernández and Salas, 2009) and *Gigaspora margarita* on *C. canephora* plants (Tristao *et al.*, 2006).

Numerical differences in number of leaves were found 84 dat and the differences were statistically significant different between treatments and between substrates 112 dat to 140 dat (Table 1). *A. brasilense* induced a larger number of leaves in the soil-coffee pulp substrate. Chattopadhyay *et al.* (2006) found the same results with *D. canephora* inoculated with *A. brasilense* and *A. chroococcum* in the field, and Aguirre-Medina *et al.* (2011) report the same response with *C. arabica* var. oro Azteca. *A. brasilense* has the capacity to induce greater root growth of the host plant, thus inducing, besides better anchorage, better efficiency in nutrient and water uptake (Hungria *et al.*, 2004). It is likely that these benefits are expressed in a larger number of leaves.

Physiological components

The highest root dry weight was found at the first three samplings in plants growing in soil-sand substrate, while at the end of assessment it was found in the substrate with coffee pulp ($P \leq 0.05$) (Table 2). Root biomass increased with inoculation of one microorganism, but not with co-inoculation. In general, *A. brasilense* promoted greater growth in both substrates at the beginning in the soil-sand substrate and in the last two samplings in the soil-coffee pulp substrate. *A. brasilense* promotes root development (Hungria *et al.*,

CUADRO 1. Comparaciones de medias de número de hojas, diámetro del tallo y altura de plantas de *C. canephora* P. inoculadas con *A. brasilense* y *R. intraradices* en dos sustratos en el Soconusco, Chiapas, México. 2013.

TABLE 1. Comparison of means of number of leaves, stem diameter and height of *C. canephora* P. plants inoculated with *A. brasilense* and *R. intraradices* in two substrates in Soconusco, Chiapas, Mexico. 2013.

Tiempo (ddt)/ Time (dat)	Sustratos /Substrates	Tratamientos / Treatments	Altura de planta/ Plant height (cm)	Diámetro de tallo / Stem diameter (mm)	Número de hojas / Number of leaves
28	Suelo: arena/ Soil: sand (1:1)	Testigo / Control	6.625 a ^z	0.967 a	
		<i>R. intraradices</i>	6.775 a	1.020 a	
		<i>A. brasilense</i>	6.575 a	1.015 a	
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	6.450 a	1.047 a	
	Suelo y 30 % pulpa de café/ Soil plus 30 % coffee pulp	Testigo / Control	7.025 a	1.017 a	
		<i>R. intraradices</i>	5.575 a	1.067 a	
		<i>A. brasilense</i>	6.225 a	1.032 a	
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	6.375 a	1.025 a	
	CV (%)		10.8	7.4	
	Suelo: arena/ Soil: sand (1:1)	Testigo / Control	7.175 a	1.137 a	2.00 a
		<i>R. intraradices</i>	8.675 a	1.097 a	2.50 a
		<i>A. brasilense</i>	8.475 a	1.150 a	2.50 a
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	8.550 a	1.167 a	2.00 a
56	Suelo y 30 % pulpa de café/ Soil plus 30 % coffee pulp	Testigo / Control	7.500 a	1.055 a	2.00 a
		<i>R. intraradices</i>	6.850 a	1.145 a	2.25 a
		<i>A. brasilense</i>	7.875 a	1.107 a	1.75 a
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	8.050 a	1.095 a	2.25 a
	CV (%)		11.5	4.4	27.1
	Suelo: arena/ Soil: sand (1:1)	Testigo / Control	8.575 a	1.400 a	4.75 b
		<i>R. intraradices</i>	8.750 a	1.405 a	5.50 ab
		<i>A. brasilense</i>	9.625 a	1.425 a	5.75 ab
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	9.125 a	1.432 a	6.00 ab
84	Suelo y 30% pulpa de café/ Soil plus 30 % coffee pulp	Testigo / Control	8.575 a	1.517 a	6.50 a
		<i>R. intraradices</i>	9.750 a	1.427 a	6.50 a
		<i>A. brasilense</i>	8.975 a	1.422 a	6.50 a
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	8.975 a	1.507 a	7.00 a
	CV (%)		8.7	7.0	11.4
	Suelo: arena/ Soil: sand (1:1)	Testigo / Control	10.92 ab	1.550 c	6.50 d
		<i>R. intraradices</i>	12.37 a	1.665 abc	7.75 bcd
		<i>A. brasilense</i>	11.62 ab	1.620 bc	6.75 cd
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	11.45 ab	1.572 bc	8.00 bc
112	Suelo y 30 % pulpa de café/ Soil plus 30 % coffee pulp	Testigo / Control	10.475ab	1.630 bc	8.00 bc
		<i>R. intraradices</i>	11.47 ab	1.870 a	9.00 ab
		<i>A. brasilense</i>	11.90 ab	1.782 ab	9.75 a
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	10.25 b	1.635 bc	7.50 cd
	CV (%)		7.5	5.6	7.4
	Suelo: arena / Soil: sand (1:1)	Testigo / Control	12.175 b	1.7475 b	9.25 b
		<i>R. intraradices</i>	18.650 a	2.5750 a	11.50 ab
		<i>A. brasilense</i>	18.225 a	2.2200 ab	10.75 ab
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	14.425 ab	2.1300 ab	11.50 ab
140	Suelo y 30 % pulpa de café/ Soil plus 30 % coffee pulp	Testigo / Control	15.325 ab	2.0500 ab	12.00 ab
		<i>R. intraradices</i>	17.675 ab	2.2075 ab	12.00 ab
		<i>A. brasilense</i>	20.000 a	2.4200 a	13.00 a
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	17.025 ab	2.5000 a	11.25 ab
	CV (%)		14.3	10.4	10.4

^zValores con la misma letra dentro de cada factor y columna son iguales (Tukey $P \leq 0.05$). CV: coeficiente de variación.

^zValues with the same letter within each factor and column are equal (Tukey $P \leq 0.05$). CV: coefficient of variation.

brasile tiene la capacidad de inducir mayor crecimiento radical en la planta huésped que le permite, además del anclaje, mayor eficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes y el agua (Hungria *et al.*, 2004) y es probable que estas bondades se expresen en la inducción de más hojas.

Componentes fisiológicos

Se registró mayor peso seco del sistema radical en el sustrato de suelo y arena durante los tres primeros muestreos, y al final de la evaluación se encontró en el sustrato con pulpa de café ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2). La biomasa radical se incrementó con la inoculación individual de los microorganismos y no cuando se inocularon juntos. En general *A. brasilense* promovió mayor crecimiento en ambos sustratos. Al inicio en el sustrato suelo y arena, y en los últimos dos muestreos en el sustrato de suelo y pulpa de café. *A. brasilense* promueve el desarrollo de la raíz (Hungria *et al.*, 2004) mediante la producción de fitohormonas como el ácido indol acético y vitaminas (Dobbelaere *et al.*, 2003), los cuales modifican la morfología e incrementan la biomasa radical. En cultivos anuales, como maíz y frijol en condiciones de campo, se ha consignado que *A. brasilense* ha demostrado capacidad para inducir mayor desarrollo radical cuando se inocula junto con *Glomus intraradices* (Dobbelaere *et al.*, 2003; Aguirre-Medina, 2006). En cambio la inoculación individual de *R. intraradices* y en coinoculación con *A. brasilense* promovió menor biomasa radical en los primeros tres muestreos. Al parecer la hifa del hongo sustituye los pelos de la raíz y la planta transporta más fotosintatos a la parte aérea para la producción de biomasa (Cuadro 2). Resultados similares citan Aguirre-Medina y Kohashi-Shibata (2002) en frijol inoculado con micorrizas, e Irizar *et al.* (2003) lo consignan en maíz. En cambio a los 140 ddt la biomasa radical del tratamiento inoculado con *R. intraradices* fue estadísticamente igual al tratamiento *A. brasilense* y superior al resto de los tratamientos.

La colonización micorrízica fue superior en 2 % en el sustrato suelo con pulpa de café en comparación con los tratamientos que crecieron en suelo y arena. Entre tratamientos, la mayor colonización se presentó donde se inoculó *R. intraradices*. La distribución de la colonización por micorriza en la raíz avanzó de la corona radical o región "a" hacia la región media "b" y al final a la inferior "c" (Figura 1). Se observó mayor colonización de la micorriza en la región "a" durante toda la evaluación y ocurrió de los 56 a los 140 días. Aguirre-Medina y Kohashi-Shibata (2002) citan este mismo hecho en frijol. En general el número de especies de microorganismos presentes en la rizosfera decrece conforme se incrementa la distancia de la raíz (Kennedy, 2005).

Al inicio de la evaluación la colonización radical presentó diferencias pequeñas, alrededor de 2 % en los tratamientos inoculados con algún microorganismo, y el menor valor se encontró en el testigo con el sustrato de suelo y arena (4.4 %). En el siguiente muestreo en ambas condiciones de suelo, el valor promedio de la colonización del testigo fue 15.3 %

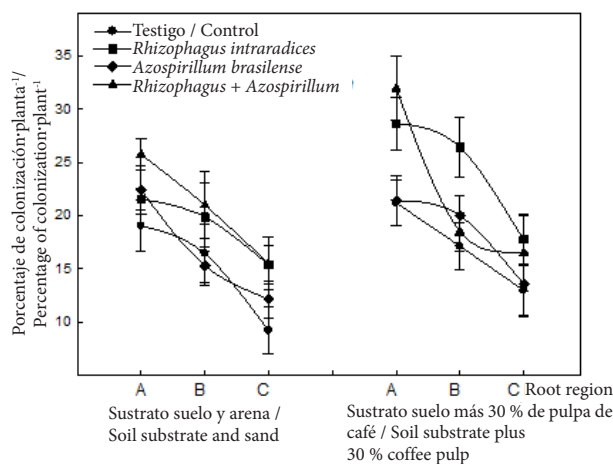


FIGURA 1. Colonización micorrízica por región de la raíz en plantas de *Coffea canephora* P. inoculadas con *A. brasilense* o *R. intraradices* en un andosol-mólico del Soconusco, Chiapas, México. La línea vertical indica \pm el error estándar de 25 segmentos de raíz en cuatro plantas por tratamiento y muestreo.

FIGURE 1. Mycorrhizal colonization by root region in *Coffea canephora* P. plants inoculated with *A. brasilense* or *R. intraradices* in a mollic andosol soil from Soconusco, Chiapas, Mexico. The vertical line indicates \pm the standard error of 25 root segments in four plants per treatment and sampling.

2004) by producing plant hormones, such as indoleacetic acid and vitamins (Dobbelaere *et al.*, 2003), which modify morphology and increase root biomass. In annual crops, such as field-grown maize and beans, it has been found that *A. brasilense* exhibits the capacity to induce greater root development when it is inoculated together with *Glomus intraradices* (Dobbelaere *et al.*, 2003; Aguirre-Medina, 2006). In contrast, individual inoculation with *R. intraradices* and co-inoculation with *A. brasilense* promoted less root biomass in the first three samplings. Apparently, the fungus hyphae substitute root hairs and the plant transports more photosynthates to the aerial part for biomass production (Table 2). Similar results have been reported by Aguirre-Medina and Kohashi-Shibata (2002) in beans inoculated with mycorrhizae, and by Irizar *et al.* (2003), who have documented it in maize. However, 140 dat root biomass in the treatment inoculated with *R. intraradices* was statistically equal to that of the treatment with *A. brasilense* and superior to the rest of the treatments.

Mycorrhizal colonization was 2 % higher in the soil-coffee pulp substrate, relative to the treatments in soil-sand. The highest colonization occurred with inoculation with *R. intraradices*. Mycorrhizal colonization in the root progressed to the root crown, that is, from region "a" to mid-"b" region, and at the end, to the lower "c" region (Figure 1). Greater mycorrhizal colonization was observed in region "a" throughout assessment from day 56 to day 140. Aguirre-Medina and Kohashi-Shibata (2002) report the same result in beans. In general, the number of species of microorga-

CUADRO 2. Comparaciones de medias de biomasa radical, de tallo y de lámina foliar, así como de área foliar de *Coffea canephora* P. inoculadas con *A. brasilense* y *R. intraradices* en un suelo andosol-mólico del Soconusco, Chiapas, México, 2013.

TABLE 2. Comparisons of means of root, stem, and leaf biomass, and leaf area of *Coffea canephora* P. inoculated with *A. brasilense* and *R. intraradices* in a mollic andosol soil in Soconusco, Chiapas, Mexico. 2013.

Tiempo (ddt)/ Time (dat)	Sustrato / Substrate	Tratamientos / Treatments	Peso seco (g.planta ⁻¹)/ Dry weight (g.plant ⁻¹)			Área foliar / Leaf area (cm ² .planta ⁻¹)
			Raíz / Root	Hoja* / Leaf*	Tallo / Stem	
28	Suelo y arena / Soil and sand (1:1)	Testigo / Control	0.017aabc ^z		0.025aab	
		<i>R. intraradices</i>	0.019aab		0.024aab	
		<i>A. brasilense</i>	0.021aa		0.027aa	
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.016abc		0.022ab	
		CV (%)				
	Suelo arena + 30% pulpa de café / Soil-sand +30% coffee pulp	Testigo / Control ^z	0.013bc		0.024aab	
		<i>R. intraradices</i>	0.016bbc		0.023ab	
		<i>A. brasilense</i>	0.013bc		0.024aab	
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.016bbc		0.026aab	
		CV (%)	9.7		6.4	
56	Suelo y arena / Soil and sand (1:1)	Testigo / Control	0.033ab	0.032abc	0.041abc	10.4ac
		<i>R. intraradices</i>	0.036ab	0.041aa	0.046aab	14.2aa
		<i>A. brasilense</i>	0.044aa	0.037aab	0.046aab	10.9abc
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.035ab	0.029acd	0.048aa	8.5acd
		CV (%)				
	Suelo arena + 30% pulpa de café / Soil-sand +30% coffee pulp	Testigo / Control	0.018bde	0.010bf	0.033bd	3.0ae
		<i>R. intraradices</i>	0.026bc	0.025bde	0.037bcd	7.7ad
		<i>A. brasilense</i>	0.024bcd	0.023be	0.034bd	13.1aab
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.015be	0.021be	0.033bd	6.4ad
		CV (%)	10.5	9.2	7.0	11.0
84	Suelo y arena/ Soil and sand(1:1)	Testigo / Control	0.070ac	0.172ae	0.074ab	47.1ac
		<i>R. intraradices</i>	0.081abc	0.175ae	0.083aab	58.8abc
		<i>A. brasilense</i>	0.109aa	0.201ade	0.091aab	51.1abc
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.098aab	0.261aab	0.106aa	62.8bab
		CV (%)				
	Suelo arena + 30% pulpa de café / Soil-sand +30% coffee pulp	Testigo / Control	0.081bbc	0.235bbc	0.089bab	68.9ba
		<i>R. intraradices</i>	0.073bbc	0.245babc	0.091bab	67.9ba
		<i>A. brasilense</i>	0.095babc	0.221bcd	0.093bab	57.3bbc
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.109ba	0.268ba	0.092bab	55.7babc
		CV (%)	13.1	5.6	12.6	9.9
112	Suelo y arena/ Soil and sand (1:1)	Testigo / Control	0.112acd	0.371acd	0.133ad	71.7be
		<i>R. intraradices</i>	0.141aab	0.481aab	0.173aab	116.3bbc
		<i>A. brasilense</i>	0.117abcd	0.437abc	0.162aabc	94.1bd
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.122abcd	0.416abcd	0.148abcd	96.1bcd
		CV (%)				
	Suelo arena + 30% pulpa de café / Soil-sand +30% coffee pulp	Testigo / Control	0.104ad	0.339ad	0.133ad	84.8ade
		<i>R. intraradices</i>	0.130abc	0.492aab	0.173aab	124.5ab
		<i>A. brasilense</i>	0.158aa	0.563aa	0.181aa	145.7aa
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.121abcd	0.389acd	0.137acd	95.6ad
		CV (%)	8.5	8.4	6.9	8.4
140	Suelo y arena / Soil and sand (1:1)	Testigo / Control	0.149 bd	0.646bd	0.211be	136.2bd
		<i>R. intraradices</i>	0.366 ba	1.743bab	0.613ba	371.4bb
		<i>A. brasilense</i>	0.305 bb	1.037bc	0.329bcd	232.8bc
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.342 bab	1.067bc	0.355bc	229.6bc
		CV (%)				
	Suelo arena + 30 % pulpa de café / Soil-sand + 30% coffee pulp	Testigo / Control	0.262 a c	0.763acd	0.247ade	188.9acd
		<i>R. intraradices</i>	0.339 a ab	1.463ab	0.459ab	340.2ab
		<i>A. brasilense</i>	0.351 a a	1.961aa	0.549aab	445.4aa
		<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	0.301 abc	1.505ab	0.481ab	340.6ab
		CV (%)	5.9	10.4	10.8	8.1

^z El primer muestreo corresponde a hojas cotiledonales. **Valores con la misma letra dentro de cada factor y columna son iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

^z The first sampling corresponds to cotyledonal leaves. **Values with the same letter within each factor and column are equal (Tukey's $P \leq 0.05$).

y en los posteriores varió ligeramente con valores de 17.4 ± 1.3 y 18.3 ± 2.1 en sustrato suelo y arena y con pulpa de café respectivamente. El alto nivel de colonización micorrízica presente no parece estar relacionado con la inducción del desarrollo vegetal del café.

La colonización micorrízica donde no se inoculó *R. intraradices* confirma la presencia de hongos endomicorrízicos en el sustrato. En promedio en el sustrato suelo y arena se encontraron 18,000 esporas y en el sustrato con pulpa de café se incrementó a 33,000 esporas 100 g de suelo. Al respecto el número de esporas no debió ser un factor limitante, pero la menor inducción en el desarrollo vegetal de estas plantas sugiere efecto diferencial en la capacidad para estimular el crecimiento del café. Cuenca *et al.* (2007) cita un incremento del 37 % en la cantidad de esporas producidas en arena en comparación con un sustrato donde se agregó cáscara de arroz. En nuestro caso, el incremento fue del orden del 83 %. El incremento en la producción de esporas en el sustrato con pulpa de café sugiere proveer un micro hábitat más favorable para la esporulación. Es probable que esta condición de mayor número de esporas esté relacionada con mayor contenido de materia orgánica del sustrato, lo que ha sido interpretado como un mecanismo que favorecería la supervivencia de las esporas expuestas a condiciones ambientales adversas (Cuenca *et al.*, 2007).

Con la inoculación de *A. brasilense* se incrementó ligeramente la colonización micorrízica de los hongos presentes en el sustrato en comparación del testigo, y el promedio de colonización radical encontrado fue de 18.2 ± 1.74 en suelo y arena y de 20.5 ± 1.73 en el sustrato con pulpa de café. Existen evidencias de que la micorriza interactúa con una amplia variedad de organismos en la rizosfera, como los diazotófos, sin embargo, la demanda por carbohidratos se incrementa con la coinoculación de más de un microorganismo, y se ha estimado que alrededor del 20 % del total de carbono asimilado por la planta puede ser transferido al hongo (Sylvia, 2005). En otros cultivos de leguminosas la coinoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrízicos mejora la colonización radical, la fijación de nitrógeno, el crecimiento y el rendimiento (Bhattarai *et al.*, 2011; Ngakou *et al.*, 2012).

La coinoculación de *A. brasilense* y *R. intraradices* indujo el porcentaje mayor de colonización micorrízica en el sustrato suelo y arena (22.4 ± 2.2) y en pulpa de café fue semejante a la inoculación sola de *R. intraradices*. Estos valores confirman la capacidad de colonización de *R. intraradices*, como ha sucedido también en otros cultivos anuales y perennes (Wright *et al.*, 2005, Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011), sin embargo es de esperarse que la simbiosis de micorriza arbuscular difiere ampliamente en los niveles de colonización (Sylvia, 2005) debido a la interacción de diversos factores ambientes y de manejo (Andrade *et al.*, 2009).

La inoculación de *R. intraradices* favoreció la colonización radical desde los 28 ddt en los dos sustratos, con ligero in-

nisms present in the rhizosphere decreases with distance from the root (Kennedy, 2005).

At the beginning of assessment, there were small differences of around 2 % in root colonization in the treatments inoculated with one organism; the lowest value was found in the control in soil-sand substrate (4.4 %). In the following sampling, in both soil conditions, the average value of colonization in the control was 15.3 %, which varied in later samplings from 17.4 ± 1.3 and 18.3 ± 2.1 in soil-sand and soil-coffee pulp substrates, respectively. The high level of mycorrhizal colonization does not seem to be related to induction of vegetative development of the coffee plant.

Mycorrhizal colonization where *R. intraradices* was not inoculated confirms the presence of endomycorrhizal fungi in the substrate. In the soil-sand substrate an average of 18,000 spores were found, while 33,000 spores per 100 g of soil were found in the soil-pulp substrate. In this respect, the number of spores should not be a limiting factor, but the lower induction of development of these plants suggests a differential effect in the capacity to stimulate coffee plant growth. Cuenca *et al.* (2007) reports an increase of 37 % in the number of spores produced in sand, compared with a substrate in which rice hulls were added. In our case, the increase was in the order of 83 %. The increase in spore production in the soil-pulp substrate suggests that it provides a micro habitat that is more favorable for sporulation. It is probable that this condition of a larger number of spores is related to the higher content of organic matter in the substrate, which has been interpreted as a mechanism that favors survival of spores exposed to adverse environmental conditions (Cuenca *et al.*, 2007).

Inoculation with *A. brasilense* slightly increased mycorrhizal colonization of the fungi present in the substrate, relative to the control; average root colonization was 18.2 ± 1.74 in soil-sand substrate and 20.5 ± 1.73 in soil-coffee pulp. There is evidence that mycorrhizae interact with a broad variety of organisms in the rhizosphere, such as diazotrophs. However, the demand for carbohydrates increases with coinoculation with more than one microorganism. It has been estimated that around 20 % of the total carbon assimilated by the plant can be transferred to the fungus (Sylvia, 2005). In other leguminous crops co-inoculation of nitrogen fixing bacteria and mycorrhizal fungi improves root colonization, nitrogen fixation, growth and yield (Bhattarai *et al.*, 2011; Ngakou *et al.*, 2012).

Co-inoculation with *A. brasilense* and *R. intraradices* induced the highest percentage of mycorrhizal colonization in the soil-sand substrate (22.4 ± 2.2) and in soil-coffee pulp it was similar to inoculation with *R. intraradices* alone. These values confirm the colonizing capacity of *R. intraradices*, as has also been observed in other annual and perennial crops (Wright *et al.*, 2005, Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). However, it would be expected that arbuscular mycorrhizal symbiosis differs widely in levels of colonization (Sylvia, 2005) due to the interaction of diverse environmental and

cremento cuando se adicionó pulpa de café. En los muestreos siguientes, el porcentaje de colonización encontrado se mantuvo en promedio de $20.9 \pm 0.82\%$ en suelo y arena, y $25.0 \pm 1.88\%$ en suelo con pulpa de café. Es probable que la mayor colonización inicial en el suelo con pulpa de café derivara en menor crecimiento radical, al considerar que la colonización demanda fotosintatos para su establecimiento y este hecho se revirtió en el sustrato a base de suelo y arena al incrementarse la colonización en los siguientes muestreos.

El peso seco de la hoja también fue superior en el sustrato de suelo con arena durante los muestreos a 56 y 84 ddt, y a 140 ddt, lo fue el sustrato suelo con pulpa de café ($P \leq 0.05$), (Cuadro 2). En esta variable, también la mayor biomasa seca se registró con la inoculación individual de los microorganismos. Entre tratamientos no se encontró respuesta consistente en esta variable, solamente al final del estudio se presenta mayor asignación de biomasa en hoja en las plantas inoculadas con *A. brasilense* y diferentes al resto de los tratamientos ($P \leq 0.05$). En ambos sustratos los tratamientos testigo presentaron menor contenido de biomasa seca en hoja. El efecto de mayor inducción de la biomasa de la hoja después de los cuatro meses de estudio con *Azospirillum*, también lo citan Chattopadhyay *et al.* (2006) en *C. canephora* en condiciones de campo y Aguirre-Medina, *et al.* (2011) en *Coffea arabica* cv. oro Azteca en el mismo tipo de suelo, pero en cacao se encontró incremento consistente en la biomasa de las hojas con *Azospirillum* en vivero (Aguirre-Medina *et al.*, 2007). La inducción en mayor desarrollo de lámina foliar con los microorganismos *A. brasilense* y *R. intraradices* en coinoculación ha sido evidente en cultivos anuales (Aguirre-Medina, 2006). El área foliar de las plantas de café presenta diferencias entre sustratos a partir de los 84 ddt, y en este caso lo fue el suelo con arena y en los siguientes muestreos la diferencia se presentó con el suelo más pulpa de café ($P \leq 0.05$). Al inicio de la evaluación, a los 56 y 84 ddt la mayor área foliar se encontró con el tratamiento *R. intraradices*, y de los 112 a los 140 ddt con *A. brasilense*, en ambos casos fueron diferentes ($P \leq 0.05$). El incremento en el área foliar del *C. canephora* también fue encontrado por Chattopadhyay *et al.* (2006) con la inoculación de *A. brasilense*. En el caso de *R. intraradices*, también se incrementó en condiciones de vivero en cacao y café y (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). Al respecto Sylvia (2005) cita que las plantas después de la colonización micorrízica incrementan su actividad fotosintética. Aun cuando se ha indicado que la simbiosis micorrízica arbuscular carece de especificidad taxonómica (Cuenca *et al.*, 2007) parece suceder que se presenta cierta compatibilidad funcional entre la planta, el sustrato y los microorganismos introducidos, y existen combinaciones de microorganismos que funcionan mejor en determinada planta huésped.

La mayor asignación de biomasa al tallo se presentó en los tratamientos inoculados con los microorganismos desde los 28 ddt y se mantuvo en esta tendencia hasta el final de la evaluación. El peso seco del tallo principal fue mayor

management factors (Andrade *et al.*, 2009).

Inoculation with *R. intraradices* favored root colonization as of 28 dat in the two substrates, slightly higher with soil-pulp substrate. In the following samplings, the percentage of colonization found remained at an average of $20.9 \pm 0.82\%$ in soil-sand and $25.0 \pm 1.88\%$ in soil-coffee pulp. It is likely that the higher initial colonization in soil with coffee pulp derived in less root growth considering that colonization demands photosynthates for establishment, but this fact was reversed in the soil-sand substrate since colonization increased in the following samplings.

Leaf dry weight was also higher in the soil-sand substrate during the samplings 56 and 84 dat, and at 140 dat it was higher in the soil-coffee pulp substrate ($P \leq 0.05$), (Table 2). For this variable, the highest dry biomass weight was also recorded for individual inoculation. There was no consistent response in terms of this variable until the end of the study when there was higher allotment of biomass in the leaves of plants inoculated with *A. brasilense*, different from the rest of the treatments ($P \leq 0.05$). In both substrates, the control treatments had lower content of dry biomass in leaves. The effect of greater induction of leaf biomass after four months of study with *Azospirillum* is also reported by Chattopadhyay *et al.* (2006) on *C. canephora* in the field and Medina, *et al.* (2011) on *Coffea arabica* cv. oro Azteca in the same type of soil, but in cacao, consistent increments of leaf biomass was found with *Azospirillum* in the nursery (Aguirre-Medina *et al.*, 2007). Induction of greater development of leaf lamina by co-inoculation with the microorganisms *A. brasilense* and *R. intraradices* has been evidenced in annual crops (Aguirre-Medina, 2006). Leaf area of coffee plants showed differences between substrates as of 84 dat. At this sampling date, leaf area was higher in soil-sand substrate, but in the following samplings, it was higher with soil-coffee pulp substrate ($P \leq 0.05$). At the beginning of assessment, at 56 and 84 dat, larger leaf area was found in the treatment with *R. intraradices*, and from 112 to 140 dat it was greater in that with *A. brasilense*; in both cases the differences were significant ($P \leq 0.05$). An increase in leaf area of *C. canephora* inoculated with *A. brasilense* was also found by Chattopadhyay *et al.* (2006). With *R. intraradices*, leaf area also increased in cacao and coffee under nursery conditions (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). In this respect, Sylvia (2005) reports that, after mycorrhizal colonization, plants increase photosynthetic activity. Even though it has been indicated that arbuscular mycorrhizal symbiosis lacks taxonomic specificity (Cuenca *et al.*, 2007), there seems to be a certain functional compatibility among plant, substrate and introduced microorganisms, and there are combinations of microorganisms that function better with a given host plant.

The greatest allotment of stem biomass was found in the inoculated treatments as of 28 dat. This trend continued to the end of assessment. Dry weight of the main stem was higher with the introduction of *G. intraradices* and *A. brasilense* alone or in combination between 56 and 84 dat, relative to the

cuando se introdujeron *G. intraradices* y *A. brasilense* solos o combinados entre los 56 y 84 ddt en comparación con el testigo (Cuadro 2). La diferencia en la influencia del sustrato, fue semejante con las otras variables, al inicio el mayor desarrollo vegetal se presentó en el sustrato suelo y arena, y al final de la evaluación en el sustrato donde se adicionó la pulpa de café. Esto puede ser posible, según Sylvia (2005) debido a la producción de enzimas hidrolíticas, como proteasas y fosfatasa de la hifa extramatricial, las cuales pueden tener un impacto importante en la mineralización de la MO y la disponibilidad de nutrientes.

La biomasa total de las plantas inoculadas con los microorganismos fue muy superior a los testigos en ambos sustratos. Así como en otros cultivos, la promoción del crecimiento en las plantas de café ha sido atribuida principalmente a los efectos de la nutrición de la simbiosis. El mayor incremento en la producción de biomasa total se presentó en las plantas que se inocularon con *A. brasilense* durante toda la evaluación y solamente al final del estudio el tratamiento inoculado con *R. intraradices* fue estadísticamente igual a *A. brasilense* y diferentes al resto ($P \leq 0.05$).

Concentración de Fósforo

La concentración de fósforo en las plantas de café fue superior en los tratamientos inoculados con microorganismos solos o en conjunto en comparación con el testigo (Figura 2).

En el sustrato de suelo y arena con la inoculación de *R. intraradices* se presentó la mayor concentración de P. Diversos autores han demostrado que las plantas micorrizadas de café absorben fósforo del suelo más eficientemente que las plantas no colonizadas (Chattopadhyay et al., 2006; Aguirre-

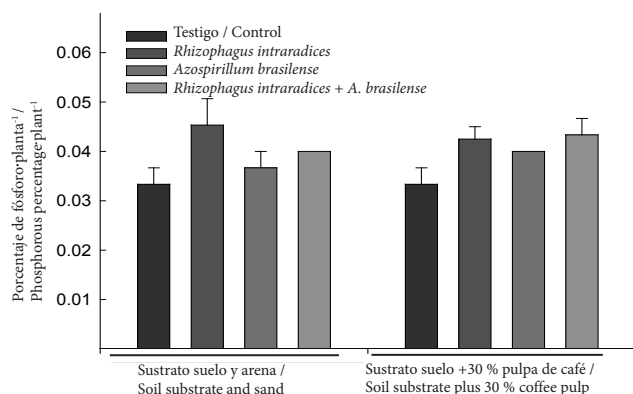


FIGURA 2. Concentración de fósforo en plantulas de *Coffea canephora* P. inoculadas con *A. brasilense* o *G. intraradices* en un andosol-mólico del Soconusco, Chiapas, México. La línea vertical indica \pm el error estándar de cuatro repeticiones a los 140 ddt.

FIGURE 2. Phosphorus concentration in *Coffea canephora* P. seedlings inoculated with *A. brasilense* or *G. intraradices* in a mollic andosol soil from Soconusco, Chiapas, Mexico. The vertical line indicates \pm the standard error of four replications at 140 ddt.

control (Table 2). The difference in the effect of the substrate was similar to the other variables. At the beginning there was more vegetative development in the soil-sand substrate, and at the end of assessment it was greater in the substrate with coffee pulp. According to Sylvia (2005), this is possible because of the production of hydrolytic enzymes, such as protease and phosphatase, by extra-matrix hyphae, which can have an important impact on OM mineralization and nutrient availability.

Total biomass of the inoculated plants was much higher than the controls in both substrates. As in other crops, promotion of coffee plant growth has been attributed mainly to the effects of symbiotic nutrition. The greater increase in the production of total biomass occurred in the plants inoculated with *A. brasilense* during almost the entire assessment period; only at the end of the study was the value resulting from inoculation with *R. intraradices* statistically equal to that of *A. brasilense* and different from the rest ($P \leq 0.05$).

Phosphorus concentration

Phosphorus concentration in coffee saplings was higher in treatments inoculated with microorganisms, alone or combined, relative to the control (Figure 2).

In the soil-sand substrate, inoculation with *R. intraradices* induced the highest concentration of P. Several authors have demonstrated that coffee plants colonized by mycorrhizae absorb phosphorus from the soil more efficiently than non-colonized plants (Chattopadhyay et al., 2006; Aguirre-Medina et al., 2011) because the capacity of hyphae to explore a larger volume of substrate allows the plant to absorb nutrients more efficiently than a non-mycorrhized root system (Sylvia, 2005). Phosphorus is the nutrient that is most transported by mycorrhizal fungi (Smith et al., 2003; Andrade et al., 2009). Co-inoculation with *R. intraradices* and *A. brasilense* also exhibited efficiency in transporting phosphorus to the plant in both substrates.

In the case of soil-sand substrate with a lower concentration of phosphorus, it would be expected to find a lower concentration in plant tissue. However, it has been demonstrated that the fungal hyphae have more affinity for the phosphate ion when its concentration in the solution is low (Tajini and Drevon, 2012), and in production systems with low inputs, mycorrhizal activity is more effective (Grant et al., 2005), especially in low fertility soils (Mudge et al., 2003).

Siqueira et al. (1993) pre-inoculated *Coffea arabica* L. seedlings with a mixture of *G. clarum* and *Gigaspora margarita*, which favored plant P absorption and increased survival and production in the field. This effect on the use of phosphorus is especially important because it can reduce the need to apply inorganic phosphate fertilizers, particularly in the nursery phase.

Medina *et al.*, 2011), debido a la capacidad de las hifas para explorar mayor volumen de sustrato y con más eficiencia en comparación con un sistema radical no micorrizado (Sylvia, 2005). El fósforo es el nutriente que más se transporta por los hongos micorrízicos (Smith *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2009). La coinoculación de *R. intraradices* con *A. brasilense* también demostró eficiencia en el transporte de fósforo a la planta en ambos sustratos. En el caso del sustrato suelo y arena con menor concentración de fósforo en el suelo, podría esperarse menor concentración en el tejido vegetal, sin embargo, se ha consignado que las hifas fúngicas tienen mayor afinidad por el ion fosfato cuando su concentración es baja en la solución (Tajini y Drevon, 2012) y en sistemas de producción de bajos insumos la actividad de la micorriza es más efectiva (Grant *et al.*, 2005), especialmente en suelos de baja fertilidad (Mudge *et al.*, 2003).

Siqueira *et al.* (1993) preinocularon plántulas de café *Coffea arabica* L. con una mezcla de *G. clarum* y *Gigaspora margarita* favoreciendo la absorción de P por la planta, así como el aumento en la sobrevivencia y la producción en campo. Este efecto en la utilización del fósforo es especialmente importante, porque puede reducir la necesidad de aplicación del fertilizante fosforado de origen inorgánico, especialmente en la fase de vivero.

CONCLUSIONES

La inoculación del *C. canephora* en vivero con alguno de los microorganismos inoculados individualmente favoreció el crecimiento y la asignación de materia seca de los componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en comparación con el testigo sin inocular.

A. brasilense promovió mayor acumulación de biomasa al inicio, mientras que *R. intraradices* resultó superior al final del estudio.

La mayor colonización micorrízica de *R. intraradices* se presentó en el primer tercio de la raíz, y en estas plantas se incrementó la concentración de fósforo en el tejido vegetal.

LITERATURA CITADA

- AGUIRRE-MEDINA, J.F.; KOHASHI-SHIBATA, J. 2002. Componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento, dinámica de la colonización micorrízica y contenido de fósforo en frijol *Phaseolus vulgaris* L. Agricultura Técnica en México 28(1): 23-33.
- AGUIRRE-MEDINA, J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tuxtla Chico, Chiapas, México. 201 p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3633/2535%20biofertilizantes%20microbianos.pdf?sequence=1>
- AGUIRRE-MEDINA, J. F.; MENDOZA-LÓPEZ, A.; CADENA-

CONCLUSIONS

Inoculation of *C. canephora* in the nursery with either of the microorganisms alone favored growth and dry matter allotment to morphological and physiological yield components relative to the uninoculated control.

A. brasilense promoted accumulation of more biomass at the beginning of the assessment period, while *R. intraradices* was superior at the end of the study.

Greater mycorrhizal colonization of *R. intraradices* occurred in the first third of the root and in these plants the concentration of phosphorus increased in plant tissue.

End of English Version

- IÑIGUEZ, J.; AVENDAÑO-ARRAZATE, C. 2007. La Biofertilización del cacao (*Theobroma cacao*) L. en vivero con (*Azospirillum brasilense*) Tarrand, Krieg et Döbereiner y (*Glomus intraradices*) Schenk et Smith. Interciencia 32(8): 1-6. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932808>
- AGUIRRE-MEDINA, J. F.; MOROYOQUI-OVILLA, D. M.; MENDOZA-LÓPEZ, A.; CADENA-IÑIGUEZ, J.; AVENDAÑO-ARRAZATE, C. H.; AGUIRRE-CADENA, J. F. 2011. Hongo endomicorrízico y bacteria fijadora de Nitrógeno inoculadas a *Coffea arabica* en vivero. Agronomía Mesoamericana 22(1): 71-80. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v22n01_071.pdf
- ANDRADE, S. A. L.; MAZZAFERA, P.; SCHIAVINATO, M. A.; SILVEIRA, A. P. D. 2009. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. Journal of Agricultural Science 147(2): 105-115. doi:10.1017/S0021859608008344
- ANÓNIMO. 2000. SAS/STAT user's Guide: Ver 8.1 SAS Institute Inc. Cary NC.
- AUGÉ, R. M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. Canadian Journal of Soil Science 84(4): 373-381. doi: 10.4141/S04-002
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, LUZ, E. 2010. Chapter Two-How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. Advances in Agronomy 108: 77-136. doi: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8
- BHATTARAI, N.; BARAL, B.; SHRESTHA, G.; YAMI, K. D. 2011. Effect of mycorrhiza and rhizobium on *Phaseolus vulgaris* L. Scientific World 9(9): 66-69. http://www.academia.edu/1088389/EFFECT_OF_MYCORRHIZA_AND_RHIZOBIUM_ON_PHASEOLUS_VULGARIS_L
- CHATTOPADHYAY, N.; SWAIN, S.; HORE, J. K. 2006. Response of Coffee Seedlings to Nitrogen Fixing Biofertilizers. Agricultural Science Digest 26(2): 103-106. <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:asd&volume=26&issue=2&article=007>
- CUENCA, G.; CÁCERES, A.; OIRDOBRO, G.; HASMY, Z.; URDANETA, C. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropica-

- les. Interciencia 32(1): 23-29. http://www.interciencia.org/v32_01/23.pdf
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKÓN J. 2001. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22(2): 107-149. doi:10.1080/713610853
- DONG, L. Q; ZHANG, K. Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party Interaction. Plant and Soil 288(1-2): 31-45. doi: 10.1007/s11104-006-9009-3
- DANIELL, T.; HUSBAND, J. R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. 2003. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. FEMS Microbiology Ecology 36(2-3): 203-209. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00841.x
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from the soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46(2): 235-244. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- GRANT, C.; BITTMAN, S.; MONTREAL, M.; PLENCHETTE, C.; MOREL, C. 2005. Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. Canadian Journal of Plant Science 85(1): 3-14. doi: 10.4141/P03-182
- IRIZAR G., M. B.; VARGAS V., P.; GARZA G., D.; TUT C., C.; ROJAS M., I.; TRUJILLO C., A.; GARCÍA S., R.; AGUIRRE M., D.; MARTÍNEZ G., J. C.; ALVARADO M., S.; GRAJEDA C., O.; VALERO G., J.; AGUIRRE M., J. F. 2003. Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. Agricultura Técnica en México 29(2): 213-225. <http://www.redalyc.org/pdf/608/60829211.pdf>
- HARRIER, L. A.; WATSON, C. A. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. Pest Management Science 60(2): 149-157. doi: 10.1002/ps.820
- HERNÁNDEZ, W.; SALAS, E. 2009. La Inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. Agronomía Costarricense 33(1): 17-30. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v33n01-017.pdf
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. 2004. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil 331(1-2): 413-425. doi: 10.1007/s11104-009-0262-0
- KENNEDY, A. C. 2005. Rhizosphere, pp. 242-262. In: Principles and Applications of Soil Microbiology. SYLVIA, M. D.; FUHRMANN, J. J.; HARTE, G. P.; ZUBERER, A. D. (eds.). Second Edition. Pearson Prentice Hall. New Jersey, USA.
- LEBRON, L.; LODGE, D. J.; BAYMAN, P. 2012. Differences in arbuscular mycorrhizal fungi among three coffee cultivars in Puerto Rico. ISRN Agronomy 2012: 1-7. doi: 10.5402/2012/148042
- MUDGE, S. R.; SMITH, F. W.; RICHARDSON, A. E. 2003. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. Plant Science 165(4): 871-878. doi: 10.1016/S0168-9452(03)00286-3
- NGAKOU, A.; NGO N., L.; DOLOUM, G.; ADAMOU, S. 2012. Mycorrhiza-*Rhizobium-Vigna subterranea* dual symbiosis: Impact of microbial symbionts for growth and sustainable yield improvement. International Journal of Agriculture and Biology 14(6): 915-921. http://www.fspublishers.org/published_papers/56823_.pdf
- PÉREZ, A.; BUSTAMANTE, C.; RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, A.; BERTOT, M.; RODRÍGUEZ, I. 2002. Influencia de diferentes variantes de fertilización en el crecimiento y desarrollo de posturas de *Coffea canephora* Pierre. Cultivos Tropicales 23(4): 89-93. <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193218135012.pdf>
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55(1): 158-161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- RILLIG, M. C.; MUMMEY, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist 171(1): 41-53. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x
- SERRALDE O., A. M.; RAMÍREZ G., M. M. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz *Zea mays* cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. Revista Corpoica 5(1): 31-40. <http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/48629/48629.pdf>
- SIEVERDING, E. 1989. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment 29(1-4): 369-390. doi: 10.1016/0167-8809(90)90303-U
- SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; GUIMARAES, P. T.G.; OLIVEIRA, E. 1993. Crescimento de mudas e producao do cafeeiro sob influencia de fungos micorrizicos e superfosfato. Revista Brasileira de Ciencia do Solo 17(1): 53-60.
- SMITH, S. E.; SMITH, F. A.; JAKOBSEN, I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plant irrespective of growth responses. Plant Physiology 133(1): 16-20. doi: 10.1104/pp.103.024380
- SYLVIA, M. D. 2005. Mycorrhizal symbioses, pp. 263-282. In: Principles and Applications of Soil Microbiology. SYLVIA, M. D.; FUHRMANN, J. J.; HARTE, G. P.; ZUBERER, A. D. (eds.). Second Edition. Pearson Prentice Hall. New Jersey, USA.
- TAJINI, F.; DREVON, J. J. 2012. Phosphorus use efficiency in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as related to compatibility of association among arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. African Journal of Biotechnology 11(58): 12173-12182. doi: 10.5897/AJB12.603
- TRISTÃO, F. S. M.; LOPEZ A., S. A.; SILVEIRA, A. P. D. 2006. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. Bragantia 65(4): 649-658. doi: 10.1590/S0006-87052006000400016.
- WRIGHT, D. P.; SCHOLLES, J. D.; READ, D. J.; ROLFE, S.A. 2005. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. New Phytologist 167(3): 881-896. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01472.x