



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**TEMA:**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) EN PLÁNTULAS DE *Coffea sp* EXPUESTOS AL ESTRÉS HÍDRICO”

|                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Trabajo de titulación previo a la obtención del título en Ingeniera en Biotecnología |
|--------------------------------------------------------------------------------------|

**Línea de investigación:** Biotecnología, energía y recursos naturales renovables

**AUTOR:**

Kelly Paola Ruales Yépez

**DIRECTOR:**

Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez MSc.

**Ibarra – Ecuador (2025)**



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

### BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

#### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

| DATOS DE CONTACTO           |                                                    |                        |            |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|------------------------|------------|
| <b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b> | 1724948813                                         |                        |            |
| <b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b> | RUALES YÉPEZ KELLY PAOLA                           |                        |            |
| <b>DIRECCIÓN:</b>           | El Olivo. Av. Cristóbal Tobar Subia                |                        |            |
| <b>EMAIL:</b>               | kprualesy@utn.edu.ec<br>kellypaoruales@hotmail.com |                        |            |
| <b>TELÉFONO FIJO:</b>       |                                                    | <b>TELÉFONO MÓVIL:</b> | 0983621313 |

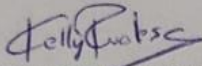
| DATOS DE LA OBRA            |                                                                                                                               |          |                                   |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------------------|
| TÍTULO:                     | Evaluación del efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de <i>Coffea sp</i> expuestos al estrés hídrico. |          |                                   |
| AUTOR (ES):                 | RUALES YÉPEZ KELLY PAOLA                                                                                                      |          |                                   |
| FECHA: DD/MM/AAAA           | 29/07/2025                                                                                                                    |          |                                   |
| SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO |                                                                                                                               |          |                                   |
| PROGRAMA:                   | <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                           | PREGRADO | <input type="checkbox"/> POSGRADO |
| TITULO POR EL QUE OPTA:     | Ingeniera en Biotecnología                                                                                                    |          |                                   |
| DIRECTOR:                   | Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez. MSc.                                                                                     |          |                                   |

## **2. CONSTANCIAS**

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 29 días del mes de julio de 2025.

### **EL AUTOR:**



.....  
Kelly Paola Ruales Yépez

C.C.: 1724948813

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE  
INTERGRACIÓN CURRICULAR**

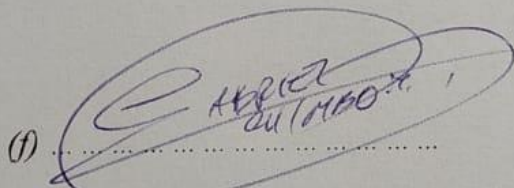
Ibarra, 29 de julio de 2025.

Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez MSc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

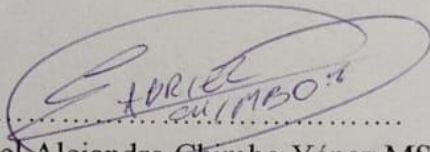


Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez MSc.

C.C.: 1721444196

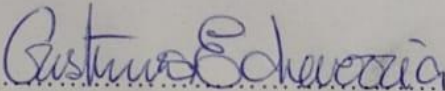
## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular "Evaluación del efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de *Coffea* sp. expuestos al estrés hídrico" elaborado por Ruales Yépez Kelly Paola, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f):.....

Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez MSc.

C.C.: 172144419

(f):.....

Ing. María Cristina Echeverría de Labastida PhD.

C.C.: 1717917189

## **PRESENTACIÓN**

Yo, Ruales Yépez Kelly Paola como autor de la Tesis Titulada “**Evaluación del efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de *Coffea sp* expuestos al estrés hídrico**”, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi madre Gloria Yépez y a mi padre Olger Ruales por su apoyo constante y confianza que depositaron en mí a lo largo de este proceso de formación académica. A mis hermanos Fernanda Ruales, Diego Ruales, María Clara Ruales y Paúl Ruales por su compañía, apoyo emocional y palabras de ánimo, aún en la distancia.

Agradezco a todos los docentes de la carrera, especialmente al MSc. Gabriel Chimbo Yépez y a la PhD. María Cristina Echeverría, por su dedicación, guía y compromiso durante el proceso de titulación.

Agradezco a la Universidad Técnica del Norte y al Laboratorio de Biotecnología, por facilitarme el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco a mis amigos por su constante apoyo en los momentos difíciles y por haber sido parte fundamental en cada etapa de este proceso.

## LISTA DE SIGLAS.

**AG:** Ácido Giberélico  
**AIA:** Ácido indol acético  
**AIB:** Acido indolbutírico  
**ANA:** Ácido naftalenacético  
**BAP:** 6-bencil-amino-purina  
**CC:** Capacidad de campo  
**CO:** Quitooligosacáridos de cadena corta  
**CONFENAC:** Consejo Cafetalero Nacional  
**HCl:** Ácido clorhídrico  
**HMA:** Hongos micorrízicos arbusculares  
**KOH:** Hidróxido de potasio  
**MA:** Micorriza arbuscular  
**MO:** Materia orgánica  
**MS:** Murashige & Skoog  
**MSR:** Medio Modificado Strullu-Romand  
**MyC-LCO:** Lipooligosacáridos de micorriza  
**NaClO:** Hipoclorito de sodio  
**ODS:** Objetivos de Desarrollo Sostenible  
**P:** Fósforo  
**PPA:** Aparato de penetración  
**pH:** Potencial de hidrógeno  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR .....                 | 3  |
| APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR .....                                             | 3  |
| AGRADECIMIENTO .....                                                                | IV |
| ÍNDICE DE CONTENIDO .....                                                           | 6  |
| RESUMEN .....                                                                       | 11 |
| CAPÍTULO I .....                                                                    | 13 |
| INTRODUCCIÓN .....                                                                  | 13 |
| 1.1 Planteamiento del problema .....                                                | 13 |
| 1.2 Justificación .....                                                             | 14 |
| 1.3 Objetivos .....                                                                 | 16 |
| 1.3.1 <i>Objetivo general</i> .....                                                 | 16 |
| 1.3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....                                            | 16 |
| 1.4 Pregunta de investigación .....                                                 | 16 |
| CAPÍTULO II .....                                                                   | 17 |
| 1. MARCO TEÓRICO .....                                                              | 17 |
| 2.1 Micorrizas .....                                                                | 17 |
| 2.1.1 <i>Endomicorrizas</i> .....                                                   | 17 |
| 2.1.2 <i>Estructuras de los HMA</i> .....                                           | 18 |
| Figura 1. <i>Estructuras de los HMA</i> .....                                       | 19 |
| 2.1.3 <i>Ciclo de vida de HMA</i> .....                                             | 19 |
| 2.2 Cultivo de <i>Coffea</i> sp. ....                                               | 20 |
| 2.2.1 <i>Condiciones edafoclimáticas</i> .....                                      | 20 |
| 2.2.2 <i>Efecto del estrés hídrico en Coffea</i> sp. ....                           | 21 |
| 2.3 Asociación de HMA en <i>Coffea</i> sp. ....                                     | 21 |
| 2.3.1 <i>Asociación de HMA durante el estrés hídrico</i> .....                      | 22 |
| 2.3.2 <i>Importancia de la capacidad de campo (CC)</i> .....                        | 22 |
| CAPÍTULO III .....                                                                  | 24 |
| 3. METODOLOGÍA .....                                                                | 24 |
| 3.1 Descripción del área de estudio .....                                           | 24 |
| 3.2 Descripción de las cepas de estudio .....                                       | 24 |
| 3.3 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Coffea</i> sp. a partir de semillas ..... | 24 |
| 3.4 Desinfección .....                                                              | 25 |

|                   |                                                                                     |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5               | Multiplicación.....                                                                 | 26 |
| 3.6               | Enraizamiento.....                                                                  | 26 |
| 3.7               | Diseño del sistema planta-HMA <i>in vitro</i> .....                                 | 27 |
| 3.7.1             | Desinfección y germinación de semillas de planta trampa .....                       | 27 |
| 3.7.2             | Desinfección de esporas HMA .....                                                   | 27 |
| 3.7.3             | Plantas trampa .....                                                                | 28 |
| 3.7.4             | <i>Coffea</i> sp.....                                                               | 28 |
| 3.7.4.1           | Tinción de raíces .....                                                             | 30 |
| 3.7.4.2           | Porcentaje de micorrización arbuscular .....                                        | 30 |
| 3.8               | Propiedades fisicoquímicas del suelo .....                                          | 31 |
| 3.8.1             | Capacidad de campo (CC) .....                                                       | 31 |
| 3.8.2             | Textura del suelo .....                                                             | 31 |
| 3.8.3             | pH .....                                                                            | 32 |
| 3.9               | Aclimatación de <i>Coffea</i> sp.....                                               | 32 |
| 3.10              | Inoculación de HMA y aplicación del estrés hídrico .....                            | 32 |
| 3.10.1            | Mediciones.....                                                                     | 33 |
| 3.11              | Análisis estadístico .....                                                          | 34 |
| CAPÍTULO IV ..... |                                                                                     | 35 |
| 4.                | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                         | 35 |
| 4.1               | Desinfección de semillas de <i>Coffea</i> sp. ....                                  | 35 |
| 4.2               | Multiplicación de <i>Coffea</i> sp.....                                             | 36 |
| 4.3               | Enraizamiento de <i>Coffea</i> sp.....                                              | 38 |
| 4.4               | Porcentaje de colonización micorrízica del sistema planta-HMA <i>in vitro</i> ..... | 39 |
| 4.5               | Crecimiento de HMA en el sistema planta-HMA <i>in vitro</i> .....                   | 42 |
| 4.6               | Colonización micorrízica de HMA bajo estrés hídrico .....                           | 44 |
| 4.7               | Efecto de los HMA sobre la biomasa vegetal bajo estrés hídrico .....                | 47 |
| CAPÍTULO V .....  |                                                                                     | 51 |
| 5.                | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....                                                 | 51 |
| 5.1               | Conclusiones.....                                                                   | 51 |
| 5.2               | Recomendaciones .....                                                               | 52 |
| REFERENCIAS ..... |                                                                                     | 53 |
| ANEXOS.....       |                                                                                     | 58 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.</b> Embrión cigótico (A) extraído a partir del endospermo (B) de <i>Coffea sp.</i> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 25 |
| <b>Figura 3.</b> Establecimiento del sistema planta-HMA, A. Plántula de <i>Coffea sp.</i> introducida in vitro, B. esporas HMA, C. Medio MSR sin sacarosa/vitaminas. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| <b>Figura 4.</b> A. Porcentaje de desinfección bajo tres concentraciones diferentes de NaClO, B. Germinación de embriones cigóticos de <i>Coffea sp.</i> .....                                                                                                                                                                                                                                               | 35 |
| <b>Figura 5.</b> A. Número de brotes, B. Longitud de brotes (cm) de <i>Coffea sp.</i> bajo diferentes concentraciones de BAP. ....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 37 |
| <b>Figura 6.</b> Multiplicación de microestacas de <i>Coffea sp.</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 37 |
| <b>Figura 7.</b> A. Longitud de raíz (cm) en diferentes medios de cultivo, B. Plántulas de <i>Coffea sp.</i> enraizadas in vitro. ....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 38 |
| <b>Figura 8.</b> Porcentaje de colonización micorrízica de la Cepa C1, C4, C6 y C3.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 40 |
| <b>Figura 9.</b> Estructuras de HMA en raíces de <i>Coffea sp.</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 41 |
| <b>Figura 10.</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 43 |
| Crecimiento de HMA usando <i>Coffea sp.</i> como planta huésped. A. Formación de hifas germinantes (HG) hacia raíces del hospedante (R), B. Formación de micelio extrarradical (ME), C. Formación de esporas secundarias (ES) en micelio extrarradical (ME), D. Esporas maduras (E) en raíces del hospedante (R), E. y F. Colonización de esporas maduras (S) e hifas (H) en raíces del hospedante (R). .... | 43 |
| <b>Figura 11.</b> Porcentaje de colonización micorrízica de raíces de plántulas de <i>Coffea sp.</i> , bajo diferentes niveles de capacidad de campo (CC). ....                                                                                                                                                                                                                                              | 45 |
| <b>Figura 12.</b> Estructuras de HMA en raíces de plántulas de <i>Coffea sp.</i> , bajo diferentes niveles de capacidad de campo (CC). ....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 46 |
| <b>Figura 13.</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 48 |
| A. Longitud de raíz (cm), B. Peso de raíz (g), C. Altura aérea (cm), D. Biomasa aérea (g) de plántulas de <i>Coffea sp.</i> inoculadas con HMA, bajo diferentes niveles de capacidad de campo (CC). ....                                                                                                                                                                                                     | 48 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> <i>Condiciones edafoclimáticas para el desarrollo óptimo del café.</i> .....                                                | 21 |
| <b>Tabla 2.</b> <i>Tratamientos para evaluar el porcentaje de desinfección.</i> .....                                                       | 25 |
| <b>Tabla 3.</b> <i>Tratamientos para evaluar la multiplicación de Coffea sp.</i> .....                                                      | 26 |
| <b>Tabla 4.</b> <i>Tratamientos para evaluar el enraizamiento de Coffea sp.</i> .....                                                       | 27 |
| <b>Tabla 5.</b> <i>Tratamientos para evaluar la colonización de HMA en plántulas de Coffea sp.</i><br>.....                                 | 30 |
| <b>Tabla 6.</b> <i>Características del suelo para la evaluación de HMA en plantas de café bajo<br/>condiciones de estrés hídrico.</i> ..... | 31 |
| <b>Tabla 7.</b> <i>Tratamientos para evaluar HMA bajo diferentes niveles de capacidad de campo.</i><br>.....                                | 33 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|                 |                                                                        |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 1.</b> | Desinfección de <i>Coffea</i> sp. ....                                 | 58 |
| <b>Anexo 2.</b> | Multiplicación de <i>Coffea</i> sp. ....                               | 58 |
| <b>Anexo 3.</b> | Enraizamiento de <i>Coffea</i> sp. ....                                | 59 |
| <b>Anexo 4.</b> | Colonización micorrízica del sistema planta-HMA <i>in vitro</i> . .... | 60 |
| <b>Anexo 5.</b> | Colonización micorrízica bajo estrés hídrico .....                     | 62 |
| <b>Anexo 6.</b> | Efecto de los HMA sobre la biomasa vegetal. ....                       | 64 |
| <b>Anexo 7.</b> | Fotografías de experimentos. ....                                      | 67 |

## RESUMEN

En Ecuador, el cultivo de *Coffea* sp., está expuesto a desafíos considerables derivados del cambio climático, identificando al estrés hídrico como principal afección a la productividad y viabilidad. Frente a esta problemática, los hongos micorrizas arbusculares (HMA) se presentan como alternativa de mejoramiento a la tolerancia de las plantas a condiciones de sequía. La presente investigación tiene como principal objetivo evaluar el efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de *Coffea* sp. expuestas al estrés hídrico con la finalidad de impulsar prácticas agrícolas sostenibles. En la fase de desinfección de *Coffea* sp. se obtuvo un 100 % de germinación en los tratamientos C1 y C2. En la multiplicación el tratamiento BG2 presentó la mayor longitud de brotes (0.7 cm). En la fase de enraizamiento, el tratamiento M3 obtuvo una mayor longitud de raíz (3.2 cm) utilizando medio MSR con activado (0.5 mg/L). Una vez obtenido el material vegetal, se estableció un sistema planta-HMA *in vitro*, destacándose la cepa C4 con el mayor porcentaje de colonización micorrízica total (67.3 %). Todas las cepas mostraron alta incidencia de hifas, en contraste, la presencia de vesículas y arbusculos fue menor al 10 %. El seguimiento no destructivo de HMA, permitió identificar la germinación de esporas al día 2, así como la aparición de esporas secundarias a los 21 días. Bajo condiciones de estrés hídrico, el tratamiento h1a1 mostró un mayor crecimiento radicular (7.5 cm), altura aérea (2.45 cm) y biomasa aérea (0.31 g) en comparación con los controles. Aunque no hubo diferencias significativas, los resultados indican una tendencia positiva en el crecimiento de plántulas de *Coffea* sp. inoculadas con HMA.

**Palabras clave:** *Coffea* sp., hongos micorrízicos arbusculares (HMA), colonización micorrízica, estrés hídrico, cultivos trampa, biomasa vegetal.

## ABSTRACT

In Ecuador, the cultivation of *Coffea* sp. faces significant challenges derived from climate change, with water stress identified as the main condition affecting productivity and viability. In response to this issue, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) emerge as a potential alternative for improving plant tolerance to drought conditions. The main objective of the present study is to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on *Coffea* sp. seedlings exposed to water stress, with the aim of promoting sustainable agricultural practices. In the disinfection phase of *Coffea* sp., 100% germination was achieved in treatments C1 and C2. During the multiplication phase, treatment BG2 showed the greatest shoot length (0.7 cm). In the rooting phase, treatment M3 resulted in the greatest root length (3.2 cm) using MSR medium with activated charcoal (0.5 mg/L). Once the plant material was obtained, an in vitro plant-AMF system was established, with strain C4 exhibiting the highest total mycorrhizal colonization percentage (67.3%). All strains showed high hyphal incidence, with vesicles and arbuscules present in less than 10%. The non-destructive monitoring of AMF allowed the identification of spore germination on day 2 and the formation of secondary spores on day 21. Under water stress conditions, treatment h1a1 showed the greatest root growth (7.5 cm), aerial height (2.45 cm), and aerial biomass (0.31 g) compared to the controls. Although no significant differences were observed, the results suggest a positive trend in the growth of *Coffea* sp. seedlings inoculated with AMF.

**Keywords:** *Coffea* sp., arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), mycorrhizal colonization, water stress, trap crops, plant biomass.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema

En Ecuador, el cultivo de *Coffea* sp. proporciona sustento a millones de agricultores y contribuye significativamente a la economía del país. Este cultivo prospera en regiones subtropicales caracterizadas por estaciones húmedas o lluvias frecuentes. Sin embargo, el cambio climático ha deteriorado estos ecosistemas naturales con aumento de temperatura y la reducción en los niveles de precipitación (Guevara Albán et al., 2018; María Elena, 2019).

Entre las regiones y cultivos afectados por este fenómeno han sido aquellas dedicadas al cultivo de café siendo uno de los principales problemas el estrés hídrico. La continua escasez de agua provoca que los cafetales produzcan frutos muy pequeños, con la cáscara adherida al grano, lo que dificulta su procesamiento, puesto a que no se pueden despulpar adecuadamente. Como resultado, se prevé que la producción de café disminuirá drásticamente en los próximos años, debido a las condiciones climáticas desfavorables (Andrade et al., 2009; Bramel et al., 2017; Guevara Albán et al., 2018).

La deficiencia de agua en el suelo incrementa la síntesis de etileno por parte de las plantas, lo que promueve la senescencia de las hojas y la reducción del contenido de clorofila. Esto afecta diversos procesos biológicos, incluyendo la fotosíntesis, intercambio gaseoso, el desplazamiento de fotoasimilados y la producción de reguladores de crecimiento. En consecuencia, se reduce la altura, grosor del tallo, crecimiento de las raíces, área foliar y la biomasa, incluso en casos extremos puede

conducir a la muerte de la planta (Kalamulla et al., 2022; Luna-Flores et al., 2012; Nazareno Saparrat et al., 2020).

A nivel de la rizósfera, el 80 % de las plantas vasculares terrestres han adoptado diversas estrategias para adaptarse a las condiciones de sequía, como la modificación de la biomasa radicular, cambios en su anatomía, ajustes fisiológicos y la interacción con hongos benéficos como las micorrizas arbusculares (HMA). Sin embargo, aunque la investigación ha demostrado el potencial de los HMA en otros cultivos, el conocimiento sobre su aplicación efectiva en *Coffea* sp. bajo condiciones de estrés hídrico aún es limitado. Estas adaptaciones reflejan la importancia de desarrollar nuevas alternativas que promuevan la producción de plantas resistentes que contribuyan a enfrentar esta problemática y que garanticen una agricultura sostenible (Crossay et al., 2017; Usman et al., 2021; Vaast et al., 1996).

## **1.2 Justificación**

En el siglo XXI, la agricultura enfrenta importantes desafíos debido a la necesidad de producir alimentos con recursos limitados como suelo, tierra y agua. Según los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas, (2018), la meta 2.4 establece que, para el 2030, se deben garantizar sistemas de producción agrícola sostenibles y promover prácticas resilientes. Estas prácticas deben incrementar la productividad y la producción, preservar los ecosistemas, y mejorar tanto la calidad del suelo como de la tierra. Además, fortalecer la capacidad de las comunidades agrícolas para adaptarse al cambio climático, fenómenos extremos, sequías, inundaciones y otros desastres.

Por ello, los HMA al ser conocidos por su relación simbiótica con las raíces de las plantas, desempeñan un papel clave en la absorción de nutrientes y agua, especialmente

en condiciones de estrés hídrico (Crossay et al., 2017; Guevara Albán et al., 2018). A través de su micelio extrarradical, estos hongos permiten a las plantas acceder a los poros del suelo que las raíces por sí solas no pueden alcanzar. Los HMA no solo incrementan la tolerancia a la sequía, sino que también fortalecen las defensas de las plantas contra patógenos y compensan la pérdida de biomasa radicular, facilitando la expansión de sus hifas en el suelo (Nazareno Saparrat et al., 2020; Rivillas Osorio et al., 2019).

Se evaluó el comportamiento fisiológico y de crecimiento de plántulas de café asociadas con HMA bajo diferentes condiciones de humedad en el suelo. La especie *Rhizophagus clarus* presentó el mayor porcentaje de colonización, alcanzando un 39% a un 71% de capacidad de campo. Las plantas micorrizadas mostraron un mayor desarrollo foliar en comparación con las no inoculadas. La biomasa radicular aumentó en un 21% cuando se inoculó con *Dentiscutata heterogama* bajo un 100% de capacidad de campo (Moreira et al., 2018) .

La investigación posee un enfoque para una agricultura sostenible y ecológica, debido a que esta simbiosis reduce la dependencia de fertilizantes químicos y el uso excesivo de pesticidas, lo que contribuye al desarrollo de sistemas agrícolas más resilientes y adaptados al cambio climático (Yañez Apam et al., 2023).

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de *Coffea* sp. expuestos al estrés hídrico.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el nivel de micorrización en plántulas de *Coffea* sp.
- Determinar el efecto de las micorrizas en el desarrollo de las plantas aclimatadas sometidas a estrés hídrico.

### **1.4 Pregunta de investigación**

¿La colonización de HMA en el sistema radicular de plántulas de *Coffea* sp. disminuye el efecto del estrés hídrico y aumenta su capacidad de absorción de agua y nutrientes?

## CAPÍTULO II

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Micorrizas

Las micorrizas representan una de las interacciones simbióticas más antiguas entre hongos y plantas terrestres, siendo las micorrizas arbusculares (MA) las más comunes, con una amplia distribución geográfica, por lo que se encuentran en todos los tipos de vegetación. El término micorriza proviene de los vocablos griegos *mykos* (hongo) y *rhiza* (raíz) (Andrade et al., 2009; Parniske, 2008).

Las micorrizas se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas, basadas en el tipo, la forma de las hifas y el modo de penetración en la raíz. Por ello, se dividen en ectomicorrizas y endomicorrizas, siendo los HMA parte de las endomicorrizas (Andrade et al., 2009; Nazareno Saparrat et al., 2020).

##### 2.1.1 *Endomicorrizas*

Este tipo de endomicorrizas, perteneciente al filo *Glomeromycota*, agrupa a los zigomicetos. En esa interacción los hongos son simbiontes obligados y las plantas facultativas. En consecuencia, las hifas penetran en las raíces, introduciéndose en las células y formando estructuras como el arbúsculo y la vesícula (Andrade-Torres, 2010; Nazareno Saparrat et al., 2020).

Las micorrizas se conectan directamente con las plantas mediante la red de hifas, que pueden alcanzar una longitud de 100 metros por centímetro cúbico de suelo. Esta red facilita la absorción de nutrientes como el fósforo y nitrógeno, mientras que los hongos se benefician al recibir el 20% del carbono fijado por las plantas (Parniske, 2008; Rivera Méndez et al., 2014; Rivillas Osorio et al., 2019).

### **2.1.2 Estructuras de los HMA**

Las micorrizas arbusculares desarrollan estructuras como apresorios, arbúsculos, vesículas, esporas y micelio intra y extrarradical (Rivera Méndez et al., 2014). Los apresorios (Figura 1A) son estructuras fúngicas inflamadas, multinucleadas y con paredes gruesas, que se desarrollan a partir de hifas que se adhieren a la raíz de la planta tras 36 horas de la interacción con el hongo. Esta es clave para el reconocimiento de la planta huésped y permite que la punta de la hifa penetre entre las células de la epidermis de la raíz (Pepe et al., 2020).

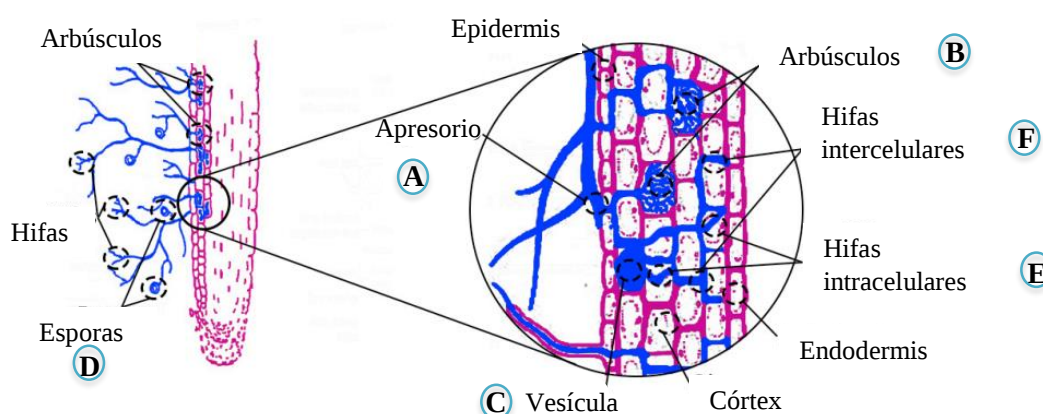
Los arbúsculos (Figura 1B) son estructuras ramificadas que se desarrollan dentro de las células que conforman la corteza de las raíces, cuya función principal es ampliar la superficie de contacto para el intercambio de compuestos bioquímicos entre el hongo y la célula vegetal. Estos viven entre 4-5 días y luego son degradados por la célula huésped. El proceso de generación y degradación ocurre de forma simultánea en la raíz (Nazareno Saparrat et al., 2020).

Por otra parte, las vesículas (Figura 1C) son estructuras de almacenamiento de lípidos, estructuras lobuladas de paredes gruesas que se forman dentro o entre las células huésped en la mayoría de los hongos del orden Glomeromycotina excepto los Gigasporales (Choi et al., 2024).

Las esporas asexuales (Figura 1D) son estructuras reproductivas que facilitan la dispersión y supervivencia del hongo a lo largo del tiempo. Poseen núcleos y lípidos de almacenamiento en forma de triaglicerol que ayudan al desarrollo del tubo germinativo. El diámetro de las esporas varía dependiendo de la especie y pueden medir entre 15 a 800  $\mu\text{m}$  (Choi et al., 2024; Nazareno Saparrat et al., 2020; Rivera Méndez et al., 2014).

La hifa intracelular (Figura 1E) es el que da origen a las esporas, vesículas y arbuscúlos. Mientras que la hifa intercelular (Figura 1F) coloniza las raíces y tiene la capacidad de extenderse más allá de la región de las raíces de las plantas con el propósito de explorar el suelo en busca de nutrientes (Rivera Méndez et al., 2014).

**Figura 1.**  
*Estructuras de los HMA.*



Nota: Nazareno Saparrat et al. (2020)

### 2.1.3 Ciclo de vida de HMA

El desarrollo del ciclo vital de los HMA depende de su capacidad para colonizar las raíces de la planta hospedera. Estas, emiten señales a través de los exudados de la raíz como las estrigolactonas, que activan el metabolismo del hongo y favorecen el crecimiento hifal, guiándolo hacia las raíces. En respuesta, el hongo secreta dos tipos de oligosacáridos, lipooligosacáridos de micorriza (Myc-LCO) y quitooligosacáridos de cadena corta (CO) que estimulan la colonización radical (Choi et al., 2024).

Los HMA forman estructuras de unión similares a pies, llamados apresorios, en la superficie de la raíz, que se desarrollan de hifas diferenciadas, y no de tubos germinación. En consecuencia, se produce un aparato de penetración (PPA) por el cual

ingresa la hifa que se extiende desde el apresorio, guiando al hongo hacia la corteza interna de la raíz (Choi et al., 2024; Parniske, 2008). Dentro de las células corticales el hongo forma hifas ramificadas dicotómicamente, llamadas arbuscúlos que están rodeados por una extensión de la membrana plasmática de la planta (Harrison, 2005).

Una vez que se establece la simbiosis micorrízica arbuscular, los HMA producen vesículas de reserva y forman nuevas esporas que se sintetizan fuera de la raíz en el extremo principal de las hifas fúngicas individuales (Choi et al., 2024).

## **2.2 Cultivo de *Coffea* sp.**

El café perteneciente a la familia Rubiaceae representa un rubro económico importante a nivel global. Se cultiva en aproximadamente 50 países y su principal uso es como bebida. Actualmente, las plantaciones se distribuyen en las cuatro regiones geográficas del Ecuador (Costa, Sierra, Amazonía y Galápagos). Según el Consejo Cafetalero Nacional (CONFENAC) el café es cultivado en 23 provincias del país principalmente en Manabí, Loja y en los estribos de la Cordillera Occidental de los Andes (Mantuano et al., 2021; Velázquez et al., 2018; Venegas Sánchez et al., 2018).

### **2.2.1 Condiciones edafoclimáticas**

Las condiciones edafoclimáticas que requieren los cafetales para su óptimo desarrollo se detallan en la Tabla 1 (Velázquez et al., 2018).

**Tabla 1.***Condiciones edafoclimáticas para el desarrollo óptimo del café.*

| Parámetros            | Características                         |
|-----------------------|-----------------------------------------|
| Altitud               | 1.200 - 1.700 msnm                      |
| Temperatura           | 15-24 °C                                |
| Precipitaciones       | 1.000 – 3000 mm                         |
| Humedad relativa      | 70 – 85 %                               |
| Topografía            | Terrenos ligeramente ondulados y planos |
| pH                    | 5.5 – 6.5                               |
| Materia orgánica (MO) | 2 % – 5 %                               |
| Nitrógeno             | 3 %                                     |
| Fósforo               | 0.06 % - 0.14 %                         |

### **2.2.2 Efecto del estrés hídrico en *Coffea* sp.**

El estrés hídrico en las plantas de café afecta su crecimiento y productividad al dañar la cutícula cerosa, destruir las paredes celulares, disminuir la conductancia estomática y la asimilación neta de carbono, incrementando su susceptibilidad a infecciones por plagas y a enfermedades como la roya (Chemura et al., 2017). La acumulación de prolina ha sido reconocida como un mecanismo de adaptación frente al estrés hídrico. Sin embargo, esta acumulación está más relacionada con el daño causado por la limitación hídrica en lugar de ser un mecanismo de defensa frente al estrés por sequía (Damatta, 2004).

### **2.3 Asociación de HMA en *Coffea* sp.**

Diversos estudios han destacado la importancia de la interacción simbiótica entre los HMA y el cafeto, especialmente en suelos con baja fertilidad. Además, se ha identificado que el café presenta una marcada dependencia de las micorrizas durante la fase de desarrollo de las plántulas. En *Coffea arabica*, se ha reportado un mayor

crecimiento bajo condiciones de estrés hídrico, una mayor absorción de P y un incremento en la masa seca (Andrade et al., 2009; Cruz et al., 2020).

Ha sido demostrado que la aplicación de consorcios de HMA obtenidos de plantaciones de café favorece el crecimiento del cafeto. En invernadero, se han reportado aumentos en la altura de las plantas de hasta un 91% respecto de aquellas que no fueron tratadas con HMA. Así mismo, en campo, las plantas inoculadas mostraron niveles de supervivencia superiores respecto al control (Urgiles-Gómez et al., 2023).

### **2.3.1 Asociación de HMA durante el estrés hídrico**

Las hifas de los HMA, junto con la glicoproteína glomalina que producen, actúan como pegamentos naturales para promover la formación y estabilidad de los agregados del suelo, mejorando tanto su estructura como la capacidad para retener agua (Garzón, 2015).

Por otro lado, los HMA han desarrollado mecanismos bioquímicos para mitigar el daño oxidativo asociado al estrés hídrico. El primer mecanismo implica la absorción directa de agua a través de sus hifas y su transferencia a la planta huésped, lo que aumenta el contenido hídrico y previene la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bahadur et al., 2019; Huang et al., 2017). El segundo mecanismo implica la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos generados por la asociación simbiótica, los cuales ayudan a controlar y eliminar los ROS, cuya acumulación puede dañar las membranas y conducir a la muerte celular (Amiri et al., 2015).

### **2.3.2 Importancia de la capacidad de campo (CC)**

Representa el volumen de agua que el suelo puede almacenar una vez que el exceso ha sido drenado y el flujo descendente de agua disminuye considerablemente.

Estudios recientes han demostrado que es un valor variable, depende de la humedad inicial y la estructura del perfil del suelo. Determinar la capacidad de campo permite una adecuada gestión del agua y en la zona radicular, especialmente para planificar el riego en los cultivos (Assouline & Or, 2014; Cassel & Nielsen, 1986).

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Descripción del área de estudio

La fase experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en el campus San Vicente de Paúl perteneciente a la Universidad Técnica del Norte, localizado en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura y se encuentra en las coordenadas [0°20'49.3"N 78°06'49.2"W].

#### 3.2 Descripción de las cepas de estudio

Se utilizaron tres cepas de HMA, disponibles en el banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y una micorriza comercial. Estas cepas fueron aisladas por Reinoso (2024), a partir de muestras de suelo rizosférico de *Coffea arabica* procedentes de tres fincas cafetaleras de la parroquia de Apuela, cantón Cotacachi, en la zona de Intag, provincia de Imbabura.

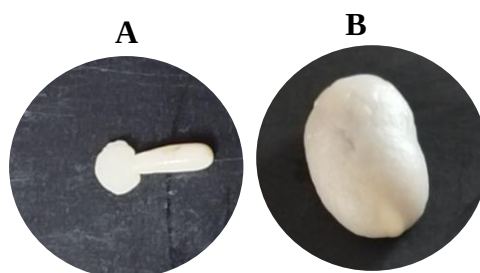
#### 3.3 Establecimiento *in vitro* de *Coffea* sp. a partir de semillas

Se seleccionaron árboles sanos de *Coffea* sp. en su fase de maduración, como fuente de semillas en una finca ubicada en la provincia de Pichincha, cuyas coordenadas son [0°12'47.4"N 78°36'57.6"W]. Los frutos maduros fueron sometidos a un pretratamiento siguiendo el protocolo descrito por Ebrahim et al. (2007).

El proceso consistió en lavar los frutos con agua de grifo y retirar manualmente la pulpa. Posteriormente, se dejaron reposar durante 24 horas para la fermentación natural. Después de este periodo, los granos fueron lavados con agua corriente para eliminar completamente el mucílago. Finalmente, se retiró el pergamino (endocarpio) para obtener el endospermo (Figura 2B), que se remojó durante 24 horas.

**Figura 2.**

*Embrión cigótico (A) extraído a partir del endospermo (B) de Coffea sp.*



### 3.4 Desinfección

Después del pretratamiento, las semillas se llevaron a la cabina de flujo laminar y se desinfectaron con una solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril (Cordova Reyes, 2020). Posteriormente, se sumergieron en soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) a tres concentraciones diferentes (Tabla 2) durante diez minutos y se enjuagó con agua destilada estéril. Con la ayuda de una pinza y un bisturí, se extrajeron los embriones cigóticos (Figura 2A), que estaban cubiertos por el endospermo (Figura 2B) (Ebrahim et al., 2007).

**Tabla 2.**

*Tratamientos para evaluar el porcentaje de desinfección.*

| Código | Concentración NaClO |
|--------|---------------------|
| C0     | 0 %                 |
| C1     | 2 %                 |
| C2     | 3 %                 |

Para la germinación se utilizaron frascos de vidrio con una capacidad de 250 ml, en cada frasco se colocaron 30 ml de medio Murashige y Skoog (MS) al 100% de concentración de sales, se añadió 0.5 mg/L de 6-bencil-amino-purina (BAP), 30 g/L de sacarosa, 5 g/L de Gelzan y ajustado a un pH de 5.7 (Castilla-Valdés et al., 2020). Se

colocaron dos embriones en cada frasco y se incubaron en el área de crecimiento durante dos semanas, a una temperatura entre 25 - 30 °C, con una humedad relativa del 27 % y un fotoperiodo 16/8 horas (luz/oscuridad). Transcurrido este tiempo se evaluó el porcentaje de desinfección.

### 3.5 Multiplicación

Después de dos meses, tras la germinación de los embriones y el desarrollo del primer par de hojas verdaderas en las plántulas, estas fueron subcultivadas como microbrotes. Se utilizó MS al 50% de su concentración, suplementado BAP en diferentes concentraciones (Tabla 3). Además, se añadió 1 mg/L de ácido giberélico (AG), , junto con 30 g/L de sacarosa, 5 g/L de Gelzan y un pH de 5.7 (Castilla-Valdés et al., 2020). Se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento de la fase de germinación.

**Tabla 3.**  
*Tratamientos para evaluar la multiplicación de Coffea sp.*

| Código | Concentración BAP |
|--------|-------------------|
| BG0    | 0 mg/L            |
| BG1    | 0.5 mg/L          |
| BG2    | 1 mg/L            |

### 3.6 Enraizamiento

Para promover la formación de raíces, se prepararon segmentos vegetales de 2 cm de longitud y se colocaron en tres diferentes medios de cultivo (Tabla 4), suplementado con 0.5 g/L de carbón activado. Estos se mantuvieron durante dos meses bajo las mismas condiciones de crecimiento establecidas en la fase de germinación.

**Tabla 4.**  
*Tratamientos para evaluar el enraizamiento de Coffea sp.*

| Código | Medio de cultivo |
|--------|------------------|
| M1     | MS 50 %          |
| M2     | MS 100 %         |
| M3     | MSR              |

### 3.7 Diseño del sistema planta-HMA *in vitro*

Se emplearon cultivos trampa *in vitro* con césped (*Cynodon dactylon*) como planta huésped, con el objetivo de incrementar la cantidad de esporas de HMA, que posteriormente fueron aplicadas a plántulas de *Coffea sp.*

#### 3.7.1 Desinfección y germinación de semillas de planta trampa

Las semillas fueron desinfectadas mediante inmersión en solución de NaClO al 3 % durante 10 minutos. Para el proceso de germinación, las semillas se colocaron en cajas Petri que contenían 20 ml de medio Modificado Strullu-Romand (MSR), añadiendo 10 g/L de sacarosa, 3 g/L de Pythagel y un pH de 5.7 (Pozo, 2024). Se mantuvieron durante 15 días en las condiciones de cultivo previamente establecidas.

#### 3.7.2 Desinfección de esporas HMA

Para desinfectar las esporas de HMA, estas se recolectaron disolviendo el agar del medio MSR del banco de germoplasma donde se encontraban las cepas de HMA, utilizando 25 ml de buffer citrato (0.01 M, pH 6.0). Una vez disuelto el agar, se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de una solución compuesta por cloramina T al 2% y Tween 20, dejando actuar durante 10 minutos. Se descartó la solución y las esporas se enjuagaron tres veces con agua destilada

estéril. Posteriormente, se añadió una solución de gentamicina 0.01% y cefalexina 0.02% durante 10 minutos en una proporción 1:1 (Cranenbrouck et al., 2005). Las esporas se recolectaron con ayuda de un estereoscopio en tubos Eppendorf de 2 ml, junto con la solución de antibióticos.

### **3.7.3 Plantas trampa**

Para cada una de las cepas de HMA, se realizó un cultivo trampa *in vitro* utilizando *Cynodon dactylon* como planta huésped. En cajas Petri plásticas de 90 mm de diámetro, se realizaron orificios de aproximadamente 2 mm tanto en la base como en la tapa. Se añadieron 20 mL de medio de cultivo MSR, sin azúcares ni vitaminas, solidificado con 3g/l de Phytigel y ajustado a un pH de 5.7. Las raíces de césped se colocaron a través del orificio, dejando las hojas y el tallo en la parte externa. Usando un estereoscopio se tomó una espora de HMA previamente desinfectada y se colocó cerca de las raíces (Ferrol & Lanfranco, 2020).

Las cajas Petri se cubrieron con cartulina negra de forma circular para mantener el sistema en oscuridad durante todo el periodo de crecimiento. La incubación se mantuvo a una temperatura entre 25 y 30 °C, con una humedad relativa del 27% y un fotoperiodo 16/8 horas (luz/oscuridad). Debido a la transpiración de la planta huésped, el medio de cultivo se agotó, por lo que, con ayuda de una pipeta de vidrio se añadió medio MSR (sin vitaminas ni sacarosa) a 45°C con el fin de mantener los niveles adecuados de nutrientes (Ferrol & Lanfranco, 2020).

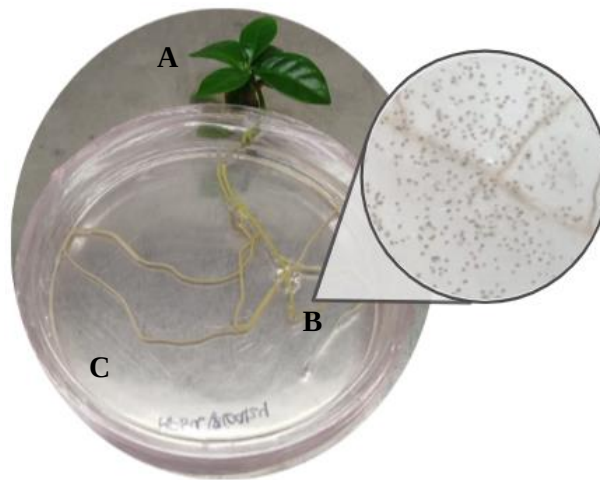
### **3.7.4 Coffea sp.**

Una vez incrementado el número de esporas de HMA utilizando *Cynodon dactylon* como planta huésped, se cortó una pequeña sección del medio MSR que las

contenía para su desinfección, siguiendo la metodología de Cranenbrouck et al. (2005) previamente descrita. Se implementó el sistema planta-HMA con plántulas de *Coffea* sp. obtenidas mediante introducción *in vitro*, las cuales presentaban un sistema radicular bien desarrollado (Figura 3).

**Figura 3.**

*Establecimiento del sistema planta-HMA, A. Plántula de Coffea sp. introducida in vitro, B. esporas HMA, C. Medio MSR sin sacarosa/vitaminas.*



Se tomaron las esporas desinfectadas y se colocaron en cajas Petri con la solución de antibióticos en proporción 1:1 para su selección, utilizando un estereoscopio. Se inocularon 10 esporas de HMA de cada cepa (Tabla 5), siguiendo la misma composición del medio MSR y el procedimiento del sistema planta-HMA empleado con *Cynodon dactylon*. La incubación se realizó durante doce semanas en el área de crecimiento bajo las mismas condiciones de crecimiento del laboratorio. A la cuarta semana, se añadió medio MSR sin vitaminas ni sacarosa con ayuda de una micropipeta a una temperatura inferior de 45 °C, debido a un agotamiento del medio de cultivo (Ferrol & Lanfranco, 2020).

**Tabla 5.**

*Tratamientos para evaluar la colonización de HMA en plántulas de Coffea sp.*

| Código | Tratamientos |
|--------|--------------|
| C4     | Cepa A       |
| C1     | Cepa B       |
| C6     | Cepa C       |
| C3     | Cepa A+B+C   |

#### **3.7.4.1 Tinción de raíces**

Se adaptó el protocolo de clarificación y tinción establecido por Ho-Plágaro et al. (2020). Para ello, las raíces fueron cortadas en fragmentos de 1 cm y colocadas en tubos Falcon de 15 ml. Se añadió agua destilada y se dejaron reposar durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró el agua destilada y se incorporó una solución de KOH al 10 % (v/v). Luego, se colocaron en un baño maría a 90 °C durante 2 horas, lo que permitió clarificar las raíces y hacer visible el cilindro vascular. Se eliminó el KOH y se enjuagó tres veces con agua destilada. Tras el aclarado, las raíces se sumergieron en HCl al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Sin enjuagar, se descartó el HCl y las raíces se tiñeron con una solución de azul de tripano al 0.05% preparada en ácido láctico al 10 % a 90°C durante 25 minutos. Se añadió ácido láctico al 10 % para eliminar el exceso de colorante y conservar las raíces hasta su observación bajo el microscopio.

#### **3.7.4.2 Porcentaje de micorrización arbuscular**

Las raíces teñidas se colocaron sobre portaobjetos con ácido láctico al 10 % (Ferrol & Lanfranco, 2020). Se evaluaron 100 campos de observación por tratamiento bajo un microscopio invertido y se calculó el porcentaje de micorrización con la Ecuación 1.

$$\% = \left( \frac{\text{Número de campos con (Hifas – Arbúsculos – Vesículas)}}{\text{Número total de campos de observación}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

### 3.8 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Se evaluaron tres propiedades fisicoquímicas del suelo: pH, capacidad de campo (CC) y textura (Tabla 6).

**Tabla 6.**

*Características del suelo para la evaluación de HMA en plantas de café bajo condiciones de estrés hídrico.*

| Características    | Valor obtenido |
|--------------------|----------------|
| Capacidad de campo | 45.52 %        |
| Textura del suelo  | Franco limoso  |
| pH                 | 6.89           |

#### 3.8.1 Capacidad de campo (CC)

Se calculó utilizando el método de saturación y drenaje, según la Ecuación 2. Primero, se tomó una muestra del sustrato, se saturó completamente con agua y se dejó drenar durante 48 horas. Luego, se pesó la muestra del suelo húmedo y se secó en una estufa a 60 °C durante 24 horas para obtener el peso seco (Petillo et al., 2008).

$$\% \text{ CC} = \left( \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

#### 3.8.2 Textura del suelo

Se empleó la pirámide de texturas para determinar la composición textural del suelo (Lizcano et al., 2017). Para ello, se pesó 50 g de muestra de suelo y se disolvieron con 150 ml de agua destilada. Esta suspensión se dejó en reposo durante dos horas hasta observar la formación de las capas (arena, limo y arcilla). Posteriormente, se midió la profundidad de cada capa y se utilizó la Ecuación 3 para calcular su porcentaje. Los

porcentajes obtenidos se compararon con la pirámide las texturas para identificar el tipo de suelo (Pozo, 2024).

$$\% = \left( \frac{\text{Profundidad de la capa en (cm)}}{\text{Profundidad total en (cm)}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

### **3.8.3 pH**

Se pesaron 25 g de suelo y se disolvieron en 50 ml de agua destilada. La mezcla se homogenizó y se midió el pH utilizando un potenciómetro calibrado (Pozo, 2024).

## **3.9 Aclimatación de *Coffea* sp.**

Las plántulas *in vitro* de café que presentaron un sistema radicular bien desarrollado se aclimataron utilizando sustrato compuesto por materia orgánica y arena en una proporción de 2:1. El sustrato fue esterilizado en autoclave a 121 °C por dos ciclos consecutivos y cada macetero se llenó con 100 g de sustrato, se cubrió con una tapa plástica perforada. Los agujeros en la tapa se ampliaron progresivamente cada semana para permitir la aclimatación gradual de las plántulas. Además, se aplicaron 35 ml de agua destilada estéril por macetero, asegurando una humedad equivalente al 60% de la capacidad de campo (Sánchez de Prager et al., 2010), condición que se mantuvo durante dos semanas. Para proporcionar los nutrientes necesarios al sistema, se añadió medio MSR líquido (sin Pythagel) como fertilizante. Las condiciones de crecimiento incluyeron una temperatura de  $25 \pm 1$  °C y un fotoperiodo 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

## **3.10 Inoculación de HMA y aplicación del estrés hídrico**

Posteriormente, se disolvieron 0.77 g de la micorriza comercial en 7.7 ml de agua destilada y se inoculó en las raíces de café. Durante esta etapa no se aplicó riego para favorecer la colonización micorrízica. Luego se una semana, se aplicaron los diferentes niveles de capacidad de campo (CC) (Tabla 7) con el fin de inducir el estrés hídrico.

Transcurridas dos semanas, se añadió medio MSR líquido (sin Pythapel) como fertilizante para proporcionar los nutrientes necesarios al sistema. El crecimiento de las plantas se mantuvo durante diez semanas bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo anteriormente mencionadas.

**Tabla 7.**

*Tratamientos para evaluar HMA bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Código | Tratamientos          |
|--------|-----------------------|
| h0a0   | Control (-) + 0 % CC  |
| h0a1   | Control (-) + 30 % CC |
| h0a2   | Control (-) + 60 % CC |
| h1a0   | Cepa C + 0 % CC       |
| h1a1   | Cepa C + 30 % CC      |
| h1a2   | Cepa C + 60 % CC      |

### 3.10.1 Mediciones

Diez semanas después de la siembra, se cosecharon los brotes de café y se retiró el sistema radicular de cada maceta. Las variables evaluadas incluyeron la longitud y peso de la raíz, así como la altura y biomasa aérea de las plantas. Además, se determinó el porcentaje de colonización micorrízica en las raíces, utilizando la técnica de clarificación y tinción descrita por Ho-Plágaro et al. (2020), como se mencionó anteriormente. Las raíces teñidas fueron montadas en portaobjetos y observadas bajo un microscopio invertido con un aumento de 40x. Para cada muestra se examinaron 100 campos de observación para identificar estructuras micorrízicas como hifas, vesículas y arbuscúlos.

### 3.11 Análisis estadístico

Para la evaluación de desinfección, multiplicación y enraizamiento de *Coffea* sp., se aplicó un diseño por bloques completamente al azar (DBCA), con tres tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento, dando un total de quince unidades experimentales. Para determinar el nivel de micorrización de HMA, se empleó un diseño completamente al azar (DCA) bajo un esquema unifactorial. En este caso, se consideraron cuatro tratamientos correspondientes a diferentes cepas de HMA: Cepa A, Cepa B, Cepa C y Cepa A+B+C, cada uno contó con tres repeticiones, resultando en 12 unidades experimentales. En el ensayo de estrés hídrico, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en un esquema factorial 2x3, con dos factores de estudio: las cepas de HMA y los niveles de capacidad de campo. Cada combinación fue evaluada con cuatro repeticiones, dando un total de 24 unidades experimentales.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software InfoStat. Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Posteriormente, se empleó un análisis de varianza (ANOVA), complementado con la prueba de Tukey y considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO IV

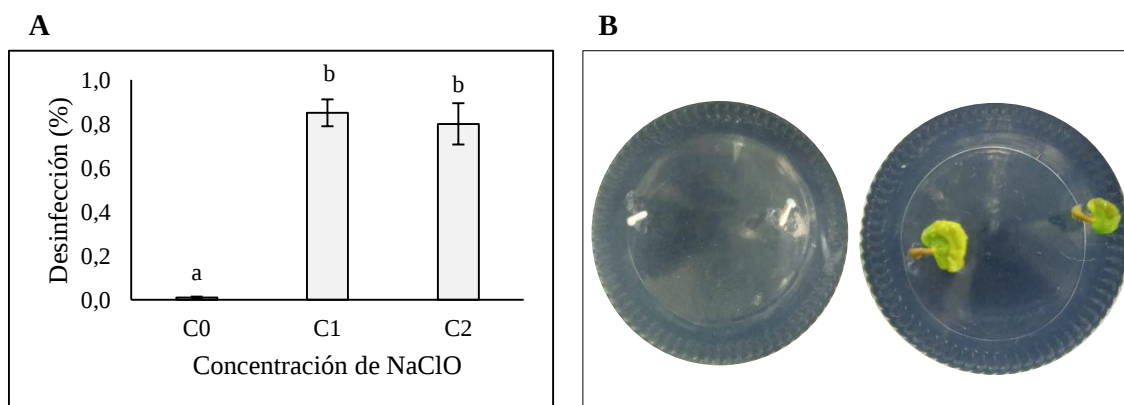
### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Desinfección de semillas de *Coffea* sp.

Se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.01$ ) (Anexo 1). En el tratamiento C0, ninguno de los embriones cigóticos germinó (Figura 4A). Por otro lado, los tratamientos C1 y C2 alcanzaron porcentajes de desinfección superiores al 80 %, permitiendo la germinación de todos los embriones que no presentaban contaminación (Figura 4B).

#### Figura 4.

A. Porcentaje de desinfección bajo tres concentraciones diferentes de NaClO, B. Germinación de embriones cigóticos de *Coffea* sp.



Al comparar estos resultados con otros estudios sobre semillas de *Coffea* sp., se encontró una limitada cantidad de investigaciones que reporten específicamente la desinfección y germinación de estos explantes para su establecimiento *in vitro*. La mayoría de estudios se centran en otro tipo de explantes, como hojas, meristemas apicales o yemas, debido a su mayor capacidad de regeneración y alta tasa de multiplicación *in vitro*, como señala Fernández et al. (2010). Sin embargo, al contrastar los porcentajes de desinfección obtenidos en este estudio (Figura 4A) con los de Ebrahim et al. (2007), se observó que estos autores reportaron resultados similares para la desinfección de semillas

de *Coffea arabica*, al emplear hipoclorito de sodio al 1.25 %, con índices de supervivencia superiores al 80 %. Estos resultados demuestran la eficacia del hipoclorito de sodio a bajas concentraciones, puesto que un aumento en su concentración puede disminuir la viabilidad de los explantes hasta un 50% (Mongelós-Franco et al., 2020).

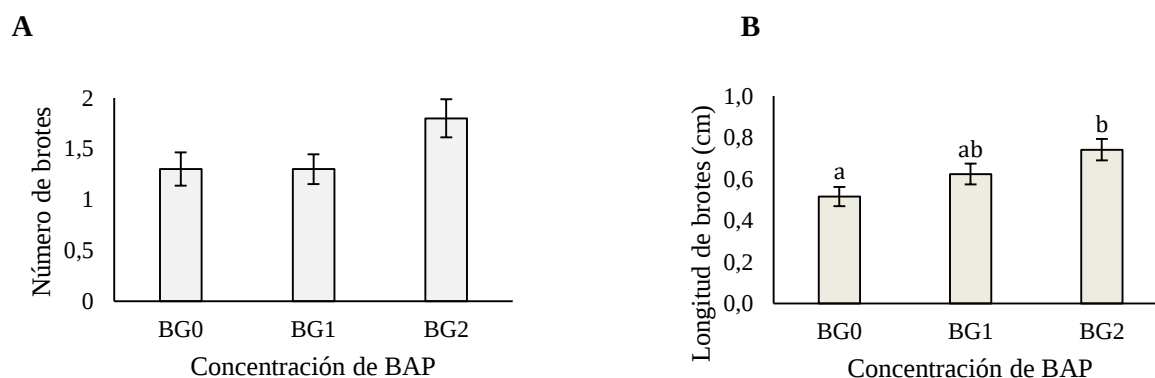
Por otro lado, al analizar la germinación observada en este estudio (Figura 4A) con la reportada por Souza et al. (2016) en semillas de *Genipa americana* L. (familia Rubiaceae), se evidencia un potencial de germinación reducido (34 %). Sin embargo, dichos autores modificaron la composición del medio MS y redujeron a la mitad la concentración de sacarosa (15 mg/L), lo que pudo haber influido en la variabilidad de los resultados. Además, la adición de BAP en el medio de cultivo empleado en esta investigación pudo haber favorecido la germinación, puesto que las citoquininas, entre ellas el BAP, se acumulan en el endospermo de la semilla y participan en su desarrollo al estimular la división celular en el embrión (Rodríguez Beraud et al., 2016).

#### **4.2 Multiplicación de *Coffea* sp.**

Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en el número de brotes ( $p>0.05$ ) (Anexo 2) (Figura 5A.). Sin embargo, el tratamiento BG2 presentó un promedio de 1.8 brotes. Para la longitud de brotes, se observaron diferencias significativas ( $p<0.01$ ) (Anexo 2) (Figura 5B, Figura 6), y el tratamiento BG2 alcanzó la mayor longitud, con un promedio de 0.7 cm.

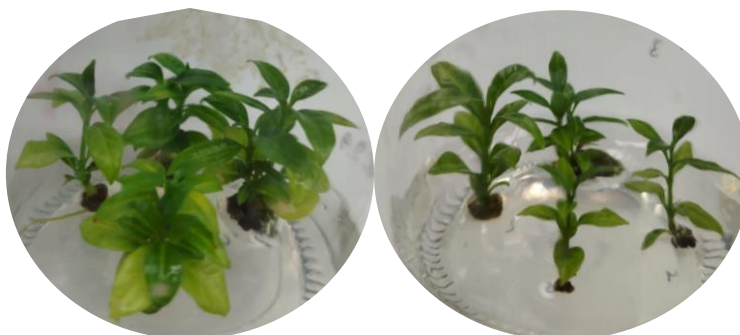
**Figura 5.**

A. Número de brotes, B. Longitud de brotes (cm) de *Coffea sp.* bajo diferentes concentraciones de BAP.



**Figura 6.**

Multiplicación de microestacas de *Coffea sp.*



Los resultados obtenidos en esta investigación difieren de los reportados por Ebrahim et al. (2007), quienes observaron resultados positivos al utilizar el medio Murashige & Skoog (MS) complementado con 8.0 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IAA, logrando entre 15.4 y 16.8 brotes. Estos hallazgos coinciden con los de AL-Azab et al. (2015), quienes demostraron que concentraciones más altas de BAP promueven un mayor número y longitud de brotes, alcanzando 14 brotes por explante con 8.0 mg/L de BAP. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio fueron significativamente inferiores (1.8 brotes y 0.7 cm de longitud) (Figura 5A, 5B), lo que podría atribuirse al uso del AG en lugar de auxinas como complemento al BAP, tal como lo sugieren Lozano et al. (2014). Además, el tiempo de cultivo es otro factor que pudo haber influido, puesto que AL-Azab et al. (2015) y Ebrahim et al. (2007) mantuvieron sus cultivos durante tres

meses antes de la evaluación, mientras que en este estudio se recolectaron los datos después de un mes.

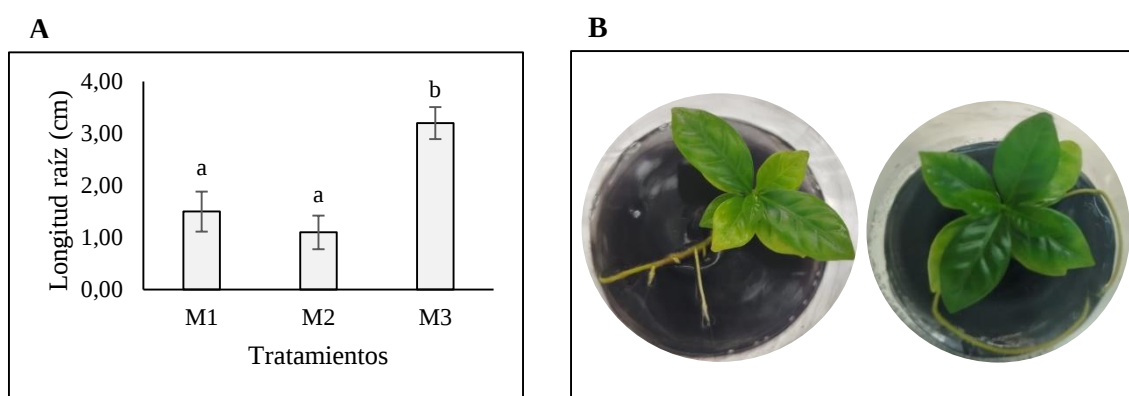
Por otro lado, este estudio evidenció la formación moderada de callo en la base del microesqueje en el tratamiento BG2, lo que podría deberse a que, en algunas especies, concentraciones superiores a 1 mg/L de BAP estimulan la división celular. Esto interrumpe la dominancia apical y reduce el crecimiento vertical de la planta, formando segmentos más cortos y la aparición de callo (Orellana et al., 2013).

#### 4.3 Enraizamiento de *Coffea* sp.

Los resultados indicaron que hubo diferencias significativas en la longitud de la raíz (cm) ( $p < 0.01$ ) (Anexo 3). El tratamiento M3 alcanzó la mayor longitud, con un promedio de 3.20 cm (Figura 7A, 7B), significativamente mayor que los tratamientos M1 y M2, que no mostraron significativas entre sí.

**Figura 7.**

A. Longitud de raíz (cm) en diferentes medios de cultivo, B. Plántulas de *Coffea* sp. enraizadas in vitro.



Al comparar esta investigación con otros estudios, no se encontró evidencia del uso exclusivo del medio Murashige & Skoog (MS) para la fase de enraizamiento, sino que se reporta su uso en combinación con auxinas como el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (AIB), como lo señala Arevalo, (2019). Sin embargo, en el

presente estudio no se evaluaron estas fitohormonas debido a la alta presencia de callo en la base de los microbrotes, lo que inhibió la formación de raíces. No obstante, se observó una formación radicular moderada en el tratamiento con medio MS al 50% (M1). De acuerdo con Castilla-Valdés et al. (2020), esta respuesta podría deberse a la baja concentración de nutrientes, lo que promueve la emisión de raíces como mecanismo adaptativo. Cabanillas Rodríguez, (2023) respalda lo señalado, quien indica que el medio MS al 50% favorece un abundante desarrollo del sistema radicular en *Coffea arabica* var. *Geisha*.

Por otro lado, la aplicación del medio MSR suplementado con carbón activado ha sido reportada por Ferrol & Lanfranco, (2020) en cultivos *in vitro* de banano, con el objetivo de absorber compuestos fenólicos, fortalecer el enraizamiento y permitir que sus raíces se desarrollen en condiciones de sombra, lo que coincide con los hallazgos del presente estudio, en el que se obtuvo un mayor crecimiento radicular bajo condiciones similares (M3). Así mismo, estos resultados concuerdan con Pedroza, (2009), quien señala que la adición de carbón activado en concentraciones entre 0.5 g a 5.0 g/L estimula la formación radicular en orquídeas, debido a un oscurecimiento del medio, lo que reduce la oxidación y favorece un mayor número de raíces.

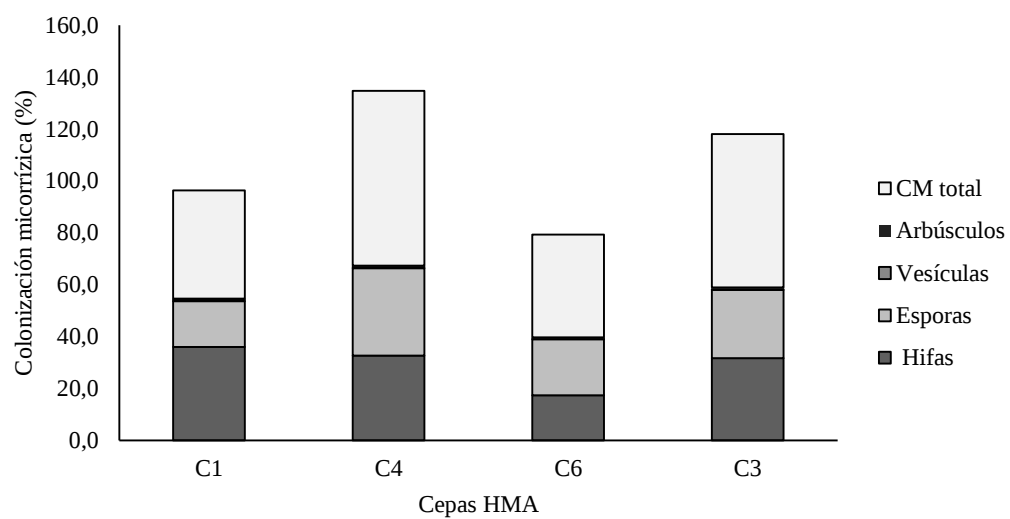
#### **4.4 Porcentaje de colonización micorrízica del sistema planta-HMA *in vitro***

Para las cepas C1, C4, C6 y C3 no existieron diferencias significativas en el porcentaje de colonización de hifas, vesículas, esporas y arbuscúlos ( $p=0.46$ ;  $p=0.88$ ;  $p=0.7$ ;  $p=0.80$ , respectivamente) (Anexo 4) (Figura 8). Sin embargo, la cepa C4 presentó el mayor porcentaje de CM total (67.3%). Las hifas fueron la estructura con mayor incidencia en todos los tratamientos, mientras que la formación de vesículas y arbuscúlos fue inferior al 10 % en todos los casos. Esta baja presencia de estructuras internas sugiere

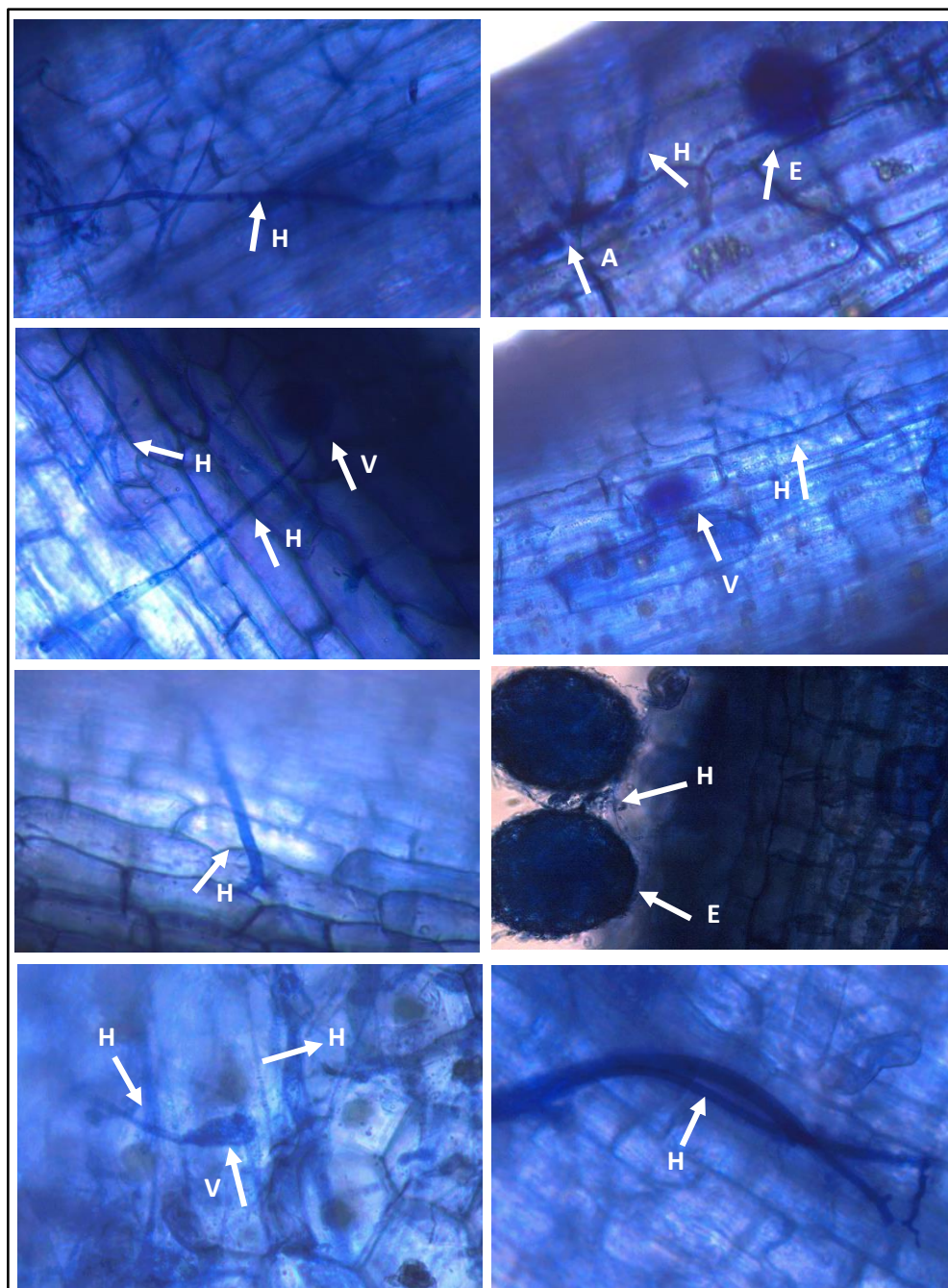
un comportamiento simbiótico de las cepas caracterizado por una colonización externa predominante, evidenciada por la alta presencia de esporas (Figura 8) (Figura 9).

**Figura 8.**

*Porcentaje de colonización micorrízica de la Cepa C1, C4, C6 y C3.*



**Figura 9.**  
Estructuras de HMA en raíces de *Coffea sp.*



Nota: H: Hifa. V: Vesícula. E: Espora. A: Arbusculo.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una baja colonización arbuscular (0.3 % - 0.7 %) a los 120 días, en contraste con lo reportado por Marysol et al. (2025) quienes observaron una colonización del 52.13 % a los 75 días en *Swietenia*

*macrophylla* inoculada con *Glomus* sp. En cuanto a la colonización por vesículas, los valores fueron similares en ambos estudios, con un 1.06 % y un rango de 0.3 % a 0.7 % en el presente trabajo. Sin embargo, se observaron discrepancias en la presencia de hifas, debido a que no reportaron colonización hifal, en contraste con este estudio que se registró una abundante colonización por hifas, con niveles superiores al 30 %.

Estas diferencias podrían estar relacionadas con el cultivo *in vitro* de HMA, Silvani et al. (2019) mencionan que el sistema de cultivo *in vitro* puede afectar el desarrollo de HMA. Se reportaron cambios morfológicos en las hifas extrarradicales de *Rhizophagus irregularis* y variaciones morfológicas en las esporas producidas *in vitro* de *Claroideoglomus etunicatum* en comparación con las esporas producidas en suelo. Además, las plantas propagadas *in vitro* de café presentan un escaso desarrollo radicular, lo que limita la secreción de exudados para establecer asociaciones simbióticas (Vaast et al., 1996).

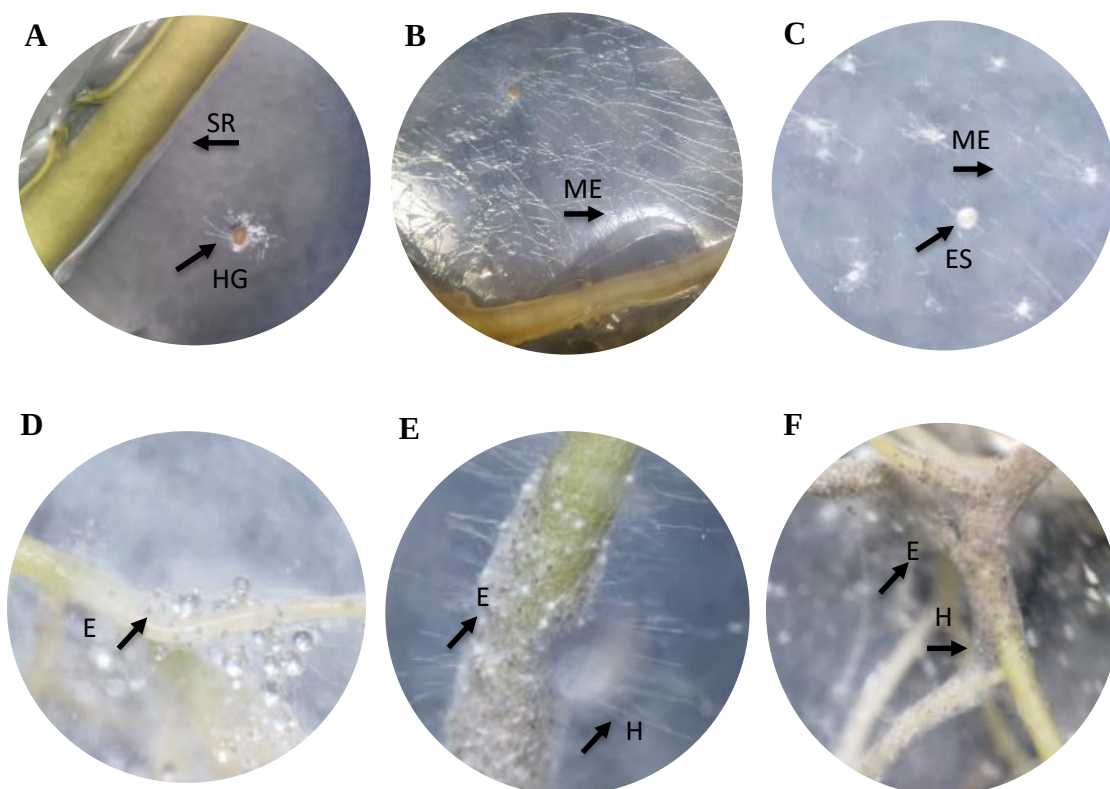
#### **4.5 Crecimiento de HMA en el sistema planta-HMA *in vitro***

El monitoreo periódico de las cepas en el sistema planta-HMA *in vitro* indicó que las esporas de todos los tratamientos (C1, C4, C6, C3) germinaron al día 2, mostrando la formación de hifas germinantes (HG) dirigidas hacia las raíces del hospedante (Figura 10A). Para el día 7, las hifas se habían expandido por todo el medio de cultivo MSR, formando un micelio extrarradical (ME) bien definido (Figura 10B). Al día 21, se observó una aglomeración de hifas en el micelio extrarradical, lo que dio lugar a la formación de esporas secundarias (ES) de color blanquecino (Figura 10C). Para el día 28, dichas esporas alcanzaron la madurez, evidenciada por un cambio de color a café (Figura 10D). Al día 35, se produjo una colonización masiva de esporas maduras (E) e hifas (H)

alrededor de todas las raíces del hospedante (Figuras 10E, 10F). A partir de este día, el crecimiento de HMA se mantuvo constante.

**Figura 10.**

*Crecimiento de HMA usando Coffea sp. como planta huésped. A. Formación de hifas germinantes (HG) hacia raíces del hospedante (R), B. Formación de micelio extrarradical (ME), C. Formación de esporas secundarias (ES) en micelio extrarradical (ME), D. Esporas maduras (E) en raíces del hospedante (R), E. y F. Colonización de esporas maduras (S) e hifas (H) en raíces del hospedante (R).*



Nota: (HG): Hifas germinantes. (ES): Esporas secundarias. (E): Esporas maduras. (ME): Micelio extrarradical. (H): Hifas. (R): Raíces del hospedante.

Dalpé et al. (2005), mencionan que las esporas de *Glomus* pueden tardar desde unos días hasta 6 meses en germinar, formando un tubo germinal que se ramifica y crece en todas las direcciones. Por su parte, Pawlowska, (1999) reportó que las esporas de *Glomus etunicatum* germinaron entre 4 y 10 días. En su estudio, utilizó el medio White modificado y raíces transformadas de zanahorias como huésped, factores que pueden influir significativamente en el tiempo de germinación. En contraste, en la presente

investigación se utilizó medio MSR y raíces de *Coffea* sp., lo que resultó en una germinación más rápida, en solo 2 días (Figura 10A).

Por otro lado, en cuanto a la formación de nuevas esporas (Figura 10C), los resultados de este estudio concuerdan con los de Pawlowska, (1999), quién indicó que este proceso inició a partir de las 2 semanas. Según su estudio, las esporas se formaron mediante hinchazones terminales en la red micelial, observándose un cambio de coloración de blanco opaco a café oscuro (Figura 10C, 10D), lo cual coincide con los resultados obtenidos.

Así mismo, los resultados registrados en esta investigación concuerdan con los de Eskandari & Danesh, (2010), quienes cultivaron *Glomus intraradices* en el medio de cultivo MSR y obtuvieron una germinación de 3 a 5 días, observando la formación de una red extensa de hifas. Además, señalaron que el crecimiento de esporas e hifas no depende directamente de la planta huésped, sino de la presencia de flavonoides, los cuales estimulan la activación y crecimiento inicial de las esporas. Nagahashi et al. (2000); Siqueira et al. (2013), destacaron que el nivel de humedad del medio de cultivo, un pH neutro, una temperatura óptima entre 20 y 30 °C, bajas cantidades de luz y los exudados de las raíces de la planta huésped son determinantes para promover la germinación y la ramificación de hifas.

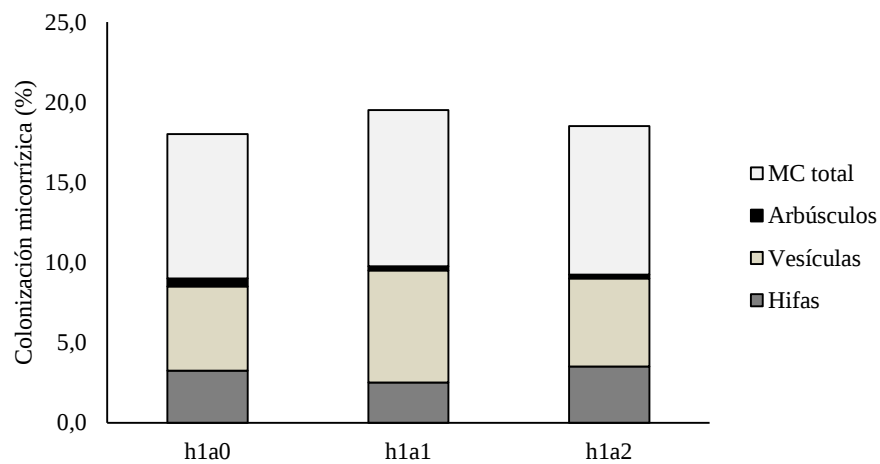
#### **4.6 Colonización micorrízica de HMA bajo estrés hídrico**

Se determinó que el porcentaje de colonización micorrízica fue similar entre los tratamientos evaluados (h1a0, h1a1, h1a2), sin diferencias significativas ( $p=0.99$ ) (Anexo 5) (Figura 11). En todos los tratamientos se identificaron las tres estructuras micorrízicas (hifas, vesículas y arbuscúlos) (Figura 12). Las hifas representan el mayor porcentaje de colonización, seguidas por las vesículas y, en menor proporción, los arbuscúlos. Estos

resultados indican una colonización micorrízica activa en las raíces de *Coffea* sp., independientemente del nivel de humedad del sustrato.

**Figura 11.**

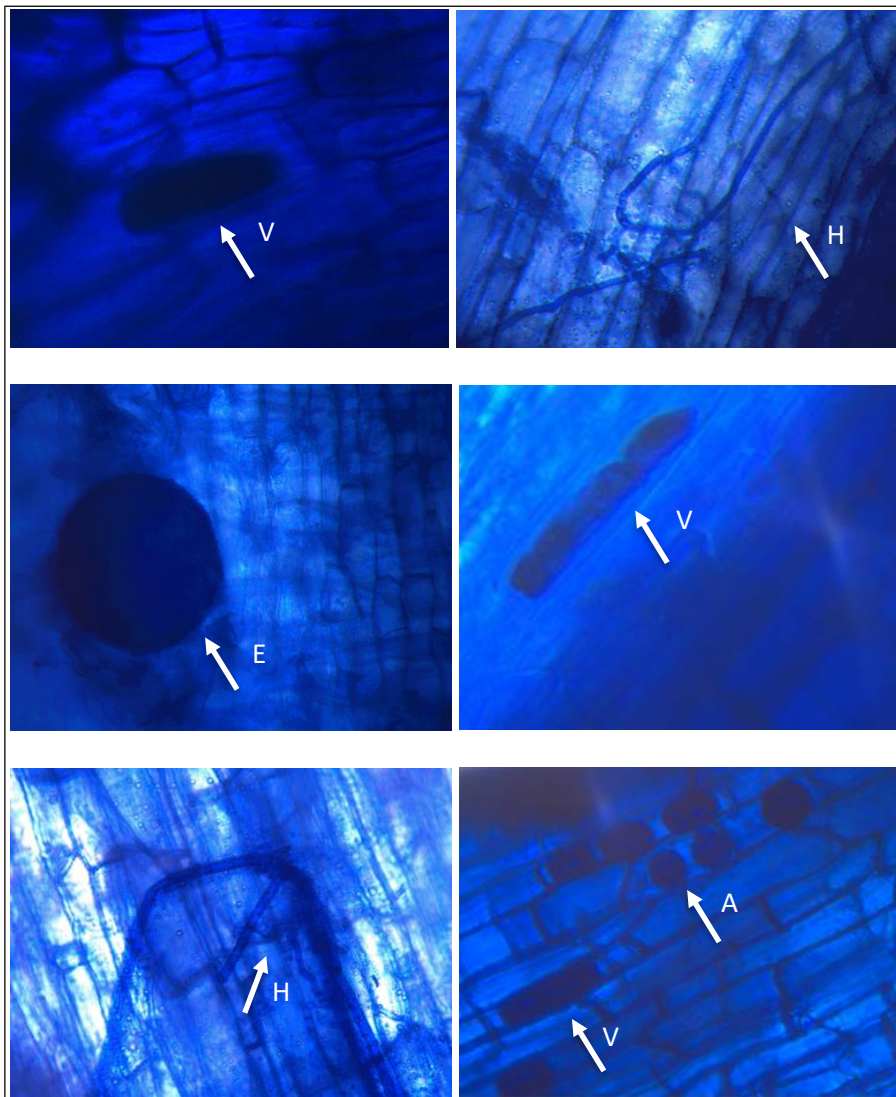
*Porcentaje de colonización micorrízica de raíces de plántulas de Coffea sp., bajo diferentes niveles de capacidad de campo (CC).*



Nota: (h1): HMA, (a0): 0 %, (a1): 30 %, (a2): 60 % de capacidad de campo.

**Figura 12.**

*Estructuras de HMA en raíces de plántulas de Coffea sp., bajo diferentes niveles de capacidad de campo (CC).*



Nota: H: Hifa. V: Vesícula. E: Espora. A: Arbúsculo.

El porcentaje de colonización micorrízica presentado en este estudio fue inferior al reportado por Moreira et al. (2019), quien obtuvo un 39 % de colonización en café en asociación con *Rhizophagus clarus* al 71 % de capacidad de campo. En ambos estudios se identificó una reducción en la colonización por HMA conforme incrementaba el nivel de humedad en el suelo. Esta reducción podría estar relacionada con una menor aireación del sustrato como resultado de un alto contenido de agua, lo que favorece el desarrollo de organismos parásitos que inhiben la germinación de esporas y el crecimiento micelial de

los hongos (Moreira & Siqueira, 2006). Según, Harris-Valle et al. (2009), la efectividad de la micorrización para potenciar la asimilación de agua varía según la especie de HMA y está vinculada con la cantidad de micelio que produce cada hongo y la frecuencia con la que las raíces son colonizadas por estructuras fúngicas.

Para la especie *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* Fernández et al. (2017), obtuvieron un porcentaje de colonización del 25 % y 50 % en plantas de Red Globe y Crimson a los dos años de aplicado el tratamiento, siendo valores superiores a los del presente estudio. Moreira & Siqueira, (2006), mencionan diversos factores pueden influir en la formación de estructuras micorrízicas como la disponibilidad de nutrientes, pH, humedad, especie, edad, ciclo y tasa de crecimiento, sistema radicular, intensidad de luz y temperatura.

#### **4.7 Efecto de los HMA sobre la biomasa vegetal bajo estrés hídrico**

Las variables evaluadas longitud de raíz, peso de raíz, altura aérea y biomasa aérea no presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ), según los análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 6) (Figura 13). Sin embargo, se observó una variabilidad biológica en las respuestas de las plantas, reflejada en las diferencias entre las medias de los tratamientos, particularmente en aquellos con inoculación de HMA (h1a0, h1a1, h1a2) que presentaron un mejor desempeño en todas las variables analizadas en comparación con los controles sin HMA (h0a0, h0a1, h0a2).

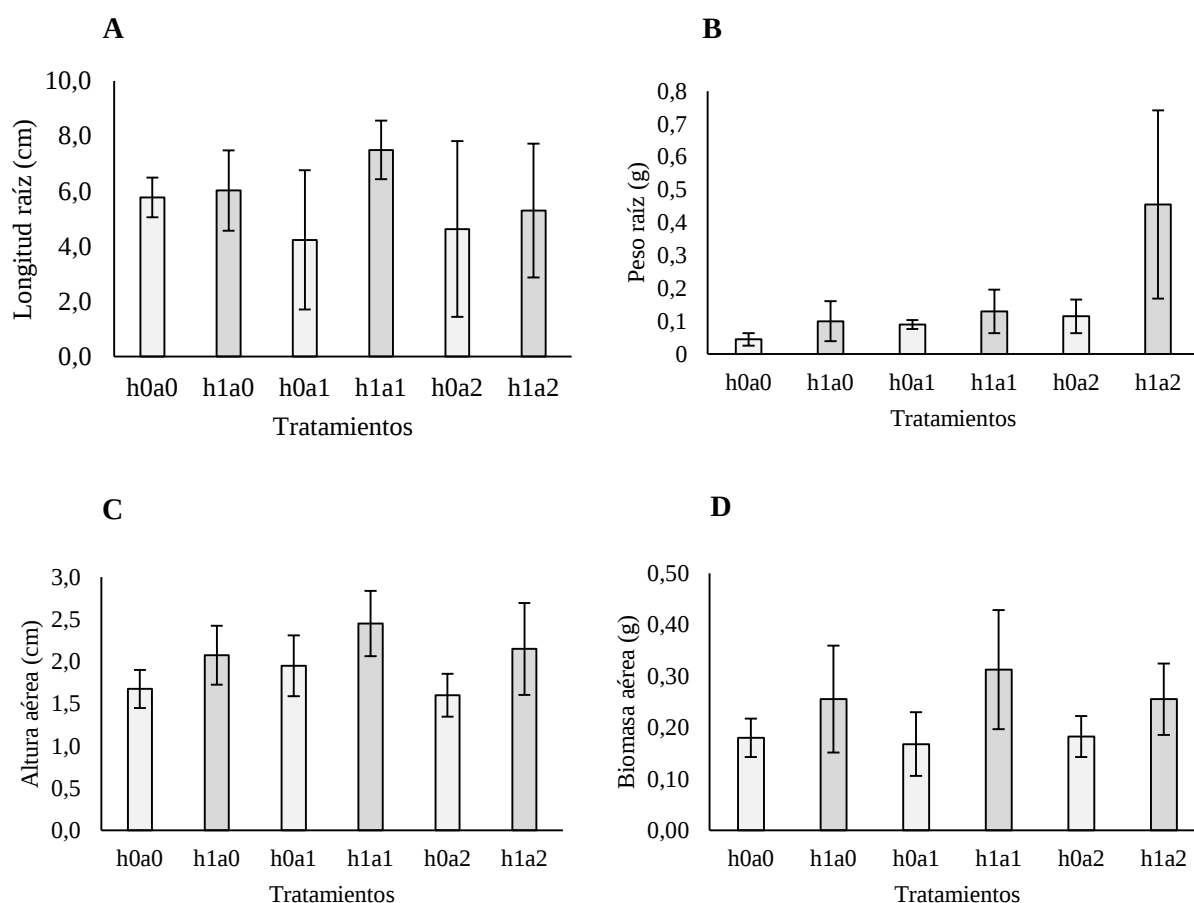
En cuanto a la longitud de raíz (Figura 13A), el tratamiento h1a1 mostró el valor más alto (7.5 cm), superando a todos los controles, aunque sin diferencia significativa. Para el peso de raíz (Figura 13B), el tratamiento h1a2 presentó la mayor biomasa radicular (0.46 g), lo que indica una posible mayor acumulación de reservas en raíces bajo estas condiciones de mayor humedad y simbiosis micorrízica. Con respecto a las variables

aéreas (Figura 13C), el tratamiento h1a1 alcanzó una mayor altura aérea (2.45 cm) y la mayor biomasa aérea (0.31 g) (Figura 13D), superando a sus respectivos controles sin micorriza.

Esta variabilidad indica una tendencia favorable en el desarrollo de las plántulas tratadas con HMA bajo condiciones de capacidad de campo intermedia y alta, lo que sugiere una posible optimización en la absorción de agua y nutrientes en situaciones de estrés hídrico moderado.

**Figura 13.**

*A. Longitud de raíz (cm), B. Peso de raíz (g), C. Altura aérea (cm), D. Biomasa aérea (g) de plántulas de Coffea sp inoculadas con HMA, bajo diferentes niveles de capacidad de campo (CC).*



Nota: (h0): control, (h1): HMA, (a0): 0 %, (a1): 30 %, (a2): 60 % de capacidad de campo.

A pesar de la falta de diferencias significativas, los resultados de esta investigación coinciden con lo reportado por Moreira et al. (2018), quienes observaron un mayor desarrollo foliar y masa seca de raíces en plantas de café inoculadas con HMA en comparación con plantas no inoculadas. En este estudio, la inoculación con especies como *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum* y *Dentiscutata heterogama* permitió a las plantas tolerar condiciones de déficit hídrico moderado, cercanas al 75 % de capacidad de campo.

De manera similar, en el presente trabajo se evidenció un mejor crecimiento de las plántulas de café cuando estuvieron asociadas con HMA y sometidas a condiciones de humedad del suelo equivalentes al 30 % y 60 % de capacidad de campo. Estos resultados sugieren que, bajo condiciones de déficit hídrico, el crecimiento de las plantas de café, se ven comprometidos debido a alteraciones en los procesos fisiológicos (Moreira et al., 2018).

La tendencia observada en los resultados sugiere que la inoculación con HMA bajo un nivel moderado de estrés hídrico podría favorecer el crecimiento de las plántulas de café. Esto coincide con lo planteado por Andrade et al. (2009), quien señala que, en condiciones de baja disponibilidad de agua, el intercambio de carbono por fósforo entre planta y hongo puede intensificarse, beneficiando a ambos organismos. Además, según Harris-Valle et al. (2009), la micorrización mejora el estado hídrico de la planta mediante un ajuste osmótico más eficiente, favoreciendo la turgencia, la apertura estomática y, por ende, la fotosíntesis. En conjunto, estos mecanismos podrían explicar por qué, incluso bajo cierto grado de estrés hídrico, la asociación micorrízica promueve un mejor desarrollo de la biomasa aérea.

La asociación simbiótica con HMA alivia el estrés hídrico en las plantas, mediante la modificación de sus perfiles hormonales y de su fisiología vegetal. Uno de los mecanismos clave en es el incremento en la producción de estrigolactona, compuestos exudados en la rizósfera que promueven el establecimiento de la simbiosis micorrízica (Chen et al., 2018; Ruiz-Lozano et al., 2016). Además, los HMA producen una proteína denominada glomalina, que se acumula en las hifas, las raíces y el suelo, contribuyendo a la formación de agregados estables del suelo. Esta acción mejora la estructura del suelo, su capacidad para retener agua e incrementar la absorción de nutrientes (González-Chávez et al., 2004).

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- La inoculación micorrízica fue efectiva en condiciones *in vitro*, destacándose la cepa C4, que alcanzó 67.3 % de colonización total. En todos los tratamientos se observó una predominancia de hifas, lo que evidencia una compatibilidad simbiótica entre las cepas utilizadas y *Coffea* sp. Sin embargo, la baja presencia de arbuscúlos y vesículas (<10%), podría estar asociada a las limitaciones del sistema *in vitro*, como la menor emisión de exudados radiculares, que son fundamentales para establecer asociaciones simbióticas.
- Bajo estrés hídrico, la aplicación de HMA mejoró las variables de crecimiento vegetal, principalmente en el tratamiento con 30 % de capacidad de campo (h1a1), donde se obtuvo la mayor longitud de raíz (7.5 cm), biomasa aérea (0.31 g) y altura foliar (2.45 cm), superando al control. Aunque no se registraron diferencias estadísticas significativas, las plantas tratadas con HMA reaccionaron mejor que los controles en todas las variables evaluadas. Se puede evidenciar que la simbiosis planta-HMA permite a las plántulas desarrollar mecanismos de tolerancia al estrés, como una mayor expansión radicular y acumulación de biomasa.
- La hipótesis planteada en esta investigación se confirma parcialmente. Los resultados sugieren que la colonización micorrízica en el sistema radicular de *Coffea* sp. puede mitigar los efectos del estrés hídrico y favorecer la absorción de agua y nutrientes; a pesar de esto, los datos estadísticos no fueron significativos,

asociando a factores externos como el tipo de cepa, etapa fenológica y condiciones del entorno que contribuirían a un mejor desarrollo.

## 5.2 Recomendaciones

- Ampliar el tiempo de cultivo en los ensayos de estrés hídrico, puesto a que se identificó que las primeras ocho semanas son una etapa de adaptación en plántulas de *Coffea* sp. Por ello, extender el periodo experimental permitiría el desarrollo más completo de las estructuras micorrízicas internas como vesículas y arbusculos, cuya presencia fue limitada en este estudio.
- Implementar ensayos que involucren diferentes concentraciones de fósforo, puesto que la disponibilidad de este nutriente influye en la colonización micorrízica. Además, evaluar el comportamiento de las cepas bajo diferentes tipos de estrés abiótico, con el fin de caracterizar su adaptabilidad y funcionalidad simbiótica.
- Realizar los ensayos en condiciones de campo controlado o invernadero, puesto que la variabilidad y complejidad de los suelos naturales pueden aportar datos más representativos sobre el comportamiento de HMA en sistemas agrícolas reales, promoviendo el uso de estas cepas en prácticas agrícolas sostenibles.

## REFERENCIAS

- AL-Azab, A., Habib, S. M., Hussein, A., & El-Sherif, F. (2015). Micropropagation of Four Coffee Cultivars (*Coffea arabica* L.) from Yemen through Shoot Tip Culture. *Hortsciencie*, 4(41522), 25–31.
- Amiri, R., Nikbakht, A., & Etemadi, N. (2015). Alleviation of drought stress on rose geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit.] in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. *Scientia Horticulturae*, 197, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.062>
- Andrade-Torres, A. (2010). MICORRIZAS: Antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*.
- Andrade, S. A. L., Mazzafera, P., Schiavinato, M. A., & Silveira, A. P. D. (2009). Arbuscular mycorrhizal association in coffee. In *Journal of Agricultural Science* (Vol. 147, Issue 2, pp. 105–115). <https://doi.org/10.1017/S0021859608008344>
- Arevalo, K. (2019). “MICROPROPAGACIÓN DE *Coffea arabica* L. Var. *Typica* ‘CAFÉ’ EN JAÉN – PERÚ.” UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN.
- Assouline, S., & Or, D. (2014). The concept of field capacity revisited: Defining intrinsic static and dynamic criteria for soil internal drainage dynamics. *Water Resources Research*, 50(6), 4787–4802. <https://doi.org/10.1002/2013WR014979.Reply>
- Bahadur, A., Batool, A., Nasir, F., Jiang, S., Mingsen, Q., Zhang, Q., Pan, J., Liu, Y., & Feng, H. (2019). Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20174199>
- Bramel, P., Krishnan, S., Horna, D., Brian, L., & Montagnon, C. (2017). Crop\_Conservation\_Strategy\_Coffee. *GLOBAL CONSERVATION STRATEGY FOR COFFEE GENETIC RESOURCES*.
- Cabanillas Rodríguez, E. A. (2023). Estandarización de un sistema de micropropagación clonal in vitro de *Coffea arabica* L. “café” var. *Geisha* tolerante a *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome “roya amarilla.”
- Cassel, D. K., & Nielsen, D. R. (1986). Field Capacity and Available Water Capacity: Part 1 Physical and Mineralogical Methods. *Methods of Soil Analysis*, 9(9), 901–926.
- Castilla-Valdés, Y., Esther González-Vega, M., & Espinosa-Torres, L. (2020). In vitro conservation of coffee-tree (*Coffea arabica* L.) by decreasing mineral salts in the culture medium. In *Cultivos Tropicales* (Vol. 41, Issue 1). <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Chemura, A., Mutanga, O., & Dube, T. (2017). Remote sensing leaf water stress in coffee (*Coffea arabica*) using secondary effects of water absorption and random forests. *Physics and Chemistry of the Earth*, 100, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2017.02.011>
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., & Reinhardt, D. (2018). Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application. *Frontiers in Plant Science*, 9(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Choi, J., Summers, W., & Paszkowski, U. (2024). Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annual Review of Phytopathology* Downloaded from [Www.Annualreviews.Org](http://www.annualreviews.org). Guest, 8, 15. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516>
- Cordova Reyes, D. A. (2020). EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE MICORRIZAS EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE CAFÉ EN ETAPA DE VIVERO EN SAN MARTIN DE PANGO - SATIPO. Universidad Nacional del Centro del Perú.

- Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, D.-G., & Declerck, S. (2005). 8 *Methodologies for in Vitro Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs* (Vol. 4). Verlag Berlin Heidelberg. <http://www.isinet.com>
- Crossay, T., Antheaume, C., Redecker, D., Bon, L., Chedri, N., Richert, C., Guentas, L., Cavaloc, Y., & Amir, H. (2017). New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-6>
- Cruz, R. de S., Araújo, F. H. V., França, A. C., Sardinha, L. T., & Machado, C. M. M. (2020). Physiological responses of coffee arabica cultivars in association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Coffee Science*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.25186/cs.v15i.1641>
- Dalpé, Y., de Souza, F. A., & Declerck, S. (2005). Life Cycle of Glomus Species in Monoxenic Culture. *Springer Nature*, 4, 49–71. [https://doi.org/10.1007/3-540-27331-x\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-27331-x_4)
- Damatta, F. M. (2004). Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. In *Braz. J. Plant Physiol* (Vol. 16, Issue 1).
- Ebrahim, N., Shibli, R., Makhadmeh, I., Shatnawi, M., & Abu-ein, A. (2007). In vitro Propagation and In vivo Acclimatization of Three Coffee Cultivars (Coffea arabica L.) From Yemen. *World Applied Sciences Journal*, 2(2), 142–150.
- Eskandari, A., & Danesh, Y. R. (2010). Study on Life Cycle of an Arbuscular Mycorrhizal. *Journal of Phytology*, 2(6), 69–75. [www.journal-phytology.com](http://www.journal-phytology.com)
- Fernández, F., Juárez, J., Nicolás, E., Kirchmair, M., García, F. J., Bernabé, A. J., Gómez-Montiel, J., & Gomez, M. (2017). Evolución de la efectividad y persistencia del hongo micorrízico arbuscular *Glomus iranicum* var *tenuihypharum* var . nova sobre la fisiología , la adquisición de nutrientes y el rendimiento de las variedades de uva Red Globe y Crimson , tratadas durante tr (Issue 1).
- Fernández, R., De Guglielmo, Z., & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café Tissue culture and genetic transformation of coffee. *Revista de Investigación N°*, 71(1), 57–84.
- Ferrol, N., & Lanfranco, L. (2020). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 2146. *Springer Nature*, 2146. <http://www.springer.com/series/7651>
- Garzón, L. P. (2015). Importancia de las micorrizas arbusculares (ma) para un uso sostenible del suelo en la amazonia colombiana. *Luna Azul*, 42, 217–234. <https://doi.org/10.17151/luaz.2016.42.14>
- González-Chávez, M., Gutiérrez-Castorena, M., & Wright, S. (2004). HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN LA AGREGACIÓN DEL SUELO Y SU ESTABILIDAD Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Soil Aggregation and its Stability. *Terra Latinoamericana*, 22, 507–514.
- Guevara Albán, G. P., Guevara Albán, C. S., & Verdesoto Arguello, A. E. (2018). Redes Informáticas aplicadas a la Educación. *RECIMUNDO*, 24–44. [https://doi.org/10.26820/RECIMUNDO/2.\(2\).2018.24-44](https://doi.org/10.26820/RECIMUNDO/2.(2).2018.24-44)
- Harris-Valle, C., Esqueda, M., Valenzuela-Soto, E. M., & Castellanos, A. E. (2009). Water stress tolerance in plant-arbuscular mycorrhizal fungi interaction: Energy metabolism and physiology | Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: Metabolismo energético y fisiología. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 265–271.

- Harrison, M. J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 59, pp. 19–42). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123749>
- Ho-Plágaro, T., Tamayo-Navarrete, M. I., & García-Garrido, J. M. (2020). Histochemical Staining and Quantification of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2146, pp. 43–52). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0603-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0603-2_4)
- Huang, Y. M., Zou, Y. N., & Wu, Q. S. (2017). Alleviation of drought stress by mycorrhizas is related to increased root H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> efflux in trifoliate orange. *Scientific Reports*, 7(January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep42335>
- Kalamulla, R., Karunarathna, S. C., Tibpromma, S., Galappaththi, M. C. A., Suwannarach, N., Stephenson, S. L., Asad, S., Salem, Z. S., & Yapa, N. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sustainable Agriculture. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su141912250>
- Lizcano, R., Dilier, T., Viciado, O., Saavedra, D., Leidy, M., Cuellar, M., Rolando, E., Manuel, V., Moreno, F., Marco, P., & Flórez, F. (2017). *Muestreo de suelos, técnicas de laboratorio e interpretación de análisis de suelos*. <http://sena.edu.co/regionales-y-centros-de-formacion/zona-andina/Huila/Paginas/Huila.aspx>
- Lozano, G. A., Escuela, K., Panamericana, A., & Honduras, Z. (2014). *Propagación in vitro de café (Coffea arabica) -variedad Lempira- a partir de meristemas*.
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Orsorio, J., & Pinzón-López, L. (2012). Effect of Water Stress on Growth and Water use Efficiency of Tree Seedlings of Three Deciduous Species. *Terra Latinoamérica*, 30(4), 343–353.
- Mantuano, W. P., Ganchozo, B. I., Landín, A. C., Vera Tumbaco, M., & Ortega, J. G. (2021). UNESUM-Ciencias: Revista Científica Multidisciplinaria. *Publicación Cuatrimestral*, 6(2), 117–134. <https://orcid.org/0000-0001-9776-9235>.
- María Elena, M. G. (2019). *Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (Coffea arabica) resistente a roya (Hemileia vastatrix)*. Universidad de Talca, Talca, Maule, Chile. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362019000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362019000200004)
- Marysol, R. C., Antonio, A. T., Evelyn, A. S., & Laura Yesenia, S. R. (2025). Establishing Monoxenic Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus sp. Through In Vitro Root Organ Culture and Swietenia macrophylla King In Vitro Cultures. *Agriculture (Switzerland)*, 15(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/agriculture15070673>
- Mongelós-Franco, Y., Mussi-Cataldi, C., Duarte-Ovejero, N., & Díaz-Lezcano, M. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento in vitro de meristema apical de banano Musa spp. *Cedamaz*, 10(2), 47–50. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815%0Ahttps://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
- Moreira, F., & Siqueira, J. O. (2006). Microbiologia e Bioquímica do Solo. *Microbiologia E Bioquímica Do Solo*, 407–447.
- Moreira, S. D., França, A. C., Graziotti, P. H., Leal, F. D. S., & Silva, E. D. B. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus doses on coffee growth under a non-sterile soil. *Revista Caatinga*, 32(1), 72–80. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n108rc>
- Moreira, S. D., França, A. C., Rocha, W. W., Tibães, E. S. R., & Neiva Júnior, E. (2018). Inoculation with mycorrhizal fungi on the growth and tolerance to water deficit of coffee

- plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(11), 747–752. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n11p747-752>
- Nagahashi, G., Douds, D., & Buee, M. (2000). Light-induced hyphal branching of germinated AM fungal spores. *Plant and Soil*, 219(1–2), 71–79. <https://doi.org/10.1023/a:1004714530021>
- Nazareno Saparrat, M., Ruscitti, M. F., & Arango, M. C. (2020). *Micorrizas arbusculares*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Orellana, L. E., Escuela, U., Panamericana, A., & Honduras, Z. (2013). *Efecto de tres concentraciones de bencil aminopurina en multiplicación in vitro de yuca – genotipo CM 6119-3* –.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 10, pp. 763–775). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pawlowska, T. E., Douds Jr, D. D., & Charvat, I. (1999). In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycological Research*, 103(12), 1549–1556.
- Pedroza, J. A. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 17–32.
- Pepe, A., Giovannetti, M., & Sbrana, C. (2020). Appressoria and phosphorus fluxes in mycorrhizal plants: connections between soil- and plant-based hyphae. *Mycorrhiza*, 30(5), 589–600. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00972-w>
- Petillo, G., Puppo, M. ;, Hayashi, L. ;, & Morales, R. ; (2008). *Metodología para determinar los parámetros hídricos de un suelo a campo*.
- Rivera Méndez, Y. D., Galindo Castañeda, T., Caicedo, F., Arley Navia Y Hernán, E., Romero, M., Técnico, B., & 35, N. (2014). *Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) en palma de aceite*. [www.cenipalma.org](http://www.cenipalma.org)
- Rivillas Osorio, C. A., Calle, C. M., & Ángel Calle, C. A. (2019). Micorrizas Arbusculares“APLICACIÓN DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN EL CULTIVO DEL CAFÉ AJUSTADO A LASCONDICIONES PARTICULARES DEL HUILA.” *CENICAFÉ*.
- Rodríguez Beraud, M., Hormazábal Vásquez, N., Araneda Durán, X., Tampe Pérez, J., Lobos Marambio, V., & Castillo Rubio, C. (2016). Efectos del ácido giberélico, bencilaminopurina y fluridona en la germinación in vitro de *Ugni molinae turcz.* (Myrtaceae). *Gayana - Botanica*, 73(1), 77–84. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000100010>
- Ruiz-Lozano, J. M., Aroca, R., Zamarreño, Á. M., Molina, S., Andreo-Jiménez, B., Porcel, R., García-Mina, J. M., Ruyter-Spira, C., & López-Ráez, J. A. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. *Plant Cell and Environment*, 39(2), 441–452. <https://doi.org/10.1111/pce.12631>
- Sánchez de Prager, M., Posada Almanza, R., Velásquez Pomar, D., & Narváez Castillo, M. (2010). *Metodologías básicas para el trabajo con Micorriza Arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular* (Primera Edición).
- Silvani, V. A., Statello, M., Scorza, M. V., Pérgola, M., Colombo, R. P., & Godeas, A. M. (2019). A novel in vitro methodology to cultivate arbuscular mycorrhizal fungi combining soil and synthetic media. *Symbiosis*, 79(2), 163–170. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00637-z>

- Siqueira, A. J. O., Hubbell, D. H., Schenck, N. C., Uri, S., Siqueira, J. O., Hubbell, D. H., & Schenck, N. C. (2013). *Mycological Society of America Spore Germination and Germ Tube Growth of a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus in vitro* SPORE GERMINATION AND GERM TUBE GROWTH OF A VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS IN VITRO1 Vesicular-arbuscular have a wide host. 74(6), 952–959.
- Souza, R. R. de, Paiva, P. D. de O., Silva, R. R. da, Reis, M. V. dos, Nery, F. C., & Paiva, R. (2016). Optimization of jenipapo in vitro seed germination process. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(6), 658–664. <https://doi.org/10.1590/1413-70542016406014816>
- Urgiles-Gómez, N., Loján, P., Ávila-Salem, M. E., Benavidez-Silva, C., Hurtado, L., Livisaca, F., Guaya, P., Villamagua, M., Poma, L., & Quichimbo, L. (2023). Microorganismos benéficos con potencial agrícola: Una alternativa sostenible para la producción de café y calidad del suelo. *CEDAMAZ*, 13(1), 103–113. <https://doi.org/10.54753/cedamaz.v13i1.1310>
- Usman, M., Ho-Plágaro, T., Frank, H. E. R., Calvo-Polanco, M., Gaillard, I., Garcia, K., & Zimmermann, S. D. (2021). Mycorrhizal Symbiosis for Better Adaptation of Trees to Abiotic Stress Caused by Climate Change in Temperate and Boreal Forests. In *Frontiers in Forests and Global Change* (Vol. 4). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.742392>
- Vaast, P., Zasoski, R. J., Bledsoe, C. S., & Program, B. (1996). Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation at different soil P availabilities on growth and nutrient uptake of in vitro propagated coffee (*Coffea arabica* L.) plants. In *Mycorrhiza* (Vol. 6). Springer-Verlag.
- Velázquez, A., Ponce Vaca, I. R., Proaño Ponce, L. A., & Orellana Suárez, P. (2018). The coffee agroforestry system. Its importance for the agro-alimentary and nutritional security in Ecuador. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 6(1), 116–129. <http://cfores.upr.edu.cu/index.php/cfores/article/view/300/>
- Venegas Sánchez, S., Orellana Bueno, D., & Pérez Jara, P. (2018). La realidad Ecuatoriana en la producción de café. *RECIMUNDO*, 2, 24–44. [https://doi.org/10.26820/recimundo/2.\(2\).2018.24-44](https://doi.org/10.26820/recimundo/2.(2).2018.24-44)
- Yañez Apam, J., Herrera-González, A., Domínguez Uscanga, A., Guerrero-Analco, J. A., Monribot-Villanueva, J. L., Fragoso-Medina, J. A., & Luna-Vital, D. A. (2023). Effect of the Enzymatic Treatment of Phenolic-Rich Pigments from Purple Corn (*Zea mays* L.): Evaluation of Thermal Stability and Alpha-Glucosidase Inhibition. *Food and Bioprocess Technology*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11947-023-03021-4/METRICS>

## ANEXOS

### Anexo 1. Desinfección de *Coffea* sp.

**Tabla 8.**

*Chi cuadrado de la desinfección de semillas de Coffea sp.*

| Tratamiento          | Explante |    | Total   |
|----------------------|----------|----|---------|
|                      | Si       | No |         |
| C0                   | 20       | 0  | 20      |
| C1                   | 3        | 17 | 20      |
| C2                   | 4        | 16 | 20      |
| Total                | 27       | 33 | 60      |
| Estadístico          | Valor    | gl | p       |
| Chi Cuadrado Pearson | 36.77    | 2  | <0.0001 |

**Tabla 9.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) para la desinfección de semillas de Coffea sp.*

| F.V         | SC   | gl | CM   | F     | p-valor  |
|-------------|------|----|------|-------|----------|
| Modelo      | 2.38 | 6  | 0.40 | 22.43 | 0.0001   |
| Tratamiento | 2.28 | 2  | 1.14 | 64.24 | < 0.0001 |
| Repetición  | 0.11 | 4  | 0.03 | 1.53  | 0.2818   |
| Error       | 0.14 | 8  | 0.02 |       |          |
| Total       | 2.53 | 14 |      |       |          |

**Tabla 10.**

*Prueba de Tukey para la desinfección de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n | E.E  |   |
|-------------|--------|---|------|---|
| C0          | 0.00   | 5 | 0.06 | A |
| C1          | 0.85   | 5 | 0.06 | B |
| C2          | 0.80   | 5 | 0.06 | B |

### Anexo 2. Multiplicación de *Coffea* sp.

**Tabla 11.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del número de brotes para la multiplicación de Coffea sp.*

| F.V         | SC    | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo      | 15.60 | 21 | 0.74 | 1.46 | 0.1520  |
| Tratamiento | 3.33  | 2  | 1.67 | 3.28 | 0.0487  |
| Repetición  | 12.27 | 19 | 0.65 | 1.27 | 0.2593  |
| Error       | 19.33 | 38 | 0.51 |      |         |
| Total       | 34.93 | 59 |      |      |         |

**Tabla 12.***Prueba de Tukey del número de brotes para la multiplicación de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n  | E.E  |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| BG0         | 1.30   | 20 | 0.16 | A |
| BG1         | 1.30   | 20 | 0.16 | A |
| BG2         | 1.80   | 20 | 0.16 | A |

**Tabla 13.***Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) de la longitud de brotes(cm) para la multiplicación de Coffea sp.*

| F.V         | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo      | 1.75 | 21 | 0.08 | 2.04 | 0.0273  |
| Tratamiento | 0.55 | 2  | 0.28 | 6.76 | 0.0031  |
| Repetición  | 1.20 | 19 | 0.06 | 1.54 | 0.1251  |
| Error       | 1.55 | 38 | 0.04 |      |         |
| Total       | 3.31 | 59 |      |      |         |

**Tabla 14.***Prueba de Tukey de la longitud de brotes(cm) para la multiplicación de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n  | E.E  |   |   |
|-------------|--------|----|------|---|---|
| BG0         | 0.52   | 20 | 0.05 | A |   |
| BG1         | 0.63   | 20 | 0.05 | A | B |
| BG2         | 0.75   | 20 | 0.05 | A |   |

**Anexo 3.** Enraizamiento de *Coffea* sp.**Tabla 15.***Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) de la longitud de raíces(cm) para el enraizamiento de Coffea sp.*

| F.V         | SC    | gl | CM    | F     | p-valor |
|-------------|-------|----|-------|-------|---------|
| Modelo      | 38.01 | 11 | 3.46  | 3.40  | 0.0105  |
| Tratamiento | 24.87 | 2  | 12.43 | 12.23 | 0.0004  |
| Repetición  | 13.15 | 9  | 1.46  | 1.44  | 0.2445  |
| Error       | 18.29 | 18 | 1.02  |       |         |
| Total       | 56.31 | 29 |       |       |         |

**Tabla 16.**

Prueba de Tukey de la longitud de raíces(cm) para el enraizamiento de *Coffea* sp.

| Tratamiento | Medias | n  | E.E  |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| M1          | 1.50   | 20 | 0.32 | A |
| M2          | 1.10   | 20 | 0.32 | A |
| M3          | 3.20   | 20 | 0.32 | B |

#### Anexo 4. Colonización micorrízica del sistema planta-HMA *in vitro*.

**Tabla 17.**

Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización micorrízica de hifas (%) en raíces de *Coffea* sp.

| F.V         | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 1792.08 | 5  | 358.42 | 1.68 | 0.2711  |
| Tratamiento | 614.92  | 3  | 204.97 | 0.96 | 0.4688  |
| Repetición  | 1177.17 | 2  | 588.58 | 2.77 | 0.1409  |
| Error       | 1276.83 | 6  | 212.81 |      |         |
| Total       | 3068.92 | 11 |        |      |         |

**Tabla 18.**

Prueba de Tukey del porcentaje de colonización micorrízica de hifas (%) en raíces de *Coffea* sp.

| Tratamiento | Medias | n | E.E  |   |
|-------------|--------|---|------|---|
| C1          | 36.00  | 3 | 8.42 | A |
| C4          | 32.67  | 3 | 8.42 | A |
| C6          | 17.33  | 3 | 8.42 | A |
| C3          | 31.67  | 3 | 8.42 | A |

**Tabla 19.**

Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización micorrízica de esporas (%) en raíces de *Coffea* sp.

| F.V         | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 877.17  | 5  | 175.43 | 1.53 | 0.3069  |
| Tratamiento | 425.00  | 3  | 141.67 | 1.24 | 0.3754  |
| Repetición  | 452.17  | 2  | 226.08 | 1.98 | 0.2191  |
| Error       | 686.50  | 6  | 114.42 |      |         |
| Total       | 1563.67 | 11 |        |      |         |

**Tabla 20.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización micorrízica de esporas (%) en raíces de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n | E.E  |   |
|-------------|--------|---|------|---|
| C1          | 17.67  | 3 | 6.18 | A |
| C4          | 33.67  | 3 | 6.18 | A |
| C6          | 21.67  | 3 | 6.18 | A |
| C3          | 26.33  | 3 | 6.18 | A |

**Tabla 21.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización micorrízica de vesículas (%) en raíces de Coffea sp.*

| F.V         | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo      | 3.83 | 5  | 0.77 | 1.45 | 0.3284  |
| Tratamiento | 0.33 | 3  | 0.11 | 0.21 | 0.8856  |
| Repetición  | 3.50 | 2  | 1.75 | 3.32 | 0.1072  |
| Error       | 3.17 | 6  | 0.53 |      |         |
| Total       | 7.00 | 11 |      |      |         |

**Tabla 22.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización micorrízica de vesículas (%) en raíces de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n | E.E  |   |
|-------------|--------|---|------|---|
| C1          | 0.67   | 3 | 0.42 | A |
| C4          | 0.67   | 3 | 0.42 | A |
| C6          | 0.33   | 3 | 0.42 | A |
| C3          | 0.33   | 3 | 0.42 | A |

**Tabla 23.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización micorrízica de arbusculos (%) en raíces de Coffea sp.*

| F.V         | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo      | 1.42 | 5  | 0.28 | 1.13 | 0.4339  |
| Tratamiento | 0.25 | 3  | 0.08 | 0.33 | 0.8022  |
| Repetición  | 1.17 | 2  | 0.58 | 2.33 | 0.1780  |
| Error       | 1.50 | 6  | 0.25 |      |         |
| Total       | 2.92 | 11 |      |      |         |

**Tabla 24.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización micorrízica de arbusculos (%) en raíces de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n | E.E  |   |
|-------------|--------|---|------|---|
| C1          | 0.33   | 3 | 0.29 | A |
| C4          | 0.33   | 3 | 0.29 | A |
| C6          | 0.33   | 3 | 0.29 | A |
| C3          | 0.67   | 3 | 0.29 | A |

**Tabla 25.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización micorrízica total (TC) (%) en raíces de Coffea sp.*

| F.V         | SC      | gl | CM      | F    | p-valor |
|-------------|---------|----|---------|------|---------|
| Modelo      | 4101.08 | 5  | 820.22  | 6.36 | 0.0217  |
| Tratamiento | 1628.92 | 3  | 542.97  | 4.21 | 0.0636  |
| Repetición  | 2472.17 | 2  | 1236.08 | 9.58 | 0.0135  |
| Error       | 773.83  | 6  | 128.97  |      |         |
| Total       | 4874.92 | 11 |         |      |         |

**Tabla 26.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización micorrízica total (TC) (%) en raíces de Coffea sp.*

| Tratamiento | Medias | n | E.E  |   |
|-------------|--------|---|------|---|
| C1          | 41.67  | 3 | 6.56 | A |
| C4          | 67.33  | 3 | 6.56 | A |
| C6          | 39.67  | 3 | 6.56 | A |
| C3          | 59.00  | 3 | 6.56 | A |

## **Anexo 5.** Colonización micorrízica bajo estrés hídrico

**Tabla 27.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de TC (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| F.V        | SC     | gl | CM    | F    | p-valor |
|------------|--------|----|-------|------|---------|
| Modelo     | 61.83  | 5  | 12.37 | 0.21 | 0.9477  |
| Agua       | 1.17   | 2  | 0.58  | 0.01 | 0.9903  |
| Repetición | 60.67  | 3  | 20.22 | 0.34 | 0.7990  |
| Error      | 358.83 | 6  | 59.81 |      |         |
| Total      | 420.67 | 11 |       |      |         |

**Tabla 28.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de TC (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Agua | Medias | n | E.E  |   |
|------|--------|---|------|---|
| h1a0 | 9.00   | 4 | 3.87 | A |
| h1a1 | 9.75   | 4 | 3.87 | A |
| h1a2 | 9.25   | 4 | 3.87 | A |

**Tabla 29.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización de hifas (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| F.V        | SC    | gl | CM   | F    | p-valor |
|------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo     | 4.42  | 5  | 0.88 | 0.19 | 0.9575  |
| Agua       | 2.17  | 2  | 1.08 | 0.23 | 0.8027  |
| Repetición | 2.25  | 3  | 0.75 | 0.16 | 0.9208  |
| Error      | 28.50 | 6  | 4.75 |      |         |
| Total      | 32.92 | 11 |      |      |         |

**Tabla 30.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización de hifas (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Agua | Medias | n | E.E  |   |
|------|--------|---|------|---|
| h1a0 | 3.25   | 4 | 1.09 | A |
| h1a1 | 2.50   | 4 | 1.09 | A |
| h1a2 | 3.50   | 4 | 1.09 | A |

**Tabla 31.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización de vesículas (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| F.V        | SC     | gl | CM    | F    | p-valor |
|------------|--------|----|-------|------|---------|
| Modelo     | 71.42  | 5  | 14.28 | 0.37 | 0.8525  |
| Agua       | 7.17   | 2  | 3.58  | 0.09 | 0.9126  |
| Repetición | 64.25  | 3  | 21.42 | 0.56 | 0.6635  |
| Error      | 231.50 | 6  | 38.58 |      |         |
| Total      | 302.92 | 11 |       |      |         |

**Tabla 32.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización de vesículas (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Agua | Medias | n | E.E  |   |
|------|--------|---|------|---|
| h1a0 | 5.25   | 4 | 3.11 | A |
| h1a1 | 7.00   | 4 | 3.11 | A |
| h1a2 | 5.50   | 4 | 3.11 | A |

**Tabla 33.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de colonización de arbusculos (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| F.V        | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo     | 0.83 | 5  | 0.17 | 0.26 | 0.9191  |
| Agua       | 0.17 | 2  | 0.08 | 0.13 | 0.8801  |
| Repetición | 0.67 | 3  | 0.22 | 0.35 | 0.7925  |
| Error      | 3.83 | 6  | 0.64 |      |         |
| Total      | 4.67 | 11 |      |      |         |

**Tabla 34.**

*Prueba de Tukey del porcentaje de colonización de arbusculos (%) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Agua | Medias | n | E.E  |   |
|------|--------|---|------|---|
| h1a0 | 0.50   | 4 | 0.40 | A |
| h1a1 | 0.25   | 4 | 0.40 | A |
| h1a2 | 0.25   | 4 | 0.40 | A |

## **Anexo 6.** Efecto de los HMA sobre la biomasa vegetal.

**Tabla 35.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) de la longitud de raíz (g) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| F.V        | SC     | gl | CM    | F    | p-valor |
|------------|--------|----|-------|------|---------|
| Modelo     | 85.48  | 8  | 10.69 | 0.72 | 0.6687  |
| Hongo      | 11.73  | 1  | 5.35  | 0.36 | 0.7019  |
| Agua       | 4.52   | 2  | 19.51 | 1.32 | 0.3039  |
| Hongo*Agua | 10.69  | 2  | 11.73 | 0.80 | 0.3866  |
| Repetición | 58.54  | 3  | 2.26  | 0.15 | 0.8593  |
| Error      | 221.25 | 15 | 14.75 |      |         |
| Total      | 306.73 | 23 |       |      |         |

**Tabla 36.***Prueba de Tukey de la longitud de raíz (g) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Hongo | Agua | Medias | n | E.E  |   |
|-------|------|--------|---|------|---|
| h0    | a0   | 5.78   | 4 | 1.92 | A |
| h0    | a1   | 4.23   | 4 | 1.92 | A |
| h0    | a2   | 4.63   | 4 | 1.92 | A |
| h1    | a0   | 6.03   | 4 | 1.92 | A |
| h1    | a1   | 7.50   | 4 | 1.92 | A |
| h1    | a2   | 5.30   | 4 | 1.92 | A |

**Tabla 37.***Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) del peso de raíz (g) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| F.V        | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo     | 0.78 | 8  | 0.10 | 1.89 | 0.1374  |
| Hongo      | 0.13 | 1  | 0.13 | 2.43 | 0.1398  |
| Agua       | 0.21 | 2  | 0.10 | 1.98 | 0.1721  |
| Hongo*Agua | 0.11 | 2  | 0.06 | 1.10 | 0.3579  |
| Repetición | 0.34 | 3  | 0.11 | 2.17 | 0.1342  |
| Error      | 0.78 | 15 | 0.05 |      |         |
| Total      | 1.56 | 23 |      |      |         |

**Tabla 38.***Prueba de Tukey del peso de raíz (g) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Hongo | Agua | Medias | n | E.E  |   |
|-------|------|--------|---|------|---|
| h0    | a0   | 0.05   | 4 | 0.11 | A |
| h0    | a1   | 0.09   | 4 | 0.11 | A |
| h0    | a2   | 0.12   | 4 | 0.11 | A |
| h1    | a0   | 0.10   | 4 | 0.11 | A |
| h1    | a1   | 0.13   | 4 | 0.11 | A |
| h1    | a2   | 0.46   | 4 | 0.11 | A |

**Tabla 39.**

*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) de la altura aérea (cm) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| <b>F.V</b> | <b>SC</b> | <b>gl</b> | <b>CM</b> | <b>F</b> | <b>p-valor</b> |
|------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo     | 7.23      | 8         | 0.90      | 2.99     | 0.0324         |
| Hongo      | 1.40      | 1         | 1.40      | 4.63     | 0.0481         |
| Agua       | 0.56      | 2         | 0.28      | 0.93     | 0.4161         |
| Hongo*Agua | 0.02      | 2         | 0.01      | 0.04     | 0.9623         |
| Repetición | 5.24      | 3         | 1.75      | 5.77     | 0.0079         |
| Error      | 4.54      | 15        | 0.30      |          |                |
| Total      | 11.77     | 23        |           |          |                |

**Tabla 40.**

*Prueba de Tukey de la altura aérea (cm) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| <b>Hongo</b> | <b>Agua</b> | <b>Medias</b> | <b>n</b> | <b>E.E</b> |   |
|--------------|-------------|---------------|----------|------------|---|
| h0           | a0          | 1.68          | 4        | 0.28       | A |
| h0           | a1          | 1.95          | 4        | 0.28       | A |
| h0           | a2          | 1.60          | 4        | 0.28       | A |
| h1           | a0          | 2.08          | 4        | 0.28       | A |
| h1           | a1          | 2.45          | 4        | 0.28       | A |
| h1           | a2          | 2.15          | 4        | 0.28       | A |

**Tabla 41.**

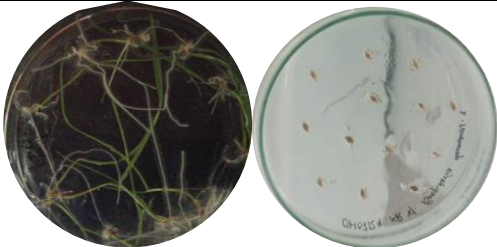
*Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) de la biomasa aérea (g) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| <b>F.V</b> | <b>SC</b> | <b>gl</b> | <b>CM</b> | <b>F</b> | <b>p-valor</b> |
|------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo     | 0.26      | 8         | 0.03      | 2.01     | 0.1157         |
| Hongo      | 0.06      | 1         | 0.06      | 3.57     | 0.0781         |
| Agua       | 2.6E-03   | 2         | 1.3E-03   | 0.08     | 0.9234         |
| Hongo*Agua | 0.01      | 2         | 3.4E-03   | 0.21     | 0.8111         |
| Repetición | 0.19      | 3         | 0.06      | 3.98     | 0.0286         |
| Error      | 0.24      | 15        | 0.02      |          |                |
| Total      | 0.50      | 23        |           |          |                |

**Tabla 42.***Prueba de Tukey de la biomasa aérea (g) bajo diferentes niveles de capacidad de campo.*

| Hongo | Agua | Medias | n | E.E  |   |
|-------|------|--------|---|------|---|
| h0    | a0   | 0.18   | 4 | 0.06 | A |
| h0    | a1   | 0.17   | 4 | 0.06 | A |
| h0    | a2   | 0.18   | 4 | 0.06 | A |
| h1    | a0   | 0.26   | 4 | 0.06 | A |
| h1    | a1   | 0.31   | 4 | 0.06 | A |
| h1    | a2   | 0.26   | 4 | 0.06 | A |

**Anexo 7.** Fotografías de experimentos

| Descripción                                                               | Fotografías                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Germinación de embriones cigóticos de café                                |   |
| Desinfección y siembra <i>in vitro</i> de semillas de césped.             |  |
| Desinfección de esporas de HMA.                                           |  |
| Establecimiento <i>in vitro</i> del sistema planta-HMA con césped y café. |  |

|                                                                                     |                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Establecimiento del ensayo de estrés hídrico en plantas aclimatadas de café.</p> |   |
| <p>Tinción HMA de raíces de café.</p>                                               |   |
| <p>Mediciones de plantas expuestas a estrés hídrico.</p>                            |  |