



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Estandarización de un sistema de micropropagación clonal *in vitro* de *Coffea arabica* L. “café” var. *Geisha* tolerante a *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome
“roya amarilla”

TESIS

Para optar el título profesional de licenciado en biología

AUTOR

Cabanillas Rodríguez, Eugenio Andrés

(ORCID: 0000-0001-5989-1889)

ASESOR

Quiñones Aguilar, Mauro Maximo

(ORCID: 0000-0001-5026-5865)

Lima, Perú

2023

Metadatos Complementarios

Datos de autor:

Cabanillas Rodríguez, Eugenio Andrés

Tipo de documento de identidad: DNI 46433959

Datos de asesor:

Quiñones Aguilar, Mauro Maximo

Tipo de documento de identidad: DNI 25757894

Datos del jurado

JURADO 1: Montoya Terreros, Haydee

Número de documento de identidad: DNI 08406252

Código ORCID: 0000-0001-9052-1093

JURADO 2: Pineda Chavarria, Roberto Christian

Número de documento de identidad: DNI 10308965

Código ORCID: 0000-0001-9388-1342

JURADO 3: Madrid Ibarra De Mejía, Flor De María

Número de documento de identidad: DNI 07222631

Código ORCID: 0000-0002-4041-2718

Datos de la investigación

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.10

Código del Programa: 511206

Dedicatoria

A Dios, porque a pesar de todas las particularidades que pudo haber en algunos momentos de mi vida, ha sido mi luz, guía y esperanza para mantenerme firme en esta complejidad cósmica llamada vida.

A mis padres, por darme la oportunidad de haber nacido, vivido en un hogar en todos los sentidos que se pueda desear y formar la persona que soy ahora. Por ustedes y para ustedes todos mis logros.

Agradecimientos

A Dios, por poner en mi camino a excelentes personas y por su presencia permanente en cada etapa de mi vida.

A mi madre, Yolinda, mi eterno agradecimiento por su amor, comprensión y apoyo desinteresado, por enseñarme a luchar contra todo para lograr mis sueños y hacerme notar que siempre tendré una mano desinteresada en la cual apoyarme siempre.

A mi padre, José Luis, mi total agradecimiento por darme su confianza y apoyo a pesar de mis errores, por ser mi admiración y ejemplo de superación, por inculcarme la fortaleza, sabiduría y templanza para tomar las decisiones correctas.

A la Universidad Ricardo Palma y mis profesores, mi agradecimiento y orgullo por darme todo lo necesario para forjarme como el profesional que soy.

A mi estimado asesor Mauro Quiñones, Jefe del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, mi eterno agradecimiento por ser más que mi maestro, un segundo padre, por darme su confianza y fortaleza en mis momentos de debilidad, por todos sus consejos, aciertos y apoyo desmedido inculcándome el espíritu de la investigación y la excelencia.

A mi jurado de tesis, Dra. Haydee Montoya Terreros, Blgo. Roberto Pineda Chavarría, Blga. Flor de María Madrid de Mejía, mi sincero agradecimiento por ser grandes maestros y sus consejos acertados en mi desarrollo profesional y de esta tesis.

A mis compañeros tesisistas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Biotecnología Ambiental, Leslie Chavarría, Miguel Montero, mi agradecimiento por su amistad, buenos momentos, consejos y total apoyo en mi estancia y desarrollo de esta investigación.

A mi compañera y gran amiga de laboratorio, Paula Álvarez Obregón, mi sincero agradecimiento, por su paciencia y su total apoyo incondicional en los días enteros a mi lado facilitándome la ejecución de esta investigación.

A todos mis amigos en general, en especial a los de la Asociación Cultural Folklórica Llaqtaymanta Pacha Perú, mi total agradecimiento porque de una u otra forma han sido mi segunda familia y por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida profesional

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
III. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
IV. OBJETIVO GENERAL.....	5
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
VI. MARCO TEÓRICO	6
6.1 <i>Coffea arabica</i> L.....	6
6.1.1 Clasificación taxonómica	6
6.1.2 Origen y distribución geográfica.....	7
6.1.3 Características morfológicas	7
6.1.4 Cultivo.....	8
6.1.5 Variedades	9
6.1.5.1 Homogeneidad	9
6.1.5.2 Distinción.....	9
6.1.5.3 Estabilidad.....	10
6.1.5.4 Variedad Geisha.....	10
6.2 Roya amarilla o roya del cafeto.....	11

6.3	Propiedades nutracéuticas y organolépticas del café.....	12
6.4	Micropropagación clonal y cultivo <i>in vitro</i>	13
6.4.1	Medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (MS).....	14
6.4.2	Fitohormonas.....	15
6.4.2.1	Auxinas	15
6.4.2.2	Citoquininas	16
6.4.2.3	Giberelinas	16
VII.	ANTECEDENTES	17
VIII.	HIPÓTESIS	27
IX.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
9.1	Lugar de ejecución.....	28
9.2	Tipo y diseño de investigación.....	28
9.3	Muestreo.....	28
9.3.1	Muestreo probabilístico estratificado con afijación simple.....	28
9.3.1.1	Unidad de análisis o de estudio.....	28
9.3.1.2	Universo.....	28
9.3.1.3	Población.....	29
9.3.1.4	Muestra	29
9.4	Procedimiento y análisis de datos.....	29
9.4.1	Establecimiento de una metodología de germinación <i>in vitro</i> de Semillas de <i>Coffea arabica</i> L.var. <i>Geisha</i>	29
9.4.2	Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10mg/l) y vitaminas de Gamborg (0% y 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas	31
9.4.3	Evaluación del efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	32
9.4.4	Determinación de la concentración de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	33
9.4.5	Establecimiento de un sistema de aclimatación de plántulas de <i>Coffea</i> <i>arabica</i> L. var. <i>Geisha</i> a condiciones ambientales (<i>ex vitro</i>).....	34
9.4.6	Análisis estadístico.....	34

X.	RESULTADOS	35
10.1	Establecimiento de una metodología de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	35
10.1.1	Porcentaje de contaminación y fenolización... ..	35
10.1.2	Porcentaje de Germinación <i>in vitro</i> y en condiciones de invernadero... ..	36
10.1.3	Concentración del medio Murashige & Skoog (50, 75 y 100%) en la obtención de plántulas a partir del cultivo de embriones cigóticos y en condiciones de invernadero... ..	37
10.2	Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas (0%, 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas	39
10.2.1	Coeficiente de Multiplicación (CM)... ..	39
10.2.2	Tasa de Crecimiento (TC) y Cantidad de Nudos (CN) en las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> var. <i>Geisha</i> L. cultivadas a diferentes concentraciones de la fitohormona 6-BAP	39
10.2.3	Cantidad total de yemas y explantes obtenidos.....	41
10.2.4	Incidencia de tejido calloso (IC)... ..	41
10.3	Evaluación del efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	42
10.3.1	Tasa de Crecimiento (TC) de las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> var. <i>Geisha</i> cultivadas en dos tipos diferentes de luz	42
10.3.2	Concentración de clorofila A, B y Total (C_A , C_B , C_T)... ..	42
10.4	Determinación de la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen la mayor tasa de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	43
10.4.1	Influencia del tipo de onda de luz	43
10.4.2	Promedio de raíces obtenidas entre las auxinas utilizadas	43
10.4.3	Promedio de raíces obtenidas entre las concentraciones de cada Auxina utilizada	44
10.4.4	Promedio de longitud de raíces obtenidas entre las concentraciones de cada auxina utilizada	45
10.4.5	Tasa de Mortalidad (TM)... ..	46
10.5	Establecimiento de un sistema de aclimatación de plántulas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i> a condiciones ambientales (<i>ex vitro</i>).....	47

10.5.1	Tasa de plantas aclimatadas a condiciones ambientales (<i>ex vitro</i>).....	47
10.5.2	Altura de plantas aclimatadas a condiciones ambientales (<i>ex vitro</i>)... ..	47
XI.	DISCUSIÓN	48
11.1	Establecimiento de una metodología de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	48
11.2	Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas (0%, 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas.....	49
11.3	Evaluación del efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	53
11.4	Determinación de la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen la mayor tasa de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i>	54
11.5	Establecimiento de un sistema de aclimatación de plántulas de <i>Coffea arabica</i> L. var. <i>Geisha</i> a condiciones ambientales (<i>ex vitro</i>)... ..	56
XII.	CONCLUSIONES	58
XIII.	RECOMENDACIONES	59
XIV.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
XV.	ANEXOS	67
15.1	Figuras	67
15.2	Tablas.....	96

Índice de figuras

Figura 1. <i>Semillas de Coffea arabica L. var. Geisha obtenidas del distrito de Villa Rica, Provincia de Oxapampa, Región Pasco, Perú.....</i>	67
Figura 2. <i>Semillas de Coffea arabica L. var. Geisha post choque térmico y sin pergamino (testa).....</i>	67
Figura 3. <i>Esterilización de semillas Coffea arabica L. var. Geisha con NaOCl y HgCl₂ para la germinación in vitro con endospermo</i>	68
Figura 4. <i>Secuencia de desinfección para la esterilización de Coffea arabica L. var. Geisha para el aislamiento de embrión cigótico.....</i>	68
Figura 5. <i>Esterilización de Coffea arabica L. var. Geisha para el aislamiento de embrión cigótico.....</i>	69
Figura 6. <i>Semillas de Coffea arabica L. var. Geisha estériles y sumergidas por 48 horas en agua estéril con 1g/l previo aislamiento de embrión cigótico</i>	69
Figura 7. <i>Aislamiento y siembra de embrión cigótico de Coffea arabica L. var. Geisha.....</i>	70
Figura 8. <i>Cambio a medio fresco y monitoreo de las plántulas de Coffea arabica L. var. Geisha.....</i>	70
Figura 9. <i>Cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo diferentes longitudes de ondas de luz</i>	71
Figura 10. <i>Análisis de concentración de Clorofila A, B y Total</i>	71
Figura 11. <i>Aclimatación a condiciones ex vitro de plantas de Coffea arabica L. var. Geisha.....</i>	72
Figura 12. <i>Plantas de Coffea arabica L. var. Geisha aclimatadas a condiciones Ambientales</i>	73
Figura 13. <i>Ensayo 2 (E2), germinación in vitro de semillas de Coffea arabica L. var. Geisha.....</i>	73
Figura 14. <i>Porcentaje de contaminación en los ensayos de la germinación in vitro de semillas con endospermo de Coffea arabica L. var. Geisha.....</i>	74
Figura 15. <i>Porcentaje de fenolización en los ensayos de la germinación in vitro de semillas con endospermo de Coffea arabica L. var. Geisha.....</i>	74
Figura 16. <i>Ensayo 6 (E6) 0% de contaminación pero 100% de fenolización.....</i>	75
Figura 17. <i>Cultivo de embriones cigóticos. 0% de contaminación.....</i>	75
Figura 18. <i>Porcentaje de fenolización en el cultivo de embriones cigóticos</i>	76

Figura 19. <i>Porcentaje de Germinación en el cultivo in vitro de embriones cigóticos</i>	76
Figura 20. <i>Porcentaje de germinación in vitro vs. Ex vitro</i>	77
Figura 21. <i>Germinación en condiciones de invernadero (ex vitro)</i>	77
Figura 22. <i>Germinación in vitro de embrión cigóticos de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	78
Figura 23. <i>Longitud de raíces de los embriones cigóticos obtenidas en las 3 concentraciones del medio MS. 90 días</i>	79
Figura 24. <i>Longitud aérea de los embriones cigóticos obtenidas en las 3 concentraciones del medio MS. 90 días</i>	79
Figura 25. <i>Coeficiente de multiplicación (CM) en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg</i>	80
Figura 26. <i>Multiyemas de Coffea arabica L. var. Geisha obtenidas bajo la influencia de la fitohormona 6-BAP a 10mg/l de concentración</i>	80
Figura 27. <i>Tasa de Crecimiento (TC) en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg</i>	81
Figura 28. <i>Crecimiento in vitro de las plántulas de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de la fitohormona 6-BAP</i>	81
Figura 29. <i>Cantidad de Nudos (CN) en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg</i>	82
Figura 30. <i>Cantidad de yemas y explantes totales obtenidos en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg</i>	82
Figura 31. <i>Incidencia de tejido calloso en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de la fitohormona 6-BAP</i>	83
Figura 32. <i>Tasa de Crecimiento (TC) y explantes totales obtenidos en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de 2 diferentes longitudes de ondas de luz</i>	83
Figura 33. <i>Plántulas de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas bajo diferentes longitudes de ondas de luz. 50 días</i>	84
Figura 34. <i>Concentración de clorofila A, B y Total de las plántulas de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas bajo diferentes longitudes de ondas de luz. 50 días</i>	84

Figura 35. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo influencia de Luz Fluorescente Blanca y la auxina ANA en diferentes concentraciones. 60 días</i>	85
Figura 36. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo influencia de Luz Fluorescente Blanca y la auxina IAA en diferentes concentraciones. 60 días</i>	86
Figura 37. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo influencia de Luz Fluorescente Blanca y la auxina IBA en diferentes concentraciones. 60 días</i>	87
Figura 38. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo influencia de Luz LED de Espectro Completo y la auxina ANA en diferentes concentraciones. 60 días</i>	88
Figura 39. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo influencia de Luz LED de Espectro Completo y la auxina IAA en diferentes concentraciones. 60 días</i>	89
Figura 40. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo influencia de Luz LED de Espectro Completo y la auxina IBA en diferentes concentraciones. 60 días</i>	90
Figura 41. <i>Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo en ausencia de auxinas (Grupos Controles) en diferentes concentraciones. 60 días</i>	91
Figura 42. <i>Raíces obtenidas en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo. 60 días</i>	92
Figura 43. <i>Longitud de raíces obtenidas (cm) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo</i>	92
Figura 44. <i>Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo</i>	93
Figura 45. <i>Tasa de Mortalidad (TM) por auxina en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo</i>	93
Figura 46. <i>Tasa de Aclimatación (TA) y longitud promedio (cm) en el establecimiento a condiciones ambientales (ex vitro) de las plantas de Coffea arabica L. var. Geisha. 30 días</i>	94

Figura 47. <i>Establecimiento a condiciones ambientales (ex vitro) de las plantas de Coffea arabica L. var. Geisha. 30 días.....</i>	94
---	----

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Ensayos de esterilización de semillas de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	96
Tabla 2. <i>Cultivo de embrión cigótico de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	96
Tabla 3. <i>Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas de Gamborg (0% y 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas</i>	97
Tabla 4. <i>Determinación de la concentración de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a luz blanca fluorescente</i>	97
Tabla 5. <i>Determinación de la concentración de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a luz LED de espectro completo</i>	98
Tabla 6. <i>Sustratos utilizados para la aclimatación a condiciones ambientales de las plantas enraizadas in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	98
Tabla 7. <i>Evaluación de la contaminación en los ensayos de germinación de semillas con endospermo in vitro</i>	99
Tabla 8. <i>Evaluación de la Fenolización en los ensayos de germinación de semillas con endospermo in vitro</i> ...	99
Tabla 9. <i>Cultivo in vitro de embriones cigóticos</i>	100
Tabla 10. <i>Test de ANOVA de un factor para los ensayos de cultivo in vitro de embriones cigóticos cultivados en diferentes concentraciones del medio MS</i>	100
Tabla 11. <i>Germinación en condiciones de invernadero de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	100
Tabla 12. <i>Test de ANOVA para la germinación in vitro por aislamiento de embrión cigótico vs. Cultivo en condiciones de invernadero</i> ...	101
Tabla 13. <i>Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas de Gamborg (0% y 100%) en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	101
Tabla 14. <i>Prueba T de Student para el Coeficiente de Multiplicación (CM) en los diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de 6-BAP para la determinación del mejor medio de cultivo de micropropagación clonal de Coffea arabica var. Geisha</i>	101

Tabla 15. Prueba U de Mann-Whitney para los ensayos realizados con los diferentes tratamientos en ausencia o presencia de las Vitaminas de Gamborg (VG) para la determinación del mejor medio de cultivo de micropropagación clonal in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha...	102
Tabla 16. Prueba de Tukey para la evaluación de la influencia de la fitohormona 6-BAP en la Tasa de Crecimiento (TC) de las plántulas de Coffea arabica var. L. Geisha cultivadas in vitro...	102
Tabla 17. Prueba de Tukey para la evaluación de la influencia de la fitohormona 6-BAP en la cantidad de nudos de las plántulas de Coffea arabica var. Geisha cultivadas in vitro. Comparaciones múltiples.....	103
Tabla 18. Cantidad total de yemas y explantes obtenidos en la estandarización del medio de cultivo que influya el mejor Coeficiente de Multiplicación (CM)...	103
Tabla 19. Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de la influencia de la fitohormona 6-BAP en la incidencia de tejido calloso (IC) en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha...	103
Tabla 20. Tasa de Crecimiento (TC) y Número Total (NT) de explantes obtenidos en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivados bajo la incidencia de la longitud de onda de luz (Luz Fluorescente Blanca y Luz LED de espectro completo)...	104
Tabla 21. Prueba de U de Mann-Whitney para la evaluación de la incidencia de la longitud de onda de luz (Luz Fluorescente Blanca y Luz LED de espectro completo) en la Tasa de Crecimiento (TC).....	104
Tabla 22. Determinación de la concentración de clorofila A, B y Total en las vitroplántulas de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes ondas de luz.....	104
Tabla 23. Prueba T de Student para la concentración de clorofila A, B y Total en las vitroplántulas de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes ondas de luz.....	105
Tabla 24. Prueba de U de Mann-Whitney para el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes concentraciones de auxinas y ondas de luz.....	105
Tabla 25. Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes concentraciones de auxinas y ondas de luz.....	106
Tabla 26. Prueba de Tukey para la evaluación del promedio de raíces obtenidas.....	107
Tabla 27. Prueba de Kuskal-Wallis para la influencia de la concentración de las diferentes auxina en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica var. Geisha	107

Tabla 28. <i>Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha</i>	108
Tabla 29. <i>Prueba de U de Mann-Whitney para Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes ondas de luz</i>	108
Tabla 30. <i>Prueba de Kuskal-Wallis para Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de diferentes auxinas</i>	108
Tabla 31. <i>Tasa de aclimatación y altura de las plantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a condiciones ex vitro</i>	109
Tabla 32. <i>Prueba de Kruskal-Wallis para la Tasa de aclimatación y altura de las plantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a condiciones ex vitro</i>	109

Resumen

Esta investigación consistió en estandarizar un protocolo de micropropagación clonal de *Coffea arabica* L. (1753) “café” var. *Geisha* tolerante a *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (1869) “roya amarilla”; donde a partir de semillas certificadas y tras ensayos de esterilización se obtuvo el 100% de asepsia empleando el aislamiento *in vitro* de embriones cigóticos, y el 90% de germinación en el medio de cultivo MS a mitad de concentración con promedios de 5,56cm y 4,19cm para la longitud radical y aérea respectivamente. El medio de multiplicación (MS 1/2) suplementado con 10mg/l de 6-BAP, sin vitaminas, permitió el mayor coeficiente de multiplicación con 8.2 brotes/explante en promedio. Así mismo, se evidencia que el uso de luz LED de espectro completo influye significativamente en la respuesta fisiológica de las plantas con el incremento de la Tasa de Crecimiento y la concentración de clorofila; sin embargo, influye negativamente en la tasa de enraizamiento *in vitro*, el cual se logró empleando 1mg/l de IAA o IBA con 96% y 98% de plantas enraizadas respectivamente; así también, se logró un 100% de sobrevivencia de plantas aclimatadas y de buen porte en el sustrato E3 (Tierra preparada:Musgo 2:1).

Palabras clave: *Coffea arabica*, enraizamiento, Geisha, *in vitro*, Multiplicación clonal, 6-BAP.

Abstract

This research consisted of standardizing a clonal micropropagation protocol for *Coffea arabica* L. (1753) “coffee” var. *Geisha* tolerant to *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (1869) “yellow rust”; where from certified seeds and after sterilization tests, 100% asepsis was obtained using *in vitro* isolation of zygotic embryos, and 90% germination in the MS medium at half concentration with averages of 5.56cm and 4, 19cm for root and aerial length, respectively. The multiplication medium (MS 1/2) supplemented with 10mg/l of 6-BAP, without vitamins, allowed the highest multiplication coefficient with 8.2 shoots/explant on average. Likewise, it is evident that the use of full spectrum LED light significantly influences the physiological response of plants with the increase of the Growth Rate and the concentration of chlorophyll; however, it negatively influences the *in vitro* rooting rate, which was achieved using 1mg/l of IAA or IBA with 96% and 98% of rooted plants, respectively; likewise, 100% survival of acclimatized and good-sized plants was achieved in the E3 substrate (prepared soil: Moss 2:1).

Keywords: Clonal multiplication, *Coffea arabica*, *in vitro*, Geisha, rooting, 6-BAP.

I. Introducción

Coffea arabica L. es una especie arbórea de la familia Rubiaceae que se cultiva prioritariamente en regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, América central, América del sur y El Caribe; entre los 500 y 1700 m s.n.m. A una temperatura oscilante entre 17 y 23°C. Sus semillas se utilizan para la elaboración del café, una de las bebidas más consumidas en el mundo, es altamente estimulante, organoléptico, nutracéutico y diurético que genera divisas de hasta 15 mil millones de dólares anuales a nivel mundial.

El cultivo del café en el mundo viene siendo amenazado por “la roya amarilla”, producida por el hongo basidiomiceto *Hemileia vastatrix* B&B, el cual produce graves problemas fitosanitarios que se reflejan en las millonarias pérdidas de la producción de café en toda Latinoamérica desde el año 2012. En el Perú, la constante asistencia del estado a través del Ministerio de Agricultura y Riego, sólo ha podido subsanar el 17% de los cultivos en los últimos 4 años con la introducción de variedades más resistentes pero con menor calidad de taza (como la variedad *Catimor*). Convencionalmente el repoblamiento de estos ejemplares se realiza por métodos tradicionales como la germinación en semilleros y la reproducción por esquejes, ambas técnicas demandan mucho tiempo y no aseguran un buen número de plantas. Por otro lado, se viene obteniendo gran número de plántones obtenidos por embriogénesis somática, que es una técnica lenta, costosa y con una alta variabilidad genética, no permitiendo abastecer con rapidez y calidad la demanda existente.

Actualmente la biotecnología vegetal, mediante la micropropagación clonal *in vitro*, nos facilita la selección y producción de gran número de plantas de calidad tolerantes a la roya en

menor tiempo y costo, manteniendo la pureza genética, a partir de una mínima cantidad de material vegetal. En diferentes países se viene aplicando esta tecnología a las diferentes variedades de café tolerantes a dicha enfermedad; Tal es el caso de la variedad (poco conocida en el Perú) “*Geisha*”, originaria de Etiopía, y que tras su llegada a América central, logró el record mundial del café más costoso del mundo al cotizarse en 350,25 dólares la libra en el año 2003 y volvió a romper su propio record en la última subasta online “XXI Best of Panamá” en más de 1000 dólares la libra en el 2019 con una alta puntuación de cata. Esta variedad, además de ser tolerante a la roya, destaca por tener un matizado e intenso aroma floral de jazmines, una distintiva acidez balanceada con brillos de vino blanco, notas de bayas, mango, papaya y mandarina que le confiere el nombre de "champán del café"; se desarrolla excelentemente a alturas superiores a los 1400 m s.n.m. y se encuentra entre las variedades más cotizadas a nivel mundial.

Por lo anterior, esta investigación planteó estandarizar un sistema de micropropagación clonal *in vitro* de la mencionada variedad, el cual sin duda será un gran paso para mejorar la productibilidad de la industria cafetalera, los ingresos económicos de los micro y macroproductores; y por consiguiente, las agroexportaciones en nuestro país que vienen descendiendo consecutivamente año tras año.

II. Planteamiento del problema

En el año 2012 la “roya amarilla” (producida por el hongo basidiomiceto *Hemileia vastatrix* B&B.) generó una crisis productiva, social, económica e institucional en el país; el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) reportó el daño de 290 000 ha de cafetales. En respuesta a la roya, el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) desarrolló el Plan Nacional

de Renovación de Cafetales (PNRC) durante el periodo 2013-2016, con lo que logró únicamente la subsanación del 17% de la producción, mediante la instalación de más de 37 200 ha de plantaciones de café (SENASA, 2016). Principalmente, se sembró la variedad *Catimor*, más resistente a la roya, pero que carece de buena calidad de taza, sumándose a ello la falta de consistencia, que es la principal razón por la cual el café peruano aún no alcanza el nivel de los mejores a nivel mundial, pues no se puede mantener el mismo nivel de calidad de una cosecha a otra (Patiño, 2017).

Según el Informe de mercado realizado por La Organización Internacional del Café, el Perú se posicionó en un quinto lugar en el 2017 como productor mundial, pero el rendimiento promedio del café peruano es bajo si se lo compara con el de otros países: la media nacional alcanza apenas 13 qq/ha (quintales por hectárea) (Díaz & Carmen, 2017), y entre el año 2018 y 2020 continúa el descenso en las ventas para el café peruano (incluso cuando éste es certificado como orgánico) afectado por la caída de los precios internacionales y las plagas, generando desánimo en los productores (Lu, 2020) (Junta Nacional del Café, 2019). A todo esto, se suma las malas prácticas agrícolas, la polinización cruzada entre variedades, la poca uniformidad de los cultivos iniciados desde semilla sin previa selección, la siembra de variedades de baja calidad, las condiciones climatológicas y sobre todo, el mal uso de la biotecnología en el sector, mediante la producción de plantas originadas por embriogénesis somática directa o indirecta que no permite conservar significativamente la pureza genética. Esto incide en un débil desarrollo social, económico y ambiental de las zonas cafetaleras, que continúan viviendo en situación de pobreza y extrema pobreza (Díaz & Carmen, 2017).

Analizando las diferentes problemáticas y teniendo en cuenta que la correcta aplicación de la biotecnología vegetal es crucial para la mejora del sector cafetalero, es necesario plantear

en qué medida estandarizar un sistema de micropropagación clonal *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* permitirá obtener un alto coeficiente de multiplicación de plantas tolerantes a *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome “roya amarilla”.

III. Justificación del problema

En el Perú, alrededor de 223,000 familias están dedicadas al cultivo de café en 425,400 hectáreas, de las cuales más del 98% se encuentran ubicadas en las zonas de selva alta de 15 regiones, destacando las regiones de Junín, San Martín, Cajamarca, Cusco y Amazonas que se encuentran cultivando cafetales de baja calidad o susceptibles a la roya (Marín, 2017).

Una solución, frente a los problemas detallados, es la aplicación de la biotecnología vegetal en este sector; La cual nos facilita técnicas de selección y propagación clonal (manteniendo estable la pureza genética) de variedades resistentes o tolerantes a patógenos (en especial a la roya amarilla), siendo las más cultivadas, preferidas y diseminadas a nivel mundial las que mejor resistencia, producción y calidad presenten. Tal es el caso de la variedad “*Geisha*”, originaria de Etiopía, que tras su llegada a América central, logró el record mundial del café más costoso del mundo en el año 2003 (350,25 dólares la libra) y volvió a romper su propio record al cotizarse en la subasta online del “XXI Best of Panamá” en poco más de 1000 dólares la libra en el 2019, con una alta puntuación de cata (EFE SERVICIOS, 2017) (AGENCIA AFP, 2020). Esta variedad destaca por tener un matizado aroma floral de jazmines, una distintiva acidez balanceada con brillos de vino blanco, notas de bayas, mango, papaya y mandarina que le confiere el nombre de “champán del café” (Excelencias Gourmet, 2014); crece y presenta mejor productividad a alturas superiores a los 1400 m s.n.m. Siendo una de las variedades más cotizadas a nivel mundial.

Por lo anterior, esta investigación pretendió establecer un sistema para la producción biotecnológica del *Geisha* en nuestro país, a través de su micropropagación clonal *in vitro*, asegurando su calidad, pureza genética y tolerancia de las plántulas frente a la roya amarilla; y así mejorar la productibilidad de la industria cafetalera, los ingresos económicos de los micro y macroproductores; y por consiguiente, las agroexportaciones de nuestro país que vienen descendiendo consecutivamente año tras año.

IV. Objetivo general

- Estandarizar un sistema de micropropagación clonal *in vitro* de *Coffea arabica* L. “café” var. *Geisha* tolerante a *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome “roya amarilla”.

V. Objetivos específicos

- Establecer una metodología de germinación *in vitro* de semillas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.
- Evaluar la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l) y vitaminas de Gamborg (0 y 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas.
- Evaluar el efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.

- Determinar la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (IAA, ANA, IBA) que inducen la mayor tasa de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.
- Establecer un sistema de aclimatación de plántulas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* a condiciones ambientales (*ex vitro*).

VI. Marco teórico

6.1 *Coffea arabica* L.

6.1.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica de la especie *Coffea arabica* L. “café” según el Integrated Taxonomic Information System (ITIS) y el Natural Resources Conservation Service (NRCS) es:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
Superdivisión	:	Spermatophyta
Division	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Asteridae
Superorder	:	Asteranae
Orden	:	Gentianales
Familia	:	Rubiaceae
Género	:	<i>Coffea</i>
Especie	:	<i>Coffea arabica</i> L.

Coffea arabica fue descrito por primera vez en 1753 por Linneo. Es genéticamente diferente a otras especies de café, ya que es tetraploide, lo que le hace tener un total de 44 cromosomas en lugar de 22 (ITIS, 2020) (USDA NRCS, 2020) (Rojo, 2014).

6.1.2 Origen y distribución geográfica.

El café arábico se originó en las tierras altas de más de 1000 m.s.n.m de Etiopía y Sudán, África. En los años 575 y 890, los persas y los árabes lo llevaron a Arabia y Yemén, en tanto los nativos africanos lo extendieron a Mozambique y Madagascar. De aquí, los holandeses y los portugueses, entre los años 1600 y 1700, lo trasladaron a Ceylán, posteriormente a Java y a la India, así como a otras regiones de Asia y África. En 1727 fue trasladado de Sumatra a Brasil, luego a Perú y Paraguay (Alvarado & Rojas, 2007).

En cuanto a su distribución, se menciona que es una especie que se cultiva en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, especialmente en Latinoamérica, África Central y Oriental, en la India y un poco en Indonesia; Siendo Brasil el principal productor de café en todo el mundo, seguido de Vietnam y Colombia (Kew Science, 2017), (ICO, 2020).

6.1.3 Características morfológicas.

Según el Catálogo Virtual de Flora del Valle de Aburrá por UEIA (2014) menciona que *Coffea arabica* L. Es un árbol de tres metros de altura aproximadamente (aunque en estado silvestre puede llegar hasta los ocho metros), con una amplitud de copa menor a siete metros, presenta hojas verde brillante, perennifolias y opuestas de 15 cm de largo por 5 cm de ancho en promedio, con forma oblonga, acuminadas, nerviación marcada y con estípulas interpeciolares. Las flores son blancas, perfumadas, pentámeras, con corola tubular, que se agrupan en ramilletes que nacen en las axilas de las hojas. Los frutos son bayas de color rojo, amarillo o púrpura en cuyo interior alberga una o dos semillas, aunque William (1922) afirma que en casos esporádicos

se pueden encontrar hasta 3 semillas dentro de cada baya. Se desarrolla óptimamente entre los 500 y 1700 m s.n.m. y a una temperatura oscilante entre 17 y 23°C. Su cultivo se debe al uso de sus semillas, que se utilizan para la elaboración del café, una de las bebidas más consumidas en el mundo, es altamente estimulante, organoléptico, nutracéutico y diurético que genera divisas de hasta 15 mil millones de dólares anuales a nivel mundial (IICA, 2019).

6.1.4 Cultivo.

Si bien el café arábico es el más cultivado en el mundo, es muy exigente a las condiciones ambientales y susceptible a patógenos (Coffee IQ, 2019). Estudios demuestran que factores como la temperatura, la lluvia, el sol, el viento y la composición del suelo son importantes para su desarrollo, aunque las exigencias varían en función de la variedad que se cultive. Las condiciones de cultivo van a ser muy importantes ya que van a influir notablemente en la incidencia de enfermedades y en la capacidad de la planta para resistir o tolerar el daño causado por ellas (Rojo, 2014). Es por ello, que si bien el cultivo está muy bien diseminado en todo el mundo, existe una zona geográfica especial denominada “El cinturón del café” (área comprendida entre los trópicos de cáncer y capricornio) (Coffee IQ, 2019) que agrupa a los países con las mejores características ambientales para su producción comercial.

Según el portal Coffe IQ (2019), La temperatura ideal para el desarrollo óptimo de los árboles arábigos es entre los 15 y los 24 grados centígrados; Por encima de este rango los árboles no crecerían muy bien, en cambio si la temperatura es más baja (<10°C) se produce clorosis e inhibición del crecimiento de hojas jóvenes, perdiendo frutos y flores (ICAFFE, 2011). El clima donde se cultiva también debe tener un nivel de precipitación de entre 1200 y 2500 milímetro por año y el suelo debe ser ligeramente ácido (Coffe IQ, 2019). En cambio si las precipitaciones son

abundantes (por encima de los 3000 milímetros por año), con una humedad relativa superior al 85%, la calidad de taza y el control fitosanitario se pueden ver afectados (ICAFE, 2011).

Para lograr un óptimo desarrollo de los cafetos hasta la etapa de recolección de frutos, calculado entre los 18 a 20 meses posteriores a la plantación (aunque es hasta el tercer año aproximadamente que los árboles alcanzan su pico más alto de productividad) (Coffe IQ, 2019); Es necesario controlar la incidencia del viento, ya que si son muy fuertes, inducen a la desecación y al daño mecánico de tejido vegetal, asimismo favorecen la incidencia de enfermedades. Por esta razón es conveniente escoger terrenos protegidos del viento, o bien establecer rompe-vientos (artificiales o biológicos) para evitar la acción de éste (ICAFE, 2011).

6.1.5 Variedades.

Según la última revisión del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, realizado en Ginebra el 19 de marzo de 1991 por La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), define como variedad a un conjunto de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido que presente las siguientes características:

6.1.5.1 Homogeneidad.

La variedad está descrita con precisión y posee un conjunto de características específicas, además que todas las plantas de este tipo tienen el mismo aspecto.

6.1.5.2 Distinción.

La variedad se distingue claramente de cualquier otra cuya existencia, a la fecha de presentación, sea notoriamente conocida.

6.1.5.3 Estabilidad.

Se considera estable la variedad si sus caracteres pertinentes se mantienen inalterados después de reproducciones o multiplicaciones sucesivas.

Muchas personas usan erróneamente el término “variedad” o “cultivar” para describir un café que no cumple con los criterios anteriormente mencionados; tales son los casos de las mal nombradas variedades: T5175, T5296 y Pacamara, que carecen de uniformidad y estabilidad de una generación a otra (World Coffee Research, 2018).

El programa WCR Verified, creado por el World Coffee Research (2018), encargado de asegurar la salud, legitimidad, legalidad y la pureza genética de las semillas de las distintas variedades de *Coffea arabica* L. en los 15 países asociados, ha descrito hasta la actualidad 54 variedades de café arábico; Las variedades más conocidas son “Typica” y “Borbón”, pero a partir de éstas se han desarrollado muchos cultivares diferentes, como son el Caturra (Brasil, Colombia), el Mundo Novo (Brasil), el Tico (América Central), el San Ramón enano y el Jamaican Blue Mountain (Internacional Coffea Organization, 2020).

6.1.5.4 Variedad Geisha.

Esta variedad de café presenta árboles de porte alto, hojas de color verde a bronce y frutos ligeramente medianos; Fue registrada en 1930 en Etiopía, para luego distribuirse en todo Panamá a través del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en la década de 1960, después de haber sido reconocido por su tolerancia a la roya. Es una variedad de muy alto rendimiento si se le cultiva en suelos sanos, con muy buena calidad en elevaciones por encima de los 1400 m s.n.m (World Coffee Research, 2019).

Es considerado el café más caro del mundo (potencial de calidad excepcional) y por el que se ha pagado más de 1000 dólares la libra en la subasta online del “XXI Best of Panamá”,

realizada el año 2019, con una alta puntuación de cata. Esta variedad se caracteriza por sus granos con delicados aromas florales cítricos, jazmín, orquídea, y sabores frutales de melocotón, pera, durazno, naranja y chocolate, entre otros (AGENCIA AFP, 2020); Por lo que muchos expertos le han conferido el nombre de "champán del café" (Excelencias Gourmet, 2014).

6.2 Roya amarilla o roya del cafeto

La Roya es un hongo fitoparásito obligado del cafeto que pertenece a la subdivisión de los Basidiomicetos, del orden Uredinales, familia Pucciniaceae. Existen 32 razas de Roya (*Hemileia vastatrix* B&B) que atacan a especies del género *Coffea* (*Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica*), a las plantas de la especie arábica y también a otras del mismo género, pero con diferentes grados de virulencia (CESVVER, 2020). Es considerada una de las siete pestes y/o enfermedades de plantas más catastróficas de toda la historia que ha dejado las mayores pérdidas económicas a nivel mundial en los últimos 100 años (Crop Life Latino America, 2020). Si bien su aparición fue registrada en el año 1868 en África, no fue hasta mediados del 2012 en que generó la mayor crisis sanitaria, social, institucional y económica en toda Latinoamérica, propiciando pérdidas millonarias en todos los países cafetaleros de la región (SENASA, 2016).

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas pulverulentas de color amarillo a naranja en el envés de las hojas acompañado de clorosis. Inicialmente, las manchas tienen un diámetro de 2 – 3 mm, pero se expanden alcanzando un diámetro de varios centímetros (SENASA, 2015) provocando la caída prematura de flores, frutos y hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética así como el debilitamiento de árboles enfermos, y en

infecciones severas, puede ocasionar la muerte regresiva de las ramas e incluso la de todos los árboles (CESVVER, 2020) (Lepodorowski, 2013).

6.3 Propiedades nutraceuticas y organolépticas del café

Se estima que al menos el 30% de la población mundial consume una vez al día, una taza de café (algunas estimaciones calculan que a diario se beben 150 millones de tazas de café en el mundo). El atractivo del café está ligado a su aroma, sabor y al placer sensorial que éste genera en los consumidores, entre quienes destacan los europeos, especialmente los países nórdicos, los norteamericanos, y los países latinoamericanos tradicionalmente productores de café como Colombia y Brasil (Mesa, Medrano, Martínez, Grave & Cabrera, 2017) (Abu, 2015).

Tanto el grano (en sus diferentes grados de madurez), como la planta misma, es un producto natural que podría enmarcarse dentro de las plantas medicinales, porque presenta muchas propiedades beneficiosas, bien sea para tratar diferentes enfermedades o en actividades biológicas como cicatrizante, antibacteriales (contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*), energizantes, afrodisiacos, contra la influenza y la hepatitis (Puertas, Villegas & Alberto, 2013); incluso algunos estudios demuestran su capacidad de reducir la incidencia de enfermedades degenerativas como el Alzheimer, Párkinson, cáncer, enfermedades coronarias e incluso diabetes, al ser un gran vasodilatador, diurético y antioxidante, presentar gran cantidad de ácido elálgico, capaz de inhibir enlaces de ADN de ciertos compuestos cancerígenos, incluidas nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Mesa *et al.*, 2017) (Naranjo, Vélez & Rojano, 2011).

Otro de los componentes principales del café, y el más conocido, es la cafeína, alcaloide vegetal que actúa como antagonista de los receptores de adenosina en el sistema nervioso, evita

la degradación del adenosín monofosfato cíclico por parte de la fosfodiesterasas, lo que potencia la neurotransmisión post-sináptica en el sistema nervioso simpático, provocando una activación en el organismo (Mesa *et al.*, 2017). Aunque es uno de los componentes más conocidos, dentro de una taza de café, se pueden encontrar la presencia de no menos de 850 compuestos químicos, destacando los compuestos volátiles como fenoles (2-4-6 triclorofenol), antracenos y benzofuranos responsables del aroma y el sabor del café que degustamos (Bohórquez *et al.*, 2005).

6.4 Micropropagación clonal y cultivo *in vitro*

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro* del cual, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además del control de la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar; cuya composición depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Castillo, 2008).

La expresión cultivo *in vitro* vegetal, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio (en un ambiente artificial). Esta forma de cultivo tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio

detallado tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Castillo, 2008).

6.4.1 Medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (MS)

Entre los medios de cultivos desarrollados a lo largo de las investigaciones, tenemos al medio Murashige-Skoog (MS) que reúne los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales (Rodríguez, Rodríguez, Quintero, Torres & Fundora, 2004). Inicialmente fue creado para el crecimiento de callos de tabaco y en la actualidad se emplea como medio de cultivo basal para un grupo importantes de plantas de interés alimenticio y con fines ornamentales (Ewind, Hall & Klerk, 2008).

Según el portal HiMedia Laboratories (HIMEDIALABS, 2017), el cual desarrolla el medio MS a nivel comercial, las sales que componen dicho medio son las siguientes:

6.4.1.1 Macroelementos (mg/l).

Nitrato de amonio 1650.000

Cloruro de calcio 332.200

Sulfato de magnesio 180.690

Nitrato de potasio 1900.000

Fosfato potásico monobásico 170.000

6.4.1.2 Microelementos (mg/l).

Ácido bórico 6.200

Cloruro de cobalto hexahidratado 0.025

Sulfato de cobre pentahidratado 0.025

EDTA de sodio dihidratado 37.300

Sulfato ferroso heptahidratado 27.800

Sulfato de manganeso heptahidratado 16.900

Ácido molíbdico 0.213

Ioduro de potasio 0.830

Sulfato de zinc heptahidratado 8.600

Debido a que las plántulas *in vitro* no son del todo autótrofas suficientes, el medio de cultivo MS (1962) generalmente es suplementado con una fuente de carbohidratos (generalmente sacarosa), diferentes vitaminas y fitohormonas para el correcto desarrollo en estas condiciones (Blanco, 2008).

6.4.2 Fitohormonas.

Las fitohormonas son moléculas orgánicas sencillas que regulan la expresión de genes determinados; son sintetizadas en diferentes partes de la planta y pueden ser transportadas a otros sitios, actúan como mensajeros químicos, controlan el crecimiento y desarrollo, responden a cambios ambientales y regulan la expresión genética de la planta. Por lo que son capaces de desencadenar una respuesta bioquímica, fisiológica y morfológica (Yumbopatin, 2017).

Existen numerosos tipos de fitohormonas, pero básicamente se pueden diferenciar en tres grandes grupos según el efecto fisiológico que desempeñan.

6.4.2.1 Auxinas.

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares (Jordán & Casaretto, 2006). Después del descubrimiento del IAA, se han sintetizado muchos compuestos que tienen actividad de auxinas y que han sido utilizados como herbicidas (ácido

2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-picolínico (picloram) y ácido 2-metoxi, 3,6-dicloro benzóico (dicamba)) o como enraizadores en cultivos de tejidos (como el ácido α -naftalenacético (α -NAA)). Estos compuestos han resultado muy útiles debido al hecho de que son más estables (2,4-D y α -NAA), tienen mayor difusión hacia dentro de las células (α -NAA) o a que se metabolizan más lentamente (2,4-D) que el IAA, aunque es importante notar que son muy tóxicos para el ser humano (Garay, De la Paz, García, Álvarez & Gutiérrez, 2014).

6.4.2.2 Citoquininas.

El término citoquinina se acuñó como nombre genérico de una serie de sustancias, naturales o sintéticas, capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas, pueden encontrarse en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos químicos que se unen al anillo de purina (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

Entre sus funciones tenemos: Inhibir el crecimiento de la raíz principal, estimular la división celular en tejidos vegetales, estimular la aparición de raíces laterales, estimular la floración, inducir la partenocarpía en frutos, provocar la germinación de semillas, mejorar el amarre de flores y frutos, aumentar el vigor de la planta, aumentar la tasa fotosintética, impedir la abscisión y senescencia de flores, frutos y hojas (Quilambaqui, 2003).

6.4.2.3 Giberelinas.

Las giberelinas (GA) fueron aisladas por primera vez a partir del hongo patógeno *Giberella fujikuroi*. Son hormonas definidas por su estructura química y a cada una se le asigna un número de acuerdo al orden cronológico de su identificación, conociéndose hasta el momento alrededor de 136 giberelinas caracterizadas (Fribourg, 2017). Pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas, tales

como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción de flores y frutos (López, López & De la Cruz, 2017).

VII. Antecedentes

Hiscox & Israelstam (1979) Desarrollan un protocolo de cuantificación de clorofila A, B y total de especies vegetales. Para ello utilizaron el método espectrofotométrico, el cual consistió en cortar finamente la muestra (hojas) en tiras de 0.5 cm², pesar y macerar 0.5 g de muestra en un mortero adicionando 5 ml de solución de acetona al 80% hasta extraer todo el colorante, colocar el macerado en un tubo y centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos; separaron el sobrenadante que contiene los pigmentos, ajustaron cada tubo a 6ml con acetona al 80%, tomaron 0.5 ml del sobrenadante de cada uno de los extractos y diluyeron hasta 5 ml con acetona al 80%. Finalmente midieron la concentración de clorofila en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm utilizando una muestra de acetona al 80% como blanco.

Kartha et al. (1981) Describieron procedimientos para la preservación de germoplasma de *Coffea arabica* L. var. *Caturra rojo* y *Catuai*. Para dicho fin, los brotes múltiples fueron obtenidos utilizando de 5 a 10 µM de BAP en combinación con 1µM de ANA en un medio de cultivo MS completo. El enraizamiento sólo se logró en el medio de cultivo MS a mitad de concentración sin sacarosa, con la adición de 1µM de IBA.

Sondahl, Nakamura & Sharp (1985) Muestran estudios de gran importancia en el cultivo *in vitro* de café variedad *Mundo novo* utilizando diferentes tipos de tejidos. Lograron el

establecimiento de meristemas apicales en el medio MS suplementado con 2mg/l BAP y vitaminas del medio B5; así mismo, evaluaron la eficiencia del BAP y la kinetina para lograr brotes múltiples en segmentos nodales, llegando a la conclusión de que el BAP es la mejor opción al permitir la recuperación de 2,1 y 2,3 yemas por nudo a 6mg/l y 12mg/l respectivamente. Además que con transferencias bimensuales y recuperando todas las yemas, se puede lograr obtener hasta 415 brotes a partir de 6 nudos después de 12 meses de cultivo continuo. También ensayaron el efecto del ácido giberélico aplicado directamente al momento de la escisión a una concentración de 50ppm, no obteniendo resultado alguno en el elongamiento entrenodal. Por último, brindan información acerca de la aclimatación de las vitroplantas de café, que constó de una mezcla de 2:3 de arena:sustrato estéril de vermiculita.

Londoño & Orozco (1986) Realizaron una investigación para el establecimiento y propagación clonal de *Coffea arabica* L. var. *Caturra rojo* en el cual se destaca el uso de la caseína hidrolizada y glicina a una concentración de 200mg/l y 2mg/l respectivamente como fuente de aminoácidos, y el uso de L-Cisteína a 40mg/l como agente antioxidante; así mismo, proponen la modificación del medio de cultivo MS, el cual consistió en la eliminación del nitrato de amonio y la duplicación del nitrato de potasio, obteniendo resultados significativos.

Duhem, Le Mercier & Boxus (1988) Evaluaron el uso de antifúngicos y antibacterianos en la esterilización de explantes de *Coffea arabica* L. y *Theobroma cacao* L. dando como resultado que muchos de los antimicrobianos utilizados como pre tratamiento a la introducción *in vitro* generan necrosis, así también aquellos adicionados al medio de cultivo son citotóxicos, reflejando un fallo total del procedimiento. Por consiguiente, recomiendan que las plantas a

utilizar sean pre tratadas con anterioridad en el invernadero a fin de reducir todo porcentaje de contaminación y no en el momento de la introducción.

George (1996) Describe como los problemas que ocasiona la oxidación y fenolización en el proceso del cultivo *in vitro*. Así mismo, hace énfasis en como los componentes del medio de cultivo, sus concentraciones y el tipo de explante influyen en la presión osmótica dentro del cultivo; y que los diferentes tipos de desinfectantes empleados requieren ser retirados con grandes lavados en cámara de flujo laminar a fin de evitar su depósito en los tejidos y generar estrés y oxidación.

Barry-Etienne et al. (2002) Realizan ensayos de enraizamiento de las plántulas de *Coffea arabica* obtenidas por embriogénesis somática *in vitro*, llegando a la conclusión que el enraizamiento en esta especie es significativamente recalcitrante y problemática a la aclimatación *ex vitro*, lográndose sólo un porcentaje de 30 a 50% de supervivencia de plantas con un buen fenotipo.

Gatica (2002) Realiza un estudio sobre la regeneración de plantas de *Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí por embriogénesis somática en donde analiza la influencia de los componentes de los medios de cultivo en la oxidación, fenolización y presión osmótica.

Eira, Silva et al. (2006) Nos muestra una recopilación de datos acerca de la estructura, fisiología y germinación de las semillas de café en condiciones controlables de laboratorio. Detallan que la germinación completa con endospermo puede tardar hasta 150 días y que las

semillas frescas son las que mejores resultados ofrecen frente a las secas; así también, muestran que la presencia de endocarpo inhibe la germinación y es preferible su eliminación antes de cualquier test de germinación.

Ebrahim et al. (2007) Realizaron una investigación en la propagación y aclimatación de tres cultivares de *Coffea arabica* L. procedentes de Yemen a partir de semillas. Para la desinfección de semillas secas con 13% de humedad emplearon una pre inmersión en una solución de 10mg/l de benomyl (fungicida) durante cinco minutos, luego realizaron un lavado con agua destilada estéril por otros cinco minutos (a fin de eliminar los restos del fungicida), para enseguida sumergir las semillas en una solución de hipoclorito de sodio 1,25% más dos gotas de tween-20 durante veinte minutos, lavaron nuevamente en agua destilada estéril por cinco minutos y finalmente sumergieron en una solución de etanol al 70% por treinta segundos con tres posteriores enjuagues en agua destilada estéril. Las semillas fueron inoculadas en diferentes medios de cultivo (Agar solo, MS 25%, MS 50%, MS 100%), siendo el medio que sólo contenía agar el que promovió la mejor respuesta germinativa tanto a nivel foliar como radicular, seguida del medio MS 25%. La fase de germinación duró 120 días y conllevó cierto porcentaje de contaminación (datos no mostrados). En la fase de multiplicación utilizaron diferentes concentraciones de BAP, TDZ, Kinetina y Zeatina en medio MS sólido con 0,05mg/l de IAA; siendo el BAP el que mejor respuesta presentó en la proliferación de brotes múltiples a una concentración de 8 mg/l tras 120 días de cultivo. En la fase enraizamiento *in vitro* se evaluó diferentes concentraciones de IAA, IBA y ANA en medio MS 50% a fin de propiciar la mayor cantidad de raíces en las vitroplantas, siendo IBA a una concentración de 3mg/l el que mayor número y longitud de raíces produjo, seguido de IAA a 3mg/l de concentración (con cierta

formación de callo); sin embargo, ANA fue la que menos éxito produjo en la producción de raíces, resultando incluso perjudicial en dos de los cultivares. Por último, para la aclimatación *ex vitro* se abrieron los tubos de las plántulas a aclimatar durante 3 días, seguido a ello se realizó un lavado con agua destilada tibia a fin de eliminar los restos del medio de enraizamiento, las plántulas fueron transferidas en pequeñas bolsas conteniendo una mezcla de 1:1 turba:perlita y depositadas en un contenedor transparente cerrado durante tres semanas. Finalmente sembraron las plantas en bolsas plásticas con 1:1 de tierra: perlita a condiciones de invernadero y en constante irrigación, obteniendo así el 100% de supervivencia.

Peña & Trujillo (2007) Evalúan la temperatura óptima para inactivar virus en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. Sus resultados demuestran que la mejor temperatura para inactivar virus en semillas es a 85°C por 10 minutos, sin pérdida de la viabilidad.

Afeifa (2009) Nos muestra una revisión bibliográfica de los problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*, como la influencia de los desinfectantes, la concentración de sales, el tamaño del explante, el uso de absorbentes, etc.

De Feria et al. (2009) Estudiaron el agotamiento de los componentes del medio de cultivo en suspensión de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, para lo cual analizaron la concentración de la sacarosa, nitrato, amonio, calcio, magnesio, cloruro, sulfatos, fosfato y la fitohormona 6-BAP durante 56 días de cultivo; llegando a la conclusión que la sacarosa desaparece totalmente a los 56 días de cultivo, el 6-BAP disminuye rápidamente hasta desaparecer al día 28 al igual que el fosfato, potasio, calcio y sulfato que disminuyen

drásticamente al día 21, generando disminución del pH. Sin embargo, los iones de magnesio y cloruro disminuyeron de forma lenta.

Mroginski et al. (2010) Describen metodologías para el cultivo *in vitro* de diferentes especies vegetales. Así mismo, brinda recomendaciones en el empleo de los desinfectantes al momento del establecimiento *in vitro* a fin de evitar el estrés y muerte de los explantes.

Bojorquez et al. (2011) Nos muestran resultados acerca del estímulo de las fitohormonas en el desarrollo de embriones cigóticos de *Coffea arabica*, siendo el GA a 0,1mg/l en el medio MS a 50% o a 100% en donde se obtuvo la más rápida respuesta germinativa, pero con problemas en la formación de raíces. Para esta investigación, presentan un sistema de esterilización de las semillas frescas, el cual consta de una primera desinfección con hipoclorito de sodio al 10% por dos horas, seguido de dos lavados con agua destilada estéril, luego una sumersión en etanol al 70% por cinco minutos (nuevamente un doble lavado con agua destilada estéril) y seguido de una sumersión en hipoclorito de sodio al 30% por diez minutos; finalmente, las semillas fueron lavadas en agua estéril y conservadas en condiciones asépticas por 48 horas para la extracción del embrión, el cuál desarrolló rápidamente en condiciones de luz (4 a 7 días) en ausencia del endospermo.

El Gawad et al. (2012) Estudiaron la micropropagación y aclimatación de plantas de *Coffea arabica* L. a partir de segmentos nodales. Así mismo, evaluaron la concentración del medio MS (50%, 75%, 100%) en combinación con diferentes concentraciones de BAP y Kinetina (2, 4, 6 mg/l) a fin de lograr el mayor número de brotes con la mejor longitud y número

de hojas, siendo el medio MS al 100% suplementado con BAP a 6mg/l, tiamina-HCl 0.1 mg/l, piridoxina-HCl 0.5 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, glicina 2 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, ácido cítrico 200 mg/l, sacarosa 20g/l, carbón activado 1g/l y agar 7 g/l el que demostró mejores resultados con medias de 2.88 brotes; 4.56cm en longitud de brote y 6.67 en número de hojas; así mismo, en la fase de enraizamiento *in vitro* evaluaron la concentración de IBA en el medio MS 50% que permitiera el mayor número y longitud de raíces de las plántulas; siendo en el medio de cultivo suplementado con 3mg/l de IBA en el que mejores resultados se obtuvo tras 6 semanas de cultivo. En la aclimatación *ex vitro* evaluaron la mejor mezcla de sustratos, siendo arena:turba (1:2) el que mostró mejores resultados en la supervivencia y aclimatación. Para dicho fin, lavaron las plántulas obtenidas en la fase en enraizamiento con agua destilada y las colocaron en pequeñas bolsas plásticas con la mezcla de sustrato dentro de un contenedor y se cubrieron totalmente con plástico durante cuatro semanas, antes de culminado el mes se fue abriendo paulatinamente el contenedor para favorecer el intercambio gaseoso. Finalmente, fueron llevadas al invernadero donde fueron cultivadas durante dos meses más.

Hidalgo (2014) Describió que el uso de aminoácidos bajo la forma de un hidrolizado proteico (caseína), favorecen la formación de callos, organogénesis y/o embriogénesis en plantas leñosas como cacao y café.

Lozano (2014) Tuvo como objetivo lograr la multiplicación masiva de café variedad *Lempira* a partir de meristemas plagiotrópicos. Tras logrado el establecimiento, realizó la multiplicación utilizando las sales de Murashige y Skoog suplementado con 100 mg/l de inositol, 30 mg/l de cisteína, 1 mg/l de BAP y 30 g/l de sacarosa, obteniendo 6.3 brotes por explante

establecido. Sugiere además el uso de 0.05 mg/l de ácido giberélico en el subcultivo cuatro y que no es recomendable un quinto subcultivo (ya que el índice de brotes es mínimo) y el cambio a medio fresco cada 21 días a fin de evitar la necrosis. Así mismo, para el enraizamiento utilizó las sales del medio Murashige y Skoog al 50% suplementado con 1 a 5 mg/l de ANA y 10 g/l de sacarosa haciendo un choque hormonal por siete días, para luego traspasar a un medio similar pero sin hormonas, en el cual tras 21 días de cultivo, sólo logró un abultamiento en la base del corte, más no raíces en ningún caso; pasado los 21 días transfirió las plántulas directamente a aclimatación *ex vitro* y tras 38 días más (día 59 de enraizamiento) logró observar la presencia de las primeras raíces en el 21%. Las plantas pequeñas que se sometieron a enraizamiento *ex vitro* murieron, las medianas tuvieron 33% de sobrevivencia y las grandes un 83%, por lo que el autor recomienda no utilizar ácido giberélico en la segunda etapa del subcultivo 4 (ya que inhibe la formación de raíces) y que si la vitroplanta es muy pequeña es preferible cultivarla en medio MS sin fitohormonas hasta obtener entre cuatro a seis nudos, a fin de asegurar su supervivencia. Por último, recomienda también, la aplicación de AIB al 0.01% para la formación de raíces adventicias en la aclimatación *ex vitro*.

Alemán et al. (2014) Para la micropropagación clonal *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Catuai*, fue utilizado el medio MS completo suplementado con sacarosa 30g/l, agar 6g/l, cisteína 25 mg/l, caseína 0,5 mg/l y el pH fue ajustado a 5,6; en adición a este procedimiento se evaluó el efecto de un campo magnético (2 mT/3min) en el desarrollo *in vitro*. Los resultados demostraron que el uso de un campo magnético influye de manera positiva y significativa en el establecimiento, multiplicación y enraizamiento de las plántulas de *Coffea arabica* L. var. *Catuai*.

Etienne et al. (2016) Evaluaron las variantes somaclonales de diferentes variedades de *Coffea arabica* L. obtenidas por cultivo *in vitro* en suspensión. Sus resultados demuestran que las primeras réplicas juveniles poseen una variación somaclonal baja (1,3%); sin embargo, este porcentaje va en aumento (25%) en cultivos superiores a 6 meses, por lo que recomiendan no realizar muchas réplicas, ni mantener por mucho tiempo *in vitro* a las plántulas.

Gil, López & López (2017) Probaron tres tipos de sustratos para la aclimatación de plántulas de *Saintpaulia ionantha* “violeta africana” obtenidas por micropropagación clonal *in vitro*. Los tratamientos probados fueron: T1 = arena + musgo + humus; T2 = arena + musgo; T3= arena + humus y T4 = arena. Encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo el tratamiento T1 (arena + musgo + humus) el que evidenció un buen porcentaje de plantas aclimatadas, el mayor porcentaje de plantas enraizadas, el mayor número promedio de hojas, el mayor número promedio de raíces normales, y la mayor longitud y ancho promedio de hoja. Así mismo, especulan que el musgo adicionado al sustrato permite una buena aireación, un buen aporte de materia orgánica y sobretodo evitando la compactación que puede ser perjudicial para el sistema radicular.

Morales (2017) Estableció *in vitro* meristemos de *Coffea arabica* L. var. *Sarchimor* y logró su multiplicación en medios semi sólido (Phytigel® 1.8 g/l) y líquido; evaluando la sobrevivencia y número de brotes por explante al día 82, realizando transferencias a medio fresco cada 21 días a fin de evitar la contaminación y necrosis. Al concluir el experimento, obtuvo una media de 2.24 brotes por meristemo en el medio semi sólido y 1.38 en el medio

líquido. Para ello utilizó el medio MS al 50%, suplementado con Inositol (100 mg/l), 6-Bencilaminopurina (1 mg/l), Cisteína (30 mg/l), sacarosa (30 g/l) y un pH de 5.8.

Gebremariam (2017) Estableció un protocolo para la rápida propagación de *Coffea arabica* L. híbrido (MCH2) a partir de segmentos nodales. Obtuvo el mayor número de brotes por explante (3.5 ± 0.8) en el medio MS suplementado con 10mg/l BAP y a un pH 5,6; sin embargo, no obtuvo ningún brote al adicionar 25mg/l de adenina, por lo que no la recomienda para la multiplicación. Además, ensayó el uso de sucrosa e IBA en el enraizamiento *in vitro*, obteniendo los mejores resultados en el medio MS al 50% suplementado con 1,5mg/l IBA y 20 g/l de sucrosa durante 10 semanas. Para ello las plántulas de 4 a 5 cm obtenidas de la multiplicación clonal fueron previamente cultivadas en un medio sin fitohormonas con carbón activado al 0.5% para eliminar el exceso de BAP. Para la aclimatación *ex vitro* las plantas fueron cultivadas en mezcla de arena y vermiculita cubiertas con bolsas transparentes a fin de incrementar la humedad por dos semanas obteniendo una supervivencia del 87%.

Picay (2017) Realizó un experimento de multiplicación *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Caturra rojo* con la interacción de dos fitohormonas (Kinetina y AIA). Sus resultados demostraron que la mejor obtención de brotes (6/nudo) y desarrollo caulinar (9,25cm en promedio) se obtuvo mediante la combinación de Kinetina 0.0025 mg/l y AIA 0.0001 mg/l.

Hermoso et al. (2018) Realizan una comparación entre las plantas obtenidas *in vitro* y las obtenidas a partir de semillas. Para ello realizaron la aclimatación de vitroplántulas y la germinación de semillas de *Coffea arabica* L. durante 9 semanas. Los resultados demostraron

que no hay diferencias fenotípicas significativas entre las plantas obtenidas por semillas de las de *in vitro*.

CDC (2021) Nos muestra la diferencia del empleo del hipoclorito de sodio y de calcio en los procesos de desinfección, así también sus diferencias, ventajas y desventajas en medio acuoso.

VIII. Hipótesis

El establecimiento de un sistema de micropropagación clonal *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* en el medio de cultivo MS, suplementado con la fitohormona 6-BAP y bajo la influencia de ondas de luz de espectro completo, asegurará el mayor coeficiente de multiplicación de plántulas tolerantes a *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome “roya amarilla”.

IX. Materiales y métodos

9.1 Lugar de ejecución

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco 15039. Lima, Perú.

9.2 Tipo y diseño de investigación

Método experimental (diseño propiamente experimental).

9.3 Muestreo

9.3.1 Muestreo probabilístico aleatorio estratificado con afijación simple.

Es aquel muestreo que se basa en el principio de equiprobabilidad. Implica dividir a la población en clases o grupos, denominados estratos. Las unidades incluidas en cada estrato deben ser relativamente homogéneas con respecto a las características a estudiar y en el que cada estrato le corresponde igual número de elementos muestrales (Porras, 2015). Cuando las muestras son aleatorias, se pueden hacer afirmaciones probabilísticas acerca de la población en estudio (Tamayo, 2003).

9.3.1.1 Unidad de análisis o de estudio.

Coffea arabica L. var. *Geisha*

9.3.1.2 Universo.

1250 semillas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*

9.3.1.3 Población.

08 Plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de semillas.

49 Plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* de embrión cigótico.

46 Plantas obtenidas por germinación en condiciones de invernadero.

9.3.1.4 Muestra.

- 4279 plántulas obtenidas por micropropagación clonal *in vitro*.

- 27 Plántulas sometidas a aclimatación a condiciones ambientales.

9.4 Procedimiento y análisis de datos

9.4.1 Establecimiento de una metodología de germinación *in vitro* de semillas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*

Las semillas certificadas de la variedad *Geisha*, fueron obtenidas del distrito de Villa Rica, Provincia de Oxapampa, Región Pasco, Perú (1485 m s.n.m). Éstas fueron almacenadas en un lugar seco y fresco hasta su posterior uso (Figura 1A-1B)

Se dividió a las semillas en tres grupos (A, B y C). El grupo A fue utilizado para realizar diversos ensayos de germinación *in vitro* (con endospermo) a fin de establecer el mejor protocolo de desinfección para la obtención de plántulas asépticas (Tabla 1), el grupo B fue utilizado para la extracción del embrión cigótico (sin endospermo), y el grupo C fue germinado en condiciones de invernadero en compost con la finalidad de comparar eficiencia en las técnicas (Laboratorio vs. Invernadero). Para todos los casos, las semillas fueron previamente deshidratadas por 3 días en estufa a 37°C (para facilitar el desprendimiento de la testa y acelerar el proceso de germinación), seguido de un choque térmico de 85°C por 10 min a fin de inactivar posibles virus, metodología propuesta por Peña & Trujillo (2007). (Figura 2)

En el grupo A se evaluó la eficacia del hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y el bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) en la esterilización de las semillas. Todos los ensayos tuvieron un pre tratamiento con los fungicidas tabuconazol 0.01% y oxicloruro de cobre 1g/l por 30 minutos en solución acuosa. (Figura 3A, 3B y 3C)

En cámara de flujo laminar, previamente esterilizada con alcohol de 70° y UV por 30 min, se depositaron 3 semillas por cada frasco de vidrio conteniendo algodón y agua destilada

con una mínima solución diluida de nitrato de potasio (KNO_3) y 0.1mg/l de GA_3 (esterilizados en autoclave a una temperatura de 125°C por 20 minutos).

Para el grupo B (cultivo de embrión cigótico) se siguió la metodología de Bojorquez *et al.* (2011) modificada, en la cual el hipoclorito de sodio fue reemplazado por el hipoclorito calcio (Figura 4). Las semillas pre tratadas fueron colocadas en una solución de hipoclorito de calcio al 10% por 2 h en constante agitación, seguido de dos lavados con agua destilada estéril; luego se añadió etanol al 70% por 5 minutos, siempre en continuo movimiento, se lavaron dos veces con agua destilada estéril, y nuevamente se desinfectó en hipoclorito de calcio al 30% por 10 minutos. Finalmente las semillas fueron lavadas hasta eliminar el hipoclorito y permanecieron sumergidas en agua destilada estéril con 0.1g de carbón activado por 48h hasta la extracción del embrión cigótico. (Figura 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F y 6)

Los embriones fueron extraídos en cámara de flujo laminar, previamente esterilizada con alcohol de 70° y UV por 30 min, con la ayuda de bisturís y pinzas, para ser cultivados en tubos con diferentes concentraciones del medio basal Murashige & Skoog (MS) sin fitohormonas, con la adición de vitaminas de Gamborg completas. (Tabla 2) (Figura 7A, 7B, 7C y 7D)

Ambos grupos (A y B) fueron incubados en semisombra por 5 días (a fin de evitar la fotoxidación post tratamiento) y luego trasladados a un cuarto de cultivo a una temperatura de 22 – 26°C con fotoperiodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 3 meses, con observaciones periódicas para la determinación del porcentaje de germinación, contaminación y fenolización; así también, para realizar las anotaciones del desarrollo y mediciones correspondientes.

Para el grupo C, en condiciones controladas de invernadero, cincuenta semillas fueron sembradas en un semillero conteniendo compost esterilizado y cubiertas con hojas para favorecer

la humedad, metodología de almácigos propuesto por la *Guía Técnica para el Cultivo de Café* (ICAFFE, 2011); dichas semillas fueron monitoreadas mes a mes a fin de tomar mediciones y anotaciones con respecto a su desarrollo.

9.4.2 Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas de Gamborg (0% y 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas.

Obtenido el material vegetal aséptico en cantidades suficientes proveniente de la germinación de semillas *in vitro* y/o del cultivo de embriones cigóticos, se evaluó las mejores condiciones para el establecimiento y multiplicación clonal del *Geisha*, tomando como referencia el medio de cultivo Murashigo & Skoog (MS) a la concentración que mejores resultados generó en el desarrollo durante la fase de la introducción *in vitro* (cultivo de embrión cigótico). Así mismo, se evaluó la concentración de fitohormonas y la influencia de la presencia o ausencia de las vitaminas de Gamborg para promover dicho fin. (Tabla 3)

Los explantes fueron pre cultivados en semisombra durante 5 días a fin de evitar la fotooxidación y luego transferidos a cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad a una temperatura de 26 ± 2 °C durante 30 días; momento en el cual se tomaron las medidas necesarias a las plántulas para los análisis correspondientes. (Figura 8C)

Luego de los 30 días, se tomó como base el medios de cultivo MS suplementado con la concentración de 6-BAP y vitaminas (ausencia o presencia) que desarrolló el mayor coeficiente de multiplicación clonal del *Geisha*. Se realizaron cambios a medio de cultivo fresco cada 30 días y se realizaron 3 subcultivos, a fin de obtener la mayor cantidad de plántulas posibles y evitar la delección génica propia de la metodología (Lozano, 2014). (Figura 8A y 8B)

9.4.3 Evaluación del efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*

Durante el tercer subcultivo, se evaluó el efecto de la longitud de onda de luz en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*. Para ello, se instaló un cuarto de cultivo con 3 hileras de luces LED de espectro completo de 1 metro de largo, conteniendo 60 chips LED cada una; seguidamente se dividió equitativamente y al azar la cantidad de frascos con los cultivos entre el cuarto de cultivo LED y el cuarto de cultivo con luces blancas fluorescentes convencionales, realizando cambios a medio de cultivo fresco cada 30 días (Figura 9A y 9B). Al final del subcultivo se tomó los datos necesarios para el análisis correspondiente.

Previo a la etapa de enraizamiento se seleccionó al azar 3 frascos de la sala de cultivo con luces LED de espectro completo y 3 frascos de la sala de cultivo con luz blanca fluorescente, a fin de evaluar la respuesta fisiológica de las vitroplantas (clorofila A, B y total) a la exposición de longitud de onda de luz; para ello, se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Hiscox & Israelstam (1979), el cual consistió en cortar finamente la muestra (hojas) en tiras de 0.5 cm², pesar 0.5 g, macerarlas en un mortero adicionando 5 ml de solución de acetona al 80% hasta extraer todo el pigmento, centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, separar el sobrenadante que contiene los pigmentos, ajustar cada tubo a 6ml con acetona al 80%, del cual se tomaron 0.5 ml del sobrenadante de cada uno de los extractos y seguidamente se diluyó hasta 5 ml con acetona al 80%. Finalmente, se calculó la absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm., utilizando una muestra de acetona al 80% como blanco. Se realizaron 3 repeticiones de lectura a fin de obtener un promedio con el mínimo margen de error

(Figura 10A, 10B, 10C y 10D). La fórmula utilizada para determinar la concentración de clorofila A, B y Total se describe a continuación.

$$\text{Clorofila A} = (12.7 \times \text{Abs } 663) - (2.69 \times \text{Abs } 645)$$

$$\text{Clorofila B} = (22.9 \times \text{Abs } 645) - (4.68 \times \text{Abs } 663)$$

$$\text{Clorofila Total} = (20.2 \times \text{Abs } 645) + (8.02 \times \text{Abs } 663)$$

9.4.4 Determinación de la concentración de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen la mayor tasa de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.

Una subpoblación de los brotes obtenidos de la multiplicación clonal fue cultivada en primera instancia en un medio MS 50% libre de fitohormonas y vitaminas durante 60 días, a fin de lograr un tamaño considerable para el enraizamiento; posteriormente, se dividió en dos grupos de cultivo (Luz LED de espectro completo y luz blanca fluorescente) para evaluar el efecto de la longitud de onda en el enraizamiento. Las vitroplantas fueron transferidas a diferentes medios de cultivo (MS 50%) enriquecido con 20 g/l de sacarosa y tres tipos de auxinas (ANA, IAA, IBA) en diferentes concentraciones, con la finalidad de evaluar la concentración que induzca la mayor tasa de enraizamiento; así como, el mayor número y longitud de raíces. La distribución de las vitroplantas para el experimento se detalla en las tablas 4 y 5 (Tabla 4 y 5).

9.4.5 Establecimiento de un sistema de aclimatación de plántulas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* a condiciones ambientales (*ex vitro*).

Se seleccionaron las plantas enraizadas *in vitro* que indujeron el mejor desarrollo del sistema radicular (al menos 2 raíces $\geq 0.5\text{cm}$) para ser lavadas con agua tibia estéril, a fin de eliminar todo rastro del medio de cultivo, posteriormente fueron colocadas por unidades en pequeñas macetas y en cámaras de aclimatación con diferentes mezclas de sustratos durante un mes, (Tabla 6) (Figura 11A, 11B, 11C, 11D y 11E). Semana y media previa a la culminación del tiempo de cultivo, se fue abriendo la cubierta de la cámara de aclimatación paulatinamente para favorecer el intercambio gaseoso. Al final del experimento se tomaron los datos para evaluar la mejor tasa de plantas aclimatadas a condiciones ambientales (*ex vitro*) y la altura promedio. (Figura 12A y 12B)

9.4.6 Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó las pruebas estadísticas de T de student, ANOVA, coeficiente de variación, modelos lineales, análisis de homogeneidad de Levene, Prueba de Tukey, Prueba de U de Mann-Whitney y Prueba de Kruskal-Wallis que se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21.0

X. Resultados

10.1 Establecimiento de una metodología de germinación *in vitro* de semillas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*

10.1.1 Porcentaje de contaminación y fenolización

Los resultados obtenidos en los ensayos de esterilización de semillas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* cultivadas en frascos con algodón con solución de KNO_3 (GRUPO A) mostraron que cuatro de los seis ensayos presentan un porcentaje de contaminación al 100% (E1, E3, E4, E5), seguido de 85% (E2) y 0% (E6) evaluados hasta los 90 días de cultivo previsto (Tabla 7); lo que demuestra que la esterilización de semillas para la germinación *in vitro* de café genera grandes pérdidas de material vegetal y es poco viable por la alta contaminación por hongos. Por otro lado, los Ensayos 1 y 2 esterilizados empleando NaOCl al 5% en diferentes tiempos; se observó que la desinfección al 5% por 15 min (Ensayo 1) presentó una fenolización de 58.33%, mientras que a 60 min (Ensayo 2), además de presentar una contaminación del 85%, presentó también un alto porcentaje de fenolización (86.67%), lo que demuestra que a mayor tiempo de exposición al hipoclorito de sodio hay mayor porcentaje de fenolización (Tabla 8); del ensayo 2 podemos resaltar que si bien hubo algunas muestras con asepsia, llegado el momento del establecimiento *in vitro* en medio de cultivo MS, el 100% presentó contaminación (Figura 13A y 13B), lo que demuestra que la germinación *in vitro* de semillas de café con endospermo utilizando algodón con solución de KNO_3 no es una opción viable para la obtención de plántulas asépticas para la experimentación *in vitro*. (Figura 14 y 15)

Los Ensayos 3, 4, 5 y 6 fueron desarrollados utilizando como solución esterilizante tres diferentes concentraciones de HgCl_2 , evidenciándose 100% de contaminación por hongos en los Ensayos 3, 4 y 5, mientras que en el Ensayo 6 no presentó contaminación (Tabla 7) (Figura 16).

Por otro lado, los 4 ensayos con HgCl_2 evidenció un porcentaje de fenolización de 100% (Tabla 8) (Figura 15).

Los resultados obtenidos empleando el aislamiento de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* cultivados directamente en diferentes concentraciones de medio de cultivo MS (GRUPO B), mostraron un porcentaje de contaminación de 0% en los tres casos (Figura 17), evidenciando ser una excelente opción viable para la obtención de plántulas asépticas para la experimentación *in vitro*. Por otro lado, con respecto a la fenolización se evidenció una diferencia significativa (Test de ANOVA de un factor, $p=0.019 \leq 0.05$) entre las tres concentraciones del medio MS empleados (50%, 75% y 100%) con porcentajes de fenolización muy leve de 0%, 5% y 15% respectivamente, lo que evidencia que la relación entre la fenolización en el cultivo de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* y la concentración de sales del medio MS es directamente proporcional (Tabla 9 y 10) (Figura 18).

10.1.2 Porcentaje de Germinación *in vitro* y en condiciones de invernadero.

De los seis resultados de los ensayos de germinación *in vitro* del Grupo A (semilla con endospermo en algodón con solución de KNO_3 estéril), en el ensayo E2 (Fig. 13) se logró obtener el 15 % de germinación aséptica, mientras que los ensayos E1, E3, E4, E5 y E6 presentaron 100% de contaminación, razón por el cual no fueron tomados en cuenta para el análisis estadístico.

En el grupo B (cultivo de embrión cigótico) se evidenció una diferencia significativa (Test de ANOVA de un factor, $p=0.013 \leq 0.05$) entre las tres concentraciones (50%, 75% y 100%) de sales del medio de cultivo MS empleados con un porcentaje de germinación de 90%, 70% y 85% respectivamente a los 7 días post aislamiento y cultivo (Tabla 10), lo que evidencia que la

concentración de sales del medio de cultivo influye en el desarrollo de los embriones cigóticos, siendo la concentración al 50% donde mejor resultados se producen. (Tabla 9) (Figura 19).

En el grupo C (Germinación de semillas en condiciones de invernadero) mostró un 88% de semillas germinadas (Tabla 11), y no presenta diferencias significativas (Test ANOVA de un factor $p=0.791 \geq 0.05$) con la metodología de aislamiento y cultivo *in vitro* de embriones cigóticos (Tabla 12) (Figura 20). Sin embargo, se observó que la germinación en condiciones de invernadero inició aproximadamente a los 30 días post siembra (Figura 21), mientras que en el cultivo *in vitro* de embrión cigótico, este periodo se reduce a siete días (Figura 22), lo que evidencia una clara ventaja de esta técnica en la propagación del Geisha.

10.1.3 Concentración del medio Murashige & Skoog (50, 75 y 100%) en la obtención de plántulas a partir del cultivo de embriones cigóticos y en condiciones de invernadero.

Según la *Guía Técnica para el Cultivo de Café* (ICAFE, 2011), las características básicas que debe presentar una planta de café germinado para su selección deben ser: plántulas vigorosas con un buen sistema radicular, con tallos verdes y rectos. En el presente investigación, se evaluó el desarrollo radicular de las plántulas cultivadas en las diferentes concentraciones del medio de cultivo MS (50, 75 y 100%), evidenciándose una diferencia significativa intergrupala (Test de ANOVA de un factor, $p=0.002 \leq 0.05$) a los noventa días de cultivo (momento en que las plántulas presentaron al menos 2 hojas verdaderas) (Tabla 10), con medias de 5.56cm, 4.02cm y 2.46cm respectivamente (Tabla 09). Los Resultados muestran que la concentración de sales del medio de cultivo MS influye directamente en el desarrollo radicular en condiciones *in vitro* de plántulas de café var. Geisha con una relación inversamente proporcional, evidenciando que la mejor concentración para un correcto y abundante sistema radicular es el medio MS al 50% de concentración. (Figura 22, 23A y 23B)

Por otro lado, los resultados obtenidos en el desarrollo longitudinal (parte aérea) de las vitroplántulas del Geisha cultivadas en las diferentes concentraciones del medio de cultivo MS (50, 75 y 100%) muestra una diferencia significativa (Test de ANOVA de un factor, $p=0.011 \leq 0.05$) a los noventa días de cultivo (Tabla 10), con medias de 4.19cm, 3.19cm y 2,21cm respectivamente (Tabla 09) (Figura 24A y 24B). Estos resultados evidencian la influencia directa de la concentración de las sales del medio de cultivo MS en el desarrollo de las vitroplantas de café var. Geisha con una relación inversamente proporcional; se evidencia así, que el medio de cultivo MS al 50% de concentración es la mejor opción para el establecimiento y cultivo *in vitro* de *Coffea arabica* var. *Geisha*. (Figura 22)

Por otra parte, los ensayos del desarrollo del café var. *Geisha* en condiciones de invernadero evidenció el inicio de la germinación a los 30 días aproximadamente sin diferencias significativas (Test ANOVA de un factor $p=0.791 \geq 0.05$) con la metodología de aislamiento *in vitro* de embriones cigóticos (Tabla 12) (Figura 21). Transcurrido los 90 días (mismo tiempo empleado para el establecimiento y desarrollo *in vitro*) se observó que las plántulas germinadas aún se encontraban en etapa de “soldado”, llamado así por la presencia de la semilla con el hipocótilo erguido por encima del suelo, sin hojas (Figura 21). Con una media de 4.93cm para la longitud radicular y una media de 7.5cm para la longitud aérea (Tabla 11); Posteriormente, las plántulas germinadas en condiciones de invernadero presentaron sus hojas verdaderas a los 5 meses de cultivo; lo que demuestra que, si bien el método agrícola convencional de obtención de plantas de café Geisha a partir de semillas no presentan diferencias significativas con respecto a la germinación *in vitro* por aislamiento de embrión cigótico, ésta requiere tiempos prolongados en comparación con los métodos *in vitro* (Figura 21 y 22).

10.2 Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas (0%, 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas.

10.2.1 Coeficiente de Multiplicación (CM)

Los resultados obtenidos en la primera etapa de multiplicación (Tabla 14), muestran una diferencia significativa (Prueba T de Student $p=0.00 \leq 0.05$) entre los coeficientes de multiplicación para los ocho tratamientos del medio de cultivo suplementados con la fitohormona 6 – BAP a los treinta días de cultivo *in vitro*, presentando plántulas con promedios de 4.4 y 4.5 (4mg/l); 5.9 y 6.02 (6mg/l); 6.7 y 6.8 (8mg/l); 8.0 y 8.2 (10mg/l). Estos resultados nos permiten suponer que a mayor concentración del 6-BAP, mayor será el coeficiente de multiplicación. (Tabla 13) (Figura 26A y 26B)

Por otra parte, en la presente investigación no se evidenció una diferencia significativa (Prueba U de Mann-Whitney $p=0.686 \geq 0.05$) entre los coeficientes de multiplicación y la presencia de las vitaminas del medio de cultivo Gamborg incorporados al medio de cultivo MS en los tratamientos realizados a los treinta días de cultivo *in vitro* (Tabla 15) (Figura 25A y 25B), lo que demuestra que la presencia de vitaminas en el medio de cultivo no influyen en el Coeficiente de Multiplicación durante la micropropagación clonal *in vitro* de *Coffea arabica* var. *Geisha*.

10.2.2 Tasa de Crecimiento (TC) y Cantidad de Nudos (CN) en las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha* cultivadas a diferentes concentraciones de la fitohormona 6-BAP

Se analizó la Tasa de Crecimiento de las vitroplantas cultivadas a diferentes concentraciones de la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las Vitaminas de Gamborg (VG), evidenciándose que existe una ligera diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2,

T3, T4, T5 y T6 (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p=0.164 \geq 0.05$) con los tratamientos T7 y T8 (10mg/l de 6-BAP, Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p=1.00 \geq 0.05$) en relación con la Tasa de Crecimiento (TC) y la concentración de la fitohormona 6-BAP (Tabla 16), con promedios de 1.31; 1.35; 1.30; 1.35; 1.29; 1.28; 1.20 y 1.21 respectivamente a los treinta días de cultivo *in vitro* (Tabla 13) (Figura 27A y 27B), lo que demuestra que una concentración igual o superior a 10mg/l del 6-BAP influye en la Tasa de Crecimiento (TC) de las plántulas de *Coffea arabica* var. *Geisha* cultivadas *in vitro* (Figura 28). Así mismo, al analizar la Cantidad de Nudos (CN) en las vitroplantas, se observó una diferencia significativa (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p=0.018 \leq 0.05$) entre los tratamientos T1 y T2 (4mg/l 6-BAP) con respecto a los tratamientos T7 y T8 (10mg/l 6-BAP), mientras que los tratamientos T3, T4, T5 y T6 no mostraron diferencias significativas intergrupales (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p \geq 0.05$) (Tabla 17); Estos datos nos permiten demostrar la influencia positiva del 6-BAP a una concentración de 10mg/l o superior sobre el desarrollo y formación de la Cantidad de Nudos (CN) en las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha*. (Figura 29A y 29B)

Las Vitaminas del medio de cultivo Gamborg (VG) incorporadas al medio de cultivo MS no muestran influencia en la Tasa de Crecimiento (TC) de las vitroplantas de café, esto se evidencia al no encontrarse diferencia significativa (Prueba U de Mann-Whitney $p=0.293 \geq 0.05$) entre la aplicación de las vitaminas y su ausencia en los ensayos con diferentes concentraciones de 6-BAP (Tabla 15). Así también, no se evidencia influencia de la presencia o ausencia de las vitaminas en el desarrollo y formación de nudos (Prueba U de Mann-Whitney $p=0.623 \geq 0.05$) a los 30 días de cultivo *in vitro* (Tabla 15) (Figura 29A y 29B), lo que demuestra que no influyen en el Coeficiente de Multiplicación (CM), en la Tasa de Crecimiento (TC), ni en la formación de

mayor Cantidad de Nudos (CN) en las plántulas de *Coffea arabica* var. *Geisha* obtenidas *in vitro*.

10.2.3 Cantidad total de yemas y explantes obtenidos

La investigación inició con un total de 80 muestras biológicas y se obtuvo un total de 507 yemas distribuidas en 167 explantes en las cuatro concentraciones evaluadas (4, 6, 8 y 10mg/l 6-BAP), con promedios de 89.90; 120.48; 135.36 y 161.26 yemas respectivamente a los 30 días de cultivo *in vitro*. (Tabla 18) (Figura 30A y 30B). Se realizó una réplica adicional en el medio de cultivo que indujo mayor Coeficiente de Multiplicación (MS 50% + 10mg/l sin Vitaminas de Gamborg) que permitió obtener un total de 800 explantes. (Figura 30C)

10.2.4 Incidencia de tejido calloso (IC)

En los resultados de los ensayos con la fitohormona 6-BAP, se observó la presencia de tejido calloso (IC) en la base de las vitroplántulas de *Coffea arabica* var. *Geisha*, evidenciándose que existe diferencias significativas (Prueba de Kruskal-Wallis $p=0.00 \leq 0.05$) entre el tejido calloso y la concentración del 6-BAP en el medio de cultivo (Tabla 19); en los medios de cultivo suplementados con 10 mg/l de 6-BAP se han observado la presencia de mayor nivel de callogénesis, estos resultados demuestran que la formación del tejido calloso es directamente proporcional a la concentración de la fitohormona 6-BAP (Figuras 26 y 31).

Por otro lado, los resultados evidencian que no hay diferencia significativa (Prueba U de Mann-Whitney $p=0.343 \geq 0.05$) en el uso de las Vitaminas de Gamborg (VG) adicionadas al medio de cultivo con la incidencia de tejido calloso (IC) en las vitroplantas de café (Tabla 15), lo que demuestra que no tienen influencia directa en la callogénesis (IC) en el cultivo *in vitro* de *Coffea arabica* var. *Geisha* (Figura 31A).

10.3 Evaluación del efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.

10.3.1 Tasa de Crecimiento (TC) de las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha* cultivadas en dos tipos diferentes de luz.

De las plántulas del subcultivo con mayor Coeficiente de Multiplicación (CM), Se logró obtener 800 miniesquejes o explantes, los cuales fueron subcultivados nuevamente en grupos de cinco y/o seis aproximadamente en frascos magentas de vidrio con medio de cultivo fresco estandarizado (MS 50% + 10mg/l sin Vitaminas de Gamborg) obteniéndose 152 frascos, mismos que fueron divididos al azar en dos grupos iguales y sometidos a dos diferentes ondas de luz: Luz Fluorescente Blanca (LFB) y Luz LED de espectro completo (LED EP). (Figura 9)

Los resultados obtenidos evidencian que hay una diferencia significativa (Prueba U de Mann-Whitney $p \leq 0.05$) (Tabla 21) en relación a la Tasa de Crecimiento (TC) de las vitroplantas con 1.58 y 2003 explantes para el cultivo bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca (LFB) y 2.25 y 2161 explantes para el de Luz LED de espectro completo (LED EP) a los 50 días de cultivo (Figura 32A y 32B); lo que demuestra claramente que la longitud de onda de espectro completo (LED EP) influye directamente en la Tasa de Crecimiento (TC) y en el número de explantes totales obtenidos, tal como se puede observar en la Tabla 20 y figura 33.

10.3.2 Concentración de clorofila A, B y Total (C_A , C_B , C_T)

Los resultados obtenidos en el análisis de las concentraciones de clorofila evidencian diferencias significativas (Prueba T de Student $p \leq 0.05$) (Tabla 23) entre las vitroplántulas cultivadas en LFB, con medias de concentración de C_A , C_B y C_T de 2.38; 1.66 y 4.04 μ/l ; y las vitroplántulas cultivadas en LED (EP), con medias de concentración de C_A , C_B y C_T de 4.28; 2.78

y 7.06 μl respectivamente (Figura 34). Lo que demuestra que las ondas de luz de espectro completo influyen directamente en la síntesis e incremento de las concentraciones de la clorofila en condiciones de cultivo *in vitro*, esto se refleja en una buena respuesta fisiológica de las plántulas en la Tasa de Crecimiento (TC) y el Número Total (NT) de explantes obtenidos (requisito indispensable para la multiplicación clonal, objetivo del experimento). Los resultados se presentan en la Tablas 22 y 20; y en las Figuras 32A, 32B y 33.

10.4 Determinación de la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen la mayor tasa de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.

10.4.1 Influencia del tipo de onda de luz

En esta investigación se evidenció que hay diferencia significativa (Prueba U de Mann-Whitney $p \geq 0.05$) para los tratamientos expuestos a diferentes ondas de luz (LFB y LED-EP), lo que demuestra que la longitud de onda de espectro completo influye negativamente en la formación, número y longitud de raíces de las vitroplantas a los 60 días de cultivado establecido (Tabla 24 y 25) (Figura 42 y 43).

10.4.2 Promedio de raíces obtenidas entre las auxinas utilizadas

Los resultados obtenidos en la observación del enraizamiento *in vitro* bajo la influencia de LFB demuestran que existe diferencia significativa (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p \leq 0.05$) entre los tratamientos Control y ANA en contraste con IAA e IBA, lo que demuestra que no hay diferencia significativa en relación a los promedios de raíces obtenidas en los tratamiento control y ANA (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p = 0.994 \geq 0.05$); así mismo, entre los tratamientos con IAA e IBA tampoco se observa diferencia significativa

(Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p=0.805 \geq 0.05$) a los 60 días de cultivo previstos (Tabla 26) (Figura 35, 36, 37, 41A y 42A).

Así también, en las observaciones del enraizamiento *in vitro* bajo la influencia de LED (EP) demuestran que existe diferencia significativa (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p \leq 0.05$) entre los tratamientos Control y ANA en contraste con IAA e IBA, lo que demuestra que no hay diferencia significativa entre los promedios de raíces obtenidas en los tratamiento control y ANA (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p=0.921 \geq 0.05$); así mismo, entre los tratamientos con IAA e IBA tampoco hay diferencia significativa (Prueba de Tukey para subgrupos homogéneos $p=0.051 \geq 0.05$) a los 60 días de cultivo previstos (Tabla 26) (Figura 38, 39, 40, 41B y 42B).

10.4.3 Promedio de raíces obtenidas entre las concentraciones de cada auxina utilizada

Los resultados obtenidos del promedio por concentración de cada auxina en la inducción y desarrollo de raíces en las vitroplantas cultivadas bajo LFB evidencian que no hay diferencia significativa (Prueba de Kuskal-Wallis $p=0.057 \geq 0.05$) entre las tres concentraciones utilizadas (Tabla 27). Los promedios para la ausencia de fitohormonas (\emptyset) fueron 0; para la auxina ANA A1, A2, A3 fueron 0, 0.4, 0; para la auxina IAA B1, B2, B3 fueron 2.6, 2,7, 2.2; y para la auxina IBA C1, C2, C3 fueron 2.8, 2.8 y 2.6 respectivamente (Tabla 25) Lo que demuestran que el aumento en la concentración de la fitohormona no necesariamente incrementa la cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha* a los 60 días de cultivo *in vitro*. Así mismo, se demuestra que las auxinas que mejores resultados inducen en el enraizamiento del café Geisha bajo LFB son IAA e IBA (Tabla 26) (Figura 42A).

Por otro lado, los resultados obtenidos del promedio por concentración de cada auxina en el desarrollo e inducción de raíces en las vitroplantas cultivadas bajo LED (EP) evidencian que

hay cierta diferencia significativa (Prueba de Kuskal-Wallis $p=0.045 \leq 0.05$) entre las tres concentraciones utilizadas (Tabla 27). Los promedios para la ausencia de fitohormonas (\emptyset) fueron de 0,2; para la auxina ANA A1_a, A2_a, A3_a fueron 0,3, 0, 0,2; para la auxina IAA B1_a, B2_a, B3_a fueron 2, 1,8, 1; y para la auxina IBA C1_a, C2_a, C3_a fueron 3, 3,3 y 2,6 respectivamente (Tabla 25). Se demuestra que el aumento en la concentración de la fitohormona bajo el cultivo de las ondas de LED (EP) influyen ligeramente en la cantidad de raíces obtenidas en las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha* a los 60 días de cultivo *in vitro*. Así mismo, queda en evidencia nuevamente que las auxinas que mejores resultados inducen en el enraizamiento del café Geisha son IAA e IBA en concentraciones menores (1mg/l) (Figura 42B).

10.4.4 Promedio de longitud de raíces obtenidas entre las concentraciones de cada auxina utilizada

Los resultados obtenidos del promedio de longitud radicular por cada concentración de auxina en las vitroplantas cultivadas bajo LFB evidencian que sí hay diferencia significativa (Prueba de Kuskal-Wallis $p \leq 0.05$) entre las tres concentraciones utilizadas (Tabla 27). Los promedios para la ausencia de fitohormonas (\emptyset) fueron de 0cm; para la auxina ANA A1, A2, A3 fueron 0,5, 0, 0cm; para la auxina IAA B1, B2, B3 fueron 1,06, 0,97, 0,7cm; y para la auxina IBA C1, C2, C3 fueron 1,26, 0,45 y 0,5cm respectivamente (Tabla 25). Se demuestra que el aumento en la concentración de la auxina generalmente reduce la longitud de las raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha* a los 60 días de cultivo *in vitro*. Así mismo, queda demostrado que las auxinas que mejor resultado inducen en el enraizamiento del café Geisha bajo LFB son IAA e IBA (Figura 43A).

Por otro lado, los resultados del promedio de longitud radicular por concentración de cada auxina de las vitroplantas cultivadas bajo LED (EP) evidencian que hay diferencia significativa

(Prueba de Kuskal-Wallis $p=0.001\leq 0.05$) entre las tres concentraciones utilizadas (Tabla 27). Los promedios para la ausencia de fitohormonas (\emptyset) fueron de 0,13; para la auxina ANA A1_a, A2_a, A3_a fueron 1, 0, 0.2cm; para la auxina IAA B1_a, B2_a, B3_a fueron 1.1, 1.02, 0.45cm; y para la auxina IBA C1_a, C2_a, C3_a fueron 0.68, 0.35 y 0.46cm respectivamente (Tabla 25). Se demuestra que el aumento en la concentración de la auxina bajo el cultivo de LED (EP) influye en las longitudes de las raíces obtenidas en las vitroplantas de *Coffea arabica* var. *Geisha* a los 60 días de cultivo *in vitro* (Figura 43B).

10.4.5 Tasa de Mortalidad (TM)

Los resultados demuestran que hay cierta diferencia significativa (Prueba U de Mann-Whitney $p=0.046\leq 0.05$) (Tabla 29) para la tasa de mortalidad (TM), entre los tratamientos expuestos a LFB y LED (EP) con 0.06 y 0.13 respectivamente (Tabla 28). Lo que demuestra que si bien la luz de espectro completo influye en la tasa de crecimiento (TC), tiene cierto efecto negativo sobre la sobrevivencia en el enraizamiento de las plántulas de *Coffea arabica* var. *Geisha* a los 60 días de cultivo *in vitro* (Figura 44).

Al mismo tiempo, se evidencia que no hay diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis $p=0.447\geq 0.05$) para la tasa de mortalidad (TM), entre las diferentes auxinas utilizadas para el enraizamiento *in vitro* bajo la influencia de LFB (Tabla 30), con tasas de 0 para el grupo control sin auxinas, 0 para ANA, 0.04 para IAA y 0.02 para IBA (Tabla 28). Así mismo, se evidencia que no hay diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis $p=0.943\geq 0.05$) para la tasa de mortalidad (TM), entre las diferentes auxinas utilizadas para el enraizamiento *in vitro* bajo la influencia de LED (EP) (Tabla 30), con tasas de 0 para el grupo control sin auxinas, 0 para ANA, 0.06 para IAA y 0.06 para IBA (Tabla 28) (Figura 45).

10.5 Establecimiento de un sistema de aclimatación de plántulas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* a condiciones ambientales (*ex vitro*).

10.5.1 Tasa de plantas aclimatadas a condiciones ambientales (*ex vitro*)

Los resultados de la aclimatación de las plantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* a condiciones de invernadero (*ex vitro*) evidencian que no hay diferencias significativas (Prueba de Kruskal-Wallis $p=0.323 \geq 0.05$) para las tasas de supervivencia entre los tres sustratos empleados (Tabla 32); con índices de 0.78 para E1, 0.78 para E2 y 1 para E3. Sin embargo, se observó 0% de mortandad en el sustrato E3 (Tabla 31) (Figura 46 A y 47).

10.5.2 Altura de plantas aclimatadas a condiciones ambientales (*ex vitro*)

Los resultados demuestran diferencias significativas (Prueba de Kruskal-Wallis $p=0.00 \leq 0.05$) entre las alturas obtenidas por las plantas de café Geisha cultivadas en los tres sustratos utilizados (Tabla 32), con promedios de 1.24 cm para E1; 1,28cm para E2 y 2.30 cm para E3 (Tabla 31). Se demuestra que el sustrato que mejores resultados induce en la aclimatación a condiciones de invernadero (*ex vitro*) es el compuesto a base de Tierra Preparada 2:1 Musgo (Figura 46B y 47).

XI. DISCUSIÓN

11.1 Establecimiento de una metodología de germinación *in vitro* de semillas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*

Uno de los principales problemas que se presentan en el establecimiento *in vitro* de *Coffea arabica* es la contaminación (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus), que puede provocar la pérdida de los cultivos, para ello el procedimiento más popularizado consiste en el uso de meristemos, semillas o embriones con una desinfección en soluciones fuertemente oxidantes como el hipoclorito de sodio 1 -3%, en su reemplazo se puede utilizar hipoclorito de calcio (6 -12 %) o el cloruro de mercurio (0,1%- 1,5%); recomendando extrema cautela con el empleo de este último compuesto, dado que es altamente tóxico y además no es removido con facilidad del explante (Ebrahim *et al.* 2007; Mroginski *et al.* 2010). En la presente investigación, se probó la eficacia del NaOCl y el HgCl₂ en diferentes tiempos para la esterilización de semillas, obteniendo un porcentaje de asepsia sólo del 15% en el Ensayo 2 (E2) y del 100% en el Ensayo 6 (E6), estos resultados son similares con los presentados por Ebrahim *et al.*, 2007 quienes mostraron un porcentaje oscilante de desinfección entre 82 – 88%, pero empleando menos concentración de hipoclorito, sin embargo el proceso de germinación fue extenso (aproximadamente 3 meses) con una gran elongación del tallo y hojas embrionales que sobrepasaron la capacidad de la magenta y que al momento del traspaso a medio de cultivo presentó contaminación al 100%. Así mismo, el empleo de cloruro de mercurio fue perjudicial para la germinación *in vitro*, ya que si bien permitió la asepsia al 100% en el Ensayo 6 (E6), fue altamente tóxico y mortal, comprobándose lo mencionado por Mroginski *et al.* 2010.

La dificultad de la desinfección de las semillas de café radica en su morfología elíptica o en forma de “huevo”, plana convexa, que posee un gran surco longitudinal que se convierte en un

sitio de difícil acceso a los desinfectantes y muchas veces se requiere de una doble exposición al mismo a fin de eliminar todos los patógenos (Eira *et al.* 2006; Sondahl *et al.* 1985), por lo que en esta investigación se redujo la contaminación a 0% mediante el aislamiento de embriones cigóticos con resultados similares a los de Bojórquez *et al.* 2011 quienes aseguran que se logra un porcentaje mínimo de contaminación, sin embargo el cambio de hipoclorito de sodio por el hipoclorito de calcio fue fundamental para lograr la asepsia total lograda en esta investigación, esto se debe posiblemente a que en esta última la presencia de cloro en sus presentaciones comerciales pueden llegar hasta el 70% (a comparación de 5,25% del hipoclorito de sodio), además su disolución genera hasta 2 veces más la presencia de cloro en el medio acuoso y su eliminación es mucho más rápida que el NaOCl (CDC, 2021). Así también al retirar el endospermo, las plantas germinadas por cultivo *in vitro* de embrión cigótico son de menor tamaño, lo que evita que éstas sobrepasen la capacidad del frasco y aumente la probabilidad de contaminación.

Con respecto al porcentaje de germinación a partir de embriones cigóticos, los resultados discrepan con los presentados por Ebrahim *et al.*, 2007, quienes obtuvieron un porcentaje de germinación de embriones cultivados en MS $\frac{1}{2}$ y MS de 78% y 66% respectivamente, asegurando que la concentración de sales del medio influye en la presión osmótica y la imbibición de los embriones y por consiguiente en el éxito de la germinación; en esta investigación si bien se obtiene un mayor porcentaje de germinación en el medio MS $\frac{1}{2}$ que en el MS al igual que Ebrahim *et al.*, 2007, se logran porcentajes mayores (90% y 85% respectivamente) para cada concentraciones de sales utilizadas.

La fenolización es un tipo de oxidación catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar,

generando daño e incluso la muerte celular, es uno de los principales problemas más serio y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996). La fenolización se puede evidenciar como oscurecimiento del explante o del medio de cultivo y según las conclusiones de Azofeifa, 2009 la concentración de sales en el medio de cultivo es influyente a medida que se incrementa la concentración, esto sea posiblemente a la cantidad de K y N disponible y la fuente de los mismos, es por ello que en algunas investigaciones en micropropagación de *Coffea* como la de Sondahl *et al.* 1985, Londoño y Orozco, 1986; y Gatica, 2002 se retira el nitrato de amonio y se duplica la concentración de nitrato de potasio, generando resultados significativos en la sobrevivencia y la reducción de la fenolización. En este trabajo de investigación se observó ligera fenolización del medio de cultivo de embriones cigóticos (0% para MS 1/2, 5% para MS 3/4 y 15% para MS) corroborando la hipótesis de que la concentración de las sales influye en la fenolización; así también, se puede deber a la presencia de residuos del endospermo o algún ligero daño en el momento de la extracción del embrión, lo que generó algunos exudados.

11.2 Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas (0%, 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas.

En esta investigación se empleó la fitohormona 6-BAP en el medio MS 1/2 para la multiplicación clonal, obteniéndose un coeficiente de multiplicación de 4.5 (4mg/l); 6.5 (6mg/l); 6.80 (8mg/l) y 8.1 (10mg/l); estos resultados difieren de los presentados por Sondahl *et al.* 1985 quienes obtuvieron sólo 2.1 y 2.3 de coeficiente de multiplicación para 4mg/l y 6mg/l de 6-BAP; así también, se discrepa con los resultados obtenidos por El Gaward *et al.* 2012, los cuales

obtuvieron el mayor coeficiente de multiplicación (2.88) utilizando 6mg/l. Se resalta los resultados obtenidos por Ebrahim *et al.* 2007 quienes lograron coeficientes de multiplicación en otras cultivares de *Coffea arabica* de 7.7 (4mg/l), 9.5 (6mg/l) y 16.8 (8mg/l) utilizando la misma fitohormona; todos los autores concuerdan que dentro de las citoquininas el 6-BAP es la mejor opción para la proliferación de multiyemas frente a zeatina, thidiazorum y kinetina, este resultado es apoyado por las investigaciones de Azcón-Bieto y Talón, 2003 quienes fundamentan la bioactividad sobresaliente del 6-BAP basado en el grado de saturación de los enlaces y la estereoquímica entre las citoquininas, siendo aquellas que presentan más dobles enlaces o anillos de purina las de mayor actividad celular o las que más resisten a los agentes fisicoquímicos.

El coeficiente de multiplicación puede variar por varios motivos, según Sondahl *et al.* 1985 el tipo de meristemo o yema de *Coffea* utilizado en la multiplicación *in vitro* influye sobre la cantidad de brotes finales obtenidos, así menciona que las yemas ortótropas generan menos brotes que las yemas plagiótropas y que se requiere concentraciones altas de citoquinina para activar el crecimiento de todas las yemas en latencia; este resultado explica el porqué del alto coeficiente de multiplicación obtenido en esta investigación (8.1) frente a otros autores. Por otro lado, también es necesario mencionar que a mayor concentración de 6-BAP se incrementa la incidencia de tejido calloso, en este trabajo se observó la presencia de callo en los tratamientos con 8mg/l y 10 mg/l, similar resultado obtuvieron Ebrahim *et al.* 2007 quienes usaron concentraciones altas de 6-BAP para recuperar la mayor cantidad de yemas inactivas pero con un incremento de la callogénesis.

Es sabido que las vitaminas actúan en el interior de la célula como precursoras de las coenzimas a partir de las cuales se elaboran miles de enzimas que regulan las reacciones químicas de las mismas, asemejándose a hormonas que el organismo necesita en cantidades

relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo (Lozano, 2012). En esta investigación no se observó diferencias significativas en el uso o prescindir de las vitaminas de Gamborg para favorecer el coeficiente de multiplicación (Prueba de U Mann-Whitney $p=0.686 \geq 0.05$) y la tasa de crecimiento (Prueba de U Mann-Whitney $p=0.293 \geq 0.05$) lo que discrepa con los autores de las referencias bibliográficas que utilizan siempre algún tipo de complejo vitamínico, ya sea de Gamborg o del medio B5 de forma completa; sin embargo, algunos autores como Londoño y Orozco, 1986 nos narran sus experiencias negativas con el empleo del uso de las mismas en los medios de cultivo, por lo que reducen su uso a sólo tiamina y ácido nicotínico presentando resultados significativos en la micropropagación *in vitro* de *Coffea*; así también Lozano, 2014 emplea las vitaminas sólo en el establecimiento de la var. Lempira, sin embargo, en la micropropagación clonal prescinde de ellas a excepción del inositol. Por último Morales, 2017 sólo emplea tiamina e inositol para la propagación de la var. *Geisha* prescindiendo de las demás por obtener resultados relativamente negativos.

Referente a la Tasa de Crecimiento (TC) los resultados de la investigación muestran que no existe diferencia significativa entre el empleo del 6-BAP a concentraciones de 4, 6 y 8mg/l con una tasa oscilante entre 1.28 y 1.31, resultados similares obtuvieron Ebrahim *et al.* 2007 empleando concentraciones similares con tasas de 1.3 a 1.4; Los autores también demuestran que el empleo de concentraciones altas de la fitohormona 6-BAP influye ligeramente en la tasa de crecimiento de las vitroplántulas, resultados similares obtenidos en esta investigación. Este efecto puede deberse a el gasto energético de los explantes en la producción y activación de nuevos brotes en contraste a la longitud.

11.3 Evaluación del efecto de la longitud de onda de luz (LED de espectro completo y luz fluorescente blanca) en el desarrollo y respuesta fisiológica de las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.

La radiación luminosa ocupa una pequeña franja del espectro electromagnético, que va desde los 400 a los 700 nm, se sitúa entre las radiaciones ultravioletas (UV) y las infrarrojas (IR), y constituye la llamada radiación fotosintéticamente activa (PAR) (Azcón-Bieto y Talón, 2003). En el cultivo *in vitro* se suele usar luces frías o fluorescentes blancas; sin embargo, las luces LEDs traen un avance eficaz y económico en la forma de hacer luces para este tipo de producción que sólo viene siendo implementado en invernaderos. Ramos y Ramírez, 2016 demuestran que para la fotosíntesis, las plantas responden más fuerte a la luz roja y azul influyendo fuertemente en la forma, desarrollo y floración (fotomorfogénesis) y en menor proporción utilizan los colores amarillo o naranja. Así describe Green, 2018 que la luz azul (430nm – 450nm) activa criptocromos y fototropinas para mediar respuestas de las plantas tales como la curvatura fototrópica, el movimiento del cloroplasto, apertura de los estomas y la regulación del crecimiento de las plántulas, mientras que la luz roja (640nm – 680nm) estimula el crecimiento del tallo, floración, producción de frutos, y la producción de clorofila. En esta investigación se propuso evaluar el efecto del uso de la luz LED de espectro completo (que hace énfasis en la luz roja y azul) en la respuesta fisiológica de las vitroplántulas obteniendo resultados significativos en relación a la concentración de clorofila A, B y total con 4.28, 2.78 y 7.06 μl respectivamente, frente a 2.38, 1.66 y 4.04 para Luz Fluorescente Blanca, corroborando lo anteriormente mencionado. Así mismo, una mayor concentración de clorofila denota una mejor respuesta fotosintética que se observó en la Tasa de Crecimiento (TC) que fue superior en los tratamientos bajo luz LED de espectro completo (2.25cm frente a 1.58cm en LFB).

En esta investigación sólo se realizaron 3 subcultivos ya que Lozano, 2014 demuestra en sus investigaciones en la var. Lempira que a partir de un quinto subcultivo se evidencia reducción en la obtención de brotes, así también que los explantes deben ser cultivados en medio fresco cada 21 días puesto que después de dicho tiempo se evidencia necrosis. Dichos resultados apoyan lo mencionado por De Feria *et al.* 2009, quien demuestra como los componentes del medio cultivo van agotándose a través de los días, y que a partir de los 28 días la mayor parte de los macro, micronutrientes y las fitohormonas ya han sido consumidas. Así también, hay que resaltar que la finalidad de la micropropagación *in vitro* es la de mantener la pureza genética en los clones de forma inalterada, es así que Etianne *et al.* 2016 afirman que en las primeras réplicas de los cultivos *in vitro* poseen una variación somaclonal baja (1,3%); sin embargo, este porcentaje va en aumento (25%) en cultivos superiores a 6 meses, por lo que recomiendan no realizar muchas réplicas, ni mantener por mucho tiempo *in vitro* a las plántulas.

11.4 Determinación de la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen la mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*.

En muchos casos el enraizamiento, es decir, la formación de raíces adventicias en la base del esqueje, es un proceso espontáneo, pero en especies recalcitrantes se ha comprobado que la aplicación de IAA e IBA, o auxinas sintéticas como ANA, estimulan el enraizamiento. La formación de raíces adventicias en esquejes es un proceso complejo que consta de, al menos, dos etapas: la formación de primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de las raíces. Ambas etapas requieren auxina, aunque en cada una de ellas las necesidades son diferentes y dependen de la especie (Azcón-Bieto y Talón, 2003). En esta investigación se

evaluaron tres auxinas (ANA, IAA e IBA) en el enraizamiento de *Coffea arabica* var. *Geisha* (en todos los casos que hubo enraizamiento se evidenció raíces pivotantes), según Barrie-Etienne *et al.* 2002 demuestra que *Coffea arabica* es una especie significativamente recalcitrante al enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* lográndose sólo un porcentaje de 30 a 50% de supervivencia de plantas con un buen fenotipo, dichos resultados difieren de los obtenidos en esta investigación donde se obtuvo tasas de mortalidad muy bajas menores a 6 % aproximadamente. En cuanto a la formación de raíces se denota diferencia significativa entre el uso de ANA y el uso de IAA o IBA con 2.46 y 2.93 aproximadamente a 2 mg/l respectivamente, resultados similares mostró Lozano, 2014 quien no obtuvo formación de raíces en medios de cultivo con ANA; Ebrahim *et al.* 2007 al evaluar las tres auxinas en el enraizamiento de *Coffea* llegaron a la misma conclusión (logrando el máximo número de raíces en IAA e IBA a 3mg/l mientras que en ANA no obtuvo resultados). En contraste, autores como Lucero, 2013 logró el mayor número de raíces con el uso de 2mg/l de IBA con 3.09 de promedio. Estos resultados pueden deberse a la naturaleza química de la auxina, ya que como describe Azcón-Bieto y Talón, 2003 existe mayor aceptación y sensibilidad de las células vegetales por las auxinas naturales como IAA e IBA posiblemente por la presencia de su anillo indólico, el cual no se encuentra en auxinas sintéticas como ANA que posee anillo naftalénico.

Con respecto a la influencia del tipo de longitud de onda, se observaron diferencias en el número y longitud de raíces obtenidas en ambos ensayos, estos resultados son similares obtenidos con Murillo *et al.* 2016, quienes evaluaron el efecto de las ondas de luz en el cultivo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, llegando a la conclusión que las luces de espectro completo (azul y roja) si bien influye positivamente en la obtención de biomasa, es contraproducente en el enraizamiento, afirmando que los receptores de luz roja (fitocromo A y

B) tienen efecto inhibitorio sobre la elongación y formación de raíces, y que la luz blanca emite menor proporción de radiación en la región roja, estimulando el enraizamiento junto con la luz verde.

11.5 Establecimiento de un sistema de aclimatación de plántulas de *Coffea*

***arabica* L. var. *Geisha* a condiciones ambientales (*ex vitro*).**

El sustrato actúa de soporte, indispensable para mantener la humedad, aireación y nutrición; debe de asegurar, además del soporte, un buen drenaje para que no permanezca el agua a nivel de las raíces y genere pudrición. INFOAGRO, 2017 indica que un buen medio de enraizamiento debe estar limpio (aunque no necesariamente estéril), húmedo y bien aireado. Si su capacidad de retención de agua es baja se puede mejorar adicionando aserrín, turba, vermiculita u otros materiales. En esta investigación se probaron 3 tipos diferentes de sustratos estériles, los cuales no tuvieron diferencia significativa en la tasa de aclimatación (Prueba de Kruskal-Wallis $p=0.323 \geq 0.05$); en el ensayo uno (E1) se utilizó arena 1:1 turba con una tasa de aclimatación del 0.78, en el ensayo dos (E2) se utilizó tierra preparada 1:0 con una tasa de aclimatación de 0.78 y en el ensayo tres (E3) se utilizó tierra preparada 2:1 musgo con una tasa de aclimatación de 1; estos resultados son similares con los mostrados por El Gaward *et al.* 2012 quienes obtuvieron una tasa de aclimatación de 0.72 usando el sustrato E1; sin embargo, difieren de los obtenidos por el mismo equipo de El Gaward *et al.* 2012 quienes usando el sustrato E2 obtuvieron una tasa de aclimatación de 0.48; así también, se difiere con los resultados obtenidos por Gebremariam, 2017 y Barry-Etienne *et al.* 2002 quienes lograron una tasa de aclimatación del 0.87 y 0.63 respectivamente usando el sustrato E3.

Con respecto a la altura lograda por las plantas en aclimatación sobresale por mucho el sustrato E3 (tierra preparada 2:1 musgo) con una altura promedio de 2.30cm en comparación con los sustratos E1 y E2 con alturas promedios de 1.24 y 1.28cm respectivamente; esto puede deberse a la compactación, poca aireación y exceso de humedad del sustrato E1; mientras que el segundo sustrato no retiene suficiente humedad, se compacta y se endurece con facilidad; En contraste, la adición de musgo en el sustrato E3 permitió la circulación de aire, la retención adecuada de agua y evitó la compactación de las raíces, permitiendo el desarrollo adecuado de las plantas, cumpliendo con las especificaciones de un buen sustrato con alta retención de humedad, buen drenaje, que permita la aireación y sin compactación, propuestas por Lucero, 2003 quien evaluó la aclimatación *ex vitro* de plantas de *Coffea canephora*.

XII. CONCLUSIONES

- Se logró obtener 100% de explantes de *Coffea arabica* var. *Geisha* asépticos mediante el aislamiento de embriones cigóticos obtenidos a partir de semillas esterilizadas en hipoclorito de calcio al 10% por 2 horas, inmersión en etanol al 70% por 5 min y nuevamente una desinfección en hipoclorito de calcio al 30% por 10 min.
- Se estableció que las sales del medio MS a la mitad de concentración permiten una germinación óptima del 90%, con un buen sistema radicular (promedio 5.56cm) y la mayor vigorosidad (altura promedio 4.19cm) a 90 días de cultivo *in vitro*.
- Se logró establecer que el medio de multiplicación MS ½, suplementado con 10mg/l de 6-BAP y sin la adición de vitaminas, permite obtener el mayor coeficiente de multiplicación (8.2 yemas/explante) a 30 días de cultivo *in vitro*.
- Se logró evidenciar que las luces LED de Espectro Completo permiten incrementar la Tasa de Crecimiento (TC) a 2.25; así como aumentar la concentración de la clorofila A, B y Total a 4.28, 2.78 y 7.06 µ/l respectivamente.
- Se estableció que los dos mejores medios para el enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* var. *Geisha* fueron el medio MS ½ suplementado con IAA a 1mg/l (2.6 raíces y 1.06cm de longitud de promedios); y el medio MS ½ suplementado con IBA a 1mg/l (2.8 raíces y 1.26cm de longitud de promedios) en Luz Fluorescente Blanca.
- Se logró obtener la supervivencia del 100% de plantas aclimatadas a condiciones ambientales en el sustrato compuesto por tierra preparada:musgo en proporción 2:1 con 2.30cm de altura en promedio.

XIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la adición de 1g/l de carbón activado al frasco con agua destilada que contiene a las semillas que permanecerán sumergidas pre extracción de embriones cigóticos, a fin de adsorber algunos exudados.
- Realizar ensayos de micropropagación clonal en otros medios de cultivo como WPM, medio Yasuda o el medio MS modificado en el cual se elimine el $\text{NH}_4(\text{NO}_3)$ y se duplique el KNO_3 a fin de evaluar la variación del coeficiente de multiplicación y la tasa de crecimiento.
- Se recomienda hacer un estudio a profundidad del efecto de cada una de las vitaminas en el cultivo *in vitro* de *Coffea arabica* L.
- Se recomienda realizar la metodología planteada en esta investigación en otras variedades de *Coffea arabica* L. a fin de evaluar una validez externa de la investigación.
- Se Se recomienda evaluar el efecto de concentraciones superiores a 10mg/l de 6-BAP en el coeficiente de multiplicación.
- Se recomienda realizar un análisis molecular a las plantas obtenidas a partir de la micropropagación clonal *in vitro* de *C. arabica* var. *Geisha*, a fin de evaluar la tasa de variabilidad genética de la técnica.
- Se recomienda realizar ensayos de resistencia entre las plantas obtenidas por la técnica de micropropagación clonal frente a *Hemileia vastatrix*.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu, S. (2015).** Las propiedades del café y su consumo adecuado. *Radio Programas del Perú (RPP)*. Recuperado de: <https://rpp.pe/lima/actualidad/las-propiedades-del-cafe-y-su-consumo-adecuado-noticia-830812?ref=rpp>. Recuperado de <https://rpp.pe/lima/actualidad/las-propiedades-del-cafe-y-su-consumo-adecuado-noticia-830812?ref=rpp>
- AGENCIA AFP (2020).** Café geisha, el exótico y carísimo grano panameño que supera los US\$ 1,000 por libra. *Diario Gestión*. Mundo. Recuperado de <https://gestion.pe/mundo/cafe-geisha-el-exotico-y-carisimo-grano-panameno-que-supera-los-us-1000-por-libra-video-nndc-noticia/>
- Aleman, E., Mbogholi, A., Fung, Y., Gonzáles, J., & Chalfun, A. (2014).** Effects of EMFs on Some Biological Parameters in Coffee Plants (*Coffea arabica* L.) Obtained by *in vitro* Propagation. *Pol. J. Environ. Stud.*, 23 (1): 95-101.
- Alvarado, M. & Rojas, G. (2007).** *Cultivo y Beneficiado del Café*. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003).** Citoquininas. *Fundamentos de Fisiología vegetal*. (pp.425). Barcelona, España: Sello Editorial McGraw-Hill.
- Azofeifa, A. (2009).** Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20 (1): 153-175
- Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Vásquez, N., & Etienne, H. (2002).** Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: Morphological, mineral and water characteristics. *Ann Bot.*, 90 (1):77-85.
- Blanco, A. (2008).** *Preparación de medios de cultivo*. Región Metropolitana, Chile: DUOC UC
- Bohórquez, D., Agudelo, I., Gómez, F., Cuéllar, A., Marín, A. Pachón,R., & Mendoza, G. (2005).** Identificación de algunos compuestos responsables del sabor en el café. *Revista Colombiana de Física*, 37(1) 13-16
- Bojórquez, J., Sánchez, L., Gamboa, N., Quintal, F., Minero, Y., Martínez, M.,...De los Santos, C. (2011).** Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination of coffee zygotic embryos. *African Journal of Biotechnology*, 10 (82): 19056-19065. doi: 0.5897/AJB11.2794

- Castillo, A. (2008).** Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, *Las Brujas, Uruguay: AR- VITRO, INIA*, 8 p.
- CDC (2021).** *Hypoclorito de sodio e hipoclorito de calcio*. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Riesgo de Enfermedades. Recuperado de https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts184.html
- CESVVER (2020).** *Roya del Cafeto (Hemileia vastatrix)*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Recuperado de <http://www.cesvver.org.mx/roya-del-cafe-hemileia-vastatrix/>
- Coffee IQ (2019).** *Café arábica, Características*. Bogotá, Colombia: CoffeeIQ. Recuperado de: <https://www.coffeeiq.co/cafe-arabica-caracteristicas/>
- CropLife Latino America (2020).** *Roya del cafeto (Hemileia vastratrix)*. San José, Costa Rica: CropLife Latin America. Recuperado de: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/roya-del-cafeto>
- De Feria, M., Jiménez, E., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M. & Quiala, E. (2009).** Determinación del contenido de los principales componentes del medio de cultivo durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Biotecnología Vegetal*, 9 (3): 131 - 139
- Díaz, C., & Carmen, M. (2017).** Línea Base del Sector Café en el Perú (Documento de Trabajo). *Programa de Green Commodities*. Secretaria de Estado para Asuntos Económicos SECO. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Recuperado de https://www.cooperacionsuiza.pe/wp-content/uploads/2016/04/linea_de_base_sector_cafe
- Duhem, K., Le Mercier, N., & Boxus, P. (1988).** Difficulties in the establishment of *axenic in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. *International Society for Horticultural Science*, 225 (7): 67-76. doi : 10.17660/ActaHortic.1988.225.7
- 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.
- EFE SERVICIOS (2017).** Café geisha natural panameño marca récord en cata de cara a subasta. *Diario La Estrella de Panamá*. Vida y Cultura, Gastronomía. Recuperado de: <http://laestrella.com.pa/vida-de-hoy/gastronomia/cafe-geisha-natural-panameno-marca-record-cata-cara-subasta/24004196>

- Eira, M., Da Silva, E., De Castro, R., Dussert, S., Walters, C., Bewley, D. & Hilhorst, H. (2006).** Coffee seed physiology (minireview). *Braz. J. Plant Physiol*, 18 (1): 149-163
- El Gawad, A., Nehad, M., Madhy, H., & Boshra, E. (2012).** *In vitro* micropropagation protocol and acclimatization of coffee trees (*Coffea arabica* L.). *J. Plant Production*, 3 (1):109 – 116.
- Etienne H., Bertrand B., Dechamp E., Maurel P., Georget F, Guyot R., & Breitler J. (2016).** Are genetics and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. *Human Genetics and Embryology*, 6 (136): 1-5. doi: 10.4172/2161-0436.1000136
- Ewind G., Hall M. & Klerk D. (2008).** *Plant Propagation by tissue culture*. Recuperado de: <https://investigacionfitopatologiaamar.files.wordpress.com/2016/06/plant-propagation.pdf>
- Excelencias Gourmet (2014).** Café Geisha de Panamá, uno de los aromáticos más caros del mundo. *Excelencias Gourmet*. Mixología. Recuperado de <https://www.excelenciasgourmet.com/es/noticia/cafe-geisha-de-panama-uno-de-los-aromaticos-mas-caros-del-mundo>
- Fribourg, G. (2017).** *Reguladores de crecimiento en el cultivo de ají escabeche (Capsicum baccatum var. pendulum) en el Valle de Cañete*. (Tesis de grado). Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Garay, A., De la Paz, M., García, B., Álvarez, E., & Gutiérrez, C. (2014).** La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB*, 33(1): 13-22.
- Gatica, A. (2002).** *Regeneración de plantas de café (coffea arabica cv. caturra y catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja*. (Informe de Práctica de especialidad). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- George, E. (1996).** Plant propagation by tissue culture; part 2. *In Practice*. 2 ed. Exegetics Limited. England.
- Gil, A., López, S. & López, A. (2017).** Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa* 24 (1), 343-350. doi: 10.22497/arnaldoa.241.24116
- Grebemariam, E. (2017).** *In vitro* Propagation of *Coffea arabica* cv. MCH2 Using Nodal Explants. *Journal of Natural Sciences Research*, 7 (1): 17-21.
- Green, D. (2018).** Espectro de luz y plantas. *Botánica*. El Laboratorio de Todogrowled. Recuperado de <http://laboratorio.todogrowled.com/espectro-de-luz-y-plantas>

- Hermoso, L., Suárez, L., Etienne, H., Bertrand, B., Barry-Etienne, D., & Menéndez-Yuffá, A. (2018).** Semejanza entre el crecimiento en vivero de cafetos (*Coffea arabica* L.) obtenidos por embriogénesis somática y por semillas. *Revista Diversidad Neotropical*, 8 (3) 168-178. doi: 10.18636/bioneotropical.v8i3.228
- Hidalgo, C. (2014).** *Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao (Theobroma cacao L.) a través de embriogénesis somática.* (Tesis de grado). Universidad de Guayaquil, Daule, Ecuador.
- HIMEDIALABS. (2017).** *Product Information: Murashige & Skoog Medium.* Mumbai, India.: HiMedia Laboratories. Recuperado de: <http://himedialabs.com/TD/PT021.pdf>
- Hiscox, J., & Israelstam, G. (1979).** A Method for Extraction of Chlorophyll from Leaf Tissue without Maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57 (12): 1332-1334. doi: 10.1139/b79-163
- ICAFE (2011).** *Guía Técnica para el Cultivo del Café.* Heredia, Costa Rica: ICAFE-CICAFE. Recuperado de: <http://www.icafe.cr/>
- IICA (2019).** *El IICA alerta por impactos negativos de los bajos precios del café y llama a gobiernos y a sector privado a encontrar soluciones.* Recuperado de <https://www.iica.int/es/prensa/noticias/el-iica-alerta-por-impactos-negativos-de-los-bajos-precios-del-caf%25C3%25A9-y-llama>
- INFOAGRO (2017).** Características del sustrato ideal. *Artículos.* Recuperado de <https://mexico.infoagro.com/caracteristicas-del-sustrato-ideal/>
- Integrated Taxonomic Information System (2020).** *ITIS Report: Coffea arabica L.* U.S.: ITIS Publishing. Recuperado de: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35190#null
- Internacional Coffea Organization (2020).** *Aspectos botánicos: About Coffee.* Londres, Inglaterra: ICO Publishing. Recuperado de: http://www.ico.org/es/botanical_c.asp
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006).** Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal.* (pp.19). La Serena, Chile: Sello Editorial de la Universidad de La Serena.
- Junta Nacional del Café (2019).** *Miles de productores abandonan cafetales y marchan a buscar trabajo en zonas de cultivo de coca.* Recuperado de <https://juntadelcafe.org.pe/2019/02/>
- Kartha, K., Mroginski, L., Pahl, K., & Leung, N. (1981).** Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. *Plant Science Letters*, 22 (4): 301-307. doi: 10.1016/0304-4211(81)90075-4

- Kew Science (2017).** *Coffea arabica L.* Plants of the world online. Recuperado de <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:747038-1>
- Lepodorowski, N. (2013).** La roya: el despiadado enemigo del café que ataca a Centroamérica. *BBC News. Mundo.* Recuperado de: https://www.bbc.com/mundo/noticias/2013/01/130123_despiadado_enemigo_cafe_centroamerica
- Londoño, L., & Orozco, F. (1986).** Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo “*in vitro*”. *Cenicafé*, 37 (4): 119-133.
- López, E., López, A., & De la Cruz, A. (2017).** Efecto del ácido giberélico en la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, “estevia”. *Arnaldoa*, 24 (2): 599 – 608. doi: 10.22497/arnaldoa.242.24211
- Lozano, G. (2014).** *Propagación in vitro de café (Coffea arabica) -variedad Lempira- a partir de meristemas.* (Proyecto de grado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Lozano, M. (2012).** Las Vitaminas en las Plantas. *Bonsaime.* Recuperado de <http://www.bonsaime.com/biblioteca/articulo/las-vitaminas-en-las-plantas#>
- Lu, A. (2020).** Perú: El 2020 tampoco sería un buen año para el café. *Diario La República.* Economía. Recuperado de <https://larepublica.pe/economia/2020/01/01/peru-el-2020-tampoco-seria-un-buen-ano-para-el-cafe-exportaciones-precios/>
- Marín, P (2017).** Las paradojas del café peruano. *Diario El Peruano.* Recuperado de <https://elperuano.pe/noticia-las-paradojas-del-cafe-peruano-57403.aspx>
- Mesa, N., Medrano, J., Martínez, M., Grave, M., & Cabrera, Y. (2017).** Efecto anticariogénico del café. *Correo Científico Médico*, 21(3), 888-898. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000300022&lng=es&tlng=en
- Morales, R. (2017).** *Propagación in vitro de café (Coffea arabica L.) -variedades Geisha y Sarchimor- a partir de láminas foliares y meristemas axilares.* (Proyecto de grado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Mroginski L, Sansberro P, Flaschland (2010).** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Bioteología y Mejoramiento Vegetal.* Buenos Aires, Argentina: Editorial.
- Murashige, T & Skoog, F. (1992).** A revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(1): 473-797. Recuperado de: <http://files.florestal81.webnode.com/200000040-03153040fe/07%20Artigo%20MS%201962.pdf>

- Murillo M., Pedraza, M., Gutiérrez, N., Rodríguez, M., Lobit, P., & Martínez, A. (2016).** Calidad de luz LED y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (orchidaceae). *Agrociencia*, 50: 1065-1080. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n8/1405-3195-agro-50-08-1065.pdf>
- Naranjo, M., Vélez, L., & Rojano, B. (2011).** Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Rev Cubana Plant Med*, 16(2), 164-173. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000200005&lng=es&tlng=es.
- Patiño, M. (2017).** Mercado del café registra pérdidas millonarias porque no logra despertar el interés de sus recolectores. *Diario Gestión*. Recuperado de <https://gestion.pe/economia/mercado-cafe-registra-perdidas-millonarias-logra-despertar-interes-recolectores-223715-noticia/>
- Peña, Z. & Trujillo, G. (2007).** Identificación de virus que se transmiten a través de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers) en áreas productoras de Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24 (1), 1-21.
- Picay, V. (2017).** *Multiplicación in vitro de café caturra rojo Coffea arabica L. con la interacción de dos fitohormonas*. (Tesis de grado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Porras, A. (2015).** Tipos de muestreo. *Diplomado en Análisis de Información Geoespacial*. CENTROGEO. CONACYT, México. Recuperado de <https://centrogeo.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1012/163/1/19-Tipos%20de%20Muestreo%20-%20%20Diplomado%20en%20An%C3%A1lisis%20de%20Informaci%C3%B3n%20Geoespacial.pdf>
- Puertas, M., Villegas, P., & Alberto, B. (2013).** Borra de café colombiano (*Coffea arabica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres *in vitro*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3): 469-478. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000300013&lng=es&tlng=es.
- Quilambaqui, J. (2003).** El efecto de las Fitohormonas en la fruticultura. *La granja*. Facultad de Ciencias Pecuarias y Agroindustriales. Número (2). p. 3.
- Ramos, Y., Ramírez, E. (2016).** Desarrollo de un sistema de iluminación artificial LED para cultivos en interiores - Vertical Farming (VF). *Informador Técnico*, 80 (2) p 111-120.
- Rodríguez, A., Rodríguez, A., Quintero, S., Torres, A., & Fundora, Z. (2004).** Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (*Musa spp.*) y malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.). *Cultivos Tropicales*, 25 (1): 23-26.

- Rojo, E. (2014).** Café I (G. Coffea). *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 7 (2), 113-132. Recuperado de: <https://eprints.ucm.es/27835/1/1757-2066-1-PB.pdf>
- SENASA (2015).** *Roya Amarilla del Café*. Lima, Perú: SENASA. Recuperado de: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/roya-amarilla-del-cafe-2/>
- SENASA (2016).** *Cafetaleros organizados y SENASA redujeron incidencia de Roya Amarilla del Café al 17%*. Lima, Perú: SENASA. Recuperado de: <https://infosenasa.blogspot.com/2016/05/cafetaleros-organizados-y-senasa.html>
- Sondahl, M., Nakamura, T., & Sharp, W. (1985).** Propagación *in vitro* del café. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. DNA Plant Technology Corporation. Nueva Jersey, Estados Unidos. (pp. 622-640)
- Tamayo, M. (2003).** El proceso de la investigación científica. Incluye evaluación y administración de proyectos de investigación. (cuarta edición). [versión Adobe Acrobat Reader DC]. (pp. 177-178) Recuperado de <https://clea.edu.mx/biblioteca/Tamayo%20Mario%20-%20El%20Proceso%20De%20La%20Investigacion%20Cientifica.pdf>
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (1991).** *Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales*. (N° 221 S). Recuperado de: https://www.upov.int/edocs/pubdocs/es/upov_pub_221.pdf
- USDA NRCS (2020).** *Plants Data Base: Classification for Kingdom Plantae Down to Species Coffea arabica L.* United States Department of Agriculture. Recuperado de <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=COAR2&display=31>
- William, H (1922).** *The Botany of the Coffee plant*. Alejandría, Egipto: Adams Media
- World Coffee Research (2018).** *Las Variedades del Café Arábica*. Portland, E.U: World Coffee Research. Recuperado de: <https://worldcoffeeresearch.org/>
- World Coffee Research (2019).** *Geisha (Panama) Gesha*. Catálogo de Variedades. Café Arábica. Recuperado de <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/es/varieties/geisha>
- Yumbopatin, E. (2017).** *Efecto de soluciones nutritivas a base de semillas germinadas de maíz (Zea mays) y lenteja (Lens culinaris) en el cultivo de fresa (Fragaria annanasa)* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.

XV. ANEXOS

15.1 Figuras

Figura 1. Semillas de *Coffea arabica* L. var. Geisha obtenidas del distrito de Villa Rica, Provincia de Oxapampa, Región Pasco, Perú.



Figura 2. Semillas de *Coffea arabica* L. var. Geisha post choque térmico y sin pergamino (testa).



Figura 3. Esterilización de semillas *Coffea arabica* L. var. Geisha con NaOCl y HgCl₂ para la germinación in vitro con endospermo.

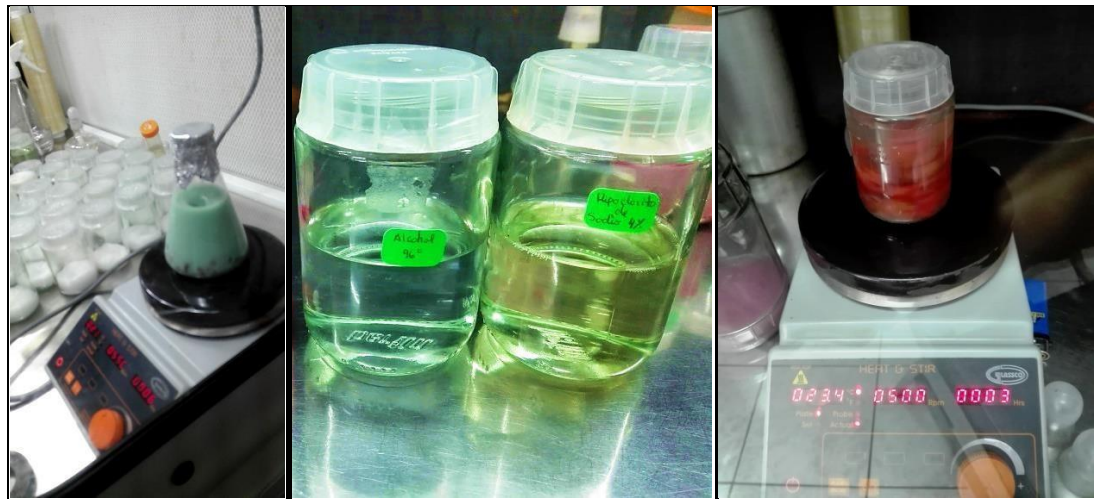


Figura 4. Secuencia de desinfección para la esterilización de *Coffea arabica* L. var. Geisha para el aislamiento de embrión cigótico.



Figura 5. Esterilización de *Coffea arabica* L. var. Geisha para el aislamiento de embrión cigótico.



Figura 6. Semillas de *Coffea arabica* L. var. Geisha estériles y sumergidas por 48 horas en agua estéril con 1g/l previo aislamiento de embrión cigótico.

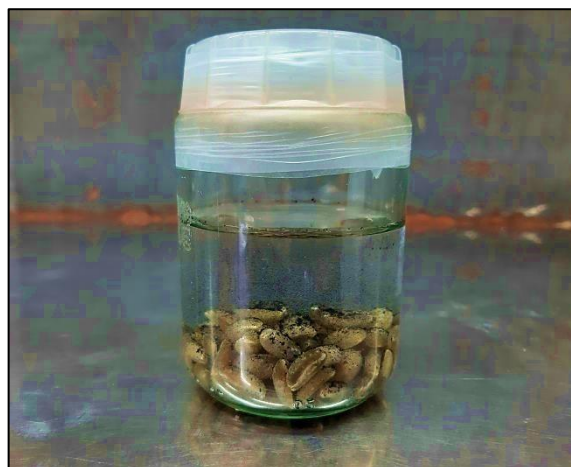


Figura 7. Aislamiento y siembra de embrión cigótico de *Coffea arabica* L. var. Geisha.



Figura 8. Cambio a medio fresco y monitoreo de las plántulas de *Coffea arabica* L. var. Geisha.



Figura 9. Cultivo *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo diferentes longitudes de ondas de luz.



Figura 10. Análisis de concentración de Clorofila A, B y Total.

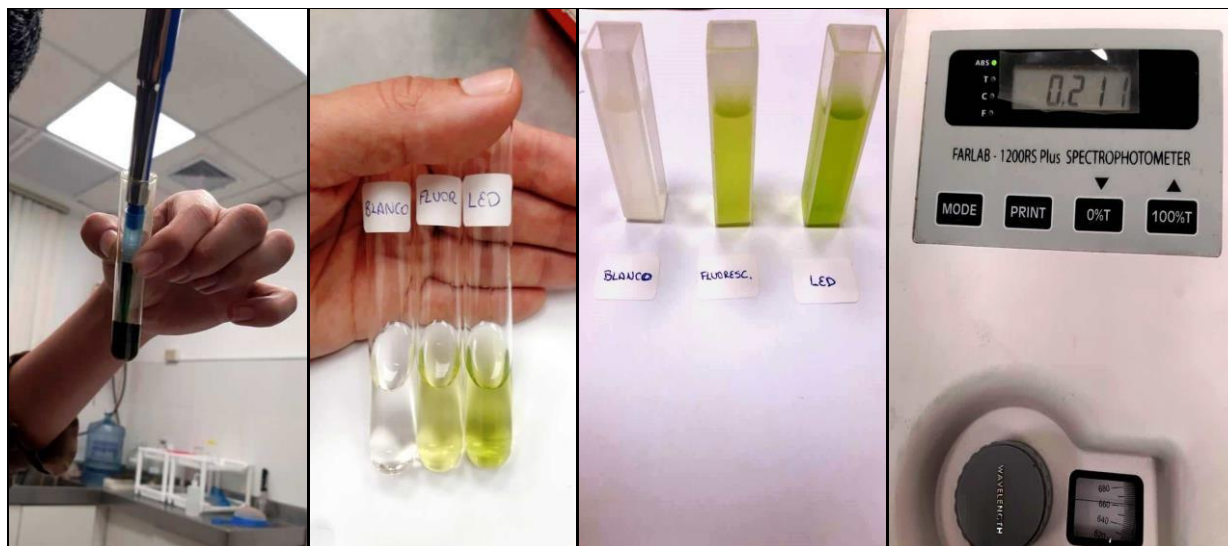


Figura 11. *Aclimatación a condiciones ex vitro de plantas de Coffea arabica L. var. Geisha.*



Figura 12. *Plantas de Coffea arabica L. var. Geisha aclimatadas a condiciones ambientales.*



Figura 13. *Ensayo 2 (E2), germinación in vitro de semillas de Coffea arabica L. var. Geisha*



Figura 14. Porcentaje de contaminación en los ensayos de la germinación *in vitro* de semillas con endospermo de *Coffea arabica* L. var. Geisha.

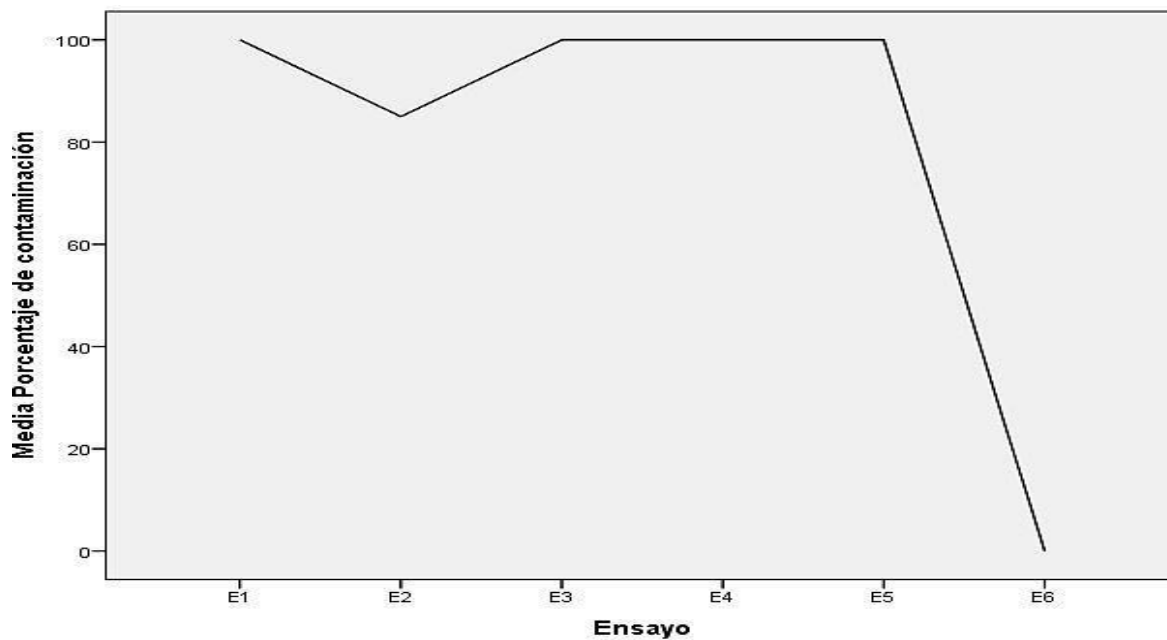


Figura 15. Porcentaje de fenolización en los ensayos de la germinación *in vitro* de semillas con endospermo de *Coffea arabica* L. var. Geisha.

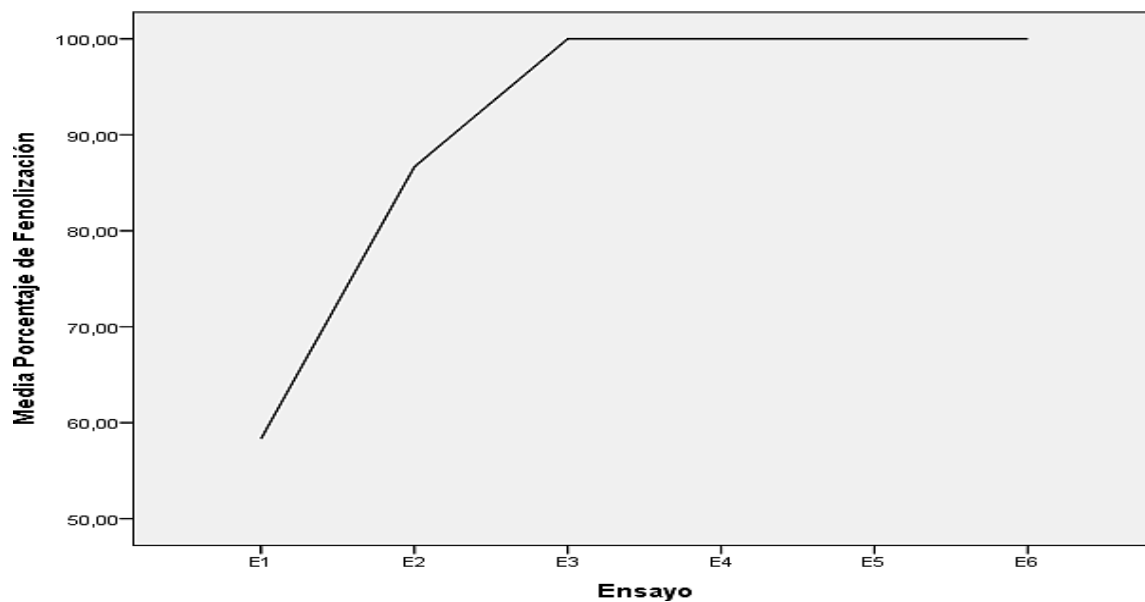


Figura 16. *Ensayo 6 (E6) 0% de contaminación pero 100% de fenolización.*



Figura 17. *Cultivo de embriones cigóticos. 0% de contaminación.*



Figura 18. *Porcentaje de fenolización en el cultivo de embriones cigóticos.*

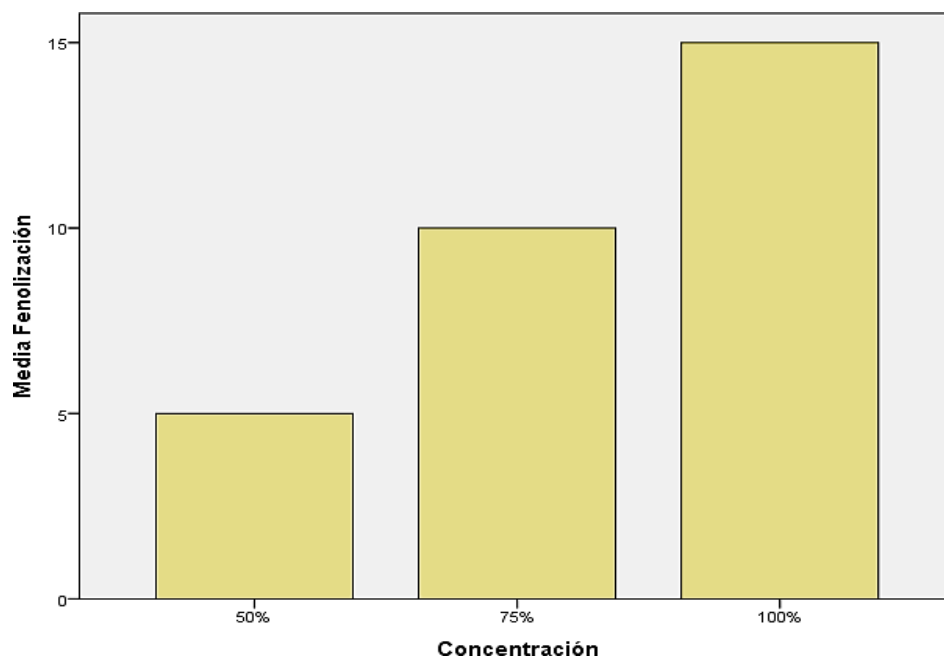


Figura 19. *Porcentaje de Germinación en el cultivo in vitro de embriones cigóticos.*

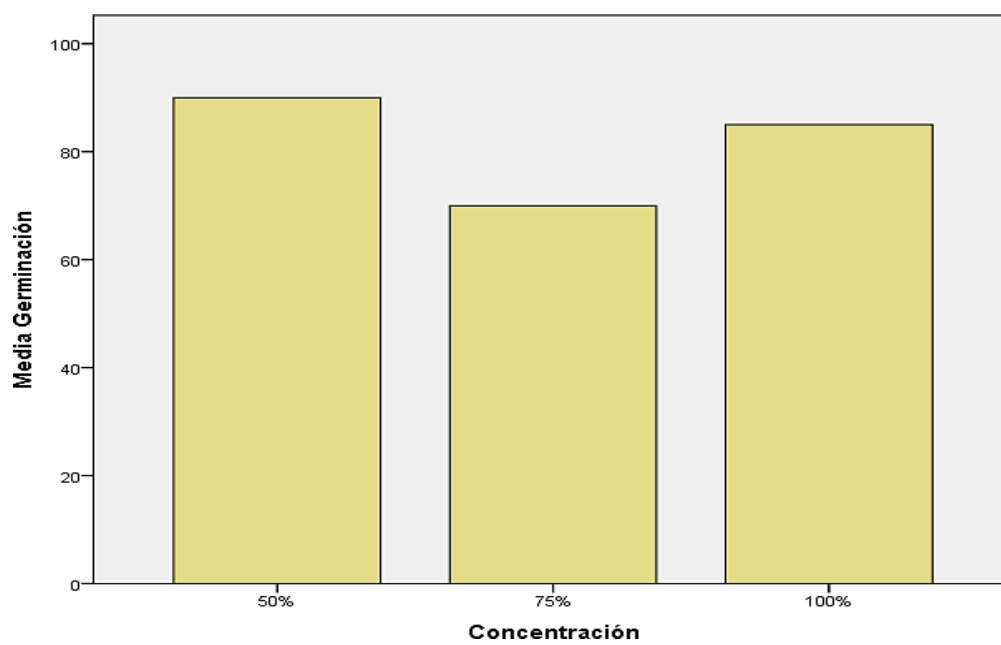


Figura 20. Porcentaje de germinación *in vitro* vs. *Ex vitro*.

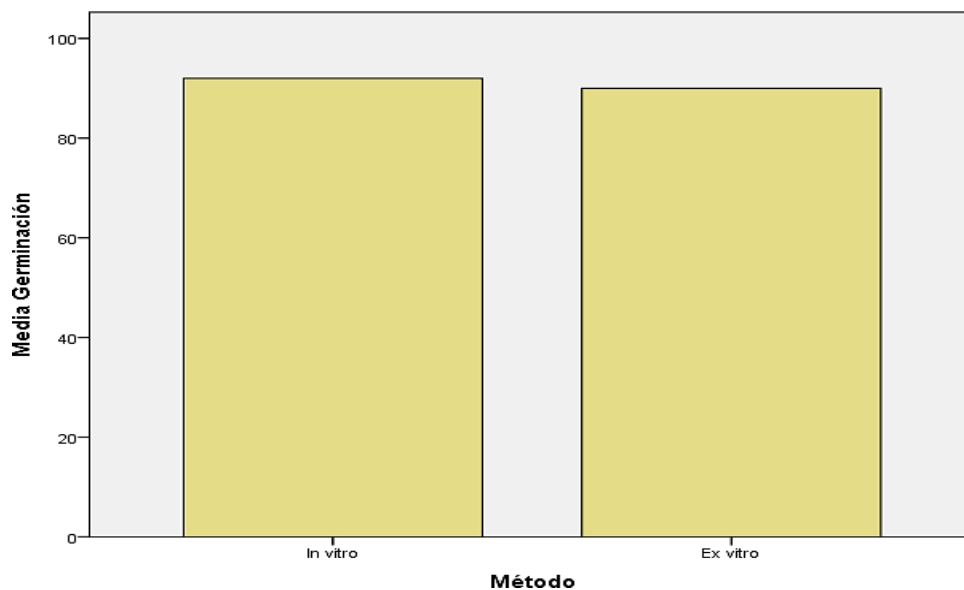


Figura 21. Germinación en condiciones de invernadero (*ex vitro*).

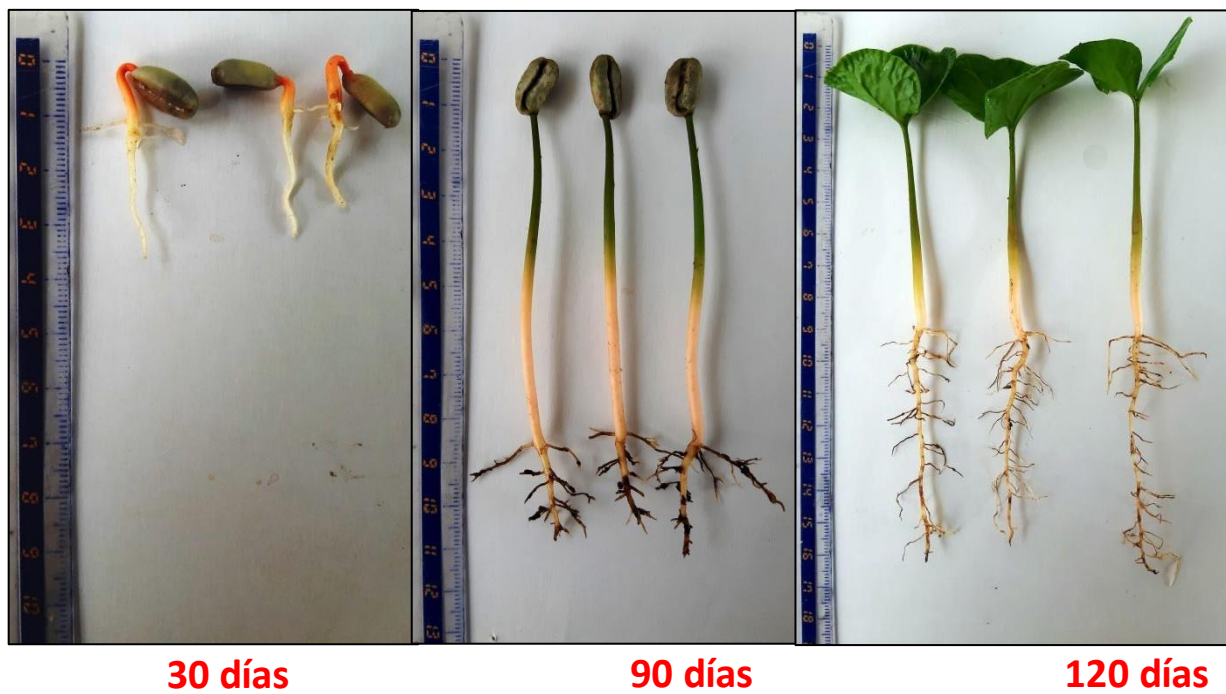


Figura 22. Germinación *in vitro* de embrión cigóticos de *Coffea arabica* L. var. Geisha.

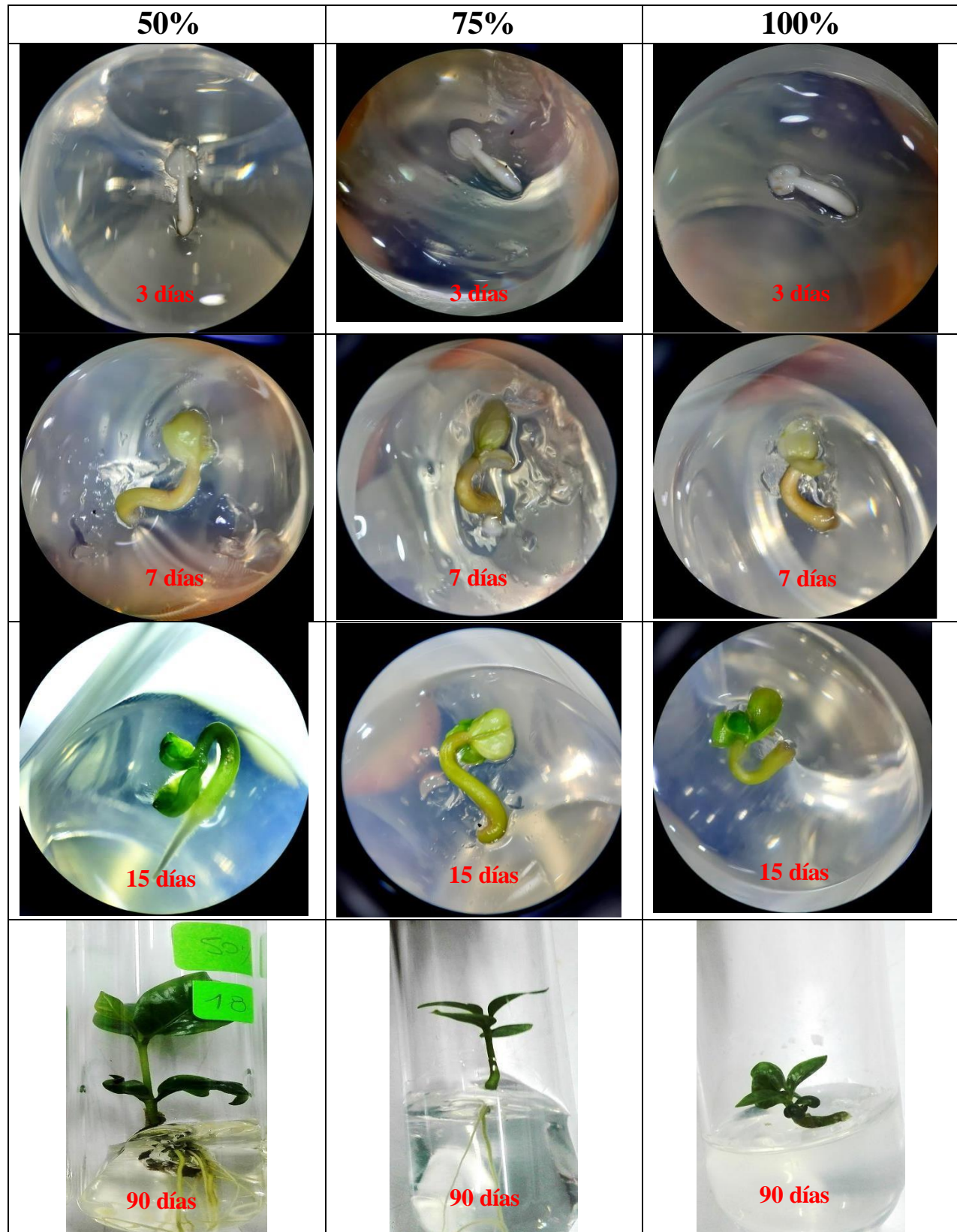


Figura 23. Longitud de raíces de los embriones cigóticos obtenidas en las 3 concentraciones del medio MS. 90 días.

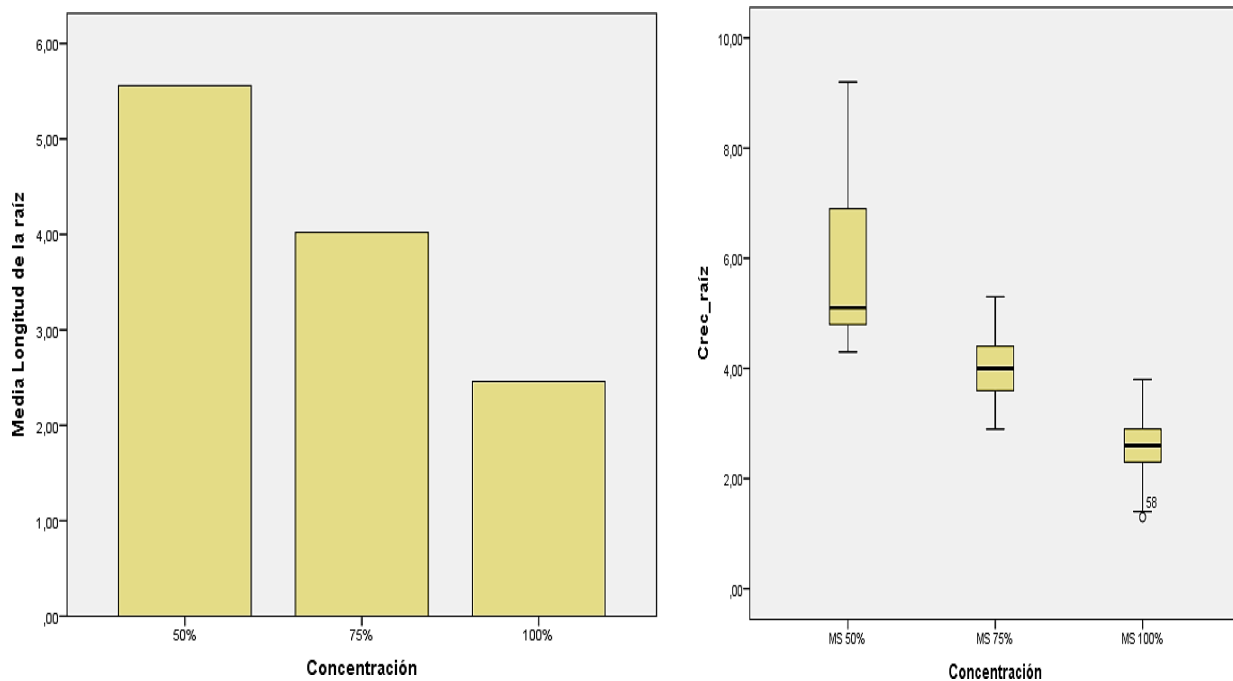


Figura 24. Longitud aérea de los embriones cigóticos obtenidas en las 3 concentraciones del medio MS. 90 días.

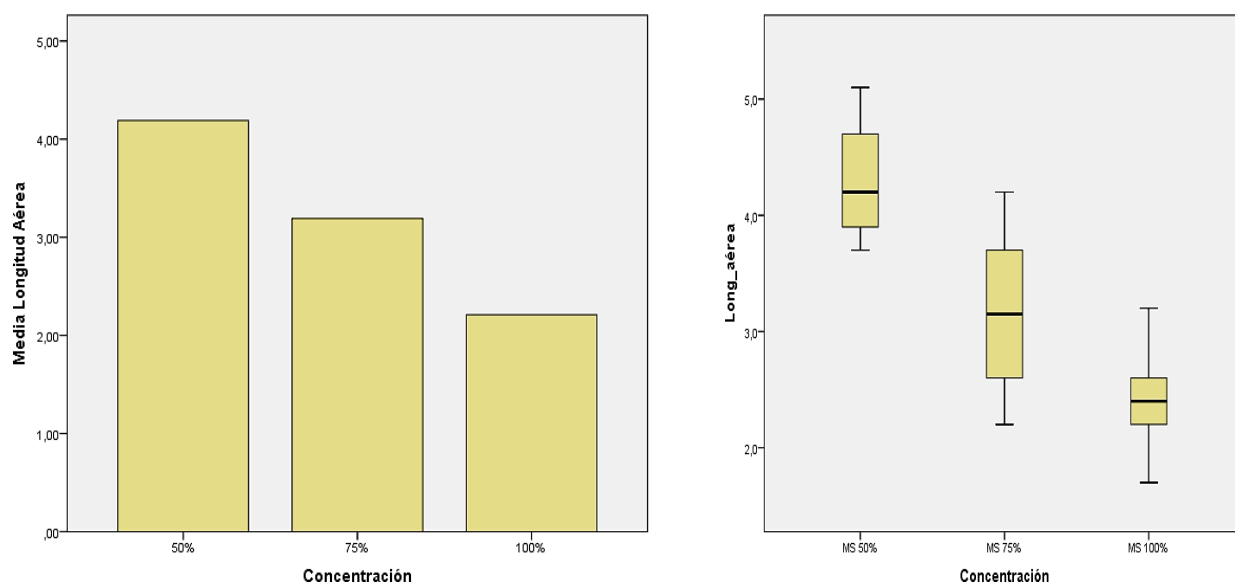


Figura 25. Coeficiente de multiplicación (CM) en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg.

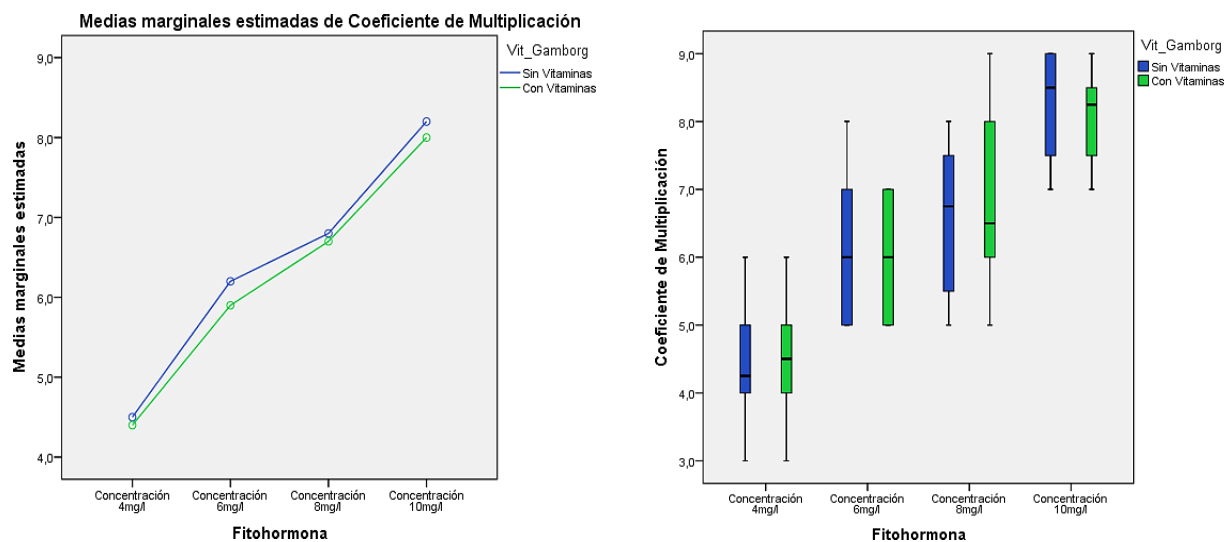


Figura 26. Multiyemas de *Coffea arabica* L. var. Geisha obtenidas bajo la influencia de la fitohormona 6-BAP a 10mg/l de concentración.

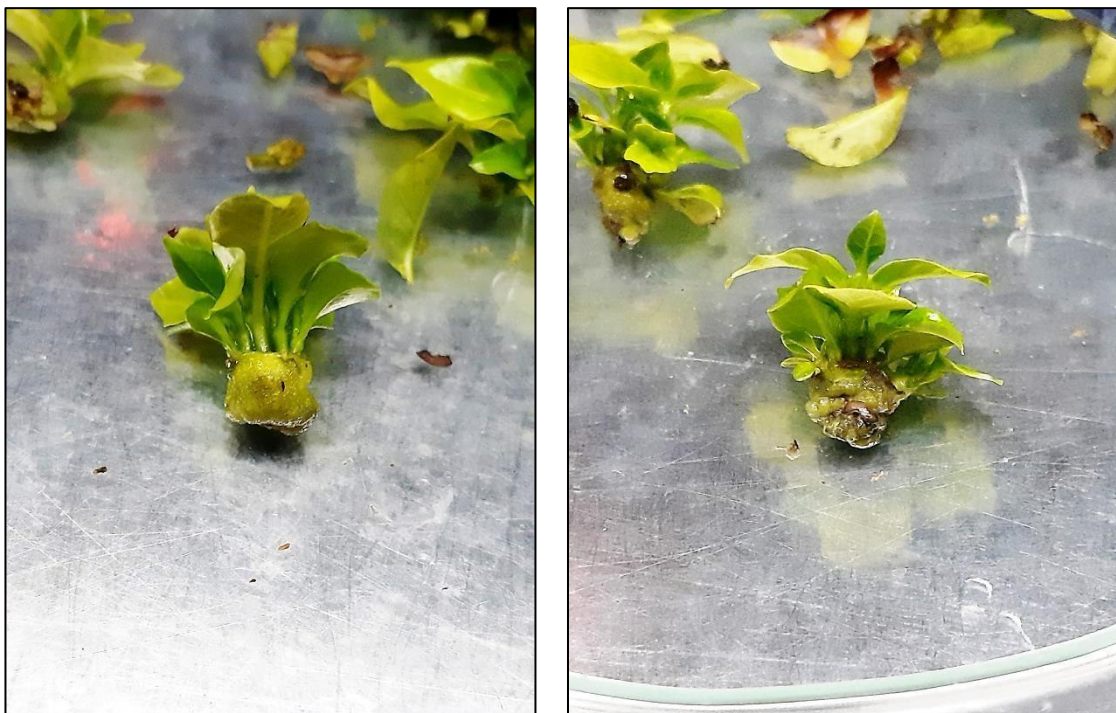


Figura 27. Tasa de Crecimiento (TC) en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg.

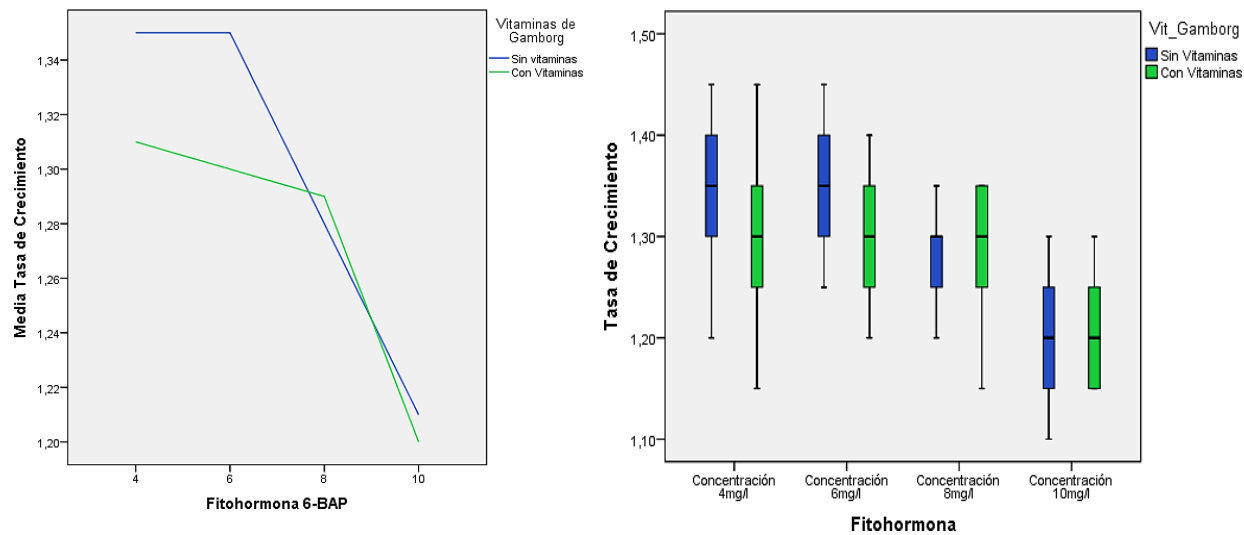


Figura 28. Crecimiento in vitro de las plántulas de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de la fitohormona 6-BAP.

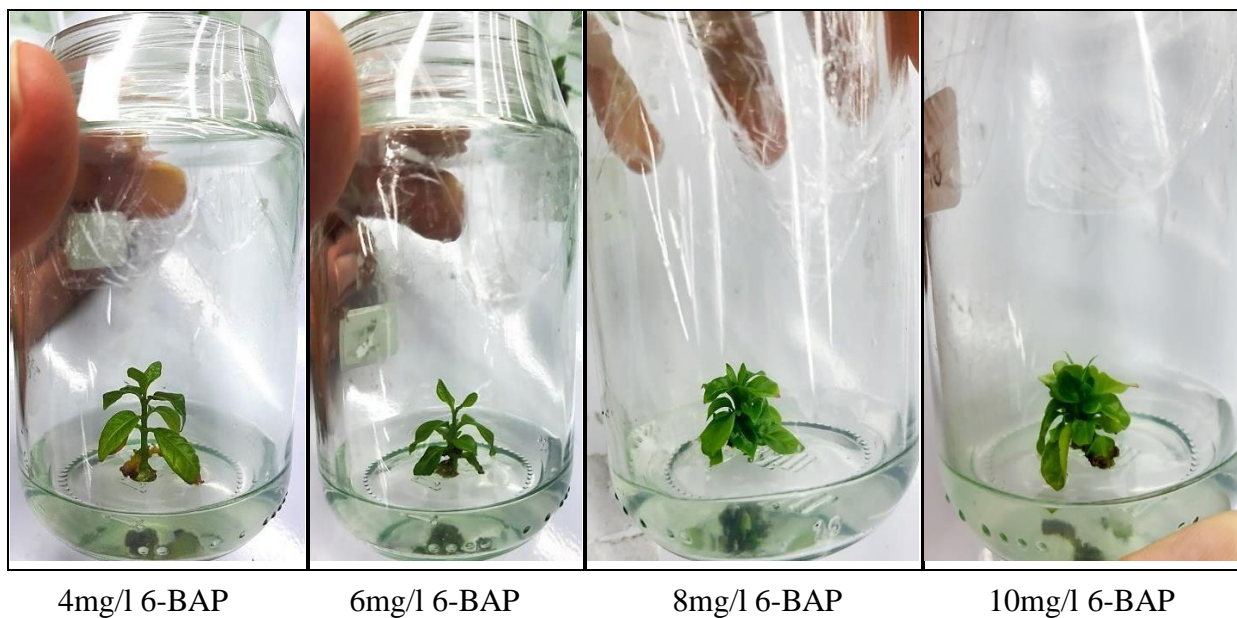


Figura 29. Cantidad de Nudos (CN) en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg.

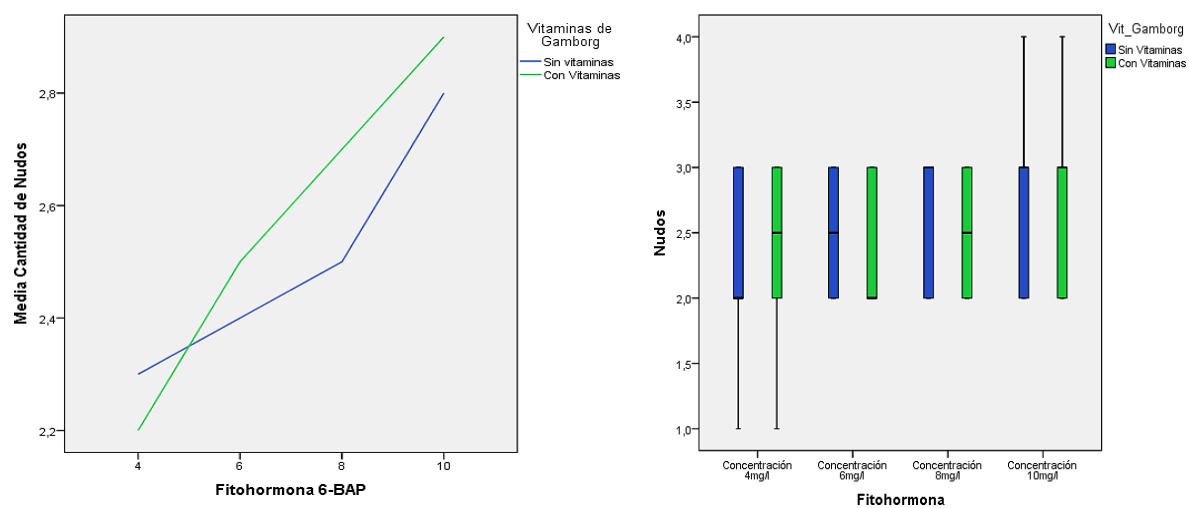


Figura 30. Cantidad de yemas y explantes totales obtenidos en los diferentes ensayos con la fitohormona 6-BAP en presencia y ausencia de las vitaminas de Gamborg.

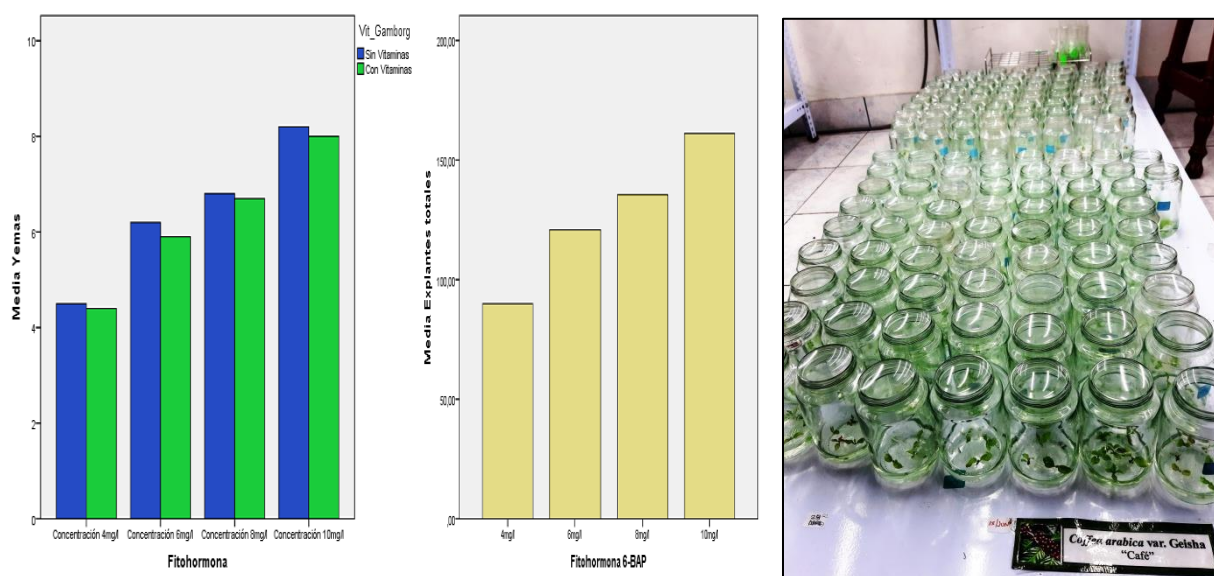


Figura 31. Incidencia de tejido calloso en el cultivo in vitro de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de la fitohormona 6-BAP.

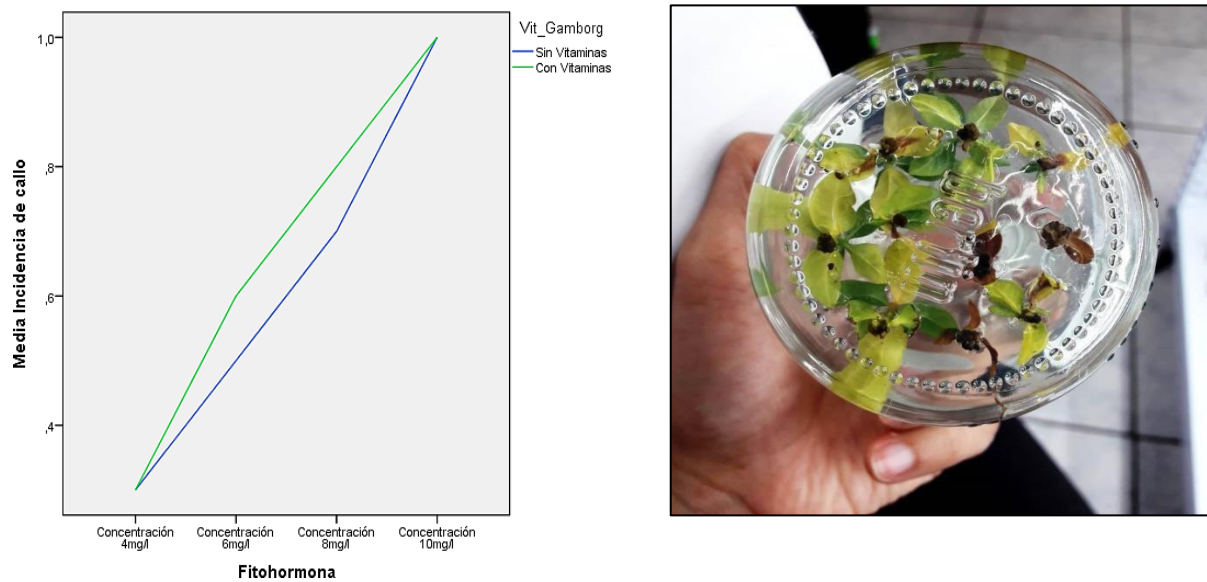


Figura 32. Tasa de Crecimiento (TC) y explantes totales obtenidos en el cultivo in vitro de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de 2 diferentes longitudes de ondas de luz.

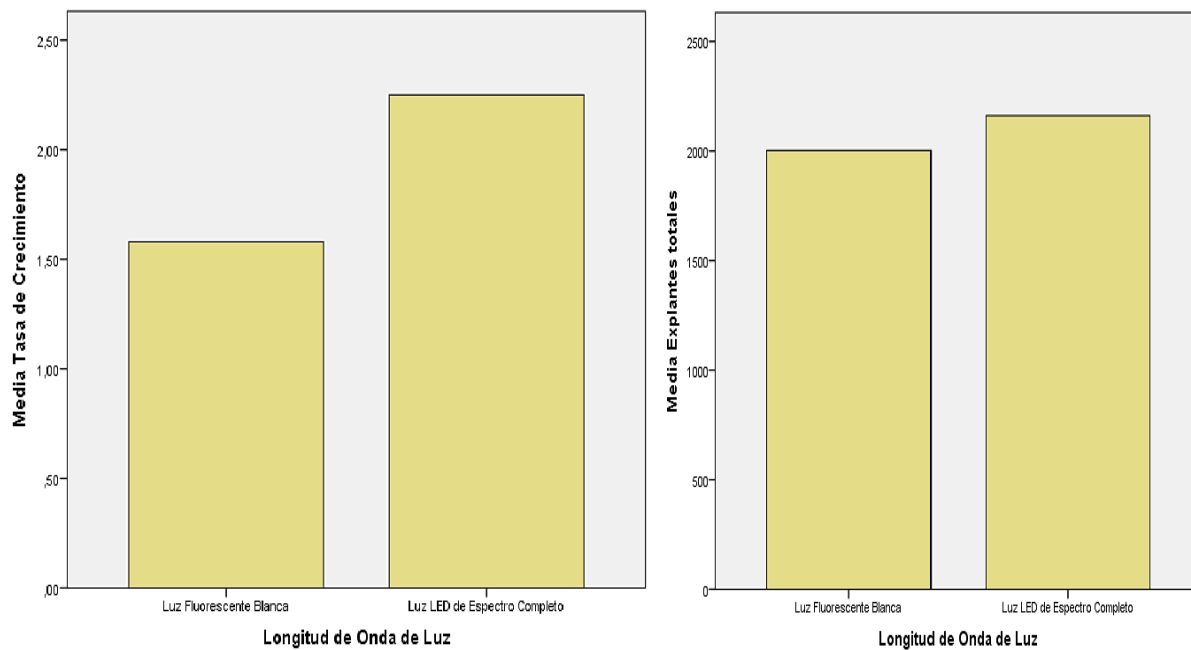


Figura 33. Plántulas de *Coffea arabica* L. var. Geisha cultivadas bajo diferentes longitudes de ondas de luz. 50 días.

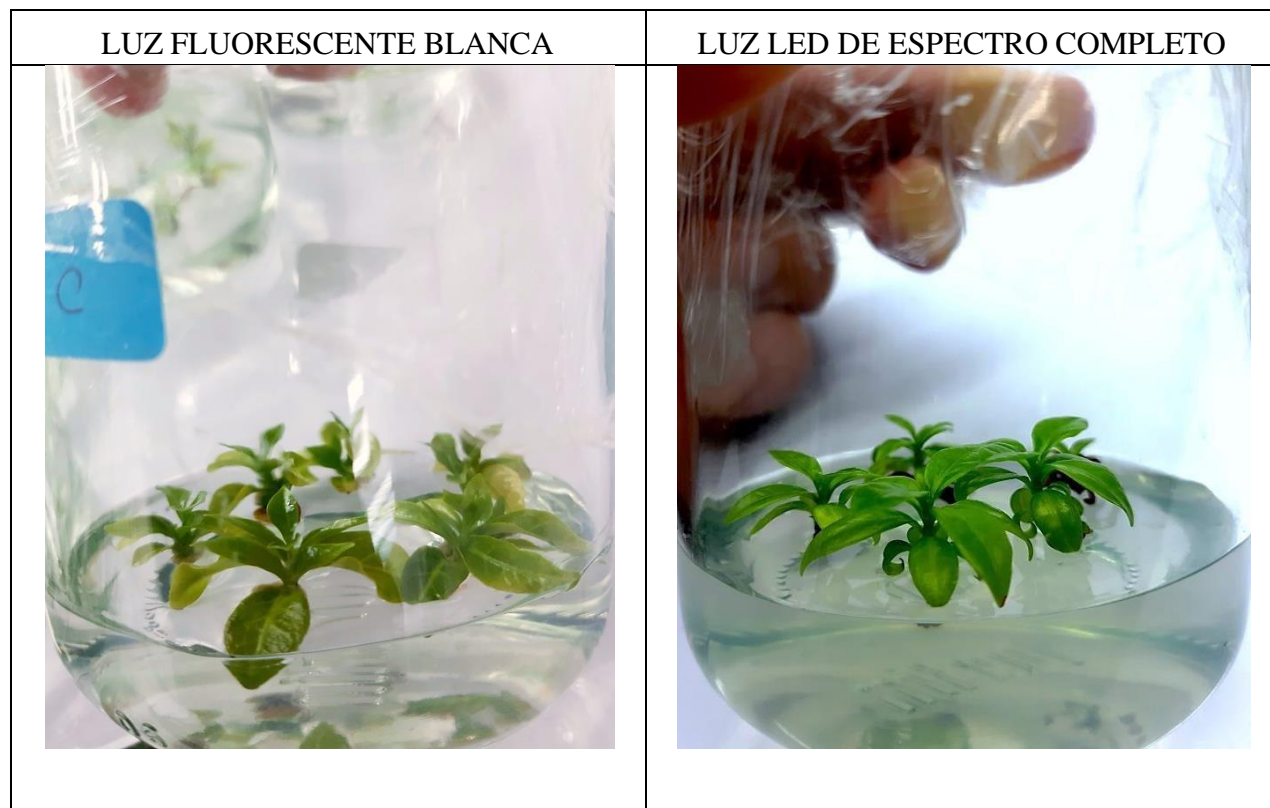


Figura 34. Concentración de clorofila A, B y Total de las plántulas de *Coffea arabica* L. var. Geisha cultivadas bajo diferentes longitudes de ondas de luz. 50 días.

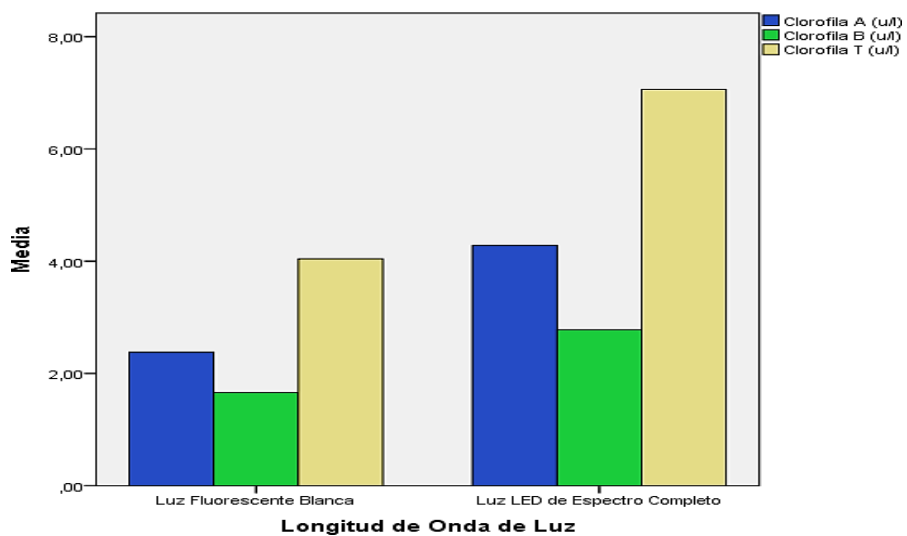


Figura 35. Enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo influencia de Luz Fluorescente Blanca y la auxina ANA en diferentes concentraciones. 60 días.



Figura 36. Enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* bajo influencia de Luz Fluorescente Blanca y la auxina IAA en diferentes concentraciones. 60 días.

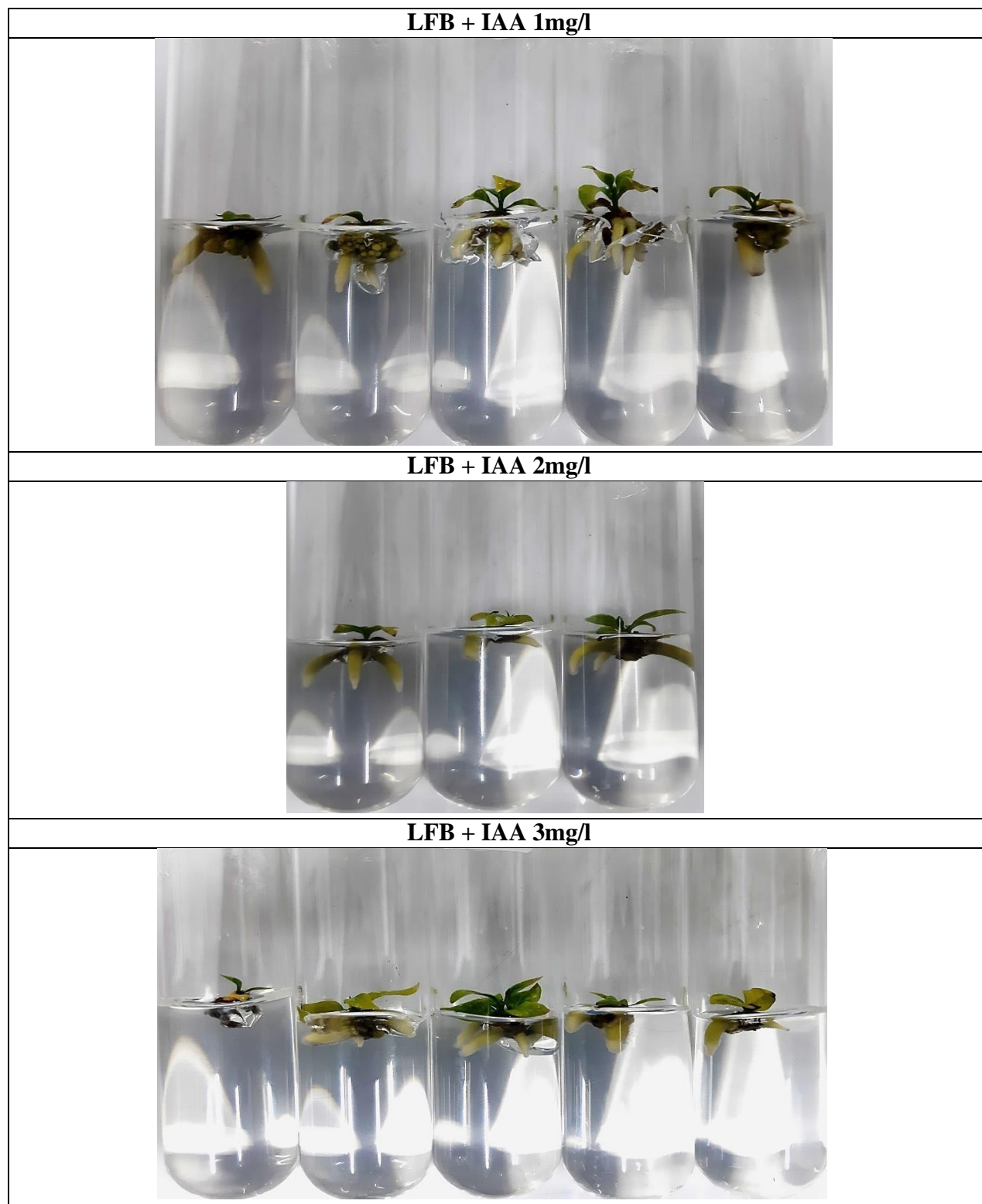


Figura 37. Enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* bajo influencia de Luz Fluorescente Blanca y la auxina IBA en diferentes concentraciones. 60 días.

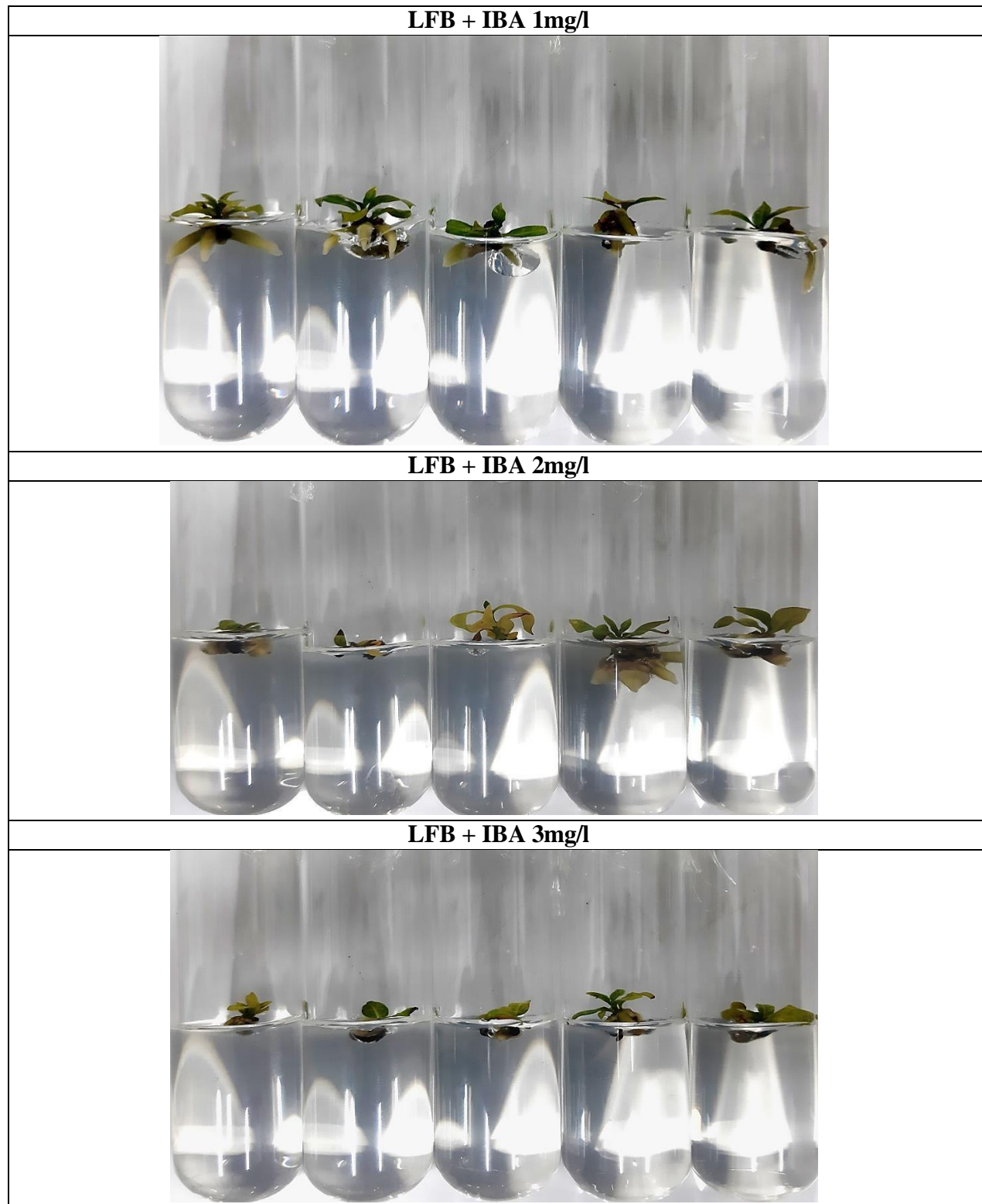


Figura 38. Enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* bajo influencia de Luz LED de Espectro Completo y la auxina ANA en diferentes concentraciones. 60 días.

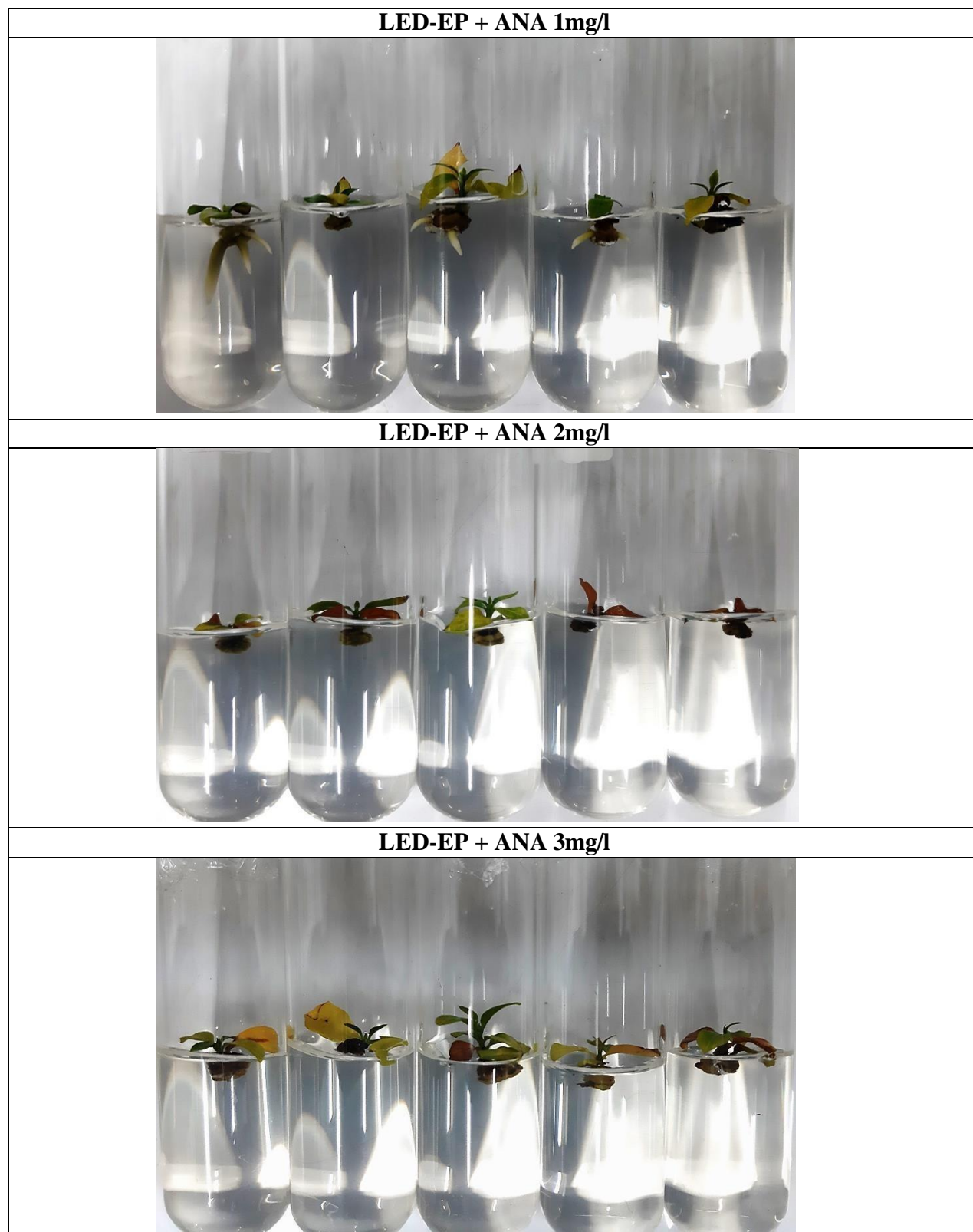


Figura 39. Enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* bajo influencia de Luz LED de Espectro Completo y la auxina IAA en diferentes concentraciones. 60 días.



Figura 40. Enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* bajo influencia de Luz LED de Espectro Completo y la auxina IBA en diferentes concentraciones. 60 días.

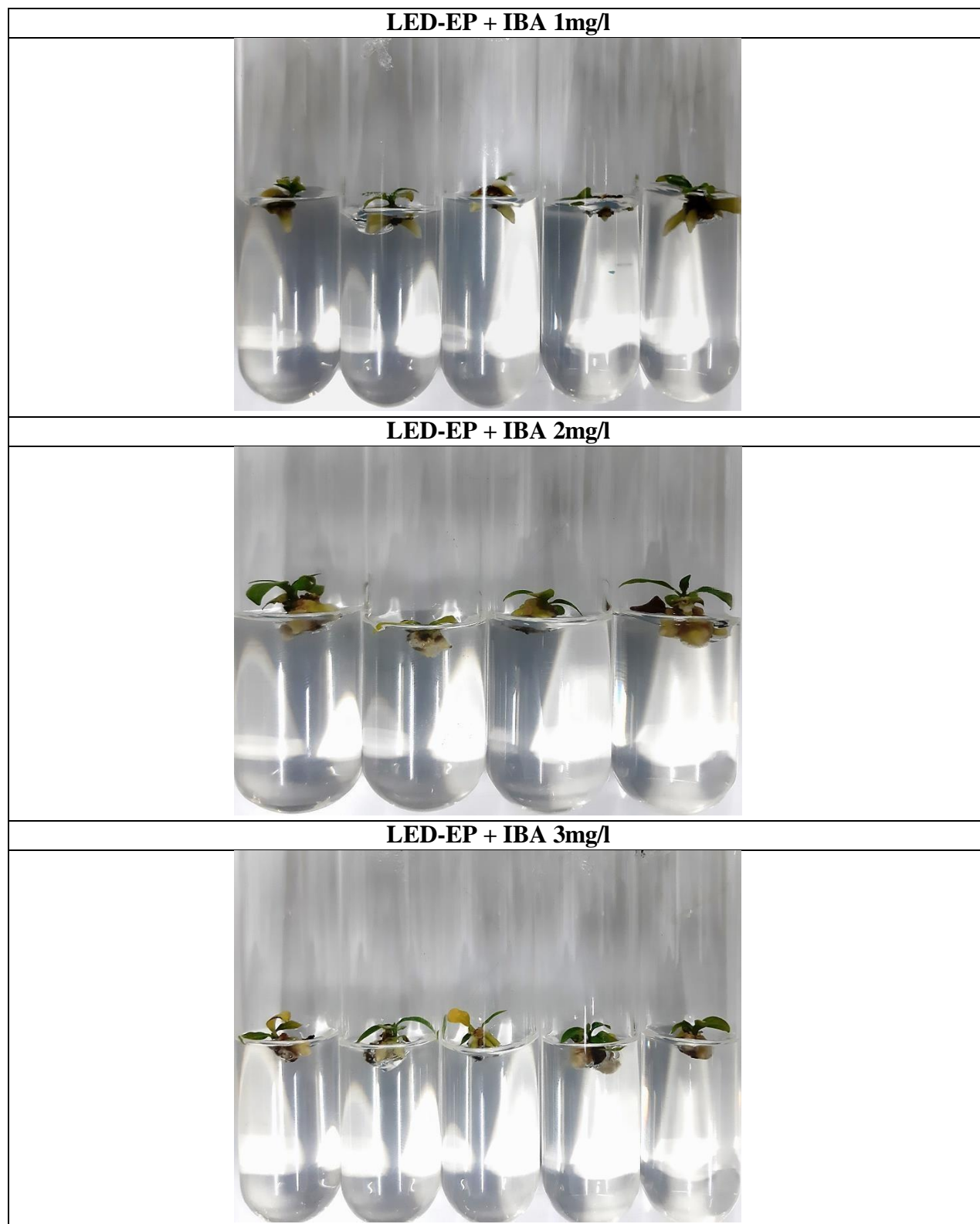


Figura 41. *Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo en ausencia de auxinas (Grupos Controles) en diferentes concentraciones. 60 días.*

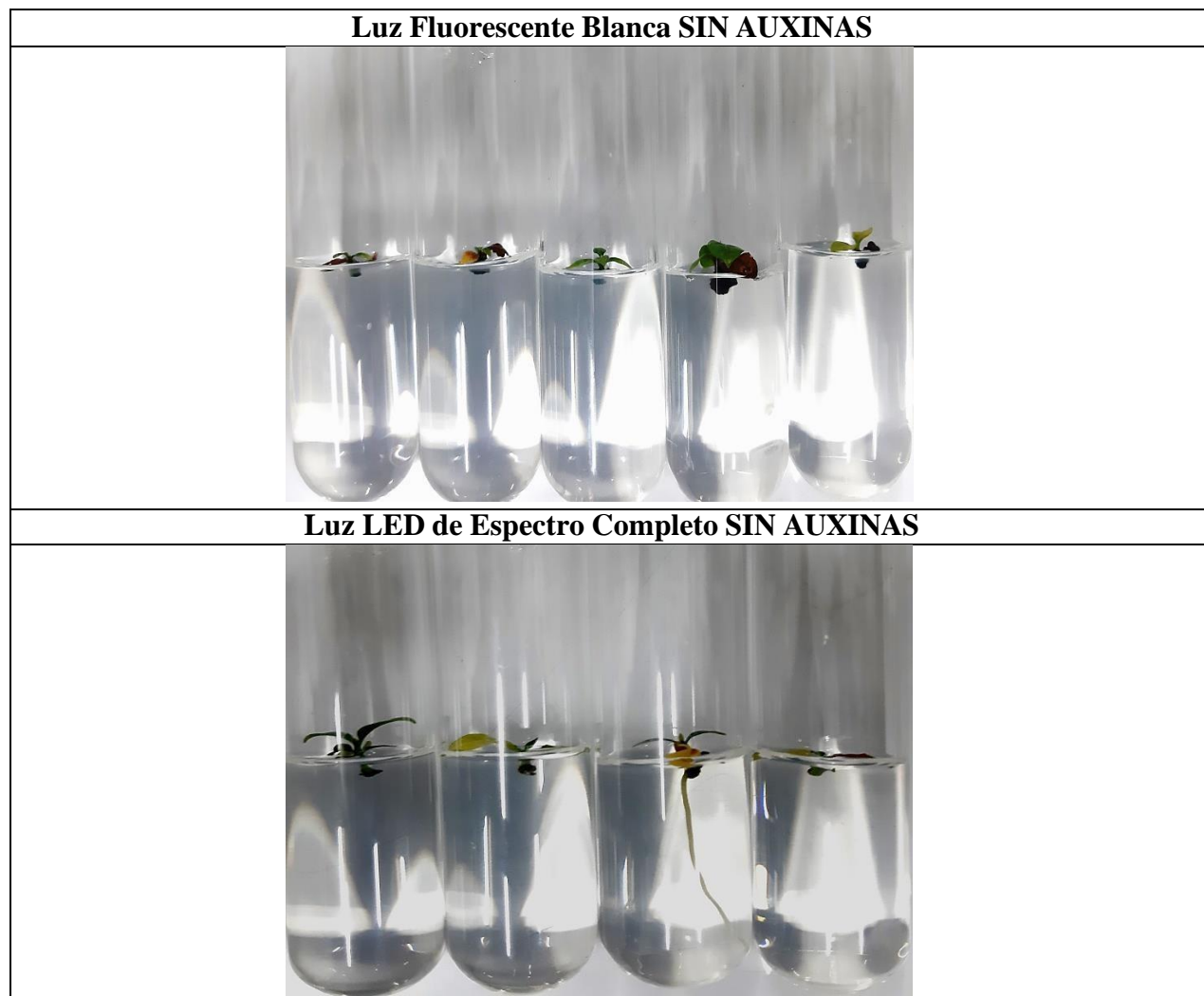


Figura 42. Raíces obtenidas en el enraizamiento in vitro de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo. 60 días.

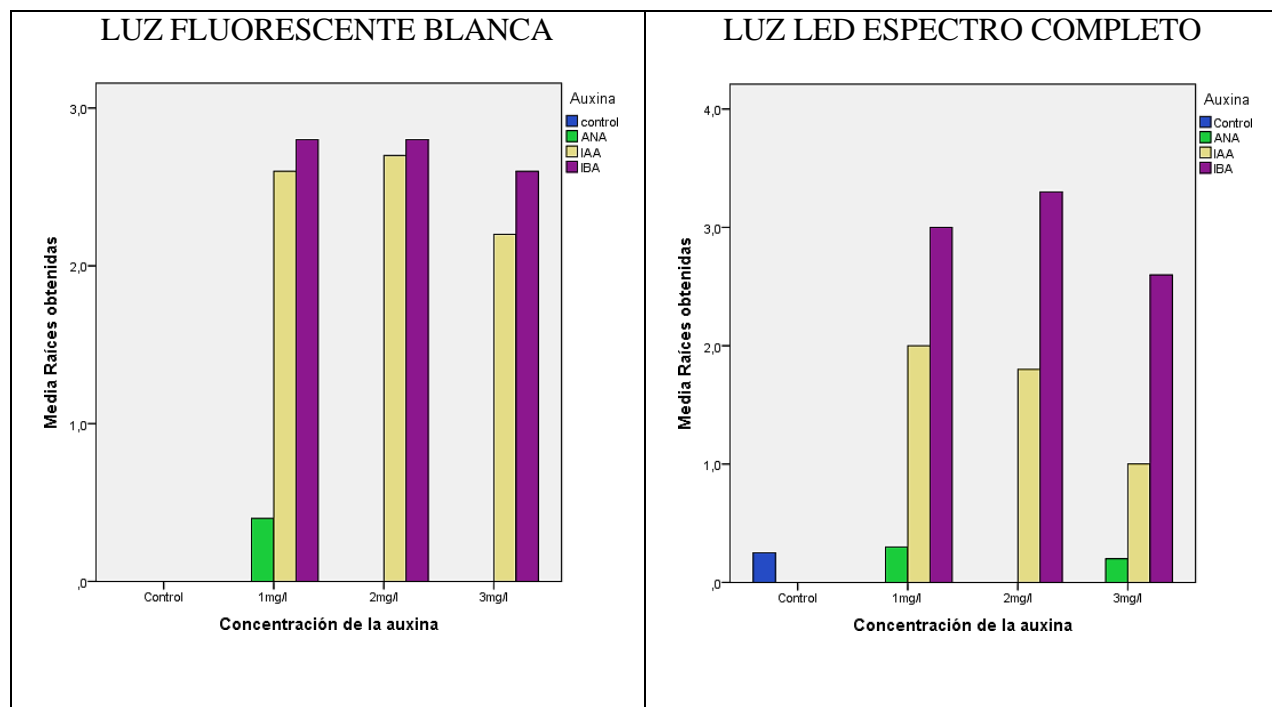


Figura 43. Longitud de raíces obtenidas (cm) en el enraizamiento in vitro de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo.

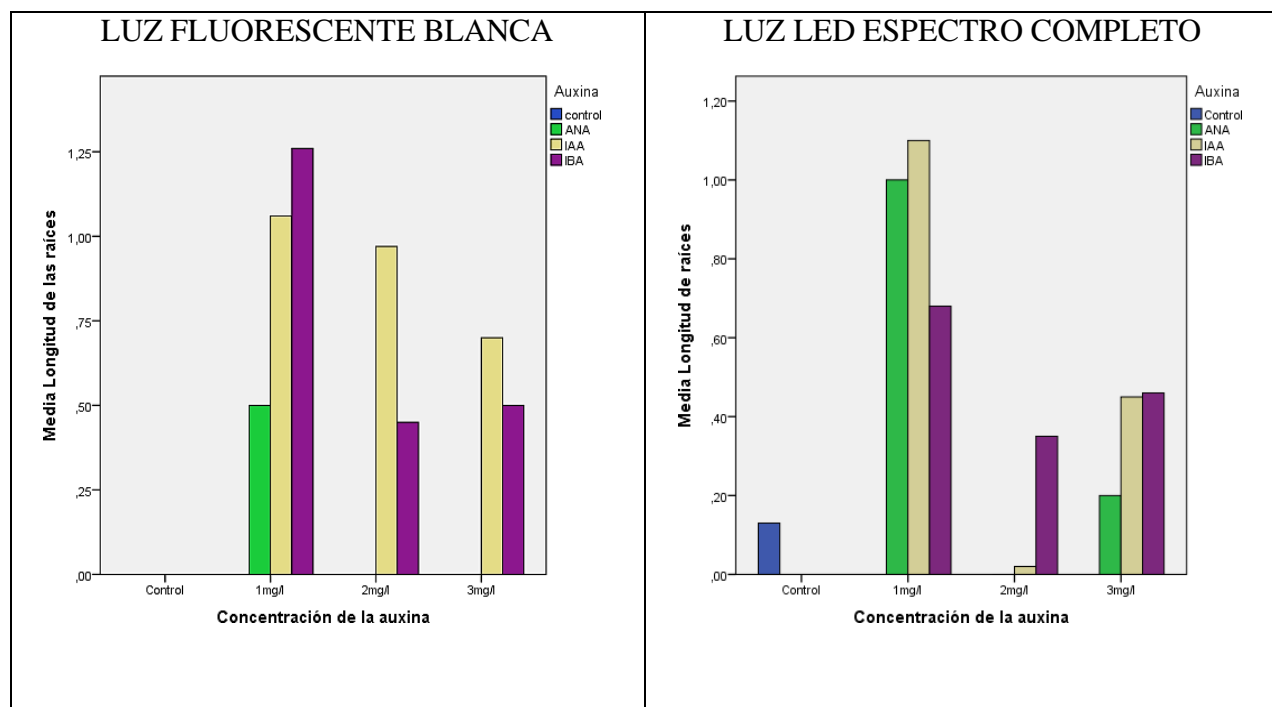


Figura 44. Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo.

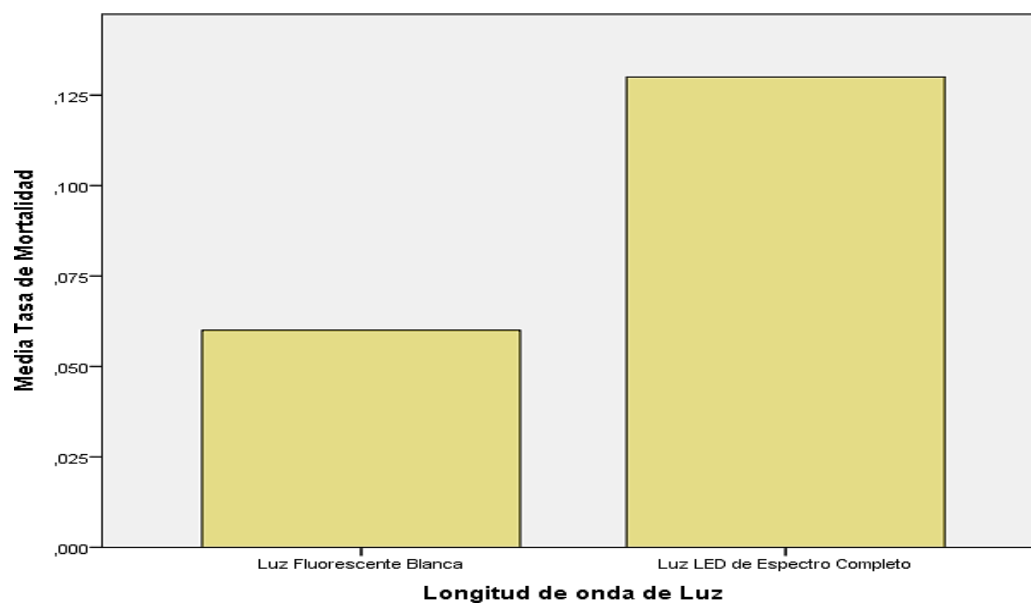


Figura 45. Tasa de Mortalidad (TM) por auxina en el enraizamiento *in vitro* de *Coffea arabica* L. var. Geisha bajo la influencia de Luz Fluorescente Blanca y LED de Espectro Completo.

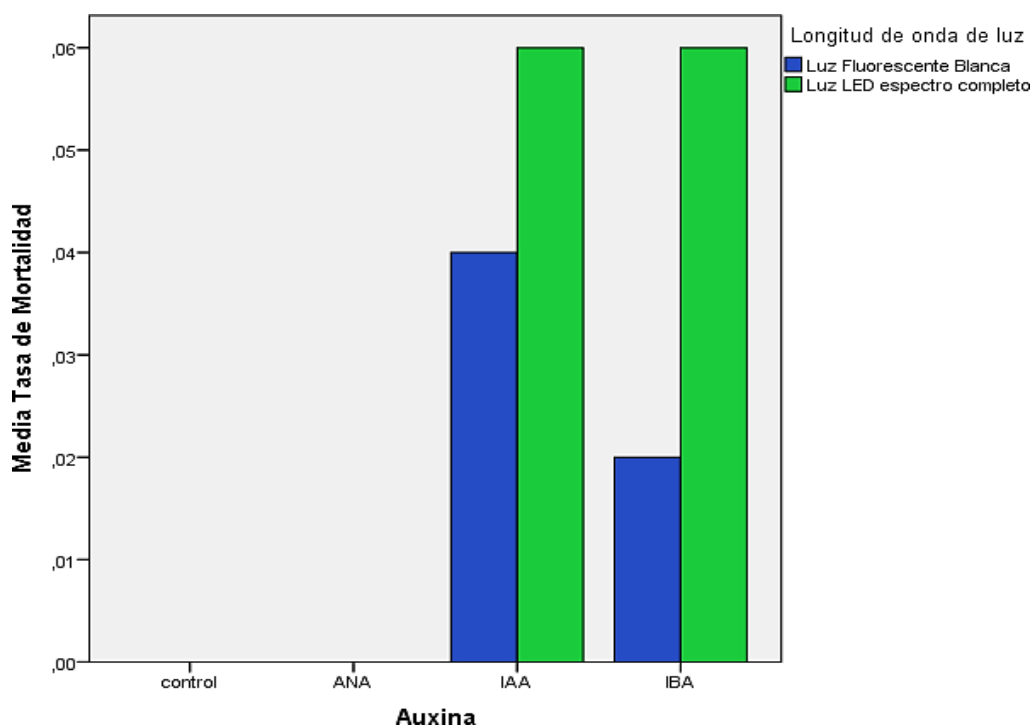


Figura 46. Tasa de Aclimatación (TA) y longitud promedio (cm) en el establecimiento a condiciones ambientales (*ex vitro*) de las plantas de *Coffea arabica* L. var. Geisha. 30 días.

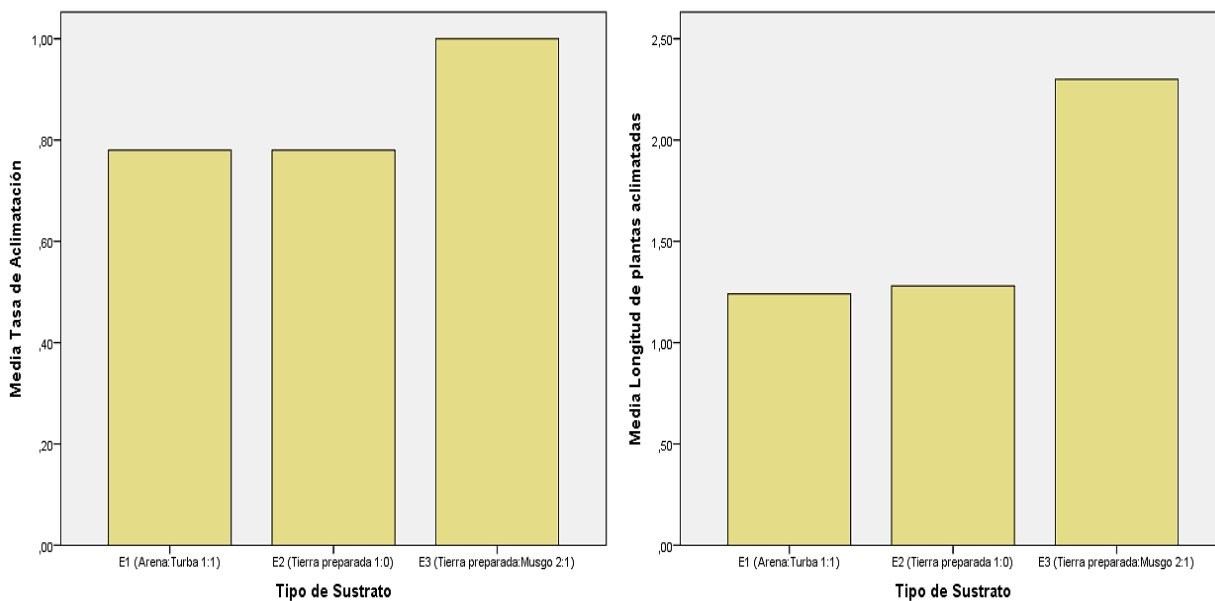


Figura 47. Establecimiento a condiciones ambientales (*ex vitro*) de las plantas de *Coffea arabica* L. var. Geisha. 30 días.



E2 (TIERRA PREPARADA 1:0)**E3 (TIERRA PREPARADA:MUSGO 2:1)**

15.2 Tablas

Tabla 1.

Ensayos de esterilización de semillas de Coffea arabica L. var. Geisha

N° Ensayo	Tratamiento	Tiempo	N° semillas
Ensayo 1 (E1)	Etanol 70%	3 min	60
	NaOCl 5%	15 min	
	10 lavados	2 min c/u	
Ensayo 2 (E2)	Etanol 70%	3 min	60
	NaOCl 5%	60 min	
	10 lavados	2 min c/u	
Ensayo 3 (E3)	Etanol 70%	3 min	60
	HgCl ₂ 0.2%	15 min	
	10 lavados	2 min c/u	
Ensayo 4 (E4)	Etanol 70%	3 min	60
	HgCl ₂ 1%	15 min	
	10 lavados	2 min c/u	
Ensayo 5 (E5)	Etanol 70%	3 min	60
	HgCl ₂ 2%	15 min	
	10 lavados	2 min c/u	
Ensayo 6 (E6)	Etanol 70%	3 min	60
	HgCl ₂ 3%	15 min	
	10 lavados	2 min c/u	

Ensayo de esterilización *in vitro* de semillas de *Coffea arabica L. var. Geisha* para la obtención de plántulas asépticas. Todos los ensayos tuvieron un pre tratamiento con los fungicidas tabuconazol 0,1% y oxícloruro de cobre 1g/l por 30 minutos en solución acuosa.

Tabla 2.

Cultivo de embrión cigótico de Coffea arabica L. var. Geisha.

N° de cultivo	MS concentración	N° de embriones
C1	50%	20
C2	75%	20
C3	100%	20

Cultivo de embriones cigóticos de *Coffea arabica L. var. Geisha* en diferentes concentraciones del medio de cultivo basal Murashige & Skoog sin fitohormonas, con la adición de las vitaminas de Gamborg completas para los 3 casos. Al igual que el grupo A, las semillas fueron pre tratadas con los fungicidas tabuconazol 0,1% y oxícloruro de cobre 1g/l por 30 minutos en solución acuosa antes de la esterilización propuesta por Bojorquez *et al.* (2011) modificada.

Tabla 3.

Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas de Gamborg (0% y 100%) que permitan el mayor coeficiente de multiplicación de brotes o multiyemas.

Cultivo código	Fitohormona 6-BAP (mg/l)				Vitaminas de Gamborg x = presencia al 100%	Número explantes
	4	6	8	10		
T1	x				x	10
T2	x					10
T3		x			x	10
T4		x				10
T5			x		x	10
T6			x			10
T7				x	x	10
T8				x		10

Evaluación del medio de cultivo para el establecimiento y multiplicación clonal de *C. arabica* L. var. *Geisha*, utilizando el medio de cultivo MS que mejores resultados generó en el desarrollo en la fase de germinación (cultivo de embrión cigótico). Las vitaminas de Gamborg completas incluyeron tiamina-HCl 10 mg/l, piridoxina-HCl 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, glicina 2 mg/l, myo-inositol 100 mg/l. Todos los medios de cultivo tuvieron como base la fitohormona IAA al 0.05mg/l, solidificados con gelrite 2.8g/l y ajustados a un pH 5.6 antes de ser esterilizados en autoclave (121°C por 20 min)

Tabla 4.

Determinación de la concentración de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a luz blanca fluorescente.

Código Tratamiento	Fitohormona auxina	Nº de plántulas a introducir
A1	ANA (1mg/l)	5
A2	ANA (2mg/l)	5
A3	ANA (3mg/l)	5
B1	IAA (1mg/l)	5
B2	IAA (2mg/l)	5
B3	IAA (3mg/l)	5
C1	IBA (1mg/l)	5
C2	IBA (2mg/l)	5
C3	IBA (3mg/l)	5
CONTROL (Ø)	----	5

Determinación de la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*. Los tubos fueron incubados en la sala de cultivo de luz blanca fluorescente por un periodo de 60 días.

Tabla 5.

Determinación de la concentración de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a luz LED de espectro completo.

Código Tratamiento	Fitohormona auxina	N° de plántulas a introducir
A1 _a	ANA (1mg/l)	5
A2 _a	ANA (2mg/l)	5
A3 _a	ANA (3mg/l)	5
B1 _a	IAA (1mg/l)	5
B2 _a	IAA (2mg/l)	5
B3 _a	IAA (3mg/l)	5
C1 _a	IBA (1mg/l)	5
C2 _a	IBA (2mg/l)	5
C3 _a	IBA (3mg/l)	5
CONTROL (Ø _a)	----	5

Determinación de la concentración (1, 2 y 3mg/l) de auxinas (ANA, IAA, IBA) que inducen el mayor porcentaje de enraizamiento y cantidad de raíces en las vitroplantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha*. Los tubos fueron incubados en la sala de cultivo de luz LED de espectro completo por un periodo de 60 días.

Tabla 6.

Sustratos utilizados para la aclimatación a condiciones ambientales de las plantas enraizadas in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha.

Código Tratamiento	Sustrato	Plántulas a introducir
E1	Arena de río : Turba (1:1)	9
E2	Tierra preparada (1:0)	9
E3	Tierra preparada : Musgo (2:1)	9

Establecimiento de un sistema de aclimatación de plantas de *Coffea arabica* L. var. *Geisha* a condiciones ambientales (*ex vitro*). El sustrato fue esterilizado en autoclave en bolsas termorresistentes a una temperatura de 130°C por 20min con la finalidad de eliminar patógenos oportunistas. Todas las plantas sembradas fueron humedecidas con agua destilada constantemente a fin de evitar el estrés hídrico y/o muerte.

Tabla 7.

Evaluación de la contaminación en los ensayos de germinación de semillas con endospermo in vitro.

Nº Ensayo	Tratamiento	Tiempo	% de contaminación
Ensayo 1 (E1)	Etanol 70% NaOCl 5%	3 min 15 min	100%
Ensayo 2 (E2)	Etanol 70% NaOCl 5%	3 min 60 min	85%
Ensayo 3 (E3)	Etanol 70% HgCl ₂ 0.2%	3 min 15 min	100%
Ensayo 4 (E4)	Etanol 70% HgCl ₂ 1%	3 min 15 min	100%
Ensayo 5 (E5)	Etanol 70% HgCl ₂ 2%	3 min 15 min	100%
Ensayo 6 (E6)	Etanol 70% HgCl ₂ 3%	3 min 15 min	0%

Número de semillas utilizadas por ensayo: 60 unidades.

Tabla 8.

Evaluación de la Fenolización en los ensayos de germinación de semillas con endospermo in vitro.

Nº Ensayo	Tratamiento	Tiempo	% de fenolización
Ensayo 1 (E1)	Etanol 70% NaOCl 5%	3 min 15 min	58.33%
Ensayo 2 (E2)	Etanol 70% NaOCl 5%	3 min 60 min	86.67%
Ensayo 3 (E3)	Etanol 70% HgCl ₂ 0.2%	3 min 15 min	100%
Ensayo 4 (E4)	Etanol 70% HgCl ₂ 1%	3 min 15 min	100%
Ensayo 5 (E5)	Etanol 70% HgCl ₂ 2%	3 min 15 min	100%
Ensayo 6 (E6)	Etanol 70% HgCl ₂ 3%	3 min 15 min	100%

Número de semillas utilizadas por ensayo: 60 unidades.

Tabla 9.*Cultivo in vitro de embriones cigóticos.*

N°	MS	Contam. (%)	Fenoliz. (%)	Germin. (%)	Alt. prom.(cm)	Raíz prom. (cm)
C1	50%	0	0	90	4.19	5.56
C2	75%	0	5	70	3.19	4.02
C3	100%	0	15	85	2.21	2.46

Número de embriones introducidos por tratamiento: 20 unidades

Tabla 10.*Test de ANOVA de un factor para los ensayos de cultivo in vitro de embriones cigóticos cultivados en diferentes concentraciones del medio MS.*

		Suma de Cuadrados	gl	media cuadrática	F	Sig.
Fenolización	Inter-grupos	,411	2	,206	4,028	,019
	Intra-grupos	9,033	177	,051		
	Total	9,444	179			
Germinación	Inter-grupos	1,300	2	,650	4,485	,013
	Intra-grupos	25,650	177	,145		
	Total	26,950	179			
Crec_raíz	Inter-grupos	5601,467	2	2800,733	6,287	,002
	Intra-grupos	64144,696	144	445,449		
	Total	69746,163	146			
Crec_brote	Inter-grupos	2145,124	2	1072,562	4,665	,011
	Intra-grupos	33107,203	144	229,911		
	Total	35252,327	146			

Significancia al 0.05

Tabla 11.*Germinación en condiciones de invernadero de Coffea arabica L. var. Geisha.*

Ensayo	Germinación	Alt. Prom (cm)	Raíz prom. (cm)
Cultivo en Invernadero	88%	7.5	4.93

Evaluación realizada a los 90 días post siembra. Número de semillas introducidas: 50 unidades.

Tabla 12.

Test de ANOVA para la germinación in vitro por aislamiento de embrión cigótico vs. Cultivo en condiciones de invernadero.

	Suma Cuadrados	gl	Media cuadrática	F	sig.
Inter-grupos	,015	1	,015	,071	,791
Intra-grupos	14,271	68	,210		
Total	14,286	69			

Comparación entre la germinación en el medio MS 50% y cultivo en condiciones de invernadero a 90 días.

Tabla 13.

Evaluación de la concentración de la fitohormona 6-BAP (4, 6, 8 y 10 mg/l), y vitaminas de Gamborg (0% y 100%) en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha.

Cultivo código	Fitohormona 6-BAP (mg/l)				Vit Gamborg	C.M	T.C	C.N prom.
	4	6	8	10				
T1	x				x	4.4	1.31	2.2
T2	x					4.5	1.35	2.3
T3		x			x	5.9	1.30	2.5
T4		x				6.2	1.35	2.4
T5			x		x	6.7	1.29	2.7
T6			x			6.8	1.28	2.5
T7				x	x	8.0	1.20	2.9
T8				x		8.2	1.21	2.8

C.M: Coeficiente de Multiplicación; T.C: Tasa de crecimiento; C.N: Cantidad de nudos. Evaluación a los 30 días.

Tabla 14.

Prueba T de Student para el Coeficiente de Multiplicación (CM) en los diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de 6-BAP para la determinación del mejor medio de cultivo de micropropagación clonal de Coffea arabica var. Geisha.

Valor de la prueba = 95						
	t	gl	sig.(bilateral)	diferencia de medias	95% de confianza Para la diferencia	
					inferior	superior
Coeficiente De Multiplicación (C.M)	-177,842	7	,000	-88,6625	-89,841	-87,484

Tabla 15.

Prueba U de Mann-Whitney para los ensayos realizados con los diferentes tratamientos en ausencia o presencia de las Vitaminas de Gamborg (VG) para la determinación del mejor medio de cultivo de micropropagación clonal in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha.

Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución del CM. es la misma entre Las categorías de Vitaminas	Prueba de U de Mann-Whitney	0,686	Retener la hipótesis nula
La distribución de la Tasa de Crecimiento es La misma entre las Categorías de Vitaminas	Prueba de U de Mann-Whitney	0,293	Retener la hipótesis nula
La distribución de la Cantidad de Nudos es la Misma entre las categorías De Vitaminas	Prueba de U de Mann-Whitney	0,623	Retener la hipótesis nula
La distribución de la Incidencia de Tejido Calloso es la misma entre las categorías de Vitaminas	Prueba de U de Mann-Whitney	0,343	Retener la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 16.

Prueba de Tukey para la evaluación de la influencia de la fitohormona 6-BAP en la Tasa de Crecimiento (TC) de las plántulas de Coffea arabica var. L. Geisha cultivadas in vitro.

	Fitohormona	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey	10mg/l 6-BAP	20	1,2050	
	8mg/l 6-BAP	20		1,2825
	6mg/l 6-BAP	20		1,3250
	4mg/l 6-BAP	20		1,3275
	Sig.		1.000	0,164

Tabla 17.

Prueba de Tukey para la evaluación de la influencia de la fitohormona 6-BAP en la cantidad de nudos de las plántulas de Coffea arabica var. Geisha cultivadas in vitro. Comparaciones múltiples.

Fitohormona (I)	(J)Fitohormona	Diferencia de Medias	error típico	sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Lim. Sup.	Lim. Inf.
4mg/l	6mg/l	-,200	,199	,747	-,72	,32
	8mg/l	-,350	,199	,300	-,87	,17
	10mg/l	-,600*	,199	,018	-1,12	-,08
6mg/l	4mg/l	,200	,199	,747	-,32	,72
	8mg/l	-,150	,199	,875	-,67	,37
	10mg/l	-,400	,199	,193	-,92	,12
8mg/l	4mg/l	,350	,199	,300	-,17	,87
	6mg/l	,150	,199	,875	-,37	,67
	10mg/l	-,250	,199	,593	-,77	,27
10mg/l	4mg/l	,600*	,199	,018	,08	1,12
	6mg/l	,400	,199	,193	-,12	,92
	8mg/l	,250	,199	,593	-,27	,77

Variable: Cantidad de Nudos. Comparaciones múltiples. (*) La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

Tabla 18.

Cantidad total de yemas y explantes obtenidos en la estandarización del medio de cultivo que influya el mejor Coeficiente de Multiplicación (CM)

Fitohormona 6-BAP	Cantidad de Yemas (Prom)	Cantidad de explantes finales
4mg/l 6-BAP	89.90	89
6mg/l 6-BAP	120.48	121
8mg/l 6-BAP	135.36	135
10mg/l 6-BAP	161.26	162
Total		507

Resultados analizados a los 30 días post cultivo. El experimento se inició con 80 muestras.

Tabla 19.

Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de la influencia de la fitohormona 6-BAP en la incidencia de tejido calloso (IC) en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha.

Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de la presencia de callo es la misma entre las categorías de concentración de 6-BAP	Prueba de Kuskal-Wallis	,000	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 20.

Tasa de Crecimiento (TC) y Número Total (NT) de explantes obtenidos en el cultivo in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivados bajo la incidencia de la longitud de onda de luz (Luz Fluorescente Blanca y Luz LED de espectro completo).

Tipo de longitud de Onda de luz	TC	NT
Luz Fluorescente Blanca	1.58	2003
Luz LED Espectro Completo	2.25	2161

Resultados obtenidos a los 50 días post cultivo. 76 frascos al azar con 5 a 6 explantes sometidos a diferentes longitudes de ondas de luz. TC= Tasa de Crecimiento, NT= Número Total de explantes obtenidos al final del experimento.

Tabla 21.

Prueba de U de Mann-Whitney para la evaluación de la incidencia de la longitud de onda de luz (Luz Fluorescente Blanca y Luz LED de espectro completo) en la Tasa de Crecimiento (TC)

Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de la de la Tasa de Crecimiento es la misma entre las categorías de presencia o ausencia de Luz LED de Espectro Completo	Prueba de U de Mann-Whitney	,000	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 22.

Determinación de la concentración de clorofila A, B y Total en las vitroplántulas de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes ondas de luz.

Clorofila	Luz Fluorescente Blanca(μ /l)	Luz LED Espectro Completo (μ /l)
A	2.38	4.28
B	1.66	2.78
TOTAL	4.04	7.06

Concentración promedio de clorofila obtenida por espectrofotometría con 3 repeticiones.

Tabla 23.

Prueba T de Student para la concentración de clorofila A, B y Total en las vitroplántulas de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes ondas de luz.

Prueba T para igualdad de medias							
	F	gl	sig.(bilat.)	Diferencia De medias	error típico De la difer.	Intervalo de confianza al 95%	
						Inferior	Superior
Concentración de la Clorofila A	1,730	4	,000	-1,88333	,01202	-1,91670	-1,84996
Concentración de la Clorofila B	,947	4	,000	-1,14000	,04320	-1,25996	-1,02004
Concentración de la Clorofila Total	1,062	4	,000	-3,02333	,03667	-3,12514	-2,92153

Tabla 24.

Prueba de U de Mann-Whitney para el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes concentraciones de auxinas y ondas de luz.

Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de los promedios de raíces obtenidas por plántula es la misma entre las categorías de presencia o ausencia de Luz LED de Espectro Completo	Prueba de U de Mann-Whitney	,006	Rechazar la hipótesis nula
La distribución de los promedios de longitudes de raíces obtenidas por plántula es la misma entre las categorías de presencia o ausencia de Luz LED de Espectro Completo	Prueba de U de Mann-Whitney	,045	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 25.

Enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes concentraciones de auxinas y ondas de luz.

	Auxina	Concentración (mg/l)	Raíces Prom(cm)	Longitud Prom(cm)	
Luz Fluorescente Blanca (LFB)	Ø	0	0	0	
	ANA	A1	1	0.4	0.5
		A2	2	0	0
		A3	3	0	0
IAA	B1	1	2.6	1.06	
	B2	2	2.7	0.97	
	B3	3	2.2	0.70	
IBA	C1	1	2.8	1.26	
	C2	2	2.8	0.45	
	C3	3	2.6	0.50	
Luz LED Espectro Completo (LED-EP)	Ø	0	0.25	0.13	
	ANA	A1 _a	1	0.3	1.0
		A2 _a	2	0	0
		A3 _a	3	0.2	0.20
	IAA	B1 _a	1	2.0	1.10
		B2 _a	2	1.8	0.02
		B3 _a	3	1.0	0.45
	IBA	C1 _a	1	3	0.68
		C2 _a	2	3.3	0.35
		C3 _a	3	2.6	0.46

Análisis realizado 60 días post cultivo. Ø= Control (Sin fitohormona)

Tabla 26.*Prueba de Tukey para la evaluación del promedio de raíces obtenidas.*

Luz Blanca Fluorescente				
	Tipo de Auxina	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey	0	5	,00	
	ANA	15	,13	
	IAA	13		2,46
	IBA	14		2,93
	Sig.		,994	,805
Luz LED de Espectro Completo				
	Tipo de Auxina	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey	0	4	,250	
	ANA	15	,533	
	IAA	11		1,745
	IBA	14		2,929
	Sig.		,921	,051

Tabla 27.*Prueba de Kuskal-Wallis para la influencia de la concentración de las diferentes auxina en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica var. Geisha.*

Luz Blanca Fluorescente			
Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de promedio de raíces obtenidas es la misma entre las categorías de tipo de auxinas empleadas	Prueba de Kuskal-Wallis	,057	Retener la hipótesis nula
La distribución de promedio De longitud de raíces Obtenidas es la misma entre las categorías de tipo de auxinas empleadas	Prueba de Kuskal-Wallis	,001	Rechazar la hipótesis nula
Luz LED de Espectro Completo			
La distribución de promedio de raíces obtenidas es la misma entre las categorías de tipo de auxinas empleadas	Prueba de Kuskal-Wallis	,045	Rechazar la hipótesis nula
La distribución de promedio De longitud de raíces Obtenidas es la misma entre las categorías de tipo de auxinas empleadas	Prueba de Kuskal-Wallis	,001	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 28.

Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha.

Auxina	Luz Blanca Fluorescente	Luz LED de Espectro Completo
∅	0	0
ANA	0	0
IAA	0.04	0.06
IBA	0.02	0.06
TOTAL	0.06	0.13

Análisis a los 60 días post cultivo. ∅= Control (Sin fitohormona)

Tabla 29.

Prueba de U de Mann-Whitney para Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha cultivadas en diferentes ondas de luz.

Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de la Tasa de Mortalidad es la misma entre las categorías de tipo de onda de luz empleadas	Prueba de U de Mann-Whitney	,046	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 30.

Prueba de Kuskal-Wallis para Tasa de Mortalidad (TM) en el enraizamiento in vitro de Coffea arabica L. var. Geisha bajo la influencia de diferentes auxinas.

Luz Fluorescente Blanca			
Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de la Tasa de Mortalidad es la misma entre las categorías de tipo de auxina utilizada	Prueba de Kruskal-Wallis	,047	Rechazar la hipótesis nula
Luz LED de Espectro Completo			
La distribución de la Tasa de Mortalidad es la misma entre las categorías de tipo de auxina utilizada	Prueba de Kruskal-Wallis	,0943	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Tabla 31.

Tasa de aclimatación y altura de las plantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a condiciones ex vitro.

Sustrato	Longitud Prom(cm)	Tasa de Aclimatación (T.A)
E1	1.24	0.78
E2	1.28	0.78
E3	2.30	1.00

Análisis realizado a los 30 días por cultivo. Plantas sometidas a cada sustrato: 9 unidades. E1= Arena de río : Turba (1:1); E2= Tierra preparada (1:0); E3= Tierra preparada : Musgo (2:1)

Tabla 32.

Prueba de Kruskal-Wallis para la Tasa de aclimatación y altura de las plantas de Coffea arabica L. var. Geisha sometidas a condiciones ex vitro.

Hipótesis nula	test	sig.	Decisión
La distribución de la Tasa de Aclimatación es la misma entre las categorías de tipo de sustrato utilizado.	Prueba de Kruskal-Wallis	,323	Retener la hipótesis nula
La distribución de la Longitud promedio es la misma entre las categorías de tipo de sustrato utilizado.	Prueba de Kruskal-Wallis	,000	Rechazar la hipótesis nula

El nivel de significancia es ,05

Estandarización de un sistema de micropropagación clonal in vitro de Coffea arabica L. “café” var. Geisha tolerante a Hemileia vastatrix Berkeley & Broome “roya amarilla”

INFORME DE ORIGINALIDAD

24%

INDICE DE SIMILITUD

24%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
2	urp.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	repositorio.unj.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	docplayer.es Fuente de Internet	1%
5	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	bdigital.zamorano.edu Fuente de Internet	1%
7	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD, UNAD Trabajo del estudiante	1%

9	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
10	repositorio.umsa.bo Fuente de Internet	1%
11	repositorio.undac.edu.pe Fuente de Internet	1%
12	repositorio.unesum.edu.ec Fuente de Internet	<1%
13	revistas.urp.edu.pe Fuente de Internet	<1%
14	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
15	repositorio.unc.edu.pe Fuente de Internet	<1%
16	baixardoc.com Fuente de Internet	<1%
17	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1%
18	ciatej.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1%
19	revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
20	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%

21	www.coffeeiq.co Fuente de Internet	<1 %
22	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
23	up-rid.up.ac.pa Fuente de Internet	<1 %
24	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
25	dspace.espoch.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
26	scielo.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
27	Maria Dolores Ribeiro Orge, Miguel Álvarez Cobelas, Palmira Riolobos, Santos Cirujano. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 2007 Publicación	<1 %
28	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
29	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
30	repositorio.espam.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
31	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %

32	dspace.unila.edu.br Fuente de Internet	<1 %
33	revistacta.agrosavia.co Fuente de Internet	<1 %
34	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
35	revista.ibp.co.cu Fuente de Internet	<1 %
36	flex.flinders.edu.au Fuente de Internet	<1 %
37	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
38	1library.co Fuente de Internet	<1 %
39	californialightworks.com.ar Fuente de Internet	<1 %
40	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
41	juntadelcafe.org.pe Fuente de Internet	<1 %
42	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
43	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1 %

44	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
45	www.bonsaime.com Fuente de Internet	<1%
46	gestion.pe Fuente de Internet	<1%
47	www.cotilleando.com Fuente de Internet	<1%
48	Submitted to Universidad Autónoma de Ciudad Juárez Trabajo del estudiante	<1%
49	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1%
50	dehesa.unex.es Fuente de Internet	<1%
51	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
52	www.mef.gob.pe Fuente de Internet	<1%
53	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante	<1%
54	repositorio.utn.edu.ec Fuente de Internet	<1%

55	revistasguatemala.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
56	ri.uaemex.mx Fuente de Internet	<1 %
57	Nehad Abd El Gawad, H. Mandy, E. Boshra. "IN VITRO MICROPROPAGATION PROTOCOL AND ACCLIMATIZATION OF COFFEE TREES (Coffea arabica L.)", Journal of Plant Production, 2012 Publicación	<1 %
58	pdffox.com Fuente de Internet	<1 %
59	www.excelenciasgourmet.com Fuente de Internet	<1 %
60	riudg.udg.mx Fuente de Internet	<1 %
61	Submitted to Quality Leadership Universidad Asociación	<1 %
62	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
63	forum.redalyc.org Fuente de Internet	<1 %
64	riuma.uma.es Fuente de Internet	<1 %

65

saludvital.com.mx

Fuente de Internet

<1%

66

uvadoc.uva.es

Fuente de Internet

<1%

67

alshamess.ifa.hawaii.edu

Fuente de Internet

<1%

68

lookformedical.com

Fuente de Internet

<1%

69

Submitted to Universidad Nacional de Tumbes

Trabajo del estudiante

<1%

70

Submitted to Universidad de Costa Rica

Trabajo del estudiante

<1%

71

doczz.com.br

Fuente de Internet

<1%

72

dspace.ups.edu.ec

Fuente de Internet

<1%

73

pubhtml5.com

Fuente de Internet

<1%

74

www.radioilucan.com

Fuente de Internet

<1%

75

Submitted to Atlantic International University

Trabajo del estudiante

<1%

76	Héctor Rondón B, Leidy Rache C, José Pacheco M. "Cariotipo de Espeletopsis muiska", Revista MVZ Córdoba, 2013 Publicación	<1 %
77	repository.udistrital.edu.co Fuente de Internet	<1 %
78	www.notredamecollege.edu Fuente de Internet	<1 %
79	Submitted to Corporación Universitaria Iberoamericana Trabajo del estudiante	<1 %
80	doi.org Fuente de Internet	<1 %
81	repository.uniminuto.edu Fuente de Internet	<1 %
82	rinacional.tecnm.mx Fuente de Internet	<1 %
83	www.ciencialatina.org Fuente de Internet	<1 %
84	www.grupobiotecnologia.com Fuente de Internet	<1 %
85	www.otca.info Fuente de Internet	<1 %
86	"Análisis de output en el largo plazo utilizando métodos de remuestreo bootstrap."	<1 %

87

Gabriel Ramírez-González, null null, José L. Rodríguez-de la O, Jesús G. Arreola-Avila et al.
"Morphogenic responses of three explants of Lupinus montanus (H.B.K.) cultured in vitro",
'Universidad Autonoma Chapingo', 2015

Fuente de Internet

<1%



repositorio.udec.cl

Fuente de Internet

<1%



repositorio.unjfsc.edu.pe

Fuente de Internet

<1%



revistas.ucr.ac.cr

Fuente de Internet

<1%



riul.unanleon.edu.ni:8080

Fuente de Internet

<1%



www.scribd.com

Fuente de Internet

<1%



Submitted to Universidad Católica de Santa
María

Trabajo del estudiante

<1%



Submitted to tec

Trabajo del estudiante

<1%



www.agrecolandes.org

Fuente de Internet

<1%

96	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
97	Submitted to Universidad Privada Antenor Orrego Trabajo del estudiante	<1 %
98	Submitted to Universidad Santo Tomas Trabajo del estudiante	<1 %
99	www.scielo.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
100	Carlos Trujillo Moya. "Estudio de la Capacidad Organogénica en tomate y especies relacionadas: Localización de QTLs implicados y estudio de la influencia del Etileno", 'Universitat Politecnica de Valencia', 2015 Fuente de Internet	<1 %
101	biblio3.url.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
102	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
103	repositorioinstitucional.uson.mx Fuente de Internet	<1 %
104	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
105	José Iannacone, Lorena Alvariño, David Minaya, Geancarlo Alarcón, Amparo	<1 %

Rodríguez, Enrique Ávila. "Entomofauna cadavérica en vertebrados marinos varados en la costa central del Perú", Graellsia, 2023

Publicación

106

repositorio.unasam.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

107

repository.eafit.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

108

wiki2.org

Fuente de Internet

<1 %

109

www.elsevier.es

Fuente de Internet

<1 %

110

www.scielo.org.co

Fuente de Internet

<1 %

Jennifer Andrea Castro, Eyda Johanna Araque,
Jose Estiben Pacheco, Jose Constantino

Pacheco. "Micropropagación y determinación del número cromosómico de Puya trianae con fines de conservación y uso ornamental", Revista peruana de Biología, 2018

Publicación

<1 %

cia.uagraria.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

de.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

fews.net

Fuente de Internet

114

<1%

115

remai.ipn.mx

Fuente de Internet

<1%

116

ri.ues.edu.sv

Fuente de Internet

<1%

117

www.turismalia.com

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 10 words

Excluir bibliografía

Activo