



## Los rizobios incrementan la germinación de las semillas de *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Segunda evidencia en Cuba<sup>1</sup>

### Rhizobia increases the germination of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* seeds. Second evidence in Cuba

Sucleidi Nápoles-Vinent<sup>2</sup>, Silfredo Milanés-Riquene<sup>3</sup>, Ionel Hernández-Forte<sup>4</sup>, Belkis Morales-Mena<sup>4</sup>,  
María Caridad Nápoles-Garcías<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Recepción: 15 de febrero, 2021. Aceptación: 16 de agosto, 2021. Este trabajo formó parte de una tesis de pregrado respaldada y financiada por la Universidad de Oriente.

<sup>2</sup> Universidad de Oriente, Avenida Las Américas s/n Santiago de Cuba, Cuba. [sucleidi.napoles@nauta.cu](mailto:sucleidi.napoles@nauta.cu) o [sucleidis@uo.edu.cu](mailto:sucleidis@uo.edu.cu) (autor para la correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-3533-2956>).

<sup>3</sup> Empresa Agroforestal San Luis, Km 1 ½ de Chile municipio San Luis, Santiago de Cuba, Cuba. [produccion@agrofsl.scu.minag.cu](mailto:produccion@agrofsl.scu.minag.cu) (<https://orcid.org/0000-0002-9528-1620>).

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Mayabeque, San José, Cuba. [tere@inca.edu.cu](mailto:tere@inca.edu.cu) (<https://orcid.org/0000-0003-1413-1717>); [ionel03@nauta.cu](mailto:ionel03@nauta.cu) (<https://orcid.org/0000-0002-5760-816X>); [bmorales@inca.edu.cu](mailto:bmorales@inca.edu.cu) (<https://orcid.org/0000-0001-6626-8390>).

## Resumen

**Introducción.** La lenta y asincrónica germinación de las semillas de café afecta la obtención de plántulas e incrementa los gastos asociados a la producción. La aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) ha mostrado ser una alternativa ante esta problemática. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la inoculación de rizobios en la germinación de dos cultivares de café en condiciones controladas y productivas. **Materiales y métodos.** Durante enero y febrero del 2020, se desarrollaron dos experimentos en la Universidad de Oriente, Cuba, en el que se emplearon diez cepas de rizobios, provenientes de leguminosas y gramíneas, y dos cultivares de café de importancia económica en Cuba: *Coffea arabica* cultivar (cv.) Isla 5-15 y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner cultivar (cv.) Robusta. Los experimentos se realizaron uno en condiciones controladas, donde la germinación de las semillas se evaluó en placas Petri y otro donde se emplearon canteros pregerminadores. En ambos experimentos se empleó un diseño completamente aleatorizado y se realizó un análisis de varianza. **Resultados.** En condiciones controladas, la inoculación de las cepas Rpr11, Rpr2, 1-2, ICA8001 y Can3, incrementaron el porcentaje de germinación, la energía germinativa, el índice de germinación, el índice de velocidad de germinación y el índice de vigor. En los canteros pregerminadores, los inoculantes a base de las cepas Rpr2 y Rpr11 produjeron los mayores porcentajes de emergencia y de energía de germinación. **Conclusión.** Las cepas Rpr2 y Rpr11 de *Rhizobium*, incrementaron la germinación de las semillas de dos variedades de café.

**Palabras claves:** café, inoculación, *Rhizobium*, fitohormonas.

## Abstract

**Introduction.** The slow and asynchronous germination of coffee seeds affects the obtaining of seedling and increases production costs. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) has shown to be an



alternative to this problem. **Objective.** To evaluate the effect of rhizobia inoculation on the germination of two coffee cultivars under controlled and productive conditions. **Materials and methods.** During January and February 2020, two experiments were carried out at the Universidad de Oriente, Cuba, using ten rhizobia strains from legumes and grasses, and two coffee cultivars of economic importance in Cuba: *Coffea arabica* Isla 5-15 and *Coffea canephora* Pierre ex Froehner Robusta cultivars. The experiments were conducted, one under controlled conditions, where seed germination was evaluated in Petri dishes, and the other one using pre-germination beds. In both experiments, a completely randomized design was used and an analysis of variance was performed. **Results.** Under controlled conditions, the inoculation of strains Rpr11, Rpr2, 1-2, ICA8001, and Can3 increased germination percentage, germination energy, germination index, germination speed index, and vigor index. In the pre-germination beds, the inoculants based on the Rpr2 and Rpr11 strains produced the highest percentages of emergence and germination energy. **Conclusion.** The Rhizobium strains Rpr2 and Rpr11 increased seed germination of two varieties of coffee.

**Keywords:** coffee, inoculation, *Rhizobium*, phytohormones.

## Introducción

El cultivo del café (*Coffea arabica* L.) resulta de gran importancia para países en desarrollo. Se estima que el procesamiento y comercialización de sus frutos movilizan más de 15 mil millones de dólares anuales para los países exportadores y constituye una fuente de trabajo para más de 20 millones de personas en el mundo (Canet Brenes et al., 2016). Como bebida, disfruta de ella un número cada vez mayor de interesados de todo el mundo y el consumo continúa en crecimiento con una tasa anual en 2019 del 2,2 % (Organización Internacional del Café, 2019).

La propagación del café, en la mayoría de los países productores, se realiza de manera sexual, a través de semillas. Para ello, es necesario establecer germinadores y viveros que permitan obtener plántulas que se trasplantarán en el menor tiempo posible. Esta técnica se emplea para reproducir la especie *Coffea arabica* L., y permite obtener una mayor homogeneidad en las plantas (Zhirvi Ordeñez, 2016).

La utilización de semillas de café de alta calidad, se considera uno de los principales factores que afecta la obtención de posturas más vigorosas. En el proceso influyen la rápida pérdida de la viabilidad de la semilla y, con ello, la disminución de los índices de germinación, lo que redundaría en una menor productividad del cultivo (Castilla Valdés, 2012).

Los rizobios son rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), muchas de ellas diazotróficas, que se han estudiado por su capacidad de establecer una relación simbiótica con las plantas leguminosas, a partir de la cual la planta se beneficia del nitrógeno fijado por la bacteria y esta utiliza los carbohidratos provenientes de la fotosíntesis (Luyten & Vanderleyden, 2000). Estudios recientes informan que los rizobios no solo establecen una interacción beneficiosa con las leguminosas, sino también con gramíneas como el arroz (*Oryza sativa* L.) (Wu et al., 2018), el maíz (*Zea mays* L.) (Tchakounté et al., 2018) y el trigo (*Triticum* spp.) (Bantu, 2016).

La inoculación de rizobios promueve la germinación de semillas de moringa (*Moringa oleifera* Lam), zanahoria (*Daucus carota* L.), pimiento (*Capsicum annum* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Bécquer et al., 2018; Blanco et al., 2018; Marquina et al., 2018). Sin embargo, en el cultivo del café, las investigaciones son escasas a nivel mundial. En Cuba, solo se ha publicado un estudio donde se demuestra el incremento de la germinación y el desarrollo de plántulas de *C. arabica* cultivar Caturra rojo, luego de ser tratadas con Bioenraiz®, el cual es un producto formulado a base de auxinas y obtenido a partir de una cepa de *Rhizobium* sp., aislada de ambiente natural, (González Vega et al., 2015). Se desconoce el efecto de nuevos inoculantes a base de rizobios en la germinación de las semillas de café, sin la extracción del ingrediente activo.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de rizobios en la germinación de dos cultivares de café en condiciones controladas y productivas.

## Materiales y métodos

Durante enero y febrero del 2020, se realizaron dos experimentos, uno en condiciones *in vitro* en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Oriente y el otro en condiciones productivas. Este último, se desarrolló en el vivero de la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) La Caoba, la cual se subordina a la Empresa Agroforestal de San Luis, que pertenece al Ministerio de la Agricultura. El vivero está ubicado en la cordillera Zagua-Nipe-Baracoa, a 550 m.s.n.m., en el Municipio San Luis, Santiago de Cuba.

### Material biológico

Se emplearon semillas de dos cultivares de café: *Coffea arabica* L. cultivar Isla 5-15 (Isla 5-15) y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner cultivar Robusta (Robusta), los cuales se caracterizan por su alto y buen comportamiento productivo, por debajo de los 300 m.s.n.m. Se utilizaron, además, diez cepas de rizobios provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Las cepas provinieron de la rizosfera de plantas de arroz y maíz, así como de nódulos de soja (*Glycine max*), kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*) y Canavalia (*Canavalia ensiformis*). En estudios previos, se comprobó el efecto estimulador del crecimiento vegetal de muchas de estas cepas (Cuadro 1).

Se emplearon inóculos de las cepas de rizobios. Para ello, se partió de pre inóculos que se prepararon a partir de una asada de las cepas, conservadas a 4 °C en tubos con medio levadura manitol (LM), sólido compuesto por diferentes reactivos descritos por Vincent (1970), en frascos Erlenmeyers de 100 mL de capacidad que contenían 10 mL del mismo medio de cultivo líquido. Los pre inóculos se incubaron en condiciones de agitación en una zaranda termostalada (modelo HZQF200, China) a 150 rpm y 28 °C, en oscuridad durante 20 h para favorecer el crecimiento bacteriano. Se emplearon los pre inóculos para inocular Erlenmeyers de 500 mL de capacidad, que contenían 100 mL de medio LM estéril, los que se colocaron en condiciones de crecimiento similares a las antes descritas, para los pre inóculos. Los inoculantes presentaron una concentración celular de  $1 \times 10^{10}$  UFC mL en el momento en el que se emplearon. La concentración celular, expresada como unidades formadoras de colonias por volumen de medio (UFC mL), se determinó mediante el método de las diluciones decimales seriadas ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ ), las cuales se cultivaron en placas Petri con medio LM sólido y se incubaron durante 48 h a 30 °C.

### Efecto de la inoculación de rizobios en la germinación de semillas de café, en condiciones *in vitro*

Las semillas de café (*Coffea arabica* L.) cv. Isla 5-15 (Isla 5-15) y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner cv. Robusta (Robusta), se obtuvieron de la cosecha de frutos de café en pleno estado de madurez, los cuales se despulparon y, una vez fermentado por un período de 12 h, se procedió a lavar las semillas con abundante agua para eliminar el mucílago, luego se secaron a la sombra hasta alcanzar entre un 25 y 30 % de humedad, las cuales se almacenaron en una atmósfera no controladas durante seis meses.

Las semillas de ambos cultivares se sometieron a un tratamiento previo, descrito por Fernández Cerna (2015). Este consistió en retirar el endocarpo de las semillas, las cuales se desinfectaron. La desinfección consistió en sumergir las semillas en etanol al 70 % durante 3 min y luego se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Luego, las semillas se sumergieron en hipoclorito de sodio al 3 % (v/v), durante 3 min y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril.

**Cuadro 1.** Principales características de las diez cepas de rizobios que se emplearon en la investigación en la Universidad de Oriente y en el vivero de la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) La Caoba, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

**Table 1.** Main characteristics of the ten strains of rhizobia that were used in the investigation at the Universidad de Oriente and La Caoba Cooperative Production Basic Unit (UBPC) greenhouse, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

Cepa	Hospedero	Identidad (ARNr16S)	Características de interés	Referencia
Rpd3	Arroz	<i>Rhizobium</i> sp.	Solubilización de fosfato de calcio.	
Rpd16			Producción de compuestos indólicos.	
Rpr2			Polihidroxitiratos (PHB), promotor del crecimiento en arroz.	Corbera Gorotiza & Nápoles García (2011);
RPr11			Producción de compuestos indólicos y PHB, promotor del crecimiento de arroz.	Hernández et al. (2015); Hernández Forte & Nápoles García (2017; 2019)
ICA 8001	Soya	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Producción de compuestos indólicos y de la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) desaminasa Ingrediente activo del producto comercial Azofert-S.	
Can3	Canavalia	<i>Rhizobium</i> sp.	Tolerancia a la acidez.	Hernández et al. (2012; 2017)
1_2	kudzú tropical	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Producción de PHB, promoción del crecimiento del kudzu tropical y tolerancia a la acidez.	Hernández et al. (2013; 2020)
R10			Oxidasa y gelatinasa positivo.	
C1	Maíz	<i>Rhizobium</i> sp.	Metabolismo oxidativo.	Pérez-Pérez et al. (2019)
C19-2			Catalasa positiva. Metabolismo oxidativo.	

Las semillas de ambos cultivares de café, ya desinfectadas, se embebieron durante 30 min en los inoculantes bacterianos, a razón de 1 mL por semilla. Luego, se colocaron en placas Petri estériles (10,5 cm de diámetro) que contenían papel de filtro estéril, humedecido con 10 mL de agua destilada estéril. Se mantuvo la hidratación de las semillas con agua destilada estéril, hasta el final del experimento. Se empleó además un tratamiento control sin inocular. Se utilizaron tres placas por tratamiento, con dieciocho semillas cada una, las cuales se distribuyeron en tres columnas y seis filas en el interior de la placa Petri. Las placas se incubaron en una cámara de germinación (modelo RTOP, China), programada a  $22 \pm 2$  °C, 67 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad, durante 20 días. Transcurrido este tiempo se evaluó: el porcentaje de germinación (PG) (%) (Ede et al., 2015) y como criterio la aparición de la radícula; la energía germinativa (EG) (%) (Pece et al., 2010); el índice de germinación (IG), a partir del número de semillas germinadas cada día a la misma hora y solo se consideraron semillas con radícula (De Souza Lemos Neto et al., 2018). Los cálculos de esta variable siguieron la expresión descrita por Maguire (1962). Además, se determinó el índice de velocidad de germinación (IVG) (Terry Alfonso et al., 2014) y el índice de vigor (I) (López Medina & Gil Rivero, 2017). Para esta última variable se determinó la longitud de la raíz a sesenta semillas por tratamiento en cuatros momentos, durante ocho días.

## Efecto de la inoculación de rizobios en la germinación de semillas de café, en pregerminadores

Se emplearon semillas con alrededor de 12 % de humedad, sin desinfectar, de ambos cultivares de café procedentes del banco de semillas de la UBPC La Caoba y la inoculación se realizó similar a la efectuada en el ensayo en condiciones *in vitro*. Se emplearon las cepas de rizobios que se seleccionaron a partir de los mejores resultados obtenidos en el ensayo en condiciones controladas. Se empleó además un tratamiento control con semillas no inoculadas. Las semillas se sembraron en canteros pre germinadores (1,20 m de ancho x 0,30 m x 18 m de largo), que contenían 6 m<sup>3</sup> de arena de río lavada y tamizada con una malla de 2 x 2 de 11,7 mm de abertura y 1,04 mm de diámetro. La arena se desinfectó con 87 L m<sup>-2</sup> agua a punto de ebullición, durante 5 min y después se aplicó con una regadera hipoclorito de sodio al 3 % diluido (30 mL L<sup>-1</sup> de agua), se dejaron en reposo por dos días para que el cloro se evaporara o se lavara, antes de sembrar. Las semillas se colocaron a 1 cm de separación entre ellas y a 2,5 cm de profundidad, en surcos separados a 5 cm entre sí.

Se utilizaron dos canteros, uno para cada cultivar, los cuales contenían 400 semillas por cada tratamiento y se sometieron al 50 % de luz solar y se humedecieron con agua corriente durante todo el experimento.

A los 30 días se determinó: el porcentaje de emergencia (PE) (%), para lo cual se consideró el número de semillas emergidas, con relación al número total de semillas en el cantero pre germinador. Se tomó como criterio de emergencia la aparición del gancho del hipocótilo. Además, se evaluó la energía de emergencia de las semillas (EE) (%) según Barraza et al. (2016) en veinte semillas por tratamiento.

### Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos experimentales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de comparación de medias de Duncan, con significación de 95 %, para discriminar diferencias entre las medias. Se utilizó el paquete estadístico SSPS versión 21.0 para el procesamiento de los datos y el programa Microsoft Excel 2013, para su representación.

## Resultados

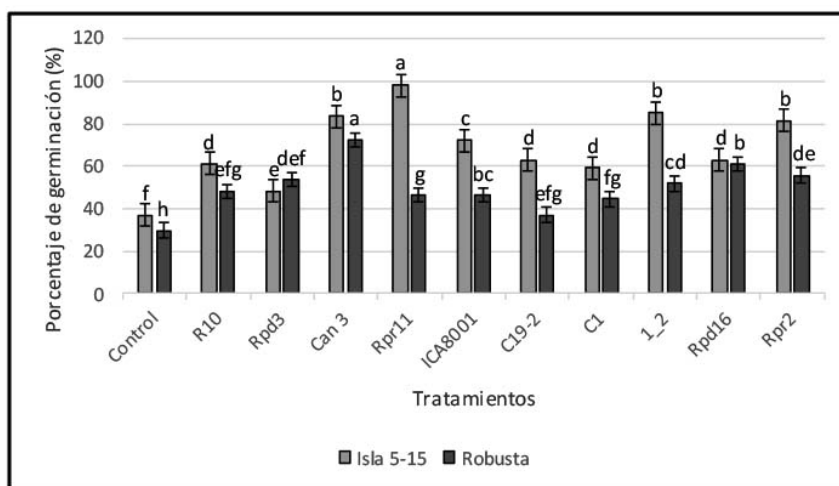
### La inoculación de rizobios incrementa la germinación de semillas de café en condiciones *in vitro*

Los resultados mostraron que el porcentaje total de semillas germinadas en ambos cultivares de café fue significativamente superior con la inoculación de todas las cepas de rizobios empleadas. En la mayoría de los tratamientos, hubo un mayor porcentaje de germinación de las semillas del cultivar Isla 5-15, en comparación con las semillas del cultivar Robusta (Figura 1).

En el cultivar Isla 5-15 los mayores porcentajes correspondieron al empleo de la cepa Rpr11, pues germinaron el 98 % de las semillas. Además, se destacaron los tratamientos donde se emplearon las cepas Can3, ICA8001, 1-2 y Rpr2, pero en menor medida que cuando se empleó la cepa Rpr11. En el cultivar Robusta, los mayores incrementos en la germinación de las semillas correspondieron a aquellos tratamientos donde se emplearon las cepas Can3, ICA8001 y Rpd16.

La inoculación de todas las cepas de rizobios incrementó significativamente la energía, el índice y la velocidad de germinación de las semillas de ambos cultivares de café en condiciones controladas de cultivo (Cuadro 2).

En el cultivar Isla 5-15, el empleo de las cepas Rpr11, ICA8001 y 1-2, produjo los mayores incrementos en la energía de germinación, sin diferencias significativas entre ellas. En el índice de germinación, las semillas



**Figura 1.** Efecto de la inoculación de cepas de rizobios en el porcentaje de germinación total de semillas de café cultivares: Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) y Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

Las líneas sobre las barras indican el intervalo de confianza (Duncan  $p < 0,05$ ,  $n = 33$ ).

**Figure 1.** Effect of the inoculation of rhizobia strains on the total germination percentage of coffee seeds cultivars Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) and Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), in the Plant Physiology laboratory of the Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

The lines above the bars indicate the confidence interval (Duncan  $p < 0.05$ ,  $n = 33$ ).

**Cuadro 2.** Efecto de la inoculación de rizobios en la energía, el índice y la velocidad de germinación de semillas de café cultivares: Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) y Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), en el laboratorio de Fisiología Vegetal Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

**Table 2.** Effect of rhizobia inoculation on energy, germination index and speed of coffee seed cultivars: Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) and Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), in the Plant Physiology laboratory of the Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

Tratamientos*	Isla 5-15			Robusta		
	EG (%)	IG (días <sup>-1</sup> )	IVG (semillas días <sup>-1</sup> )	EG(%)	IG (días <sup>-1</sup> )	IVG (semillas días <sup>-1</sup> )
Control	55,3 d	1,31e	4,13 d	56,74 e	0,82 f	3,87 e
R10	70,3 b	2,03 d	6,02 bc	71,533 ab	1,43 cde	5,62 abcd
Rpd3	62,9 c	2,12 d	7,16 a	70,3 abc	1,88 b	6,15 abc
Can 3	70,3 b	3,96 ab	5,30 c	75,233 a	2,28 a	6,58 a
Rpr11	78,933 a	4,29 a	7,00 ab	62,9 d	1,27 e	5,10 d
ICA8001	77,7 a	3,42 b	7,43 a	64,153 cd	1,4 bcd	6,25 ab
C19-2	69,067 b	2,72 c	7,09 ab	69,067 bc	1,36 de	6,22 abc
C1	67,833 bc	1,90 d	6,00 bc	66,6 bcd	1,92 b	5,21 cd
1-2	77,7 a	3,93 ab	6,69 ab	70,3 abc	1,81 b	6,04 abcd
Rpd16	69,067 b	2,06 d	5,98 bc	69,067 bc	1,94 b	5,55 bcd
Rpr2	71,867 b	4,19 a	7,51 a	65,367 bcd	1,69 bc	5,74 abcd
C.v	7,1563	1,08634	9,1372	5,5301	0,41234	7,1571
Ex	0,2458	0,18911	0,5906	0,9627	0,07178	0,2459

EG: energía de germinación, IG: índice de germinación e IVG: índice de velocidad de germinación. / EG: germination energy, IG: germination index and IVG: germination speed index.

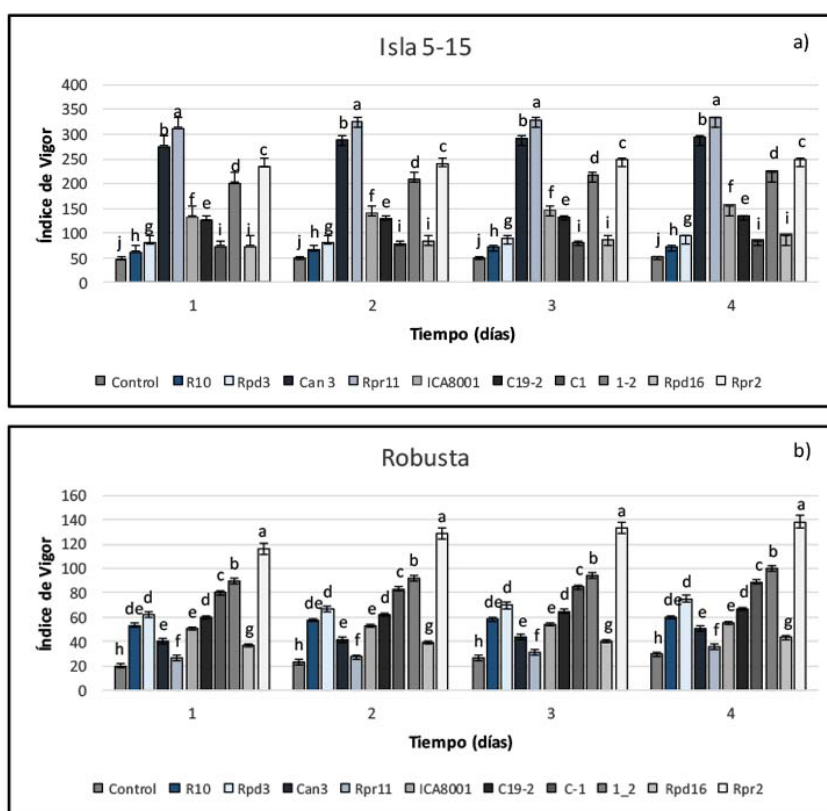
Media con letras iguales en la misma columna no difieren estadísticamente (Duncan  $p < 95\%$ ,  $n = 33$ ). / Mean with the same letters in the same column did not differ statistically (Duncan  $p < 95\%$ ,  $n = 33$ ).

\* cepas de rizobios. / \* rhizobia strains.

inoculadas con las cepas Rpr11 y Rpr2 superaron significativamente a las semillas tratadas con las restantes cepas. La inoculación de las cepas Rpd3, ICA8001 y Rpr2 incrementó significativamente el índice de velocidad de germinación, aunque no se diferenciaron estadísticamente de las semillas inoculadas con las cepas Rpr11, C19-2 y 1-2.

En el cultivar Robusta, la inoculación de la cepa Can3 produjo los mayores incrementos de la energía, el índice y la velocidad de germinación. En la primera de estas variables, las semillas inoculadas con las cepas R10, Rpd3 y 1-2, no difirieron estadísticamente de las que se trataron con la cepa Can3. Algo similar ocurrió en la velocidad de germinación con las semillas que se inocularon con las cepas R10, Rpd3, ICA8001, C19-2, 1-2 y Rpr2.

El efecto de la inoculación de rizobios en el vigor de las semillas de ambos cultivares de café mostró que la aplicación de todas las cepas de rizobios incrementó esta variable en las semillas de ambos cultivares, con diferencias significativas respecto al control (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto de la inoculación de cepas de rizobios en el índice de vigor de germinación de las semillas de café cultivares: (a) Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) y (b) Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), en el laboratorio de Fisiología Vegetal Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

Las líneas sobre las barras indican el intervalo de confianza Duncan,  $p < 0,05$ ,  $n = 60$ .

**Figure 2.** Effect of the inoculation of rhizobia strains on the germination vigor index of coffee seed cultivars: (a) Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) and (b) Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), in the Plant Physiology laboratory of Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

The lines above the bars indicate the Duncan confidence interval,  $p < 0.05$ ,  $n = 60$ .

En el cultivar Isla 5-15, la inoculación de la cepa Rpr11 produjo los valores más altos de índice de vigor de germinación en los cuatros momentos. Se destacaron además las semillas tratadas con las cepas Can3, 1-2 y Rpr2, con diferencias significativas con la cepa Rpr11 (Figura 2 a). En el cultivar Robusta, las semillas inoculadas con la cepa Rpr2 presentaron los mayores valores de la variable. La inoculación de las cepas C-1 y 1-2 también produjo un incremento de la variable, aunque con valores inferiores a los obtenidos con el empleo de la cepa Rpr2 (Figura 2 b).

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos en condiciones controladas, se seleccionaron las cepas Can3, 1-2, Rpr2 y Rpr11 para realizar estudios de su actividad promotora del crecimiento en el cultivo de café, en canteros pregerminadores.

### La inoculación de rizobios incrementa la germinación de semillas de café en el pregerminador

Hubo efecto de la inoculación de cepas de rizobios, seleccionadas como más promisorias en el experimento de germinación en condiciones controladas (Cuadro 3). Se pudo constatar un incremento significativo en el porcentaje y energía de germinación de las semillas de ambos cultivares de café, a partir de la inoculación con las cepas de rizobios.

**Cuadro 3.** Efecto de la inoculación de cepas de rizobios seleccionadas como más promisorias en el porcentaje de emergencia y la energía de germinación de semillas de café cultivares: Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) y Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), en condiciones productivas, vivero de la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) La Caoba, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

**Table 3.** Effect of the inoculation of rhizobia strains selected as more promising on the emergence percentage and germination energy of coffee seed cultivars: Isla 5-15 (*Coffea arabica* L.) and Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), under productive conditions, nursery of the Basic Unit of Cooperative Production (UBPC) La Caoba, Santiago de Cuba, Cuba. 2020.

Tratamientos*	Isla 5-15		Robusta	
	PE (%)	EE (%)	PE (%)	EE (%)
Control	84,0 d	63,25 d	82,0 b	62,0 e
Can3	94,0 bc	77,5 c	90,0 a	73,25 d
1-2	93,0 c	86,75 b	93,0 a	83,5 c
Rpr2	98,0 a	96,75 a	97,0 a	96,25 a
Rpr11	97,0 ab	96,0 a	94,0 a	91,50 b
Cv	6,2	11,5	9,22	10,58
Ex	0,0549	0,3624	0,0306	0,0644

PE: porcentaje de emergencia, EE: energía de germinación. / PE: emergency percentage, EE: germination energy.

Media con letras iguales en la misma columna no difieren estadísticamente (Duncan  $p < 95\%$ ,  $n=20$ ). / Mean with the same letters in the same column does not differ statistically (Duncan  $p < 95\%$ ,  $n=20$ ).

\* cepas de rizobio. / \* rhizobia strains.

El empleo de las cepas Rpr2 y Rpr11 produjo los mayores incrementos del porcentaje de emergencia y de la energía de germinación de las semillas del cultivar Isla 5-15. En el porcentaje de emergencia de las semillas del cultivar Robusta, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. La energía de germinación de las semillas de este cultivar inoculadas con la cepa Rpr2 superó al resto.



## Discusión

Hubo efecto favorable de la inoculación de rizobios en la germinación de dos cultivares de café en condiciones controladas y en la capacidad germinativa de semillas de café con reducida longevidad, conservadas bajo condiciones convencionales de almacenamiento. Aspectos que resultaron ser el precedente a la pérdida de la capacidad germinativa de las semillas correspondientes al tratamiento control, en el primer ensayo. El trabajo realizado sobre efecto del almacenamiento de las semillas de café (*Coffea arabica* L. var. Catuai amarillo) sobre la emergencia, informa que la capacidad de las semillas de café para germinar depende del grado de tolerancia a la pérdida de agua, al tiempo y las condiciones de almacenamiento (Arizaleta et al., 2005). En el estudio realizado sobre la conservación de recursos fitogenéticos de café (*Coffea* spp.), se dio a conocer que para el caso de esta especie vegetal, la conservación de sus semillas a través del método tradicional bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad, solo es posible a corto plazo, debido a que presentan determinadas características que dificultan su almacenamiento por un largo período (Castilla Valdés, 2012).

El trabajo fisiología de las semillas de café aborda que el contenido de humedad mínimo que toleran las semillas de *C. arabica* y *C. canephora*, sin reducir su viabilidad es de 9 y 11 %, respectivamente (Eira et al., 2006), y en la investigación de radiosensibilidad de café (*Coffea arabica* L. var. Typica) aplicado con radiación gamma, indicó que la semilla de café muestra una pérdida rápida de su viabilidad cuando se almacena con contenido muy alto (35 a 40 %) o bajo (12 a 15 %) de humedad en una atmósfera no controlada, ya que después de cinco meses en estas condiciones, el poder germinativo llega a ser menor del 60 % (Quintana, 2018).

El empleo de las cepas de rizobios incrementó algunas de las variables más importantes que se tienen en cuenta en los estudios de germinación de semillas de café, tanto en condiciones controladas como en el pregerminador. Investigaciones previas como: selección de rizobios por su efecto en la germinación y desarrollo incipiente de *Moringa oleifera* Lam. Fase I: condiciones controladas; germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e identificación molecular de las cepas y aislamiento y caracterización de metilobacterias de la filosfera de la hoja de tomate y su efecto en el crecimiento de las plantas (Bécquer et al., 2018; Blanco et al., 2018; Senthilkumar & Krishnamoorthy, 2017), informan valores similares a los que se obtuvieron en el presente estudio, en el porcentaje de germinación y emergencia de semillas en condiciones controladas y semicontroladas.

Los valores del porcentaje total de semillas germinadas en los cultivares de café aquí estudiados, superaron a los obtenidos en el cultivar de café Típica, inoculado con cepas de *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Fernández Cerna, 2015). Este autor informó alrededor de un 60 % de incremento en condiciones experimentales similares, mientras que en el presente estudio, algunas cepas de rizobios incrementaron la germinación en más del 70 %.

Investigaciones recientes sobre actividades probióticas de *Rizobium Laguerreae* sobre el crecimiento y la calidad de las espinacas, demostraron el efecto selectivo del genotipo de las plantas, expresado en sus exudados radicales, sobre la concentración y la diversidad estructural y funcional de las comunidades microbianas en la rizosfera (Jiménez-Gómez et al., 2018). Estos estudios permiten pensar que puede existir una mayor afinidad de los cultivares de café estudiados con las cepas Rpr2 y Rpr11, respecto al resto de las cepas de rizobio, lo que en alguna medida podría explicar el efecto positivo de ambas cepas en el porcentaje y velocidad de germinación de los cultivares de café utilizados en el presente estudio.

El efecto positivo que provocó la inoculación de rizobios en la germinación de café en ambas condiciones experimentales pudo deberse a un incremento de la actividad metabólica de las semillas, que provocó una promoción del crecimiento del embrión, lo cual es esencial para acelerar la germinación (Barraza et al., 2016; Kanwar et al., 2014); también pudo estar asociado al efecto positivo de las auxinas de origen microbiano en la emergencia de las semillas. Hay un efecto fitoestimulador que realizan las PGPB, como parte de los mecanismos que promueven el crecimiento vegetal. La producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA) y giberelinas por estas bacterias, favorecen la germinación de las semillas (Hernández Forte et al., 2015; Parray et al., 2016). El AIA es una

de las hormonas de mayor importancia por los efectos reguladores, participa en la división celular, la elongación y la diferenciación celular (Vega-Caledón et al., 2016). La división y el alargamiento celular en el embrión provoca la rotura de las cubiertas seminales, que por lo general se produce por la emergencia de la radícula que sale fuera del pergamino (Coa Urbaz et al., 2014).

Investigaciones previas demostraron que algunas cepas de las que se emplearon en la presente investigación, como Rpr11 y Rpr2, producen compuestos indólicos del tipo AIA (Hernández Forte & Nápoles García, 2019). La producción de estos compuestos podría haber influido en la germinación de las semillas de ambos cultivares de café. Estudios anteriores en Cuba informaron un incremento del porcentaje de germinación, el desarrollo fenológico y productivo de semillas de café cultivar Caturra rojo, tratadas con Bioenraiz®, bioproducto a base de hormonas producidas por una cepa de *Rhizobium* sp. (González Vega et al., 2015). Sin embargo, hasta ahora no existían evidencias que comprobaran el efecto estimulador de inoculantes a base de rizobios en el proceso de germinación de los cultivares de café empleados en la investigación.

## Conclusiones

Las cepas de rizobios Rpr2 y Rpr11, incrementaron la germinación de las semillas de dos cultivares de café de importancia económica en Cuba: Isla 5-15 y Robusta, tanto en condiciones controladas como en el pregerminador.

## Referencias

- Arizaleta, M., Montilla, J., & Pares, J. (2005). Efecto del almacenamiento de las semillas de café (*Coffea arabica* L. var. Catuai amarillo) sobre la emergencia. *Revista Facultad Agronomía*, 22(3), 205–213. <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/fagro/v22n3/art1.pdf>
- Bantu, N. N. K., Nagaraju, B., & Rao, Y. R. K. V. T. (2016). Isolation and purification of *Rhizobium* from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root nodules. *Journal of Biology and Today's World*, 5(2), 30–34. <https://www.iomcworld.org/abstract/isolation-and-purification-of-rhizobium-from-french-bean-phaseolus-vulgaris-l-root-nodules-3425.html>
- Barraza, A., Benavides, B., & Torres, M. (2016). Calidad fisiológica y energía de germinación de semillas de balsamina (*Momordica charantia* L.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1), 43–52. <http://doi.org/10.22267/rcia.163301.5>
- Bécquer, C. J., Cancio, T., Nápoles, J. A., Muir, I., Ávila, U., Álvarez, O., & Madrigal, Y. (2018). Selección de rizobios por su efecto en la germinación y desarrollo incipiente de *Moringa oleifera* Lam. Fase I: condiciones controladas. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4), 473–484.
- Blanco, E. L., Castro, Y., Olivo, A., Skwierinski, R., & Moronta, B. F. (2018). Germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e identificación molecular de las cepas. *Bioagro*, 30(3), 207–218.
- Canet Brenes, G., Soto Viquez, C., Ocampo Thomason, P., Rivera Ramírez, J., Navarro Hurtado, A., Guatemala Morales, G. M., & Villanueva Rodríguez, S. (2016). *La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), & Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ). <http://repositorio.iica.int/handle/11324/2792>
- Castilla Valdés, Y. (2012). Conservación de recursos fitogenéticos de café (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: Una alternativa para su preservación. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 29–39.

- Coa Urbaz, M., Méndez Natera, J. R., Silva Acuña, R., & Mundarain Padilla, S. (2014). Evaluación de métodos químicos y mecanismos para promover la germinación de fosforitos en café (*Coffea arabica*) var. Catuaí Rojo. *Idesia*, 32(1), 43–53. <http://doi.org/10.4067/S0718-34292014000100006>
- Corbera Gorotiza, J., & Nápoles García, M. C. (2011). Evaluación de la inoculación conjunta *Bradyrhizobium elkanii* hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya, cultivada en época de primavera. *Cultivos Tropicales*, 32(4), 13–19.
- De Souza Lemos Neto, H., de Almeida Guimarães, M., Do Nascimento Silva, B., Do Santos, C., & Medeiros Filho, S. (2018). Germinación y emergencia de lechuga a temperaturas elevadas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(3), 677–684. <http://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i3.7720>
- Ede, A. E., Ndubuaku, U. M., & Baiyeri, K. P. (2015). Media effects on emergence and growth of moringa (*Moringa oleifera* Lam) seedlings in the nursery. *American Journal of Experimental Agriculture*, 7(3), 182–189. <http://doi.org/10.9734/AJEA/2015/13602>
- Eira, M. T. S., Amaral da Silva, E. A., De Castro, R., Dussert, S., Walters, C., Derek, J., & Hilhorst, H. W. M. (2006). Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 149–163. <http://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100011>
- Fernández Cerna, C. J. (2015). *Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de café (Coffea arabica L cv "Típica") en sus primeros estadios de su desarrollo* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Lima]. Red de Repositorios latinoamericanos. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1369320>
- González Vega, M. E., Rosales Jenqui, P., Castilla Valdés, Y., Lacerra Espino, J. Á., & Ferrer Viva, M. (2015). Efecto del Bioenraiz® como estimulante de la germinación y el desarrollo de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* L.). *Cultivos Tropicales*, 36(1), 73–79.
- Hernández, I., Nápoles, M. C., Rosales, P. R., Baños, R., & Ramírez, J. F. (2013). Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 47(3), 311–318.
- Hernández, I., Rosales, P. R., González, P. J., Ramírez, J. F., Nápoles, M. C., & Pérez, R. (2020). Increase in the development of *Pueraria phaseoloides* (tropical Kudzu) due to tolerant acid rhizobia under acidity and low fertility conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1), 113–124.
- Hernández Forte, I., & Nápoles García, M. C. (2019). Rhizobia promote rice (*Oryza sativa* L.) growth: First evidence in Cuba. In F. González-Andrés, D. Zúñiga-Davila, & E. Ormeño-Orrillo (Eds.), *Microbial probiotics for agricultural systems: Advances in agronomics use* (pp. 155–168). Springer Nature Switzerland AG. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9_10)
- Hernández Forte, I., & Nápoles García, M. C. (2017). Rizobios residentes en la rizosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 39–49.
- Hernández Forte, I., Nápoles García, M. C., & Morales Mena, B. (2015). Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 65–72.
- Hernández Forte, I., Nápoles García, M. C., Rosales Genqui, P. R., Ramírez Pedroso, J. F., & Ponte Betancourt, S. (2017). Tolerancia a la acidez de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*, 38(3), 55–57.

- Hernández Forte, I., Pérez Hernández, G., Nápoles García, M. C., Rosales Genqui, P. R., Baños Gordillo, R., & Ramirez Pedroso, J. F. (2012). Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 27–33.
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Menéndez, E., Velázquez, E., & Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*, 8(1), Article 295. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18632-z>
- Kanwar, R., Mehta, D. K., & Lal, M. (2014). Effect of seed priming on physiological parameters of aged and non-aged seeds of bitter gourd, *Momordica charantia* L. *International Journal of Farm Sciences*, 4(3), 24–32. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijfs&volume=4&issue=3&article=005>
- López Medina, S. E., & Gil Rivero, A. E. (2017). Características germinativas de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) «cacao». *Arnaldoa*, 24(2), 609–618. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.24.24212>
- Luyten, E., & Vanderleyden J. (2000). Survey of genes identified in *Sinorhizobium meliloti* spp., necessary for the development of an efficient symbiosis. *European Journal of Soil Biology*, 36(1), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)00134-5)
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination—Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2), 176–177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- Marquina, M. E., Ramírez, Y., & Castro, Y. (2018). Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. var. Cacique gigante. *Bioagro*, 30(1), 3–16.
- Organización Internacional del Café. (2019). *Informe sobre desarrollo cafetero de 2019. Crecer para prosperar: viabilidad económica como catalizador de un sector cafetero sostenible*. <http://www.ico.org/documents/cy2019-20/ed-2320c-coffee-development-report.pdf>
- Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (2016). Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(3), 877–902. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9583-4>
- Pece, M.G., Gaillard de B. C., Acosta, M., Bruno, C., Saavedra, S., & Buvenas, O. (2010). Germinación de Tipuana tipu (Benth.) O. Kuntze (tipa blanca) en condiciones de laboratorio. *Revista de Ciencias Forestales- Quebracho*, 18, 5-15. <https://www.redalyc.org/pdf/481/48118695001.pdf>
- Pérez-Pérez, R., Oudet, M., Serrano, L., Hernández, I., Nápoles, M. C., Sosa, D., & Pérez-Martínez, S. (2019). Rhizospheric rhizobia identification in maize (*Zea mays* L.) plants. *Agronomía Colombiana*, 37(3), 255–262. <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n3.80189>
- Quintana, V. C. (2018). *Radiosensibilidad de café (Coffea arabica L. var. Typica) aplicado con radiación gamma*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Lima]. Repositorio Institucional Universidad Nacional Agraria La Molina. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3721>
- Senthilkumar, M., & Krishnamoorthy, R. (2017). Isolation and characterization of tomato leaf phyllosphere methylobacterium and their effect on plant growth. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 2121–2136. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.250>
- Tchakounté, G. V. T., Berger, B., Patz, S., Fankem, H., & Ruppel, S. (2018). Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological Research*, 214(1), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.008>

- Terry Alfonso, E., Ruiz Padrón, J., Tejeda Perez, T., & Reynaldo Escobar, I. (2014). Efectividad agrobiológica del producto bioactivo Pectimorf® en el cultivo del rábano (*Raphanus sativus* L.). *Cultivos Tropicales*, 35(2), 105–111.
- Vega-Caledón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37(especial), 33–39.
- Vincent, J. M. (1970). Manual for the practical study of root-nodule bacteria. In B. Scientific (Ed), *International biological programme* (pp. 164). Blackwell Scientific Publ. <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524>
- Wu, Q., Peng, X., Mingfeng, Y., Zhang, W., Dazzo, B., Uphoff, N., Jing, Y., & Shen, S. (2018). Rhizobia promote the growth of rice shoots by targeting cell signaling, division and expansion. *Plant Molecular Biology*, 97(6), 507–523. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0756-3>
- Zhirvi Ordeñez, C. M. (2016). *Evaluación de dos (2) especies nativas y una comercial de Trichoderma sp. como agente de control de los hongos que ocasionan el damping off (Rhizoctonia spp.) en semilleros de café (Coffea arabica L.) variedad bourbón* [Tesis de Maestría, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26240>