

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL Y  
AMBIENTAL**



**“MICROPROPAGACIÓN DE *Coffea arabica* L. Var. Typica  
“CAFÉ” EN JAÉN – PERÚ”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
FORESTAL Y AMBIENTAL**

**Autor : Bach. Karen Lesly Arevalo Roque**

**Asesor : Mg.Sc. José Salomón Almestar Montenegro**

**JAÉN – PERÚ, AGOSTO 201**



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

Ley de Creación N° 29304

Universidad Licenciada con Resolución del Consejo Directivo N° 002-2018-SUNEDU/CD

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Jaén, el día 19 de Agosto del año 2019; siendo las 6:59 pm horas, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador:

Presidente            Dr. Juan Manuel Garay Román  
Secretario            Dr. Segundo Edilberto Vergara Medrano  
Vocal                    Mg. Candy Lisbeth Ocaña Zuñiga

Para evaluar la Sustentación del INFORME FINAL DE TESIS; titulado: "Micropropagación de Coffea arabica L Var. Typica "café" en Jaén - Perú", presentado por la Bachiller Karen Lesly Arevalo Roque de la Carrera Profesional de Ingeniería Forestal y Ambiental de la Universidad Nacional de Jaén.

Después de la sustentación y defensa, los Miembros del Jurado Evaluador acuerdan:

Aprobar      ( ) Desaprobar      ( ) Unanimidad      ( ) Mayoría

Con la siguiente mención:

Excelente	18, 19, 20	( )
Muy bueno	16, 17	<u>(19)</u>
Bueno	14, 15	( )
Regular	13	( )
Desaprobado	12 o menos	( )

Siendo las 6:59 pm horas del mismo día, los Miembros del Jurado Evaluador concluyen el acto de sustentación confirmando su participación con la suscripción de la presente.

\_\_\_\_\_  
Dr. Segundo Edilberto Vergara Medrano  
Secretario Jurado Evaluador

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Manuel Garay Román  
Presidente Jurado Evaluador

\_\_\_\_\_  
Mg. Candy Lisbeth Ocaña Zuñiga  
Vocal Jurado Evaluador

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	2
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	3
<b>3.1.</b>	<b>UBICACIÓN</b> .....	3
<b>3.2.</b>	<b>ETAPAS</b> .....	4
<b>3.3.</b>	<b>TRATAMIENTOS EN ESTUDIO</b> .....	6
<b>3.4.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	9
<b>3.4.1.</b>	<b>Prueba estadística</b> .....	10
<b>3.4.2.</b>	<b>Evaluaciones realizadas</b> .....	10
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	12
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	19
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	23
	<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	27
	<b>ANEXOS</b> .....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Tratamientos aplicados en la fase de desinfección.</i> .....	7
Tabla 2: <i>Tratamientos aplicados en la fase de crecimiento.</i> .....	7
Tabla 3: <i>Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación.</i> .....	8
Tabla 4: <i>Tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.</i> .....	8
Tabla 5: <i>Tratamientos aplicados en la fase de aclimatación.</i> .....	9
Tabla 6: <i>Prueba de comparación de medias de Duncan, variable altura (mm) fase de crecimiento.</i> .....	14
Tabla 7: <i>Prueba de comparación de medias de Duncan, variable número de brotes.</i> .....	15
Tabla 8: <i>Prueba de comparación de medias de Duncan, variable altura (mm) promedio de brotes.</i> .....	16
Tabla 9: <i>Promedio de número y longitud de raíces por tratamiento.</i> .....	17
Tabla 10: <i>Prueba de comparación de medias de Duncan, variable porcentaje de plántulas sobreviviente por sustrato.</i> .....	18
Tabla 11: <i>Resultados de los tratamientos realizados en desinfección de Coffea arabica L. Var. Typica.</i> .....	29
Tabla 12: <i>Análisis de varianza (ANVA), variable altura promedio del explante de Coffea arabica L. Var. Typica, a los 60 días</i> .....	29
Tabla 13: <i>Análisis de varianza (ANVA), variable altura promedio de explante de Coffea arabica L. Var. Typica, en la fase de crecimiento.</i> .....	29
Tabla 14: <i>Análisis de varianza (ANVA), variable número de brote promedio por explante en la fase de multiplicación.</i> .....	30
Tabla 15: <i>Análisis de varianza (ANVA), variable altura promedio por explante en fase multiplicación.</i> .....	30
Tabla 16: <i>Análisis de varianza (ANVA), variable porcentaje de plántulas sobrevivientes por sustrato en la fase de aclimatación.</i> .....	30

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Porcentaje de explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica, no contaminadas por tratamiento.....	12
GRÁFICO 2: Promedio de brotes por explante de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica.....	15
GRÁFICO 3: Medias de supervivencia en la fase de aclimatación de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Var: Typica .....	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Obtención de la planta madre de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica .....	35
Figura 2: Selección de plantas madre y esterilización de material.....	35
Figura 3: Preparación de medio de cultivo Gamborg (1968). .....	36
Figura 4: Preparación de la solución desinfectante ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) hipoclorito de calcio.....	36
Figura 5: Esterilización de material en la cámara de flujo laminar, y siembra del explante en el medio de cultivo dentro de la cámara de flujo laminar.....	37
Figura 6: Establecimiento del medio de cultivo en los tubos de ensayo de 25x150 ml. ...	37
Figura 7: Explantes de <i>Coffea arabica</i> L, Var. Typica en fase de crecimiento, y teniendo como medio basal a Gamborg (1968).....	38
Figura 8: Explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica en fase de multiplicación. ....	38
Figura 9: Explantes de <i>Coffea arabica</i> L. en fase de multiplicación de brotes. ....	39
Figura 10: Explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica, en fase de enraizamiento se pueden apreciar la aparición de raíces por explante.....	39
Figura 11: Explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica, con presencia de raíces. ....	40
Figura 12: Aclimatación de explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Var. Typica. ....	40

## RESUMEN

Para la ejecución de la investigación establecida se recolectaron semillas de *Coffea arabica* L. Var: Typica, en el centro poblado El Nogal, la micropropagación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Jaén, la identificación de la variedad se hizo mediante el proyecto “Identificación taxonómica de variedades de café especial certificado y análisis de su calidad de taza en relación al tiempo de fermentado en la provincia de Jaén”. Las semillas germinaron en sustrato de arena fina para obtener los explantes, en la fase de desinfección se aplicaron cuatro tratamientos utilizando alcohol etílico al 70 por ciento por 30 segundos, luego se sumergieron en tratamientos de solución de hipoclorito de calcio al tres por ciento más tres gotas de Tween 80 en tiempos de cinco min, 10 min, 15 min y 20 min respectivamente, obteniendo resultados favorables en la exposición de 20 min, en la fase de crecimiento se evaluaron tres medios de cultivo: Murashigue & Skoog (1962), Gamborg (1968) y el medio De Fossard (1974), en la fase de multiplicación se adicionó fitohormonas de crecimiento BAP y KIN, se evaluó el número de brotes y la altura del mismo en la fase de enraizamiento. Se adicionó dos tipos de auxinas AIB y ANA, evaluándose el número de raíces y longitud promedio; en la última fase de aclimatación se observó la sobrevivencia de los plantines in vitro llevados a ex vitro en tres tratamientos de sustrato diferente, para finalmente realizar el protocolo guía de micropropagación de la especie de *Coffea arabica* L. “Café” Var: Typica.

**Palabras claves:** *Coffea arabica* L. Var. Typica, micropropagación, aclimatación, fitohormonas.

## ABSTRACT

For the execution of this research, seeds of *Coffea arabica* L Var: Typica were collected, in the populated center El Nogal, the micropropagation was carried out in the Biotechnology Laboratory at the National University of Jaen, the identification of the variety was given by the project 'Taxonomic identification of certified special coffee varieties and analysis of its cup quality in relation to the fermented time in the province of Jaen'. The seeds were germinated in fine sand substrate to obtain the explants, four treatments using 70 percent ethyl alcohol for 30 seconds were applied in the disinfection phase, then they were immersed in three percent calcium hypochlorite solution treatments plus three drops of Tween 80 in times of 5 min, 10 min, 15 min and 20 min respectively, obtaining favorable results in the 20 min exposure, in the growth phase three cultivation means were evaluated: Murashige & Skoog (1962), Gamborg (1968) and De Fossard medium (1974), in the multiplication phase was added growth phytohormones BAP and KIN, the number of shoots were assessed and the length of the shoot in the rooting phase was added two types of AIB and ANA auxins, assessing the number of roots and average length, in the last phase of acclimatization the survival of in vitro seedlings taken to ex vitro were observed in three different substrate treatments, to finally carry out the micropropagation guide protocol of the species of *Coffea arabica* L. "Coffee" Var: Typica.

**Keywords:** *Coffea arabica* L. Var. Typica, micropropagation, acclimatization, phytohormones.

## I. INTRODUCCIÓN

La micropropagación es la propagación de un genotipo seleccionado usando técnicas de cultivo in vitro. Esta técnica consistió en la propagación de plantas en un ambiente controlado, empleando un medio de cultivo adecuado con posibilidades de producción en gran cantidad, a partir de un explante genéticamente idéntico a la planta madre. Es una alternativa viable de propagación de especies forestales, principalmente nativas y con valor comercial.

El Perú es el octavo productor de café en el mundo, pese a que no incluye esta bebida entre los productos de consumo preferido (Queirolo, 2010). El potencial de crecimiento del café en el país es alrededor de 2 millones de hectáreas. (MINAGRI, 2015). Los cafetales han demostrado ser amigables con el ambiente y tiene el potencial para mejorar el hábitat de la vida silvestre y la conectividad biológica entre ecosistemas. (Guiracocha. G, 2000).

El café llegó al Perú y se desarrolló en forma comercial en el valle de Chanchamayo en la selva central a partir de 1876 introducido por inmigrantes europeos. (CAMCAFE 2019). En las provincias de Jaén y San Ignacio, el cultivo de café es de suma importancia para muchas instituciones públicas y privadas, aparte de promover su cultivo están realizando investigaciones en toda la cadena productiva; es el caso de la cooperativa Sol & Café, está institución y sus productores están interesados en nuevas propuestas de producción, teniendo a la propagación de material genético de calidad como uno de sus anhelos. Ante esta necesidad de conocimiento, se ha visto por conveniente desarrollar el presente trabajo de investigación que tuvo como finalidad establecer un protocolo de micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Typica “café” destacando calidad y demanda en el mercado, conservando todo su potencial genético, al mismo tiempo genera una alternativa de producción de plantones de alta calidad a precios competitivo.

## **II. OBJETIVOS**

### **a. Objetivo general**

- Evaluar el efecto de regulador de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de *Coffea arabica* L Var. Typica “Cafe”

### **b. Objetivo específico**

- Identificar el tiempo óptimo para la desinfección de explantes de *Coffea arabica* L Var. Typica “Cafe”.
- Establecer el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento vegetal más apropiados para la micropropagación de *Coffea arabica* L Var. Typica “Cafe”
- Proponer un protocolo de micropropagación para *Coffea arabica* L Var Typica “Cafe”.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Jaén, provincia y distrito de Jaén cuyas coordenadas UTM: Zona 17, Este: 742696 Norte: 9367750, con una altitud de 729 msnm, departamento Cajamarca.

##### a. Material biológico

En cuanto a la recolección de los granos o semillas de *Coffea arabica* L. Var. Typica, fueron ubicados en el centro poblado el Nogal, parcela denominada el Zapote con las coordenadas UTM, Este: 731519 Norte: 9355938 con una altitud de 1860 msnm.

Integradas por plántulas jóvenes originarias de la germinación *Coffea arabica* L. Var. Typica en un vivero que reunió las condiciones óptimas, de los que se obtuvo explantes constituidos por yemas, previa identificación de la especie fue realizada por el Consultor Botánico José Ricardo Campos de la Cruz C.B.P. N° 3796.

En relación a los reactivos se aplicó la composición de los medios basales: Murashigue y Skoog (1962), De Fosard (1974) y Gamborg (1968), ver (anexo 3), reguladores de crecimiento: N6 –bencil aminopurina (BAP), kinetina (KIN), ácido naftalen acético (ANA) y ácido indol butírico (AIB), como agentes desinfectantes se aplicó hipoclorito de calcio  $Ca(ClO)_2$ , alcohol al 70 por ciento, finalmente Tween 80. Respecto a equipos se emplearon: Ph-metro, autoclave, agitador magnético, cámara de flujo laminar, entre otros.

## **3.2. ETAPAS**

### **a. Preparación del medio de cultivo**

Se dio inicio preparando las soluciones madre y almacenándolas en botellas de vidrio color ámbar para evitar que penetre la radiación solar, en la elaboración de dichas soluciones madre, se utilizó: Agua destilada, macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento vegetal, sacarosa, y agar. Las cantidades se utilizaron según de la literatura citada y en relación a los tipos de tratamientos a ejecutar, se procedió ajustar el pH a  $5.8 \pm 0.2$  con hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) al 0.1 N, en agitación.

En la solución preparada se vertió el agar, para homogenizar el medio de cultivo se colocó un agitador magnético con una temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  a más, esto fue para lograr la disolución y homogenización de sustancias del medio de cultivo; se vertió en volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo con capacidad de 25X150 ml, con la ayuda de pipetas graduadas de 10 ml. Se selló la entrada del tubo con papel aluminio, finalmente fue colocado en el autoclave digital a una temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 25 minutos, una vez empleado el tiempo se dejó enfriar para luego mantenerlo en un ambiente estéril hasta su posterior uso.

### **b. Obtención del explante**

Las semillas recolectadas a la cual se le describen líneas arriba indicando su lugar de procedencia; fueron acondicionados en sustrato de arena fina previamente desinfectado con agua caliente e hipoclorito de sodio. En el sustrato antes mencionado las semillas germinaron y enseguida fueron trasplantadas a un sustrato preparado a base de tierra negra u orgánica, y arena fina, en proporciones (2:1). Este sustrato se encargó de brindarle las condiciones para el crecimiento, ayudándolo con la aplicación de abonos foliares, hasta obtener las yemas para dicho estudio.

**c. Fase de desinfección**

Se basó en eliminar los microorganismos contaminantes latentes en la superficie de explante, con la finalidad de obtener la esterilidad ya que esta viene a ser un requisito indispensable en los cultivos in vitro, para lograr la eliminación de microorganismos. La planta madre o donadora de yemas se lavó con jabón comercial y fue enjuagada con agua corriente, enseguida se sometieron a un baño con alcohol etílico al 70 por ciento, por 30 segundos, luego se vertieron en solución de hipoclorito de calcio  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  al tres por ciento, más tres gotas de Tween 80. Durante periodos de tiempo de cinco, 10, 15 y 20 minutos, una vez transcurrido estos tiempos, las yemas fueron enjuagadas con abundante agua destilada esterilizada, dentro de la cámara de flujo laminar, después los explantes fueron seccionados de 2 cm aproximadamente.

**d. Fase de crecimiento**

Las explantes desinfectados en la fase anterior se sembraron en tubos de ensayo que contenían los diferentes medios de cultivo, todo este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar (se colocó una explante por tubo de ensayo). Los tubos de ensayo con la siembra fueron puestos en gradillas y se mantuvieron en la cámara de cultivo, el cual se mantenía a una temperatura promedio de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , a una exposición de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un espacio de tiempo de 60 días. El factor a evaluar fue la altura del explante.

**e. Fase de multiplicación**

Se tomaron los explantes del medio de cultivo que presentó superioridad en crecimiento, en este caso el medio de cultivo Gamborg (1968); los explantes de la fase de crecimiento fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde se extrajeron del tubo de ensayo con ayuda de pinzas previamente desinfectadas y esterilizadas, al igual que todos los materiales a usar, una vez extraídas se reposaron sobre placas Petri de 20 cm, el explante fue seccionado en fragmentos para luego ser sembrados en los tubos de ensayo.

Estos contenían el medio de multiplicación, más los reguladores de crecimiento BAP y KIN en concentraciones según los tratamientos a realizar, visualizar tabla 3. Por último los tubos fueron llevados a la zona de cultivo por 30 días.

**f. Fase de enraizamiento**

En esta fase se tomaron los brotes que fueron producidos en la fase anterior, los cuales fueron repicados o cambiados a tubos de ensayo conteniendo como medio de cultivo Gamborg (1968), más los reguladores de crecimiento AIB y ANA en las cantidades que indican en los tratamientos a realizar, visualizar tabla 4. Seguidamente se selló la boca de los tubos de ensayo de 25x150 ml con papel aluminio esterilizado, se ordenaron en las gradillas y llevados al cuarto de cultivo por un espacio de 30 días, pasado el tiempo indicado se logró visualizar la formación de primordios radiculares.

**g. Fase de aclimatación**

Formadas las raíces de las plántulas en la fase anterior, fueron repicadas a los sustratos, las plántulas se mantuvieron en un ambiente adecuado tipo invernadero.

### **3.3. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO**

**a. Desinfección**

Al iniciar el proceso de desinfección se utilizó jabón comercial el cual contenía el componente químico denominado cloruro de benzalconio y agua corriente, enseguida se aplicó la composición del desinfectante mencionado en la tabla 1, expuestos a un lapso de tiempo determinado.

**Tabla 1: Tratamientos aplicados en la fase de desinfección.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DESINFECTANTE</b>	<b>TIEMPO DE EXPOSICIÓN</b>	<b>REPETICIONES</b>
I	Ca(ClO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	5 minutos	10
II	Ca(ClO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	10 minutos	10
III	Ca(ClO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	15 minutos	10
IV	Ca(ClO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	20 minutos	10

Fuente: Elaboración propia

**b. Crecimiento**

**Tabla 2: Tratamientos aplicados en la fase de crecimiento.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MEDIO BASAL</b>	<b>REPETICIONES</b>
I	Murashigue & Skoog (1962)	10
II	Gamborg (1968).	10
III	De Fossard (1974)	10

Fuente: Elaboración propia

### c. Multiplicación

**Tabla 3: Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
I	Medio + BAP 0.5 mg/l	10
II	Medio + KIN 0.5 mg/l	10
III	Medio +BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l	10
IV	Medio + BAP 1 mg/l	10
V	Medio + 1 KIN mg/l	10

Fuente: Elaboración propia

### d. Enraizamiento

**Tabla 4: Tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
I	Medio + AIB 0.5 mg/l	10
II	Medio + ANA 0.5 mg/l	10
III	Medio+ AIB 0.5 mg/l+ ANA 0.5 mg/l	10
IV	Medio+ ANA 1 mg/l	10
V	Medio + AIB 1 mg/l	10

Fuente: Elaboración propia

**e. Aclimatación**

**Tabla 5: Tratamientos aplicados en la fase de aclimatación.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>REPETICIONES</b>
I	Humus 50% + arena 50%	3
II	Turba 60% + arena 40%	3
III	Humus 100%	3

Fuente: Elaboración propia

**3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA), para cada una de las fases de micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Typica

**a. Método aditivo lineal del diseño completamente al azar**

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_{ij}$$

- Fase de crecimiento

<b>Fuentes de Variabilidad (F.V)</b>	<b>Grados de Libertad(G.L)</b>
<b>Tratamientos</b>	2
<b>Error experimental</b>	27
<b>Total</b>	29

Fuente: Elaboración propia

- Fase de multiplicación

<b>Fuentes de Variabilidad (F.V)</b>	<b>Grados de Libertad (G.L)</b>
<b>Tratamientos</b>	2
<b>Error experimental</b>	27
<b>Total</b>	29

Fuente: Elaboración propia

- Fase de aclimatación

<b>Fuentes de Variabilidad (F.V)</b>	<b>Grados de Libertad (G.L)</b>
<b>Tratamientos</b>	2
<b>Error experimental</b>	6
<b>Total</b>	8

Fuente: Elaboración propia

### **3.4.1. Prueba estadística**

Se realizó la prueba “F” mediante análisis de varianza (ANVA), y la prueba de comparación de medias de Duncan, para determinar la diferencia entre los tratamientos en estudio.

### **3.4.2. Evaluaciones realizadas**

#### **a. Fase de desinfección**

Se verificó si el explante había adquirido o no contaminantes por algún agente patógeno (hongos o bacterias), para diferenciar la contaminación se tuvo en cuenta la turbidez del medio y/o la presencia de estructuras macroscópicas que evidencien la presencia del microorganismo contaminante en el explante o medio de cultivo. Esta evaluación se realizó después de 10 días de sembrado el explante.

#### **b. Fase de crecimiento**

En esta fase se centró exclusivamente en medir la elongación del explante

semanalmente.

**c.** Fase de multiplicación

Consistió en evaluar:

- Longitud promedio por explante, semanalmente.
- El número de brotes por explante, semanalmente.

**d.** Fase de enraizamiento

Se analizó:

- El porcentaje de explantes enraizadas.
- Número de raíces por explante.
- Número promedio de raíces por explante.
- Longitud promedio de las raíces de cada explante.

**e.** Fase de aclimatación:

Se evaluó:

Porcentaje de plántulas sobrevivientes por sustrato, después de un mes y medio.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. FASE DE DESINFECCIÓN

En la tabla 11 (Anexo 2) y el gráfico 1 se muestra los resultados de los tratamientos aplicados en la fase de desinfección de los explantes de *Coffea arabica L. Var. Typica*, obteniendo como respuesta un resultado favorable en 90 por ciento de explantes no contaminados y el 10 por ciento de explantes contaminados con exposición de un tiempo de 20 min. Llegando a la conclusión que el tratamiento IV fue el más adecuado en la fase de desinfección de dichos explantes; seguido el tratamiento III que presentó el 50 por ciento de explantes no contaminados y el 50 por ciento de explantes contaminados, mientras que el tratamiento II presentó un 20 por ciento de explantes no contaminados y el 80 por ciento de explantes contaminados, por último se tuvo al tratamiento I que correspondió al 100 de explantes contaminados, considerándose al tratamiento I y II como inapropiados o menos adecuados para la fase de desinfección por presentar alto número de explantes contaminados. .

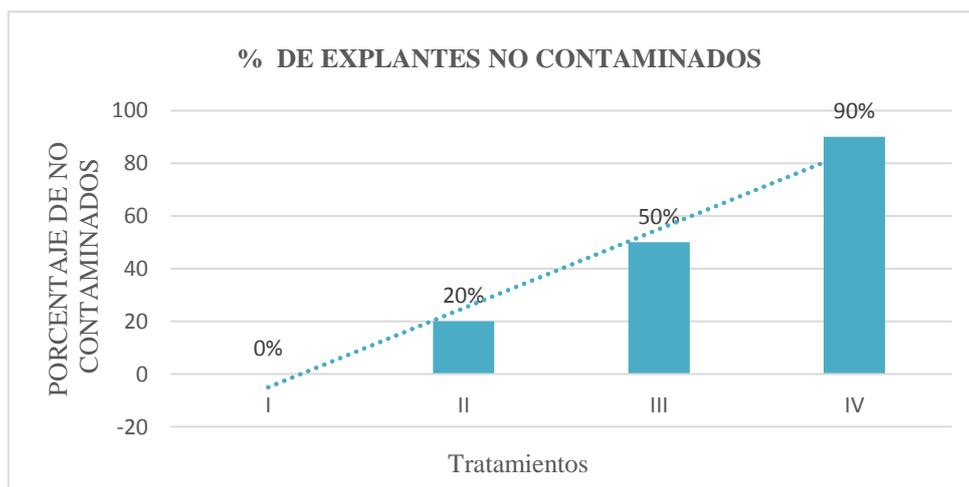


GRÁFICO 1: Porcentaje de explantes no contaminadas por tratamiento.

El proceso de desinfección de los explantes en el tratamiento IV de *Coffea arabica L.* (café) Var. Typica, inició mediante la inmersión de los explantes en una solución de jabón comercial, seguidamente se enjuagó con agua corriente, luego se sumergió en alcohol al 70 por ciento por 30 segundos por último fueron sumergidos en la solución desinfectante de hipoclorito de calcio al 3 por ciento, más 3 gotas de Tween por un tiempo de 20 min, después de enjuagues continuos con agua destilada estéril. Al finalizar este procedimiento se obtuvo un 90 por ciento de desinfección en los explantes.

#### **4.2. FASE DE CRECIMIENTO**

Después de haberse realizado el análisis de varianza en la tabla 13 (Anexo 1) se observó que en su fuente de variación existe diferencia estadística significativa, así mismo presentó un coeficiente de variabilidad de 12.98 por ciento.

En la tabla 6 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se observó que el tratamiento II “medio de cultivo Gamborg (1968)” fue estadísticamente superior a los otros dos tratamientos, en relación a la altura promedio del explante sin la aplicación de hormonas, con 23.8 mm, seguido del tratamiento I “medio Murasgigue & skoog (1962)”, con una altura promedio de 19.1 mm y finalmente el tratamiento III “medio De Fossard (1974)”, en el cual se obtuvo la altura promedio de 5.6 mm, siendo estos diferentes estadísticamente.

Se tomaron en cuenta solo 10 repeticiones, debido a que mayor número de repeticiones mostraron explantes con rápida oxidación y posterior mortalidad.

**Tabla 6: Prueba de comparación de medias de Duncan, variable altura (mm) fase de crecimiento.**

TRATAMIENTO	MEDIO BASAL	MEDIA * (Altura) (mm)
II	Gamborg (1968)	23.8 a
I	Murasgigue & Skoog (1962)	19.1 b
III	De Fossard (1974)	5.6 c

Fuente: Elaboración propia

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

Los resultados estarían indicando que el medio de cultivo de Gamborg (1968) tuvo un efecto óptimo, porque la altura alcanzada en este medio fue superior a los demás medios que se utilizó para la micropropagación de *Coffea arabica* L. Var: Typica.

### 4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

#### a. Número de brotes de *Coffea arabica* L. Var. Typica

En el análisis de varianza tabla 14 (Anexo 1) se observó en su fuente de variación una diferencia estadística significativa, así mismo presentó un coeficiente de variabilidad de 13.66 por ciento.

En la tabla 7 se evidenció la prueba de comparación de medias de Duncan, donde resultó que el tratamiento III (Medio+0.5 ml/L de BAP + 0.5 ml/L de KIN) tuvo el más alto número de brotes con 3.4, seguido del tratamiento V (Medio+1ml/L de KIN) con un número de brotes de 2, mientras que el tratamiento IV (Medio+1ml/L de BAP) con un número de brotes de 1.6. Se puede inferir según tabla 7, que no existió diferencia significativa entre el tratamiento IV (Medio+1ml/L de KIN) y V (Medio+1ml/L de BAP), sin embargo, si existió un efecto sinérgico entre la mezcla de BAP y KIN respecto al número de brotes que fue mayor a KIN y BAP individualmente.

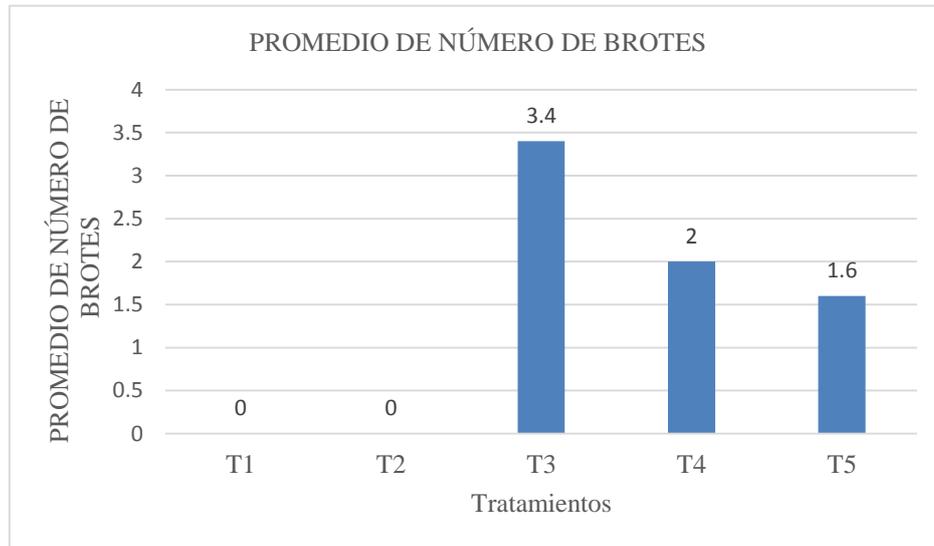
En la tabla 7 se obvió trabajar con los resultados de los tratamientos I y II, por el hecho que no presentaron resultados.

**Tabla 7: Prueba de comparación de medias de Duncan, variable número de brotes.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	MEDIA*
I	Medio + 0.5 mg/l BAP	0
II	Medio + 0.5 mg/l KIN	0
III	Medio +BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l	3.4 a
IV	Medio + 1 mg/l BAP	1.6 b
V	Medio + 1 mg/l KIN	2 b

Fuente: Elaboración propia

\*Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.



**GRÁFICO 2:** Promedio de brotes por explante de *Coffea arabica* L. Var. Typica

#### **b. Altura de brotes de *Coffea arabica* L. Var. *Typica***

Mediante el análisis de varianza tabla 15 (Anexo 1). Se observó en su fuente de variación diferencia estadística significativa, el cuál presentó un coeficiente de variabilidad al 15.88 por ciento.

En la tabla 8 se describen las medias de Duncan. Se observó que el tratamiento III (Medio+0.5 mg/L de BAP+0.5mg/L) tiene una media de 6.4 mm en altura de brotes, por lo que se consideró estadísticamente diferente y superior a los demás tratamientos. Seguido del tratamiento IV (Medio+1 mg/l BAP) con una media de altura de brote de 4.8 mm y por último el tratamiento V (Medio+1 mg/l KIN) con una media de 1.6 mm respectivamente, considerándose estadísticamente iguales los dos últimos tratamientos. Los tratamientos I y II no fueron considerados por no presentar datos diferentes a cero debido a la baja concentración de hormonas aplicadas al tratamiento.

**Tabla 8: Prueba de comparación de medias de Duncan, variable altura (mm) promedio de brotes.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>MEDIA* (Altura) (mm)</b>
III	Medio+ BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l	6.4 a
IV	Medio+1 mg/l BAP	4.8 b
V	Medio+1 mg/l KIN	1.6 b

Fuente: Elaboración propia

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

#### **4.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO**

En la tabla 9 se observó el comportamiento de los 5 tratamientos aplicados, en el cuál uno de ellos presentó resultados en número y longitud de raíces. El tratamiento IV (Medio+ ANA 1 mg/l) presentó un número de raíces de 1.55 promedio y una longitud de 4.21 mm.

**Tabla 9: Promedio de número y longitud de raíces por tratamiento.**

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN	N° RAICES PROMEDIO	LONGITUD (mm)
I	Medio+ AIB 0.5 mg/l+ ANA 0.5 mg/l	0	0
II	Medio+ AIB 0.5 mg/l+ ANA 0.5 mg/l	0	0
III	Medio+ AIB 0.5 mg/l+ ANA 0.5 mg/l	0	0
IV	Medio+ ANA 1 mg/l	1.55	4.21
V	Medio + AIB 1 mg/l	0	0

Fuente: Elaboración propia

#### **4.5. FASE DE ACLIMATACIÓN**

##### **a. Porcentaje (%) de supervivencia**

Según el análisis de varianza cuadro 16 (Anexo 1) se observa que presentó un coeficiente de variabilidad al 16.72 por ciento.

En el cuadro 10 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, en el cual los tratamientos son estadísticamente iguales, por lo se infiere decir que cualquiera de los tratamientos aplicados da resultados para la aclimatación de *Coffea arabica* L. Var. Typica, sin embargo el tratamiento III en el que se aplicó el 100 por ciento de humus fue más favorable para la aclimatación.

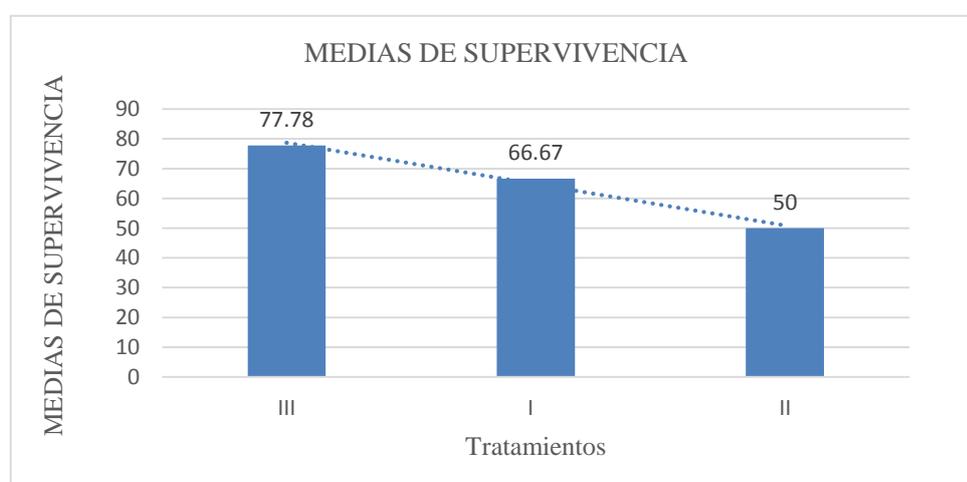
**Tabla 10: Prueba de comparación de medias de Duncan, variable porcentaje de plántulas sobreviviente por sustrato.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	MEDIA*
I	Humus 50% + arena 50%	66.67 a
II	Turba 60% + arena 40%	50 a
III	Humus 100%	77.78 a

Fuente: Elaboración propia

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

Las plántulas obtenidas in vitro se trasplantaron a ex vitro en pequeñas bandejas de plástico o macetas de plástico.



**GRÁFICO 3:** Medias de supervivencia en la fase de aclimatación de los explantes de *Coffea arabica L. Var: Typica*

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. FASE DE DESINFECCIÓN

(Paz, 2000), en su investigación “Inducción de embriogénesis somática in vitro de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares”, concluyó que al usar los tratamientos con 15% y 20% hipoclorito de calcio tuvieron excelentes efectos desinfectantes con niveles bajos de contaminación, que están en un rango de 0% a 21% de contaminación de los explantes, pero en dosis mayores al 20% se obtuvo muy bajos niveles de contaminación, aunque provocaron la necrosis del material vegetativo.

Los resultados obtenidos se asemejan con los resultados que alcanzó (Cruz, 2019), quien determinó en su investigación “Micropropagación de *Theobroma cacao* l. “cacao nativo” para conservación de germoplasma en Jaén – Perú”, en la fase de desinfección de explantes realizó un tratamiento óptimo con el tres por ciento hipocloritos de calcio más tres gotas de Tween 80 con un tiempo de inmersión de 20 minutos, para obtener un porcentaje de 90 por ciento de explantes desinfectados.

Además, (Mroginski y Roca, 1991) mencionan que hay una vasta gama de compuestos químicos que se pudieron utilizar como desinfectantes, etanol (70% v/v), hipoclorito de sodio (NaOCl) de 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico (agua de lavandina), con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , 6% a 12%], (Tween-20, del 0.01% al 0.1%), pero puede ser innecesario, también se tiene el cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ , 0.1% a 1.5%), recalando que dicho compuesto es altamente tóxico y no es remueve fácilmente del explante.

## 5.2. FASE DE CRECIMIENTO

El resultado de la fase de crecimiento fue de 23.8 mm altura promedio, los cuáles se asemejaron a los resultados que obtuvo (Campos, 2018) en la fase de crecimiento en su investigación “Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de *Cinchona pubescens vahl* (cascarilla)”. En el que obtuvo un 28.8 por ciento de altura promedio del explante en mm, sin la aplicación de hormonas utilizando como medio de cultivo Gamborg (1968).

(Mroginski & Roca, 1991), indicaron que en los medios desarrollados entre ellos Murashigue & Skoog (1962), Gamborg (1968) y Chu (1975), destacaron las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno se suministró en forma de nitrato o solo amonio como fuente nitrogenada.

## 5.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

### a. Número de brotes de *Coffea arabica* L. Var. *Typica*

Los resultados de esta fase, mostrarón una media de 3.4, utilizandó la composición de hormonas BAP 0.5 mg/L + KIN 0.5 mg/L la cuál presentó superioridad ante los otros tratamientos, dichos resultados presentarán similitud con la fase de multiplicación en la investigación realizada por (Campos, 2018) en “Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de *Cinchona pubescens Vahl* (Cascarilla)” que obtuvo una media superior con un número de brotes de 3.1 aplicando la combinación de BAP y KIN en un solo tratamiento. En tanto (Becerra, 2001) indicó que la concentración de BAP y KIN influyeron en el número de brotes producidos, la concentración aplicada fue de 0.5 mg/l de fitorreguladores, que estímulo la formación de brotes.

Por su parte (Daquinta *et al*, 2001) mencionó que en su investigación “Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.F)”, en la fase de

multiplicación obtuvo un mayor número de brotes emitidos donde se combinó BAP y KIN, como resultado presentó un número de brotes de 4.3. Considerándose el mejor medio para multiplicar brotes.

(Collado *et al*, 2004), mencionó que la citoquinina más utilizada es el BAP; se aplicó en bajas concentraciones y estimuló las yemas apicales y terminales en la etapa de micropropagación, y no solo promovió la división celular sino también la brotación y elongación de las yemas. Por su parte (Becerra, 2001), estableció que una elevada concentración de citocininas, trajo como consecuencia una exagerada y desordenada división celular en los meristemas axilares. (Solis *et al*, 2011), en su investigación “Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales” nos indica que tanto BAP y KIN proporcionarán buenos resultados en la fase de multiplicación.

#### **b. Altura de brotes de *Coffea arabica* L. Var. *Typica***

En cuanto a los resultados de altura del brote que fue una media de 6.4 mm, aplicando BAP 0.5 mg/L + KIN 0.5 mg/L al medio de cultivo presentaron gran similitud con los de (Sangay, 2001) citado por Becerra, donde logró una longitud de brote de 5.0 mm, usando MS (1969), más 1 mg/L de BAP y KIN en la investigación denominada “Multiplicación de *Caesalpinea spinosa* (Tara)”.

### **5.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO**

El resultado obtenido en la investigación utilizó ácido naftalenacético (1 mg/L de ANA), obteniéndose 1.55 por ciento en número de raíces y 4.21 mm longitud de raíz, al respecto (Suarez y Quintero, 2014) incrementaron el suministro de ANA que favoreciendo un mejor enraizamiento de los brotes micropropagados en *Stevia rebaudiana bertonii*. Por su parte, (Cruz, 2019) logró una longitud de brote de 19.87 mm y un número de raíces de 1.75 utilizando como tratamiento ANA 1mg/l en su investigación “Micropropagación de *Theobroma cacao* L.

(cacao nativo)” para conservación de germoplasma. Así mismo, (Quintero *et al*, 2003) en su investigación “Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas sp*” indicó que el efecto de ANA fue mayor hasta registrar 3.6 por ciento por planta con dosis de 0.9 mg/l de ANA.

## **5.5. FASE DE ACLIMATACIÓN**

Los resultados obtenidos no son diferentes estadísticamente, sin embargo el tratamiento III utilizó humus al 100 por ciento y se obtuvo una media de 77.78 por ciento. Los resultados de esta fase coincidieron con lo señalado por (Diaz, Medina *et al*, 2004) en su investigación “Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz” quien señaló que en esa fase sobresalió el tratamiento (100 % humus de lombriz + 0 % tierra) al mostrar diferencias significativas obteniendo un 21.756% de sobrevivencia.

Por otro lado, (Ahuja, 1993) mencionó que la humedad es un factor crítico en el momento que se trasladó del ambiente in vitro a ex vitro, el mismo que determinó la sobrevivencia de las plantas. Dichas plántulas son más susceptibles ya que su capacidad de fotosíntetizar no se encuentra al 100 por ciento, por no poseer capa cerosa, ni cutícula

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### a. Conclusiones

- El mejor medio de cultivo identificado para la “Micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Typica “café” corresponde al medio de cultivo Gamborg (1968).
- El tiempo óptimo para la desinfección de *Coffea arabica* L. Var. Typica “café” es de 20 minutos.
- Las concentraciones de hormonas óptimas para la fase de multiplicación, en las variables número y altura de brotes corresponden al 0.5 mg/L de BAP (Bencilamino purina) más 0.5 mg/L de KIN (Kinetina).
- En la fase de enraizamiento se aplicó 1mg/L ANA (Ácido  $\alpha$ -naftalenacético), para alcanzar la aparición de primordios radiculares.
- Para la micropropagación óptima de *Coffea arabica* L. Var. Typica “café”, se debe aplicar el protocolo del anexo 3.

### b. Recomendaciones

- Que la planta donadora de explantes sea producida en vivero con el mejor cuidado para evitar la contaminación por agentes patógenos y mantener un buen estado fitosanitario del explante.

- Investigar nuevas rutas en la investigación sobre la fase de multiplicación y agregar ácido giberélico para lograr un mayor elongación y número brotes en los nudos del explante y facilitar la micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Typica.
  
- En la fase de enraizamiento de la especie se recomienda evaluar nuevas concentraciones de auxinas, más elevadas a las que se aplicaron en el proyecto de investigación, debido a que se obtuvo un mínimo porcentaje al 1.5 por ciento.
  
- No usar los tratamientos I y II que se evaluarón en las tablas 3 y 4, ya que a ese porcentaje hormonas no se obtuvo resultados favorables.
  
- Realizar más trabajos de investigación de la especie y llegar hasta la fase de aclimatación, con la finalidad de ampliar el conocimiento. Y variar los sustratos y su composición para ver el mayor número de plantines sobrevivientes y su adaptabilidad en vivero después de haber estado en un cultivo in vitro.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, M. (1993). *Micropropagation. Micropropagation of wood plants*. Kluwer.
- Becerra, V. (2001). *Micropropagación Vegetativa In Vitro de Nageia rospigliosii*. From [http://dina.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=0a57f731d8f19e91a96dd3446392?id\\_investigador=20954](http://dina.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=0a57f731d8f19e91a96dd3446392?id_investigador=20954)
- CAMCAFE 2019, C. P. (n.d.). *Datos estadísticos actualizados sobre el café en Perú*. Retrieved 2019 from <http://www.camcafeperu.com.pe/index.php/elcafe>
- Campos, O. (2018). *Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de Cinchona pubescens Vahl "Cascarilla"*. Universidad Nacional de Jaén, Jaén-Perú.
- Cruz, A. (2019). Micropropagación de Theobroma cacao L. "Cacao nativo" para conservación de germoplasma en Jaén – Perú.
- Daquinta, M., Ramos, L., Capote, I., Lezcano, Y., Rodríguez, R., Trina, D., & Escalona, M. (2001). Micropropagación de la teca (Tectona Grandis L.F.). *Revista Foestal Centroamericana*. From <http://bco.catie.ac.cr/portal-revistas/index.php/rna/article/view/696>
- Diaz, Medina, L., Latife, J., Digonzelli, P., & Sosa, S. (2004). Aclimatación de plantas Micropropagadas de caña de azucar utilizando el Humus de Lombriz. *Revista de investigaciones Agropecuarias*. From <https://www.redalyc.org/pdf/864/86433208.pdf>
- Guiracocha, G. (2000). *Rol de los sistemas agroforestales cacaoteros y bananeros en la conservación de la biodiversidad arbórea*.

- MINAGRI. (2015). *El Café: Principal producto de Agroexportación*. Ministerio de Agricultura y Riego, Lima. From <http://minagri.gob.pe/portal/22-sector-agrario/vision-general/192-principales-productos-de-exportacion-tradicional>
- MINAGRI. (2015). *Situación actual del café en el país*. From <http://minagri.gob.pe/portal/485-feria-scaa/10775-el-cafe-peruano>
- Mroginski, L., & Roca, W. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In L. A. Mroginski, & W. M. Roca, *Cultivo de tejidos en la agricultura* (p. 27). From <http://exa.unne.edu.ar/biología/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo2.pdf>
- Queirolo, c. (2010). *Promoción del Consumo Interno del Cafe: Lineamientos de Estrategia Tesis para Optar el Grado de Magister en Comunicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de Post Grado*. From <http://infocafes.com/portal/biblioteca/promocion-del-consumo-interno-del-cafe-en-el-peru-lineamientos-de-estrategia-ensayo/>
- Quintero , I., Polo , J., Jarma, A., & Espitia, A. (2003). Enraizamiento in vitro de Dioscoreas sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2). From <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/575>
- Sangay, H. (2001). *Cultivo In Vitro de Epicótilos de Caesalpinia spinosa Kuntze (Tara)*. Universidad Nacional de Cajamarca, Tesis, Cajamarca - Perú.
- Suarez, I., & Quintero, I. (2014). Micropropagación de Stevia rebaudiana Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con Merístemos pre-existentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21-32. From [//www.redalyc.org/pdf/776/77631180003.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/776/77631180003.pdf)

## **AGRADECIMIENTO**

Eternamente agradecida con Dios por permitirme la dicha de vivir. A mis padres Florentina Roque y Gilberto Arévalo, por ser ellos unos guías constantes en mi vida, por ser el motivo fundamental para el trazo y cumplimiento de cada una de mis metas personales y profesionales, a mis hermanos por ser la motivación y ejemplo a seguir ofreciéndome el cariño más sincero y apoyo incondicional.

El agradecimiento a mi asesor el Ing. M. Sc. José Salomón Almestar Montenegro y mis co-asesores el Ing. M. Sc Vitoly Becerra Montalvo e Ing. M. Sc Francisco Fernando Aguirre de los Ríos, por encaminarme en el desarrollo de mi proyecto de tesis, por compartir desinteresadamente sus conocimientos y experiencias.

Al Ph.D Omar Zeballos Cáceres por su apoyo en el procesamiento de datos estadísticos, a la Cooperativa de Servicios Múltiples Sol&Café LTDA, por su apoyo en parte del financiamiento y ejecución del proyecto.

A la Ing. Omery Campos por su apoyo y ser de guía en el laboratorio, al Ing. Santos e Ing. Franklin por la atención y permiso al acceder al Laboratorio de Biotecnología y brindarme las herramientas de trabajo necesarias.

Por último, a mis amigos: Roxana Cruz, Susan Brito, Luci Barturen, Katharine Gaytan, David Coronel y Jimbler flores, que durante mi etapa universitaria me brindaron su paciencia y comprensión, enseñándome el significado de la amistad, finalmente a César Chero Sandoval por impulsarme a seguir y brindarme su amor y comprensión en cada momento.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Florentina Roque y Gilberto Arévalo quienes son los pilares fundamentales de mi formación personal y profesional, por brindarme siempre su apoyo incondicional y desinteresado en cada momento.

### **A mis hermanos**

Neiker, Emmerson,

Diorkaeff y Deyman.

Por ser un gran ejemplo a seguir y brindarme su compañía, comprensión y amor.

## ANEXOS

### Anexo 1: Pruebas estadísticas

**Tabla 11: Resultados de los tratamientos realizados en desinfección de *Coffea arabica* L. Var. *Typica*.**

<b>Desinfección</b>				
N° Tratamiento	Duración de exposición (min)	N° Explantes tratados	% Explantes contaminados	% Explantes no contaminados
I	5	10	100	0
II	10	10	80	20
III	15	10	50	50
IV	20	10	10	90

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 12: Análisis de varianza (ANVA), variable altura promedio del explante de *Coffea arabica* L. Var. *Typica*, a los 60 días.**

Tratamientos	<b>Repeticiones</b>									
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
TI - M. S	18	20	20	21	17	17	20	15	23	20
TII – G	28	22	24	25	24	20	21	27	24	23
TIII – F	5	7	5	5	5	5	7	8	4	5

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 13: Análisis de varianza (ANVA), variable altura promedio de explante de *Coffea arabica* L. Var. *Typica*, en la fase de crecimiento.**

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>F.T</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	2	1785.27	892.635	202.700967	3.35	*
Error experimental	27	118.9	4.4037037			
Total	29	1904.17				

Fuente: Elaboración propia

<b>C.V</b>	12.98
------------	-------

**Tabla 14: Análisis de varianza (ANVA), variable número de brote promedio por explante en la fase de multiplicación.**

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>F.T</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	2	1.89	0.945	22.579646	3.35	*
Error experimental	27	1.13	0.04185185			
Total	29	3.02				

Fuente: Elaboración propia

<b>C.V</b>	13.66
------------	-------

**Tabla 15: Análisis de varianza (ANVA), variable altura promedio por explante en fase multiplicación.**

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>F.T</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	2	119.4 7	59.735	130.06814 5	3.3 5	*
Error experimental	27	12.4	0.4592592 6			
Total	29	131.8 7				

Fuente: Elaboración propia

<b>C.V</b>	15.88
------------	-------

**Tabla 16: Análisis de varianza (ANVA), variable porcentaje de plántulas sobrevivientes por sustrato en la fase de aclimatación.**

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>F.T</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	2	448.1	224.05	2.7345959	5.14	N.S
Error experimental	6	491.59	81.9316667			
Total	8	939.69				

Fuente: Elaboración propia

<b>C.V</b>	16.72
------------	-------

**Anexo 2: Composición de los medios de cultivo.**

<b>COMPONENTES (mg/L)</b>	<b>MURASHIGE Y SKOOG (1962)</b>	<b>GAMBORG (1968)</b>	<b>De FOSSARD (1974)</b>
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub> (Nitrato de potasio)	1900	2500	1011
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Nitrato de amonio)	1650		800.5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O (Nitrato de calcio tetrahidratado)			294.1
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Cloruro de calcio dihidratado)	440	150	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Sulfato de magnesio heptahidratado)	370	250	369.8
KCl (Cloruro de potasio)			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de potasio monobásico)	170		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (Fosfato de sodio hidratado)		150	138
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sulfato de sodio)			63.9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sulfato de amonio)		134	
<b>Micronutrientes</b>			
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (sulfato de manganeso (II) tetrahidratado)	22.3	13.2	11.153
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (sulfato de zinc tetrahidratado)	8.6	2	5.751
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido bórico)	6.2	3	3.092
K I (Yoduro de potasio)	0.83	0.750	0.415
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O (Sulfato de cobre II pentahidratado)	0.025	0.025	0.0249
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Molibdato de sodio dihidratado)	0.25	0.250	0.0242

CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (Cobalto de cloruro hexahidratado)	0.025	0.024	0.119
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Sulfato de hierro II heptahidratado)	27.85	13.902	13.902
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	37.25	18.613	18.613
<b>Vitaminas</b>			
Inositol	100	99.1	54
Tiamina - HCl	0.1	10.118	0.675
Ácido nicotínico	0.5	0.985	2.462
Piridoxina – HCl	0.5	1.028	0.617
Ác. Pantoténico			0.4765
Biotina			0.0489
Choline chloride			0.1396
Riboflavina			0.376
Ácido ascórbico			0.176
Ácido fólico			0.441
<b>Otros</b>			
Agar (g/l)	7	7	7
Sacarosa (g/l)	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7

Fuente: Elaboración propia

### **Anexo 3: Protocolo base para la Micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Typica**

**Nombre científico:** *Coffea arabica* L. Var. Typica.

**Nombre común:** Café.

**Establecimiento de los cultivos:**

**a. Explante utilizado.**

Se utilizarán explantes jóvenes fragmentados o fracciones de tallos de aproximadamente de 2 cm de largo.

**b. Desinfección del explante:**

Los explantes se lavan con agua corriente, luego se sumergen los explantes en alcohol etílico al 70 por ciento durante 30 segundos, luego enjuagarlos y someterlos a una solución de hipoclorito de calcio al 3 por ciento más 3 gotas de Tween 80, durante 20 minutos, seguidamente se retiran de la solución y se enjuagan repetidas veces con agua destilada y esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar.

**c. Medios de cultivo para el establecimiento:**

Ya teniendo los explantes desinfectados se instalan en el medio de cultivo Gamborg (1968), que contienen los macro y micronutrientes adicionando como fuente de carbono azúcar (30g/l) más agente gelificante como agar agar. Adicionalmente se utilizó la combinación de hormonas (citoquininas) en concentraciones de 0.5 mg/L BAP (bencilamino purina) más 0.5 mg/L de KIN (Kinetina).

La preparación del medio de cultivo se depositó en tubos de ensayo de 25x150, ajustando el pH entre  $5.8 \pm 2$ , seguidamente se esterilizó en autoclave a 121°C, por un tiempo de 25 minutos.

**Condiciones de incubación:** Se mantuvieron a una temperatura de  $23^{\circ} \text{C} \pm 2$ , con una exposición de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

**d. Enraizamiento:**

Los brotes obtenidos son subcultivados en medio basal Gamborg (1968) más la concentración de 1 mg/l de la hormona ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenacético).

#### **e. Aclimatación**

Las plantas enraizadas de la fase anterior se extraen del tubo de ensayo en condiciones in vitro para ser llevadas a condiciones ex vitro finalmente se transfieren al sustrato de Humus al 100 por ciento esterilizado, bajo condiciones ambientales controladas, suministrando agua destilada por un mes hasta lograr la adaptabilidad de la planta.

#### Anexo 4: Panel fotográfico



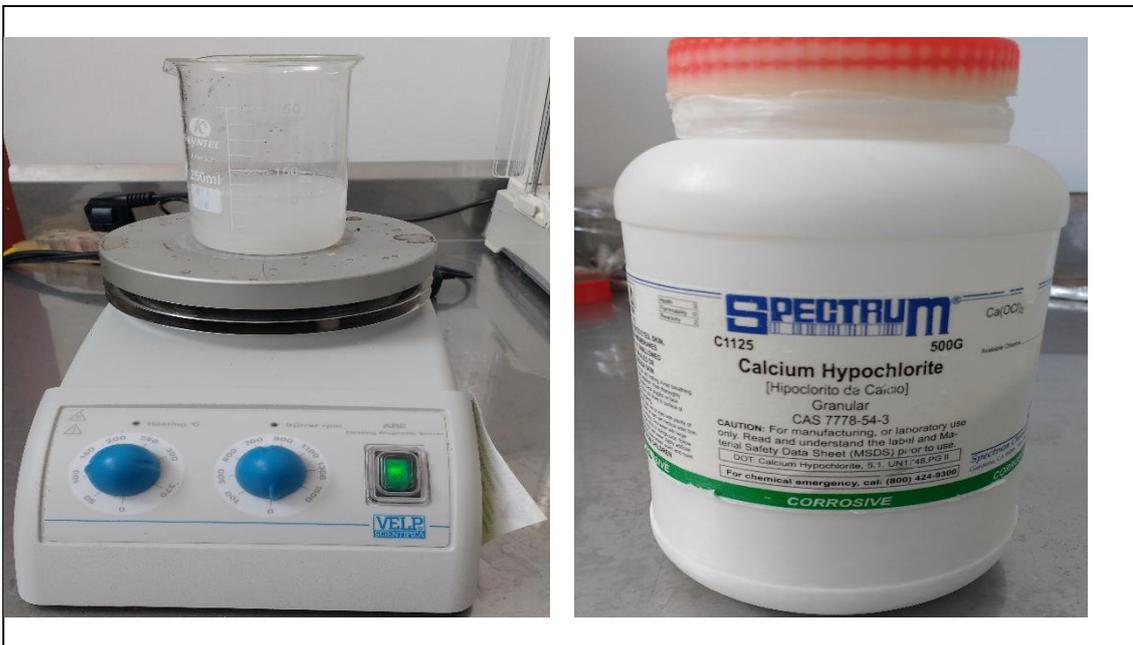
*Figura 1: Obtención de la planta madre de Coffea arabica L. Var. Typica.*



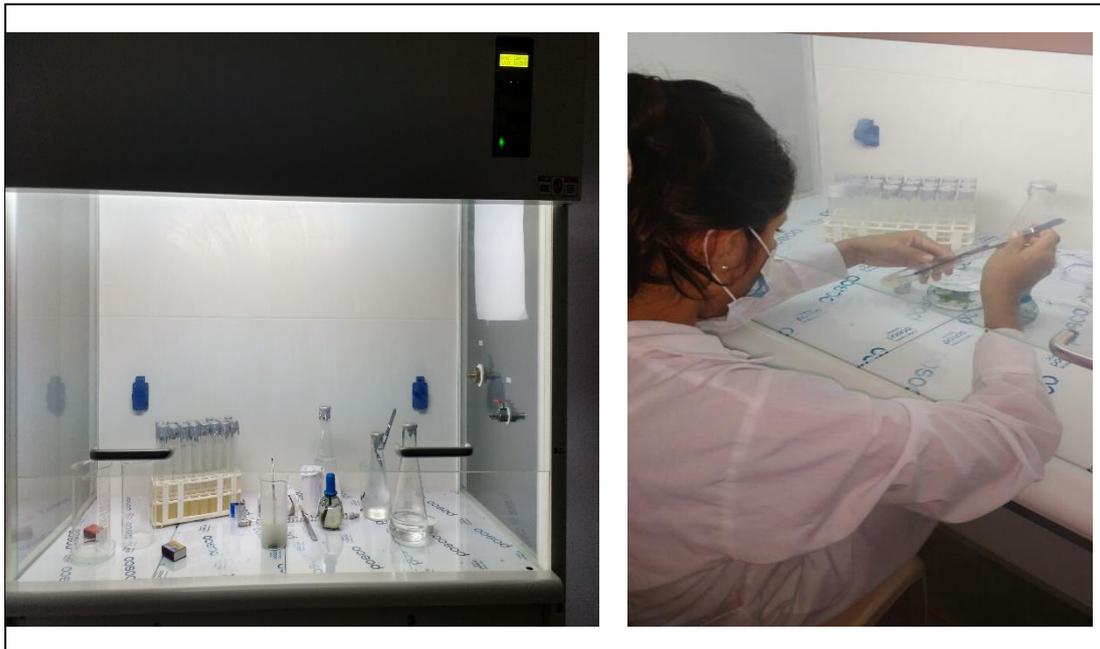
*Figura 2: Selección de plantas madre y esterilización de material.*



**Figura 3: Preparación de medio de cultivo Gamborg (1968).**



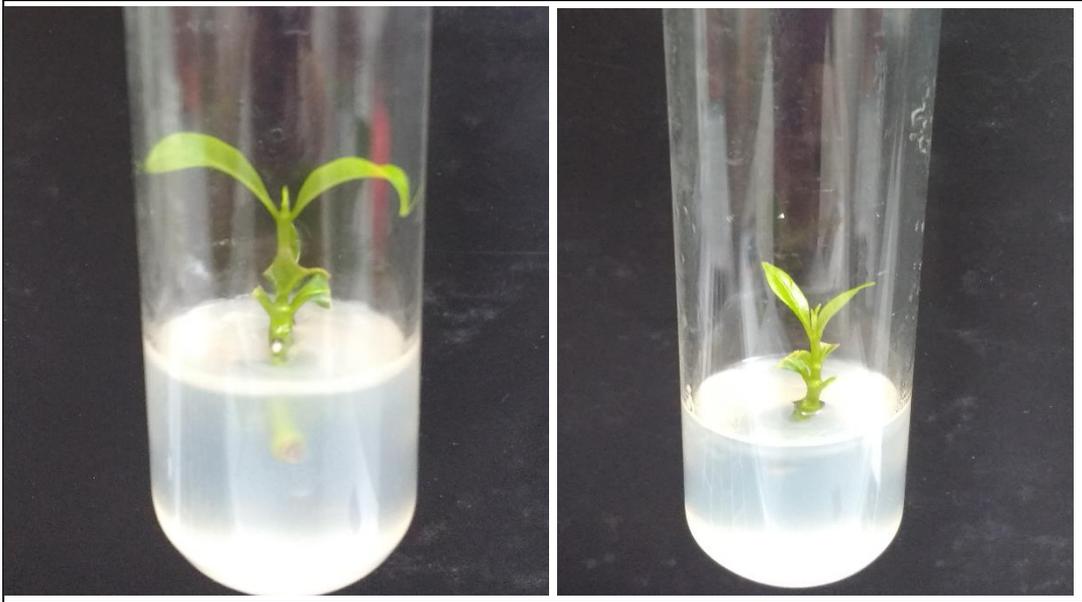
**Figura 4: Preparación de la solución desinfectante ( $Ca(OCl)_2$ ) hipoclorito de calcio.**



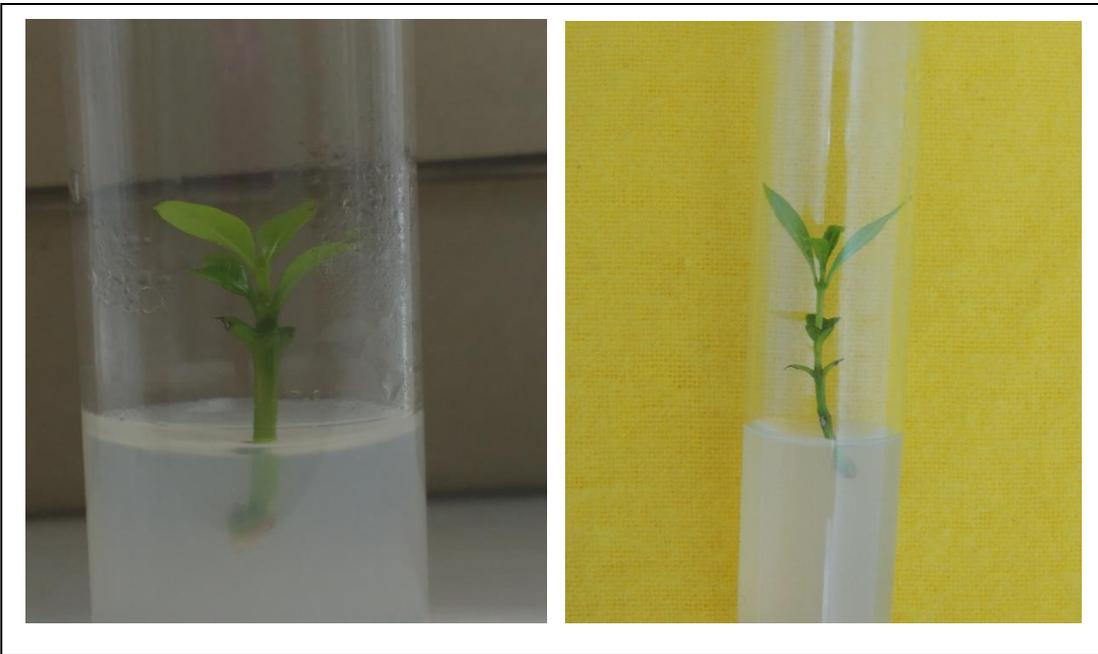
**Figura 5:** Esterilización de material en la cámara de flujo laminar, y siembra del explante en el medio de cultivo dentro de la cámara de flujo laminar.



**Figura 6:** Establecimiento del medio de cultivo en los tubos de ensayo de 25x150 ml.



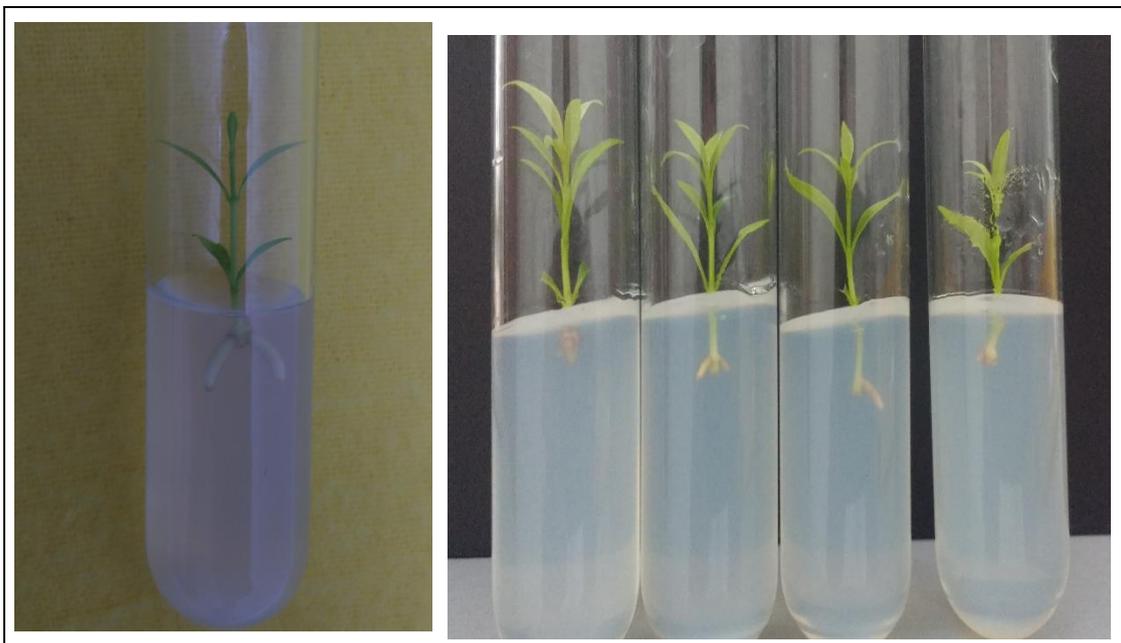
**Figura 7:** Explantes de *Coffea arabica* L, Var. Typica en fase de crecimiento, y teniendo como medio basal a Gamborg (1968).



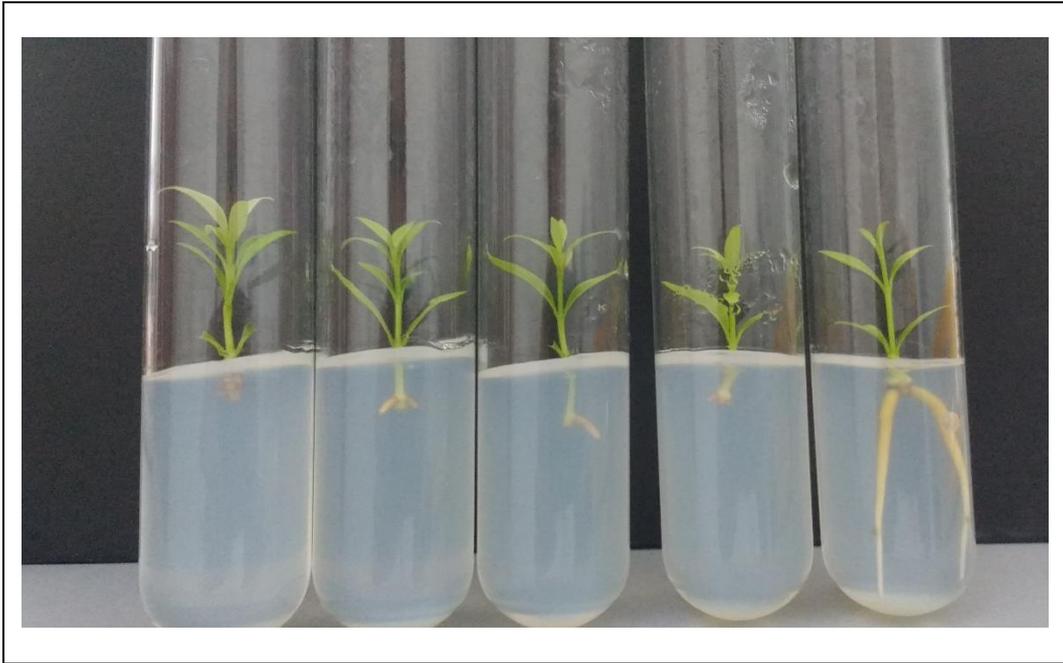
**Figura 8:** Explantes de *Coffea arabica* L. Var. Typica en fase de multiplicación.



**Figura 9:** Explantes de *Coffea arabica* L. en fase de multiplicación de brotes.



**Figura 10:** Explantes de *Coffea arabica* L. Var. Typica, en fase de enraizamiento se pueden apreciar la aparición de raíces por explante.



**Figura 11:** Explantes de *Coffea arabica* L. Var. Typica, con presencia de raíces.



**Figura 12:** Aclimatación de explantes de *Coffea arabica* L. Var. Typica.

## Anexo 5: Certificado de identificación botánica de *Coffea arabica* L Var: Typica

José Ricardo Campos de la Cruz  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C. B. P. N° 3796  
Tel: 017512863 - RPM 963689079  
e-mail: joramde@gmail.com



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### Certifica:

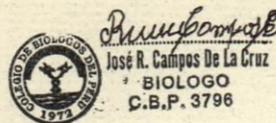
Que, la **COOPERATIVA DE SERVICIOS MULTIPLES SOL&CAFE LTDA.** En el marco del proyecto "Identificación taxonómica de variedades de café especial certificado y análisis de su calidad en taza en relación al tiempo de fermentado en la provincia de Jaén". Contrato N° 007\_2016\_INIA\_PNIA\_UPMSI\_IA. Ha solicitado la identificación y certificación botánica de una muestra de café con código SC153 proveniente de la localidad Chimburique. Distrito de La Coipa. Provincia de San Ignacio. Departamento de Cajamarca. La muestra ha sido identificada como *Coffea arabica* L. Var. *Typica*. En base al Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae  
DIVISIÓN : Magnoliophyta  
CLASE : Magnolopsida  
SUBCLASE : Asteridae  
ORDEN : Rubiales  
FAMILIA : Rubiaceae  
GENERO : *Coffea*  
ESPECIE : *Coffea arabica* L.

Variedad cultivar: *Coffea arabica* L. Var. *Typica*

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 21 de abril del 2018



Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es