

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS ARTIFICIALES DE
ORQUÍDEA (*Phragmipedium kovachii*) MEDIANTE LA
ENCAPSULACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.**

Autor: Bach. Osber Jhonel Cunia Guevara

Asesor: Msc. Oliva Cruz Segundo Manuel

Co-asesor: Ph.D. Ligia Magali García Rosero

Co-asesor: Ing. Nuri Carito Vilca Valqui

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

DATOS DE ASESOR:

Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

DNI N° 05374749

Registro ORCID N° 0000-0002-9670-0970

<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>

**Campo de la Investigación y Desarrollo, según la Organización para la
Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE):**

4.00.00 – Ciencias agrícolas

4.01.00 – Agricultura, Silvicultura, Pesquería

4.01.06 -- Agronomía

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme con la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

A mis padres Hector Cunia Bruno y Emiliana Guevara Burga por su apoyo desinteresado y estar acompañándome en todo momento.

Personas cercanas especiales en mi vida, son un conjunto de seres queridos que cuento con su apoyo en todo momento.

Osber Jhonel Cunia Guevara

AGRADECIMIENTO

A la Universidad que me dio la bienvenida a un mundo como tal, años con excelentes personas, brindándome amistad y compañerismo, personas que me ayudaron a formarme como profesional y buena persona.

A mis asesores Msc. Oliva Cruz Segundo Manuel, Ph.D. Ligia Magali García Rosero, Ing. Nuri Carito Vilca Valqui, con quienes tuve la oportunidad de que fueran mis docentes y supervisor de prácticas, demostrando su confianza, profesionalismo y sobre todo consejos de crecimiento para que el proyecto de investigación se desarrolle de la mejor manera.

Al INDES-CES y personal en general, por brindarme realizar dicha investigación en los ambientes del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, brindándome materiales, insumos, ambientes, equipos y personal técnico para desarrollar las investigaciones necesarias.

A los profesionales miembros del jurado, presidente Ing. Ms. Santos Triunfo Leiva Espinoza, secretario Ing. Mg. Sc. Elí Pariente Mondragón y vocal Ing. Ms. C. César Guevara Hoyos.

A todas aquellas personas e instituciones ayudaron con sus aportes para el desarrollo de esta investigación, como al herbario “Kuelap”, vivero Kgory Thyka a cargo del señor Jhon Charles.

Osber Jhonel Cunia Guevara

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ
DE MENDOZA**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
Rector

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN
VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Mg. Sc. ARMSTRONG BARNARD FERNANDEZ JERÍ
DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (✓)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Elaboración de un protocolo para la producción de semillas artificiales de arquiidea (Phragmipedium kovachii) mediante la encapsulación de embriones somáticos del egresado Osber Shenel Cunia Guevara de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 20 de febrero del 2022


Firma y nombre completo del Asesor

Msc. Segundo Manuel Oliva Cruz

VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (✓)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Elaboración de un protocolo para la producción de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium koxachii*) mediante la encapsulación de embriones somáticos del egresado Osber Shonel Cunia Guvvara de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 20 de febrero del 2022

Firma y nombre completo del Asesor

Ph.D

Ligia Magali García Rosero.

VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K


VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (✓), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Elaboración de un protocolo para la producción de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium kovachii*) mediante la encapsulación de embriones somáticos del egresado Osber Jhonel Cunia Guevara de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 20 de Febrero del 2022


Firma y nombre completo del Asesor
Ing. Nuri Carito Vilca Valqui

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Ing. Ms. Santos Triunfo Leiva Espinoza

PRESIDENTE



Ing. Mg. Sc. Eli Pariente Mondragón

SECRETARIO



Ing. Ms. C. César Guevara Hoyos

VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-0

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

*Elaboración de un protocolo para la producción de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium kovachii*) mediante la encapsulación de embriones somáticos,*

presentada por el estudiante ()/egresado (x)

de la Escuela Profesional de *Ingeniería Agrónoma*

con correo electrónico institucional *7344348951@untrm.edu.pe*

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor () / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene *10* % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, *13* de *Julio* del *2021*

E.N.M.

SECRETARIO

[Signature]

PRESIDENTE

[Signature]

VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 27 de enero del año 2022, siendo las 11:00 horas, el aspirante: Osber Shonel Cunia Guevara, defiende en sesión pública presencial () / a distancia (X) la Tesis titulada: Elaboración de un protocolo para la producción de semillas artificiales de orquídea (Phragmipedium kovachii), mediante la encapsulación de embriones somáticos, teniendo como asesor a D.sc. Segundo Manuel Oliva Cruz, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ing. Ms. Santos Triunfo Leiva Espinoza

Secretario: Ing. Mg. Sc. Eli Pariente Mandragon

Vocal: Ing. Ms. C. Cesar Guevara Hoyos

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

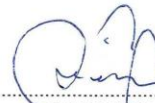
Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (X) Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 12:30 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

INDICE DE CONTENIDO

DATOS DE ASESOR:	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS	vi
VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS	vii
VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS	viii
JURADO EVALUADOR DE TESIS	ix
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	x
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	xi
ÍNDICE DEL CONTENIDO.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. MATERIALES Y METODOS.....	22
2.1. Caracterizar morfológicamente de <i>Phragmipedium kovachii</i> con miras a una correcta selección de la planta madre.....	22
2.2. Obtener embriones somáticos a partir de semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de cultivo in vitro.....	23
2.3. Obtener semilla artificial de <i>Phragmipedium kovachii</i> mediante encapsulación del embrión en estado plúmula.....	25
2.4. Identificar un protocolo para la producción y conservación in vitro de semillas artificiales de orquídea (<i>Phragmipedium kovachii</i>).	27
III. RESULTADOS.....	28
3.1. Caracterización morfológica de <i>Phragmipedium kovachii</i> en la Región Amazonas.....	28
3.2. Establecimiento de las semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de cultivo in vitro.	40
3.3. Efecto del alginato de sodio para determinar la encapsulación del embrión en estado plúmula.....	42

3.4. Protocolo para la conservación de semilla artificial en condiciones in vitro.	46
IV. DISCUSIÓN	49
V. CONCLUSIONES	57
VI. RECOMENDACIONES	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medio de cultivo establecido para cada tratamiento.....	23
Tabla 2. Partes de la planta de la especie <i>P. kovachii</i> obtenida en Amazonas-Perú, expresada en medidas y cantidad de cada muestra vegetal.	29
Tabla 3. Símbolo y significado de la formula floral de la especie <i>P. kovachii</i>	39
Tabla 4. Prueba de Kruskal Wallis para la variable días a la germinación.....	40
Tabla 5. Prueba de Kruskal Wallis para la variable días al estado plúmula.	41
Tabla 6. Prueba de Anva y Kruskal Wallis para la variable horas a la deshidratación.	43
Tabla 7. Proceso del experimento para determinar el protocolo.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la planta, especie <i>Phragmipedium kovachii</i> . a) raíz, b) hojas, c) tallo, d) flor.	28
Figura 2. Morfología de la raíz, especie <i>P. kovachii</i>	30
Figura 3. Morfología del tallo, especie <i>P. kovachii</i>	30
Figura 4. Morfología de la hoja, especie <i>P. kovachii</i>	31
Figura 5. Morfología de la hoja, especie <i>P. kovachii</i>	31
Figura 6. Morfología de la bráctea floral, especie <i>P. kovachii</i>	32
Figura 7. Morfología del ovario, especie <i>P. kovachii</i>	32
Figura 8. Partes de la flor, especie <i>P. kovachii</i>	33
Figura 9. Apertura de la flor, especie <i>P. kovachii</i>	33
Figura 10. Morfología del sépalo, especie <i>P. kovachii</i>	34
Figura 11. Morfología del pétalo, especie <i>P. kovachii</i>	35
Figura 12. Morfología del labelo, especie <i>P. kovachii</i>	35
Figura 13. Morfología de la columna floral, especie <i>P. kovachii</i>	36
Figura 14. Morfología del botón floral, especie <i>P. kovachii</i>	36
Figura 15. Morfología de una cápsula madura, especie <i>P. kovachii</i>	37
Figura 16. cápsula madura dehiscente, especie <i>P. kovachii</i> , tomada en el vivero Kgory thyka, Amazonas-Perú.	37
Figura 17. Morfología de la semilla, especie <i>P. kovachii</i> , obtenida en captura con un estereoscopio.	38
Figura 18. Diagrama floral de la especie <i>P. kovachii</i>	39
Figura 19. Grupos estadísticos en días a la germinación, bajo el análisis Duncan, determinándose en los grupos A (T3, T4), B (T1, T2) y C (T5).	40
Figura 20. Grupos estadísticos de días al estado plúmula, bajo el análisis Duncan, determinándose los grupos A (T3, T4), B (T1), C (T2) y D (T5).	41
Figura 21. Especie, <i>P. kovachii</i> ; A) Semilla sin germinar; B) 1. restos de la envoltura de la semilla, 2. embrión germinado; C) Embrión germinado; D) 1. embrión en estado plúmula.	42
Figura 22. Semilla artificial con embrión de <i>P. kovachii</i> en estado plúmula, T1 (A y B) y T2 (C y D).	43

Figura 23. Diferencias significativas para la variable: tiempo a la deshidratación a las: A) 6 horas, B) 9 horas, C) 12 horas, D) 15 horas, E) 18 horas, F) 21 horas y G) 24 horas.	44
Figura 24. Tendencia de deshidratación en 24 horas del tratamiento 1 y 2.....	45
Figura 25. Deshidratación de las semillas artificiales del tratamiento 1, A), 0 horas B), 3 horas C), 6 horas D), 9 horas E), 12 horas F), 15 horas G), 18 horas H), 21 horas I), 24 horas.....	45
Figura 26. Deshidratación de las semillas artificiales del tratamiento 2, A), 0 horas B), 3 horas C), 6 horas D), 9 horas E), 12 horas F), 15 horas G), 18 horas H), 21 horas I), 24 horas.....	46
Figura 27. Desarrollo del protocolo para la elaboración y producción de la semilla artificial, especie <i>P. kovachii</i>	48

RESUMEN

La especie *Phragmipedium kovachii*, es una orquídea endémica que habita naturalmente en las zonas húmedas de la región Amazonas del Perú, misma que han sido extraídas de sus hábitats naturales, ocasionando que esté en peligro crítico por la CITES. Uno de los objetivos de esta investigación fue establecer un protocolo para producir semilla artificial y conservarla en condiciones *in vitro*. Se obtuvo la muestra vegetal que fue llevada al herbario Kuelap de la UNTRM, ratificándose la especie y se caracterizó la morfología óptima de una planta madre. En la fase del establecimiento de la semilla en cultivo *in vitro* para la obtención de embriones somáticos, la prueba Kruskal Wallis para días a la germinación, determinó que el T1 y T2 está en el mismo grupo, siendo los más eficientes, logrando la germinación de la semilla en 43 días. Para días al estado plúmula, según la prueba Kruskal Wallis, el T1 es el más eficiente con 139 días. En la fase de encapsulamiento, se usó cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a una concentración del 2% p/v, y dos dosis de alginato de sodio al 2 y 3 % p/v, ambos logrando la encapsulación del embrión somático en estado plúmula, pero en la prueba de deshidratación a temperatura ambiente por 24 horas, el tratamiento con alginato de sodio al 2 % sufre menos deshidratación en cuanto al tiempo. Siendo esta investigación un inicio para la conservación de especies en peligro de extinción con técnicas de biotecnología en semilla artificial.

Palabras clave: Semilla artificial, conservación, embriogénesis somática, estado plúmula, biotecnología, protocolo.

ABSTRACT

The *Phragmipedium kovachii* species is an endemic orchid that lives naturally in the humid areas of the Amazon region of Peru, which have been extracted from its natural habitats, causing it to be critically endangered by CITES. The objective of this research is to establish a protocol to produce artificial seed and conserve it. The plant sample was obtained and taken to the Kuelap herbarium of the UNTRM, determining the species and characterizing the morphology of the plant. In the seed establishment phase in in vitro culture to obtain somatic embryos, the Kruskal Wallis test for days to germination, determined that T1 and T2 are in the same group, being the most efficient, achieving the germination of the seed in 43 days and for days to the plumule state, according to the Kruskal Wallis test, the T1 is the most efficient reaching the plumule state in 139 days. In the encapsulation phase, dihydrated calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was used at a concentration of 2% w / v, and two doses of sodium alginate at 2 and 3% w / v, both achieving embryo encapsulation somatic in plumule state, but in the dehydration test at room temperature for 24 hours, the treatment with 2% sodium alginate suffers less dehydration in terms of time. This research being a beginning for the conservation of endangered species with biotechnology techniques in artificial seed.

Keywords: Artificial seed, conservation, somatic embryogenesis, plumule state, biotechnology, protocol.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú, conocido en el mundo por ser muy diverso en sus riquezas biológicas caracterizado por su diversidad genética, climas, pisos ecológicos, y zonas de producción, así como ecosistemas muy productivos que convierten en uno de los centros más importantes sobre recursos genéticos de plantas y animales (Herrera, 2019).

Así en el reino vegetal, las orquídeas de la familia Orchidaceae es considerada como una de las familias más diversas con 30 000 especies aproximadamente (MINAM, 2017), organizadas en 750 géneros (Cavero, Collantes y Patroni, 1979); siendo el Perú con más diversidad del mundo en géneros, con 212 y con 3 000 especies de orquídeas (Millán, Bravo, Chocce y Coz, 2007).

Mediante el CITES se registró la comercialización internacional de orquídeas desde 1975 hasta el 2015 cerca de 182 677 plantas en el Perú (MINAM, 2017); sin embargo, muchas de estas especies se han visto amenazadas por la excesiva extracción masiva de sus hábitats naturales y la deforestación a gran escala (Millán, Bravo, Chocce y Coz, 2007).

Se han identificado 9 especies del género *Phragmipedium* para nuestro país, de las cuales 5 de ellas están en peligro crítico, encontrándose en el apéndice I del CITES, dentro de ella la especie *Phragmipedium kovachii* (MINAM, 2017). Mediante el Decreto Supremo N°0052-91-AG se aprobó el Reglamento de Conservación de Orquídeas, que prohíbe a nivel territorio peruano por tiempo indefinido, la extracción, transporte, comercialización y exportación de especies de orquídeas (Millán, B., Bravo, M., Chocce y Coz, 2007), todos estos datos sobre las orquídeas en el Perú hacen que se creen alternativas para la conservación y comercialización.

Las orquídeas del género *Phragmipedium* es conocido como “zapato de reina” (Cavero, Collantes y Patroni, 1979), siendo muy apreciado por la diversidad de sus flores, colores, formas vistosas y su rareza, las orquídeas se adhieren a distintas condiciones ambientales, como al tronco de un árbol en la selva baja o en una pared rocosa en los andes (MINAM, 2017).

La orquídea de especie *Phragmipedium kovachii* está en peligro crítico, en el apéndice I, según el CITIES (MINAM, 2015), por lo que es de mucha importancia tener información sobre la especie, sobre todo en la caracterización morfológica para su debida identificación en campo; hasta el momento solo se tiene un artículo que menciona a esta especie de manera generalizada, realizada en el 2002, por John T. Atwood, de título: “*PHRAGMIPEDIUM KOVACHII*, A NEW SPECIES FROM PERÚ”, que menciona las características morfológicas generales que presenta la planta (Atwood, 2002); por lo que es de mucha importancia caracterizar de forma más detallada a la especie que puede estar en peligro de extinción.

De tal modo, la propagación sexual se da de manera natural por semillas, algunas especies de orquídeas solo son polinizadas por un par de insectos; los frutos son nombrados como cápsulas y se estima que dentro de ellas puede haber entre 200 mil a 1 millón de semillas, midiendo micras que consta de un embrión, una cubierta y con poco o casi nada de endospermo; estas semillas realizan una simbiosis con hongos específicos para su germinación y alimentación; el éxito que se tiene por este sistema es de que por cápsula puedan germinar de 12 a 15 semillas y lleguen a ser adultas 1 o 2 después de 3 años; además se obtienen plantas heterogéneas genéticamente (MINAM, 2017).

La propagación asexual se puede obtener de fracciones de la planta madre mediante pseudobulbos, separación de raíces, hijuelos, yemas y cultivo de tejidos, obteniendo plantas más homogéneas genéticamente (Menchaca, 2011).

Todos estos sistemas de propagación pueden provocar una limitada disponibilidad de material vegetal; a diferencia de la última técnica de la propagación asexual por cultivo de tejidos que se puede obtener clonaciones de la planta madre mediante la embriogénesis somática, que es cuando las células o semillas experimentan una dediferenciación para formar una estructura y estas mismas pueden madurar y germinar (Rodriguez, 2018).

El cultivo in vitro es usada en propagación de tejidos, que tiene por procedimiento separar una parte de la planta y someterla a condiciones artificiales para su desarrollo (Rodriguez, 2018), a la misma vez puede ser usado con fines de comerciales, de conservación o una alternativa para disminuir la extracción masiva

de los hábitats naturales de especies que en peligro de extinción de orquídeas (Díaz et al., 2015), esta técnica es capaz de germinar las semillas de orquídeas en ausencia del hongo, sustituyéndolas por el medio de cultivo (Billar, Dalzotto & Lallana, 2014).

Distintos trabajos sobre cultivo *in vitro* en orquídea fueron realizados vía embriogénesis somática (Alejandro et al., 2013; Espinosa et al., 2010; Lee, Murguía, Laguna, García, Gáamez, Galindo, Landero, Iglesias, Santana, 2009 y Morales, 2012). En Perú hay investigaciones escasas en embriogénesis somática en orquídea, una de las más resaltantes fue realizado por De la cruz, Ruiz & Guerrero (2017). No obstante, la implementación de una técnica con fines de conservación, que es capaz de alimentar el embrión hasta que desarrolle su primera hoja y raíz, se vuelve un factor de investigación.

La utilización de la semilla artificial que consta de encapsular al embrión somático y funciona como endospermo del mismo para su germinación (Eddy Morales, 2012), se han realizado trabajos de semilla artificial en Alfalfa, arroz, papaya, papa, plátano, orquídeas y otros. Las investigaciones se han realizado de forma exitosa y obtenido altos porcentajes de germinación de dichos embriones encapsulados con endospermos artificiales. Sin embargo, esta técnica de semilla artificial aún no ha sido realizada en Perú, por lo que de dichas investigaciones realizadas anteriormente pueden ser adoptados para la obtención de semillas artificiales y aclimatación de las plantas provenientes de embriones somáticos de orquídeas con el fin de producir a gran escala, conservar el material genético, rescatar la biodiversidad y fines comerciales.

En base a lo mencionado, la actual investigación tiene por principal objetivo desarrollar una semilla artificial que contenga el embrión de la especie a conservar, y para el logro de ello, se tiene como objetivo específico; 1) Caracterizar morfológicamente *Phragmipedium kovachii* con miras a una correcta selección de la planta madre, 2) Obtener embriones somáticos a partir de semillas de *Phragmipedium kovachii* en medio de cultivo *in vitro*, 3) Conservar semilla artificial de *Phragmipedium kovachii* mediante encapsulación del embrión en estado plúmula y, 4) Identificar un protocolo para la producción y conservación *in vitro* de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium kovachii*).

II. MATERIALES Y METODOS

La actual investigación se realizará en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) área de cultivo in vitro, a cargo del INDES-CES, de la UNTRM, en la ciudad de Chachapoyas de la Región Amazonas.

2.1. Caracterizar morfológicamente de *Phragmipedium kovachii* con miras a una correcta selección de la planta madre.

La planta de la especie *P. kovachii* para la caracterización morfológica fue obtenida del vivero KGORY THIKA que se ubica en el anexo Shucayacu, distrito de Yambrasbamba, provincia de Bongara, departamento de Amazonas, que está a cargo del señor Jhon Charles Valle Mas; que por el Gobierno Regional de Amazonas y la Autoridad Regional Ambiental con informe técnico N° 004-2015-GRA-ARA-DEGBFS-A,BONG/PCFFS-POM/LARCH, que autorizaron el funcionamiento del vivero con fines comerciales.

El material vegetal fue llevado al Laboratorio de Dendrología y Herbario KUELAP, a cargo del Ing. Eli Pariente Mondragón, de la Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico (ICNDMB) con código de autorización N° AUT-ICND-2020-001, perteneciente a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM); donde se realizó la determinación botánica de la especie y su ingreso al herbario.

Para la determinación de la caracterización morfológica de la planta, se tomó medidas referenciadas al ancho, largo y altura, como también fotografías de dichas partes, que tiene por finalidad mostrar la forma, tamaño y color de cada parte de la planta, establecida por Haimovich et al, (2012); demostrada en la raíz, tallo, hoja, bráctea floral, ovario, botón floral, flor completa y sus partes de la misma.

Se desarrolló la fórmula floral de la especie *Phragmipedium kovachii* y la realización del diagrama floral, según el manual establecido por Changoluisa y Martínez (2012).

2.2. Obtener embriones somáticos a partir de semillas de *Phragmipedium kovachii* en medio de cultivo in vitro.

Para lograr el establecimiento de un material vegetal de cierta especie, pasa por un protocolo establecido, como selección del material vegetal, asepsia del explante, preparación del medio de cultivo y inoculación del material vegetal en medio de cultivo in vitro, establecida por Mroginski y Roca (1991).

El material vegetal usado es de la especie *Phragmipedium kovachii* colectada del vivero Kgory, ubicada en distrito de Yambrasbamba, Provincia de Bongara, Departamento de Amazonas, la cápsula contiene semillas que se da después del ciclo de floración; el material vegetal debe estar adherido a la planta madre hasta que complete su maduración y antes de su dehiscencia; al ser colectada debe guardarse en refrigeración hasta que esté listo para su siembra in vitro.

Se estableció 5 tratamientos en medio de cultivos, con la finalidad de experimentar cuál de los tratamientos es más eficiente en la germinación en cuanto a número de días.

Tabla 1. Medio de cultivo establecido para cada tratamiento.

	T1	T2	T3	T4	T5
MS	4.33 gr/L	4.33 gr/L	4.33 gr/L	4.33 gr/L	4.33 gr/L
Agar	6 gr/L	6 gr/L	6 gr/L	6 gr/L	6 gr/L
Sacarosa	20 gr/L	20 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L
Carbón activado	2 gr/L	2 gr/L			2 gr/L
Harina de plátano				30 gr/L	40 gr/L
Agua de coco		20 %		0.5 %	
Myo inositol			100 mg/L		
ANA			2 mg/L		
BAP			2 mg/L		
AIA			2 mg/L		
pH	5.2 +- 2	5.2 +- 2	5.7 +- 2	5.2 +- 2	5.2 +- 2

Se determinó los medios de cultivo para cada tratamiento, como base para todos los tratamientos se usó Murashige y Skoog, sacarosa, agar y pH ligeramente ácido regulado con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCL); también se añadió a los tratamientos sustancias reguladoras para

evaluar la germinación, como carbón activado usado para los T1, T2, T5; agua de coco para los T2, T4; harina de plátano para los T4, T5; myo inositol, ANA, BAP y AIA para el T3; usando para la disolución agua destilada estéril; cada tratamiento fue puesto en 10 frascos, con 25 ml cada uno.

Los medios nutritivos preparados fueron depositados en una magenta de vidrio con tapa a presión, se pasa a autoclavarlo con un tiempo de esterilización de 20 minutos a 120 °C, luego se pone a refrigerar hasta que se realice la siembra del material vegetal.

Antes de pasar a la cabina de flujo laminar, se desinfecto la cabina, materiales a usar, instrumentos a usar, medios de cultivo, con alcohol al 70 %, el material vegetal que es la cápsula antes de su dehiscencia que contiene las semillas, se desinfecto con jabón líquido por 5 minutos, se enjuago 3 veces, se puso en hipoclorito de sodio al 4% para ingresar a la cabina de flujo laminar sin ningún agente externo.

Ya en la cabina de flujo laminar, se pone en esterilización por rayos UV por 15 minutos, se encendió el aire, la cápsula se sumergió en alcohol a 95° y se flamea, este procedimiento se hace dos veces, la cápsula se coloca en una placa petri estéril, y se hace el corte el corte segmental a la cápsula con un bisturí N° 11, las semillas descubiertas se sirvieron a los magentas que contienen el medio de cultivo, colocando una película de agua destilada estéril, tapando, sellando con parafilm y rotulando a la magenta.

Los magentas son llevadas a un ambiente de crecimiento donde se evaluó la germinación, con un fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas oscuridad, iluminada con luz artificial, a una temperatura ambiente de 22 °C, regulada por aire acondicionado.

Las evaluaciones para determinar la germinación de las semillas se realizaron periódicamente cada semana, tomándose como dato que se considera una semilla germinada cuando el embrión logra romper la testa, hincharse y notarse una coloración verdosa, la evaluación entre tratamientos se dio por el número de días a la germinación.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa informático infostat. se determinó la distribución normal de los datos usando el estadístico de Shapiro Wilk. dependiendo de los resultados de normalidad de datos, se realizó un análisis ANOVA en un diseño completamente aleatorio para cada tratamiento. Los resultados fueron comparados con la prueba Duncan ($p < 0.1$) para las variables.

2.3. Obtener semilla artificial de *Phragmipedium kovachii* mediante encapsulación del embrión en estado plúmula.

Para realizar la técnica de “semilla artificial”, se esperó que el embrión llegue estado plúmula, que consta que el embrión está desarrollando parte de lo que podría ser la primera hoja y raíz, para alcanzar el desarrollo del estado plúmula, fue evaluado periódicamente, donde se evaluó el número de días al estado plúmula en cuanto a los tratamientos establecidos.

Alcanzado el embrión al estado plúmula se procedió a preparar los medios de cultivo para realizar la encapsulación, la primera solución es el cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2 % (P/V), agregando MS al 100 %, con un pH que se regulo a 5.7 ± 2 ; el siguiente es el Alginato de Sodio a dos concentraciones del 2 y 3 %, adicionando MS al 100 %, regulado a un pH de 5.7 ± 2 ; ambos medios de cultivo fueron autoclavados a 121°C por 20 minutos.

En la cabina de flujo laminar, se desinfecto la cabina, materiales, instrumentos, con alcohol al 70 %, la cabina se pone en esterilización con rayos UV por 15 minutos.

Los embriones somáticos en estado plúmula se retiraron de los frascos con medio cultivo, y se lo vertió en los frascos que contiene alginato de sodio, luego con un dropper se succiono el embrión junto con el alginato de sodio, y se vertió en forma de gota que contenía un embrión a la solución que contenía cloruro de calcio di hidratado, se removió por 30 minutos para dar forma a la cápsula; procedente a esto se decantó el medio de cloruro de calcio, y se enjuago por 3 veces las cápsulas con agua destilada estéril, misma que se procedieron a colocar en una placa petri estéril con una película de agua para

evitar la deshidratación; se selló la placa petri con parafilm, se rotulo con el número de tratamiento y fecha y se lleva al ambiente de aclimatación, a una temperatura de 22 °C con luz artificial en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad; para cada tratamiento se desarrollaron 50 semillas artificiales.

Disposición del diseño experimental, donde cada tratamiento constara de 50 unidades experimentales (1 unidad experimental = 1 semilla artificial).



T1: alginato de sodio al 2%.

T2: alginato de sodio al 3%.

Todos los análisis estadísticos serán realizados usando el programa informático Infostat, las concentraciones del alginato de sodio con las combinaciones de los nutrientes minerales serán comparadas por medio del análisis de varianza (ANOVA) mediante un Diseño completamente aleatorio con un análisis bifactorial de 2x2 y los resultados serán comparados por la prueba de Duncan ($p < 0.1$). También se realizará las comparaciones entre los tratamientos y los resultados obtenidos.

Para la evaluación de este factor, se determinó en cuanto a la cápsula, formación y consistencia de la semilla artificial, prueba de deshidratación a temperatura ambiente a las 24 horas con 20 unidades por cada tratamiento de alginato de sodio.

Para la variable de deshidratación se determinó estadísticamente con la prueba de Anva y Kruskal Wallis, para los tratamientos de alginato de sodio al 2 y 3 %, a las horas 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas; expresadas en tabla y con sus respectivos gráficos representativos.

2.4. Identificar un protocolo para la producción y conservación in vitro de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium kovachii*).

La identificación de un protocolo se basó a base de los resultados obtenidos en la experimentación, el tratamiento más eficiente obtenido en la parte de germinación de las semillas y estado plúmula de la especie *Phragmipedium kovachii*; tratamiento más eficiente con alginato de sodio en la formación de la semilla artificial y en la deshidratación a temperatura ambiente.

III. RESULTADOS

3.1. Caracterización morfológica de *Phragmipedium kovachii* en la Región Amazonas.

3.1.1. Planta de *Phragmipedium kovachii*

Según la caracterización morfológica de la orquídea de la especie *Phragmipedium kovachii* tiene hábito de crecimiento litófito y un tipo de crecimiento monopodial.

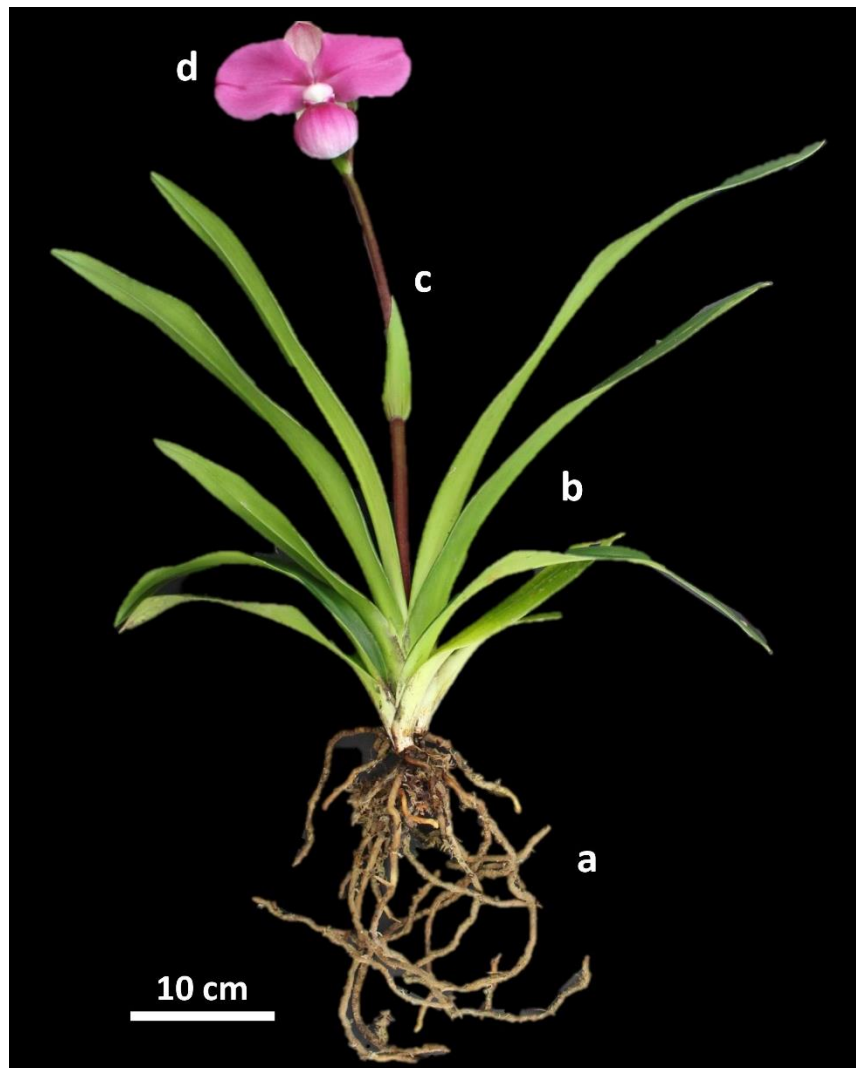


Figura 1. Partes de la planta, especie *Phragmipedium kovachii*. a) raíz, b) hojas, c) tallo, d) flor.

3.1.2. Medidas de la muestra vegetal

Tabla 2. Partes de la planta de la especie *P. kovachii* obtenida en Amazonas-Perú, expresada en medidas y cantidad de cada muestra vegetal.

Partes de la planta		Largo (cm)	Ancho (cm)	Altura (cm)	Número piezas
Planta entera			54.1	73	
Raíz		29.2	0.5		19
Hojas		(15 – 53)	(1.8 - 5)		6
Tallos		40.8	0.9		
Bráctea		9.4	1.8		
Botón floral no maduro	Bráctea floral	3.6	1.3		
	Ovario	4	0.7		
	Botón	2.7	2.1		
Botón floral maduro	Flor completa	14.5	11.8		
	Bráctea floral	5.1	1.8		
	Ovario	7	0.8		
	Sépalo	4.8	3.7		2
	Pétalo	7.2	6.6		2
	Labelo	7.6	5.5	4.2	
	Columna	2.6	2.3		
Cápsula madura		8.6	1.1		

3.1.3. Raíz

En la caracterización morfológica de esta estructura se determinó que, es de tipo de crecimiento litófito por lo que no tiene velamen. La medida de la raíz obtenida es de 29.2 cm, con raíces de diferente tamaño en largo, con un máximo de 49.5 cm y un mínimo de 7.5 cm, teniendo un promedio de número de raíces de 19; con un color marrón claro.



Figura 2. *Morfología de la raíz, especie P. kovachii.*

3.1.4. Tallo

Respecto al tallo de esta especie es cilíndrica, y las medidas obtenidas de la muestra vegetal son con un largo de 40.8 cm y de espesor de 0.9 cm, con una coloración en la base donde están las hojas a rosado claro y para la parte superior de color verde, en la misma que se aprecia tricomas de color rojizo que le dan una tonalidad a la vista de marrón rojizo.

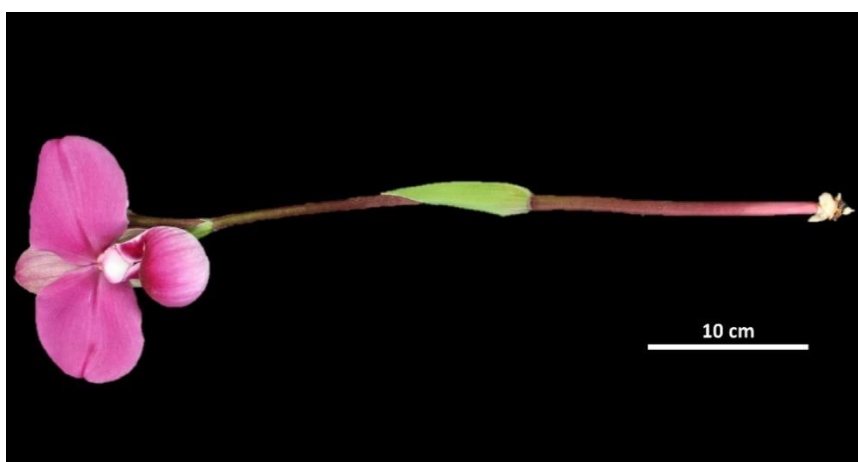


Figura 3. *Morfología del tallo, especie P. kovachii.*

3.1.5. Hoja

La morfología de la hoja es plegada, de diferentes tamaños, se distribuyen de forma paralela, las hojas más viejas son más grandes con una medida de 53 cm de largo y un ancho de 5 cm, la más joven es más pequeña con 15 cm de largo y 1.8 cm de ancho; así mismo la tonalidad varía de acuerdo a la edad de la hoja, las más viejas son más oscuras que las jóvenes y el haz de las hojas son más oscuras que el envés.



Figura 4. *Morfología de la hoja, especie P. kovachii.*



Figura 5. *Morfología de la hoja, especie P. kovachii.*

3.1.6. Bráctea floral

La bráctea floral de esta muestra vegetal obtenida tiene una medida en largo de 3.6cm por 1.3 cm de ancho, con forma de embudo con punta en la parte superior, con un color verde claro.



Figura 6. *Morfología de la bráctea floral, especie P. kovachii.*

3.1.7. Ovario

Respecto al ovario, se caracterizó a partir de un ovario inmaduro, de medidas de 7 cm de largo, 0.8 cm de ancho y tiene un color generalizado de marrón claro con tricomas color rojizo.



Figura 7. *Morfología del ovario, especie P. kovachii.*

3.1.8. Flor

La caracterización morfológica de la flor de la orquídea *Phragmipedium kovachii* es zigomorfa, tiene una medida de 14.5 cm de largo y 11.8 cm de ancho, consta de 2 sépalos, 2 pétalos, 1 labelo y 1 columna.

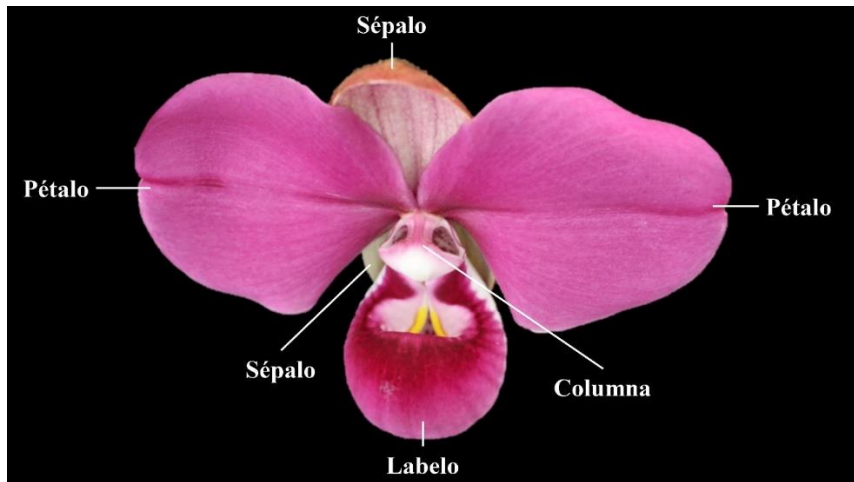


Figura 8. Partes de la flor, especie *P. kovachii*.

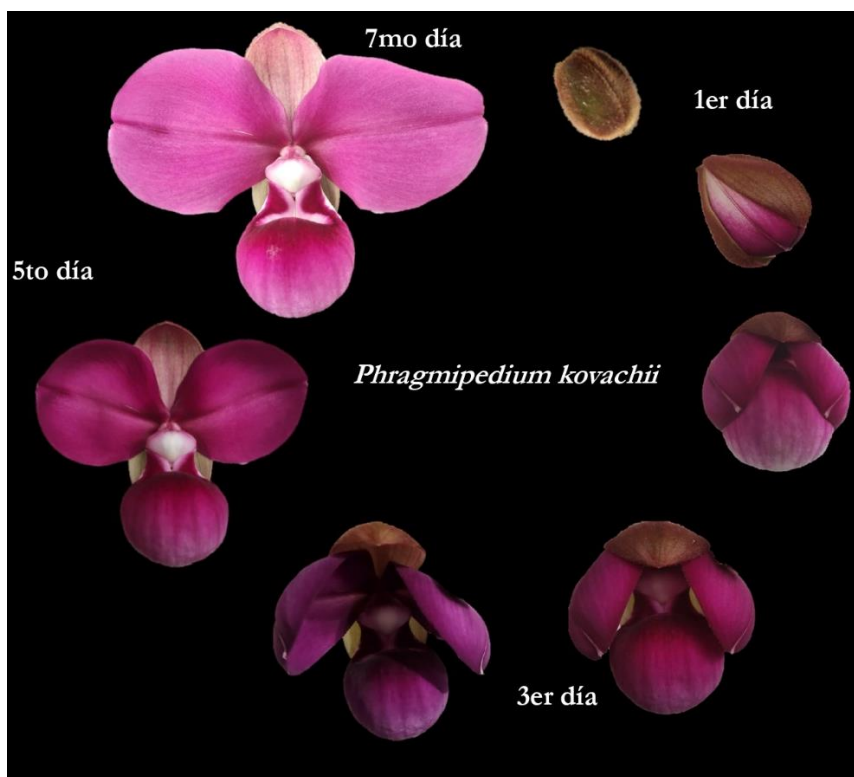


Figura 9. Apertura de la flor, especie *P. kovachii*.

3.1.9. Sépalo

El sépalo, recubre y protege a las partes de la flor hasta su apertura de la flor. El botón floral cuando está cerrada, desarrollada la flor se divide en 2 para la expansión de la flor y se ubica en la parte de atrás. Tiene una medida de 4.8 cm de largo y 3.7 cm de ancho. La característica de que los extremos estén ligeramente recurvados hacia adentro, la parte exterior que estuvo más expuesta al ambiente es de color verde con tonalidades sectoriales marrón y

rojizo con tricomas de color rojo; mientras que la parte interna presenta una tonalidad blanquecina con tonalidades en línea de color violeta, de textura lisa.



Figura 10. Morfología del sépalo, especie *P. kovachii*.

3.1.10. Pétalo

La flor de la especie *Phragmipedium kovachii* cuenta con 2 pétalos grandes llamativos. Las medidas del material vegetal obtenido son de 7.2 cm de largo y 6.6 de ancho, tienen un ligero recurvado hacia afuera, la parte de adelante tiene un color púrpura más claro y la parte de atrás un púrpura más oscuro con una parte que se va difumando a tonalidad blanca hacia la parte central interna, también tiene la característica de tener una línea horizontal que atraviesa los pétalos con un color diferenciado por la tonalidad.



Figura 11. *Morfología del pétalo, especie P. kovachii.*

3.1.11. Labelo

Las medidas del labelo colectado son 7.6 de largo, 5.5 cm de ancho y 4.2 cm de altura. Morfológicamente, tiene forma de saco, en la parte de atrás se muestra de color blanco, que va cambiando de color hacia la parte de adelante con un color púrpura. Va dirigiéndose en el ápice con una tonalidad de purpura más oscura, para el ingreso al interior del labelo se torna de color rosa pálido con dos franjas de color amarillo, donde al interior del labelo se puede observar tricomas blancos con un fondo de color blanco y puntos de color púrpura.



Figura 12. *Morfología del labelo, especie P. kovachii.*

3.1.12. Columna

La columna de la *Phragmipedium kovachii* es la parte central reproductora de la flor. Consta de dos anteras de color amarillo opaco, y el estigma está muy cercana, para una mejor eficiencia en la recepción de polen, la columna tiene una medida 2.6 cm de ancho y 2.3 cm de largo con el ápice recurvado hacia adentro, los colores varían externa e internamente de un rosa pálido a blanco en distintos sectores.

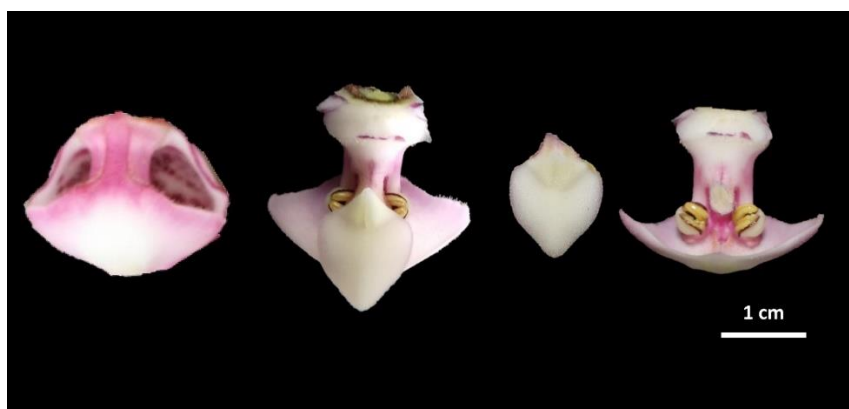


Figura 13. Morfología de la columna floral, especie *P. kovachii*.

3.1.13. Botón floral

De morfología redonda, presenta una medida de 2.7 cm por 2.1 cm, con un color verde oscuro, con tricomas de tonalidad marrón a rojizo.



Figura 14. Morfología del botón floral, especie *P. kovachii*.

3.1.14. Cápsula

Phragmipedium kovachii presenta una cápsula de forma alargada y circular, que se forma detrás de la flor. Tiene la medida de 8.6 cm de largo y 1.1 cm de ancho. De color marrón claro, con algunas tonalidades verdes por partes, también presenta tricomas de color rojizo.

Podemos ver también una cápsula ya en estado de dehiscencia, que se abre naturalmente y el polen es transportado mediante el viento, ya que sus semillas son muy pequeñas y se liberan como polvo.



Figura 15. *Morfología de una cápsula madura, especie P. kovachii.*



Figura 16. *cápsula madura dehiscente, especie P. kovachii, tomada en el vivero Kgory thyka, Amazonas-Perú.*

3.1.15. Semilla

La colecta del material vegetal obtenido aún no estaba en forma madura. Las semillas están adheridas a su base, donde podemos apreciarlo microscópicamente al embrión de un tono oscuro que está cubierta por una testa de células muertas.



Figura 17. *Morfología de la semilla, especie P. kovachii, obtenida en captura con un estereoscopio.*

3.1.16. Formula floral

La fórmula floral de la especie *Phragmipedium kovachii* se identificó que es la siguiente:

$$\text{♂} \downarrow \text{P}2+3, [\text{A} (2) \bar{\text{G}} (1) \left[\begin{array}{c} \infty \\ 3 \end{array} \right.$$

La especie *Phragmipedium kovachii* es una planta hemafrodita; con una flor de forma zigomorfa; la unión de sus 2 sépalos, 2 pétalos y 1 labelo son denominados perianto con verticilo doble; en el siguiente verticilo tenemos por unión al androceo que cuenta con dos anteras y el gineceo con ovario ínfero, con 3 cavidades ováricas y un número de óvulos finito.

Tabla 3. Símbolo y significado de la formula floral de la especie *P. kovachii*.

SÍMBOLO	SIGNIFICADO		
♂	Hermafrodita o bisexual		
↓	Zigomorfa		
P	Perianto		
A	Androceo		
\bar{G}	Gineceo	∞	Numeroso no infinito
		3	Cavidades ováricas
+	Verticilos dobles		
,	Separa cada verticilo		
()	Piezas del verticilo están unidas		
[]	Verticilos unidos		

3.1.17. Diagrama floral

Gráficamente se representa la disposición de las piezas florales de la especie *Phragmipedium kovachii*, se determina que la flor es de doble simetría, con la presencia de estaminodios, labelo y perianto que es la unión de la bráctea y pétalos; se presenta el diagrama floral representativo:

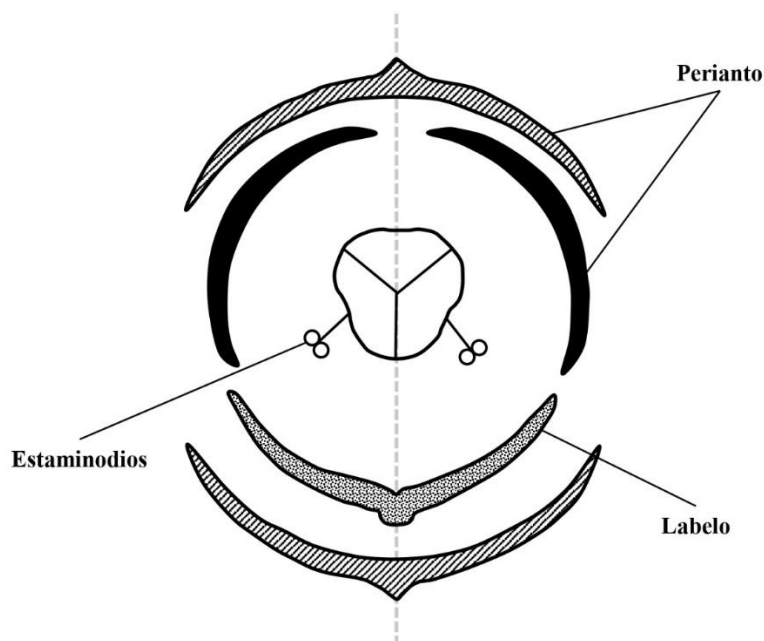


Figura 18. Diagrama floral de la especie *P. kovachii*.

3.2. Establecimiento de las semillas de *Phragmipedium kovachii* en medio de cultivo in vitro.

Se muestra los datos expresados en días, referente al tiempo que toma el embrión en llegar a la germinación y al estado plúmula.

3.2.1. Prueba de Kruskal Wallis para días a la germinación.

En la tabla 4, muestra la Prueba de Kruskal Wallis para la variable que se estudia días a la germinación en el medio de cultivo. Se identificaron diferencias estadísticas significativas para los tratamientos. El mayor valor en la germinación respecta al Tratamiento 5 con 56 días a la germinación del embrión. En tanto que, los tratamientos 3 y 4, no llegaron a germinar hasta la fecha final del experimento que fue hasta los 223 días.

En este sentido, la figura 19 muestra los grupos estadísticos bajo el análisis Duncan, donde se determinó en el grupo A los tratamientos 3 y 4, en el grupo B a los tratamientos 1 Y 2, y en el grupo C al tratamiento 5 de manera independiente.

Tabla 4. Prueba de Kruskal Wallis para la variable días a la germinación.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
días a la germinación	T T1	10	6.56	0.07	6.56	38.78	<0.0001
días a la germinación	T T2	10	6.56	0.15	6.56		
días a la germinación	T T3	10	0.71	0.00	0.71		
días a la germinación	T T4	10	0.71	0.00	0.71		
días a la germinación	T T5	7	7.47	0.13	7.48		

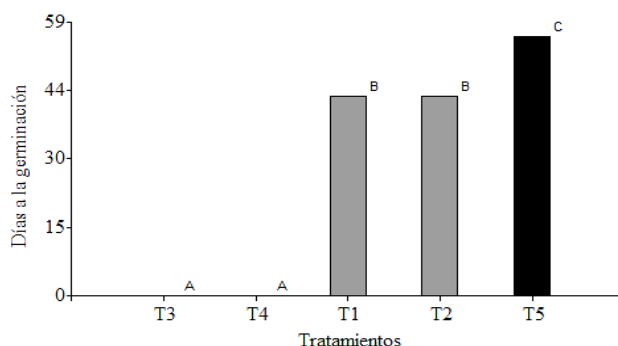


Figura 19. Grupos estadísticos en días a la germinación, bajo el análisis Duncan, determinándose en los grupos A (T3, T4), B (T1, T2) y C (T5).

3.2.2. Prueba de Kruskal Wallis para días al estado plúmula

En la tabla 5, muestra la Prueba de Kruskal Wallis para la variable días al estado plúmula. Se identificaron diferencias estadísticas significativas para los tratamientos. El mayor valor respecta al Tratamiento 5 con 185 al estado plúmula del embrión. En tanto que, los tratamientos 3 y 4, no llegaron al estado plúmula hasta la fecha final del experimento que fue hasta los 223 días.

Tabla 5. Prueba de Kruskal Wallis para la variable días al estado plúmula.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H
p Días al estado plúmula <0.0001	T1	10	139.00	1.63	139.00	41.44
	T2	10	160.00	2.75	160.00	
	T3	10	0.50	0.00	0.50	
	T4	10	0.50	0.00	0.50	
	T5	7	185.86	2.04	185.00	

En este sentido, la figura 20 muestra los grupos estadísticos bajo el análisis Duncan, donde se determinó en el grupo A los tratamientos 3 y 4, en el grupo B a los tratamientos 1, en el grupo C al tratamiento 2 y en el grupo D al tratamiento 5, de manera independiente.

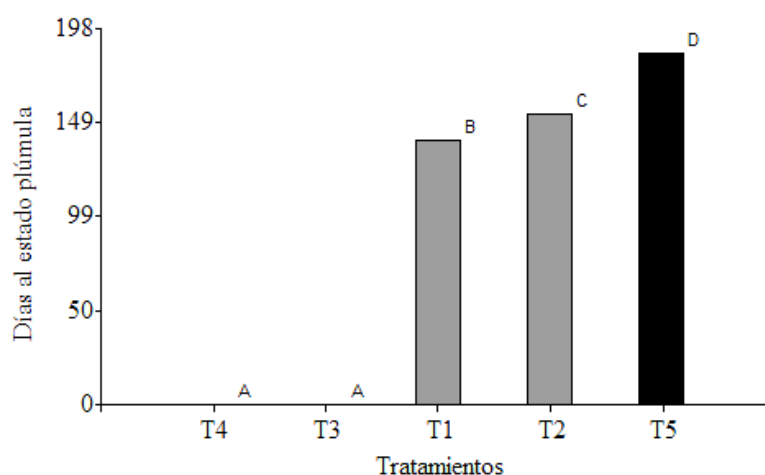


Figura 20. Grupos estadísticos de días al estado plúmula, bajo el análisis Duncan, determinándose los grupos A (T3, T4), B (T1), C (T2) y D (T5).

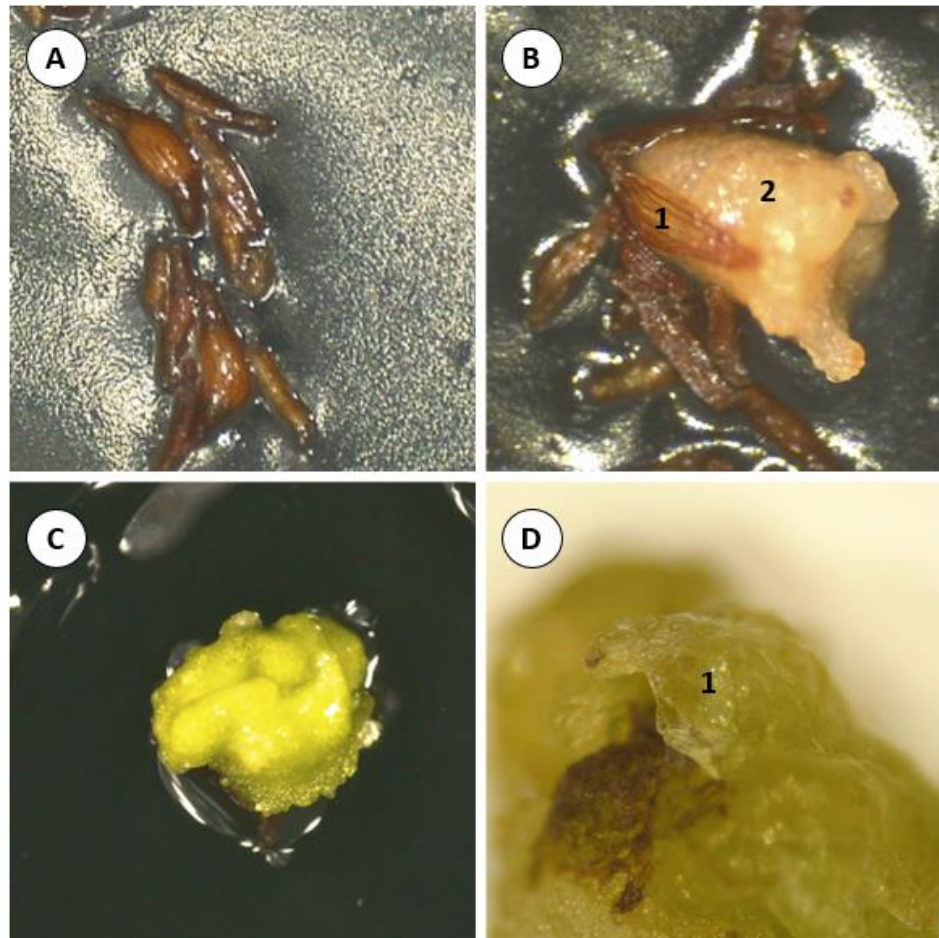


Figura 21. *Especie, P. kovachii*; A) *Semilla sin germinar*; B) *1. restos de la envoltura de la semilla, 2. embrión germinado*; C) *Embrión germinado*; D) *1. embrión en estado plúmula.*

3.3. Efecto del alginato de sodio para determinar la encapsulación del embrión en estado plúmula.

Se obtuvo semilla artificial con la encapsulación de los embriones somáticos en estado plúmula con ambas dosis, tratamiento 1 con alginato de sodio al 2 % y el tratamiento 2 con alginato de sodio al 3%.

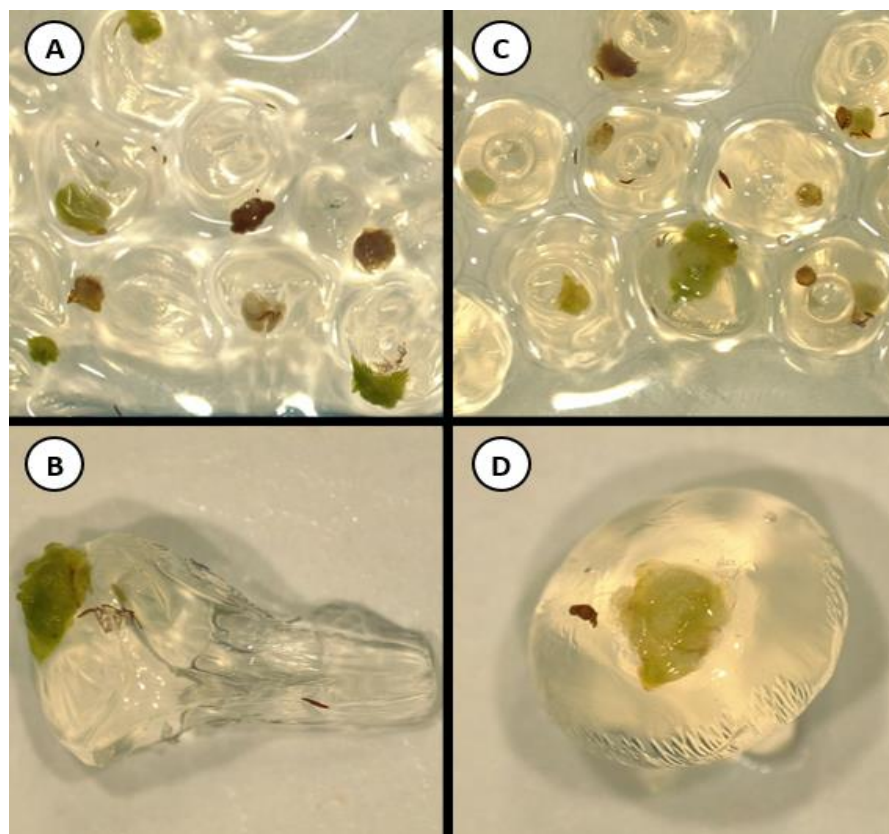


Figura 22. Semilla artificial con embrión de *P. kovachii* en estado plúmula, T1 (A y B) y T2 (C y D)

3.3.1. Deshidratación de las cápsulas.

En la tabla 6, muestra la Prueba de Anva y Kruskal Wallis para la variable de deshidratación cada 3 horas, donde se identificaron los tratamientos 1 y 2, con datos no significantes, tenemos a las horas 1 y 3, y con los datos estadísticamente significantes a las horas 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24

Tabla 6. Prueba de Anva y Kruskal Wallis para la variable horas a la deshidratación.

Nivel de significancia	Horas a la deshidratación								
	1 ^{ns}	3 ^{ns}	6 ^{**}	9 ^{**}	12 ^{**}	15 ^{**}	18 ^{**}	21 ^{**}	24 ^{**}
Promedio T1	5.31	4.80	3.85	3.05	2.53	2.12	1.87	1.60	1.53
Desviación estándar T1	± 0.5 9	± 0.5 6	± 0.6 1	± 0.5 6	± 0.55	± 0.5 3	± 0.4 4	± 0.2 6	± 0.19
Promedio T2	5.48	5.04	4.62	4.06	3.71	3.45	2.77	1.91	1.80
Desviación estándar T2	± 0.6 6	± 0.6 9	± 0.7 6	± 0.6 9	± 0.69 1	± 0.7 4	± 0.5 3	± 0.3 1	± 0.31
Tipo de prueba	Anva	Anva	Anva	Anva	Anva	Anva	Anva	Anva	Kruskal Wallis

ns= no significativo
 **= estadísticamente significativo
 T1= alginato de sodio al 2%
 T2= alginato de sodio al 3%

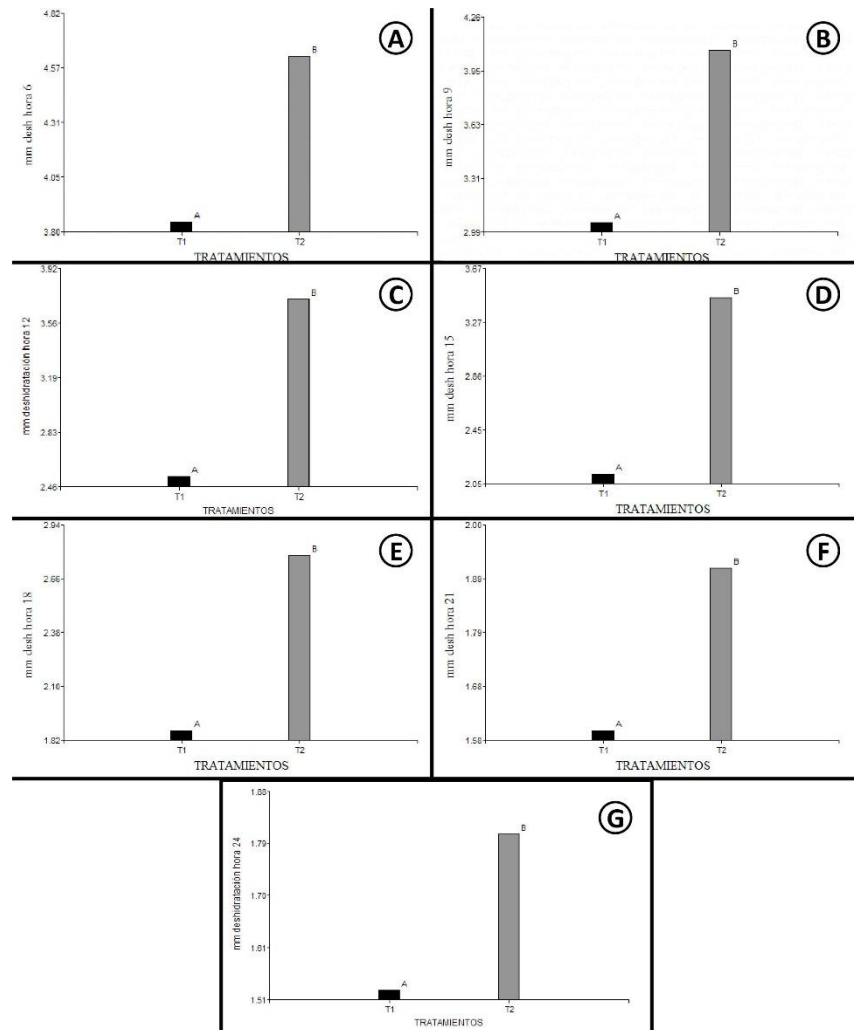


Figura 23. Diferencias significativas para la variable: tiempo a la deshidratación a las: A) 6 horas, B) 9 horas, C) 12 horas, D) 15 horas, E) 18 horas, F) 21 horas y G) 24 horas.

Se obtuvo una deshidratación en ambos tratamientos con alginato de sodio, variable medida en mm por cada hora a temperatura ambiente, el T1 muestra una deshidratación más rápida en cuanto al T2 (figura 24).

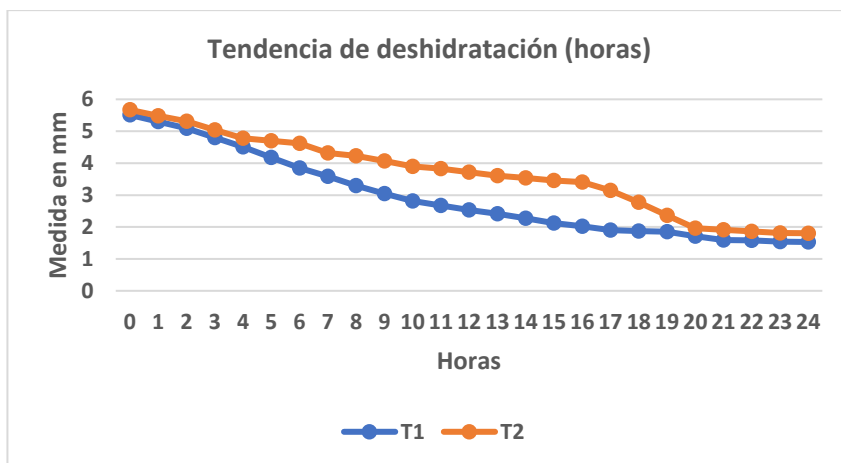


Figura 24. *Tendencia de deshidratación en 24 horas del tratamiento 1 y 2.*

En la figura 25 y 26, se muestra un gráfico con fotografías, la deshidratación del T1 y T2, tomada cada 3 horas; mostrándose que en el tratamiento 1, hasta la hora 9 aún se mantiene la forma de la semilla artificial; mientras que en el tratamiento 2, se mantiene la forma esférica hasta la hora 18; donde procedente a la deshidratación de la semilla artificial, se da la muerte del embrión.

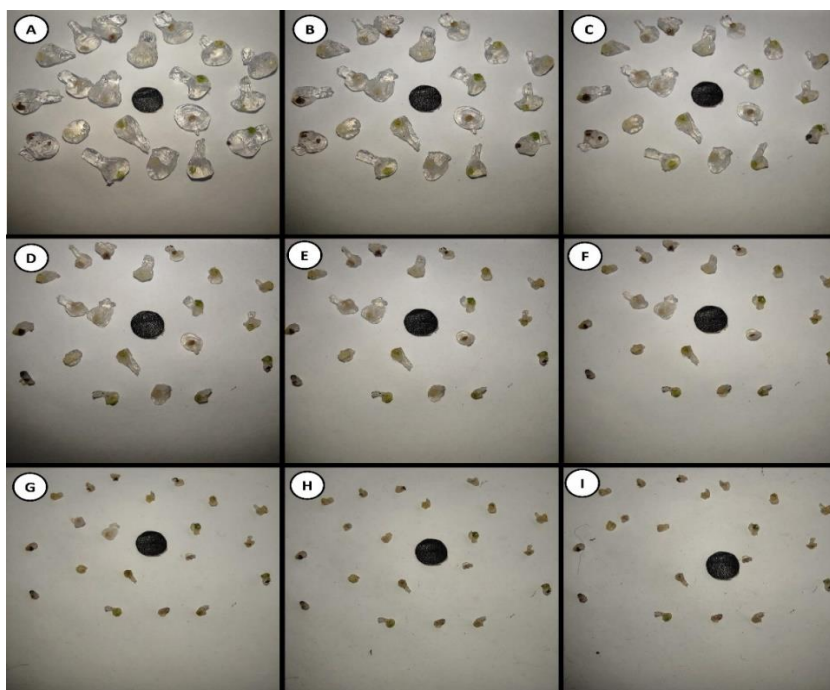


Figura 25. *Deshidratación de las semillas artificiales del tratamiento 1, A), 0 horas B), 3 horas C), 6 horas D), 9 horas E), 12 horas F), 15 horas G), 18 horas H), 21 horas I), 24 horas.*

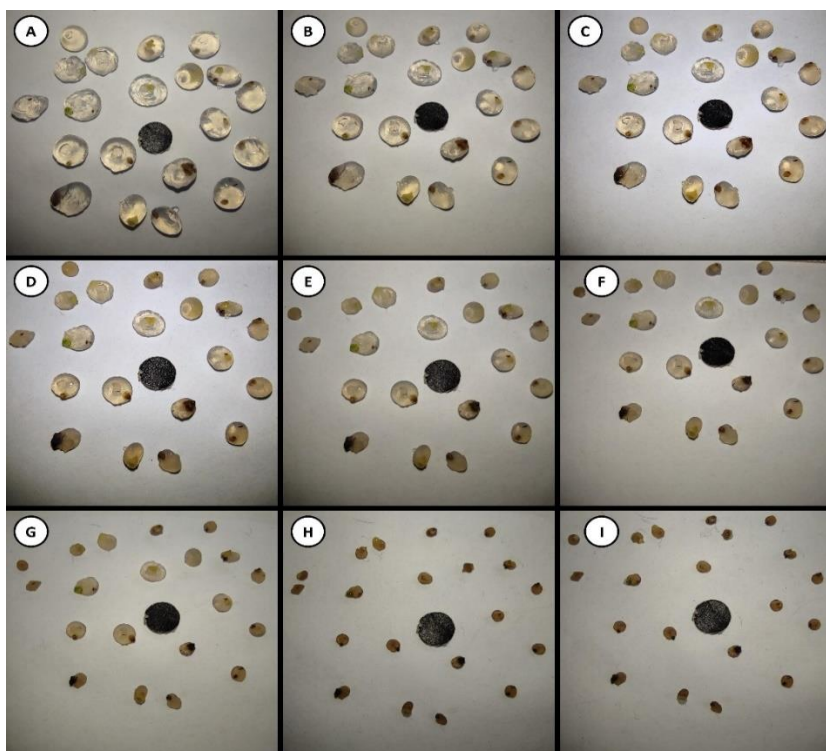


Figura 26. *Deshidratación de las semillas artificiales del tratamiento 2, A), 0 horas B), 3 horas C), 6 horas D), 9 horas E), 12 horas F), 15 horas G), 18 horas H), 21 horas I), 24 horas.*

3.4. Protocolo para la conservación de semilla artificial en condiciones in vitro.

Para la realización del experimento, se determino por etapas, proceso que se muestra en la tabla 7, cinco fases que comienza con el establecimiento del explante al medio de cultivo hasta la obtención de la semilla artificial, etapas que se determinaron de acuerdo a los días transcurridos por los tratamientos experimentados; en la etapa de establecimiento del explante en el medio de cultivo, germinación de la semilla y la obtención del estado plúmula, se determino con los 5 tratamientos establecidos, donde el T1 logro un desarrollo más rápido hasta los 139 días y el T5 logro desarrollar hasta los 185 días; en cuanto a la fase de encapsulación y evaluación de la semilla artificial, se determinaron dos tratamientos evaluados con alginato de sodio al 2 y 3 %, donde ambas dosis fueron óptimas para encapsular al embrión en estado plúmula, logrando conservar el embrión 123 días, dato obtenido en la ultima evaluación de la experimentación.

Tabla 7. *Proceso del experimento para determinar el protocolo.*

	Establecimiento in vitro	Germinación	Embrión en estado plúmula	Encapsulación del embrión	Evaluación de la semilla artificial
T	Inoculación de las semillas en medio nutritivo.	Desarrollo de la semilla en embrión somático.	Pequeño ápice que emerge del embrión, que proporcionara la primera hoja.	Embrión somático en estado plúmula encapsulada con alginato de sodio y cloruro de calcio.	Desarrollo del embrión encapsulado.
T1	0	43 días	139 días	219 días	342 días
T2	0	43 días	160 días		
T3	0	0	0		
T4	0	0	0		
T5	0	56 días	185 días		

La investigación realizada, desarrolló un protocolo con los pasos para la obtención de la semilla artificial, resultados eficientes según la experimentación realizada, como se muestra en la figura 27, iniciándose con la colección del explante, inoculando en un medio nutritivo para la germinación de la semilla y logrando desarrollar el embrión somático a estado plúmula, procediendo a la encapsulación del embrión somático con la solución de alginato de sodio al 3 % y cloruro de calcio di hidratado, con la ayuda de un dropper y conservada en placa petri con una película de agua para evitar la deshidratación.

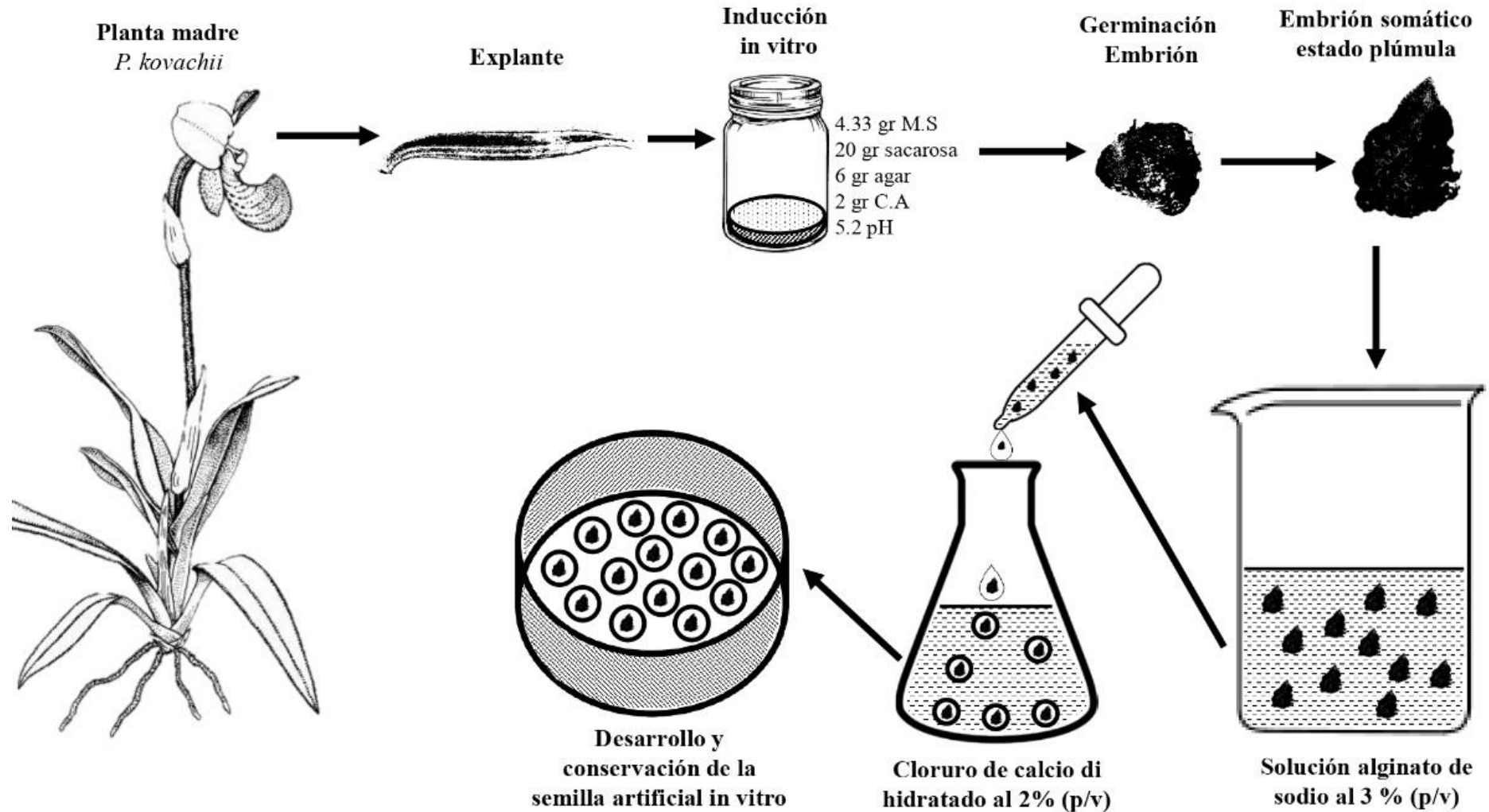


Figura 27. Desarrollo del protocolo para la elaboración y producción de la semilla artificial, especie *P. kovachii*.

IV. DISCUSIÓN

En el año 2001, *P. kovachii* fue descubierto por Faustino Medina Bautista, cerca de su finca cerca de Moyobamba y Chachapoyas en el norte de Perú (Manza, 2006 y Pittman, 2005). En junio del 2002, JM Kovach compró 3 plantas de Bautista y las llevó de manera ilegal (Manza, 2006), donde fue inmediatamente reconocida como nueva para la ciencia (Cribb, 2005). El descubrimiento fue publicado en la revista *Selbyana*. JT Atwood & S. Dalstron, y un revisor peruano, R. Fernandez le denominaron *Phragmipedium kovachii* en retribución a Michael Kovach, descubridor de esta especie (Atwood, 2002).

Eric Christenson, estaba describiendo esta especie al mismo tiempo, mediante fotografías que recibía, que lo bautizó como *Phragmipedium peruvianum* (Christenson, 2002 y Pittman, 2005). El documento fue publicado en *Orchids*, el Boletín de la American Orchid Society, tan sólo 5 días después de la publicación de JT Atwood y colaboradores (Cribb, 2005).

En el año 2004, en los Estados Unidos se le declaró a Kovach culpable de contrabando de plantas silvestres en peligro de extinción, así como tener en sus poder ilegalmente plantas de orquídea (Pittman, 2005). En el año 2006 fue propuesto por Paul Van eliminarse el nombre *Phragmipedium kovachii* de la revista *Selbyana* publicada el año 2002 (van Rijckevorsel, 2006). Higgins & David H. Benzing (Editors, *Selbyana*), en el 2007, respondieron, invalidando la propuesta por varias razones. Se aduce principalmente que, no se violó ninguna de las normas o recomendaciones señaladas en el el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) (Higgins & Benzing, 2007). El primer nombre nombre más antiguo dado a una planta es el nombre correcto, los nombres posteriores se reducen a sinonimia (Cribb, 2005).

Al tener las orquídeas un alto valor ornamental y comercial (Cadena, 2017), ha ganado el interés de científicos, conservacionistas y mercaderes, tal como la polémica en líneas anteriores. Por ello, han sido incluidas en CITES (MINAM, 2016). Esta investigación, se alinea a la promoción CITES, para la implementación de viveros y laboratorios de cultivo (MINAM, 2015). Se presenta entonces, un determinado protocolo para la obtención y conservación *in vitro* de orquídeas. Para ello, se tomó en cuenta, una caracterización morfológica de una planta madre de

Phragmipedium kovachii (Atwood, 2002), de las cuales se consiguió embriones somáticos (en estado plúmula) a partir de semillas en medio de cultivo in vitro según Lee et al., (2007). Finalmente conseguimos probar el uso de un medio de cultivo para conservar el material vegetal por un año (365 días), mediante encapsulación del embrión en estado plúmula según Lee et al., (2009).

El reclutamiento de plántulas es esencial para la sostenibilidad de cualquier población de plantas (Rasmussen et al., 2015). La descripción o caracterización de las orquídeas vienen de muchos años antes de cristo, el primero fue el filósofo y naturalista griego Teofrasto (374-287 A.C) describiendo algunas plantas de orquídeas con el nombre de Orchis (Ajú, 2009).

Atwood (2002), describen algunas características generales de *Phragmipedium kovachii*, respecto al tamaño de raíces, hojas, inflorescencias, flores, bráctea, ovario, sépalo, estaminodios, pétalos, estaminodios. En el 2003, Koopowitz describió gráficamente su hábitat basándose en una visita a la única población superviviente en 2003, en acantilados de piedra caliza sin sombra. La ubicación detalla que estuvo creciendo hacia el suroeste, a unos 85 m de altura, en el bosque primario de montaña de 1900 a 2000 msnm. Sin embargo, la presente investigación, muestra de manera gráfica y detallada cada una de las partes de una planta madre, enfatizando características primera vez descritas respecto al botón floral no maduro (bráctea floral, ovario) y fórmula floral.

En las orquídeas existen dos tipos de raíces, que se determinan por el hábito de crecimiento. Raíces con velamen, que cumplen la función de captar agua y absorber nutrientes, y otras sin velamen, que cumplen la función de sostener la planta (MINAM, 2015). Las epífitas poseen velamen, y las litófitas y terrestres sin velamen (Menchaca, 2011). por lo que *Phragmipedium kovachii* es de hábito de crecimiento de las litófitas, no tienen velamen (Figura 2).

Generalmente, en orquídeas, se clasifican en tres tipos de tallos distintos. El tallo cilíndrico, pseudo bulbos y cormos (Menchaca, 2011). Los tallos son cilíndricos son alargados y rectos, con entrenudos donde salen las hojas e inflorescencia, típico en *Phragmipedium kovachii* (Figura 3).

En todas las orquídeas, las hojas son simples no tienen características relevantes como espinas, aserradas u otros, por lo general son alargadas y angostas, que pueden conservarse por muchos años (Menchaca, 2011). Existen 3 tipos de hojas en las orquídeas; plegadas, conduplicada y cilíndrica (MINAM, 2015, 2017). por lo que *Phragmipedium kovachii* tiene el tipo de hoja plegada.

Cribb (2005), describió a *P. kovachii* con tipo de hojas coriáceas, lineales-lanceoladas, agudas o acuminadas, de hasta 55 cm de largo, 5 cm de ancho, color verde brillante o amarillo-verde por encima, y con una textura de color blanco, tal como se muestra en la figura 4, de la presente investigación.

Respecto a las flores de las orquídeas, todas tienen un patrón floral distintivo (Díaz, 2013), con tres sépalos distantes; tres pétalos, dos de ellas dorsales e iguales entre sí y diferente al tercero, que es llamado labelo (MINAM, 2013). Adquiere las formas más extrañas para la eficiencia en la polinización y los órganos reproductores están unidos en una sola estructura llamada columna (Díaz, 2013), *Phragmipedium kovachii* tiene un color púrpura en sus flores, y son únicas en el género, que se especializa en flores verdes, amarillas y marrones. amarillo y marrón (Cribb, 2005).

La flor de la planta madre usada en esta investigación, alcanzó 14.5 cm de pétalo a pétalo, a los 5 días desde el inicio de la floración. Carol Woodin ilustró una *P. kovachii* con las flores más grandes de todas las que se han visto hasta ahora, con una extensión de casi 20 cm de punta de pétalo a punta de pétalo (Vermeulen, 1966), presuntamente que, fue el momento al término de la floración.

Se define como ovario al órgano de las flores donde se encuentran los óvulos, en las plantas de orquídeas esta se presenta debajo de las partes de la flor (MINAM, 2013). *P. kovachii*, está por debajo de las demás piezas florales, con triloculares y almacenan una gran cantidad de óvulos que al madurar se convierten en semillas.(Ajú, 2009).

P. kovachii, presenta labelo (Figura), que tiene la característica de ser más grande y vistosa que las demás partes de la flor, que con frecuencia está acoplado (Rivera, 2002). Esta parte de la flor actúa en especies como atrayente de insectos polinizadores que los atrae con formas especiales y colores llamativos (Ordóñez,

2016). La morfología de labelo, define las características de diferentes tipos de orquídeas (Ajú, 2009).

En las orquídeas, los órganos sexuales de la flor están unidos a una estructura llamada columna, estas mismas albergan a las anteras y el estigma (Ordóñez, 2016). *P. kovachii* presenta Columna corta; estaminodio convexo, transversalmente elíptico, glabro (Cribb, 2005), como se presenta en la figura 13. Presenta además bráctea, referida a un órgano foliar, que tiene la función de proteger las estructuras reproductoras (MINAM, 2017), como se presenta en la figura 6.

La antera es la fuente de varios de los caracteres principales utilizados tradicionalmente para la clasificación en Orchidaceae (Freudenstein et al., 2002 & SINGER, 2009). *P. kovachii* presenta dos anteras de color amarillo opaco, condición diferente del 99% de las orquídeas, que tienen una sola antera (Vanilloideae, Orchidoideae, Epidendroideae).(Freudenstein et al., 2002). El polen de la orquídea se encuentran unidas entre ellas, formando una grupo que se denomina polinio, que tiene un extremo ensanchado y adherente, que sirve para que el polen se adhiera al insecto (Ajú, 2009). La orientación intrusa / yuxtapuesta del polinio en *Phragmipedium* (Vermeulen, 1966), surge por la reorientación de las tecas de manera que los estomios se vuelven adaxiales (Freudenstein & Rasmussen, 1996). Las anteras intrusas caracterizan a todas las orquídeas excepto aquellas con polinias superpuestas (Freudenstein et al., 2002).

Los frutos obtenidos del órgano floral de las orquídeas son denominados botánicamente cápsulas (Menchaca, 2011). Dentro de cada cápsula, se encuentran semillas de un tamaño muy pequeño (MINAM, 2015). En *P. kovachii*, son Cápsulas de 8-10,5 cm de longitud, 0,8-0,9 cm de diámetro (Cribb, 2005), como se ve en la muestra obtenida de la figura 15. Una cápsula o botón floral de orquídea puede contener aproximadamente dos millones de semillas en su estado maduro, que, por lo general, carecen de endospermo y tienen un embrión indiferenciado de un solo cotiledón (Ordóñez, 2016). La semilla es esparcida por el viento, teniendo simbiosis natural con un hongo para su inicial germinación y desarrollo (Ajú Upún, 2009).

En esta investigación, se consiguió, fotografiar a *P. kovachii*, en un hábitat artificial sobre rocas. De los tres tipos de crecimiento registrados en orquídeas: litófitas,

epífitas y terrestres (MINAM, 2015), *P. kovachii* pertenece a las orquídeas litófitas (Figura 2). Esta orquídea, es una hierba terrestre o litófita, a menudo formando grandes grupos compactos rizomas cortos y robustos (Cribb, 2005). La característica principal, es crecer en las rocas, nutriéndose de los musgos de la piedra, nutrientes disueltos de la lluvia, desechos de las rocas y sus tejidos muertos (Ajú, 2009).

Morel cultivó por primera vez meristemas de brotes de *Cymbidium*, y desde entonces, la biotecnología moderna ha reformado la investigación de las orquídeas y ha revolucionado la industria de las mismas (Arditti, 1996).

Son necesarios estudios que permitan conocer el camino hacia la obtención de una multiplicación *in vitro*, con objeto de continuar el ciclo de vida de esta especie de orquídea y mantener y recuperar sus poblaciones silvestres (Li et al., 2008), así como, conservación *in vitro* de las plantas ornamentales (Bonilla et al., 2015).

El Perú, desde el año 1975 forma parte de las CITES (MINAM, 2018). En el Apéndice I, se encuentran todas las especies del género *Phragmipedium*, que constan todas aquellas en peligro de extinción (CITES, 2019). Quedando prohibido la comercialización de estas especies con fines de intercambio o negocio (CITES, 2021). Sin embargo, el comercio de especímenes que sean híbridos, está permitido, siempre y cuando procedan de la reproducción artificial (vegetativa y/o *in vitro*) (MINAM, 2015). Se recalca la importancia y pertinencia de la presente investigación.

La planta madre debe conservar características de pureza varietal y libre de plagas y enfermedades (FAO, 2013). Se usó la semilla de cápsula cerrada para evitar contaminación, antes de su dehiscencia, donde inicia con la inoculación de la semilla en el medio de cultivo para la germinación de la semilla (Lee et al., 2007).

Autores usan un medio base solidificado para el establecimiento *in vitro* de semillas de orquídeas antes de su dehiscencia o en cápsula, que está determinada por Murashige y Skoog, sacarosa, agar y pH ligeramente ácido (Virginia & Hugo, 2013) (Eugenia, 1922) (Pérez & Castañeda, 2016). También hay autores que adicionan sustancias que permiten una mejor eficiencia en la germinación, como la mejora de la germinación con la sustancia de carbón activado (Vaca et al., 2018), que fue

usado en el T1, T2 y T5; agua de coco (Lee et al., 2009) (Torres et al., 2011), que fue usado en el T2 y T4; harina de plátano (Pérez, 2015), que se usó en el T4 y T5; Myo inositol, ANA, BAP y AIA (Lee et al., 2007), que se usó en el T3, datos mostrados en la tabla 1.

En laboratorio, primero se debe conseguir la germinación de embriones somáticos (Lee et al., 2009). Se sugiere el uso del tratamiento 1 o 2 (T1= 4.33 gr de MS + 20 gr de sacarosa + 6 gr de agar + 2gr Carbón activado; todo a un pH 5.2 Y, T2=las mismas condiciones del T1+20% de agua de coco) como medio de cultivo por conseguir el menor número de días (6.56 días promedio en ambos casos). Del establecimiento *in vitro*, hasta la obtención de un embrión somático en estado plúmula, transcurren 135 días en promedio, usando el T1.

Para la encapsulación, se seleccionaron embriones en estado de plúmula, sin raíz, luego de transcurridos 43 días desde su desarrollo *in vitro* (Figura 21). El tratamiento 1 consiguió el estado plúmula a los 139 días. la especie *Laelia anceps* consiguió el estado plúmula, aproximadamente, 3 meses después de la siembra *in vitro*, usando embriones de callo embriogénico, obteniendo embriones cigóticos maduros luego 40 días de su desarrollo *in vitro* (Lee et al., 2009). La diferencia en tiempos, se debe no sólo a las características genéticas de la planta, sino a condiciones del medio, temperatura, entre otros factores (Alcantara et al., 2017).

Los tratamientos 1, 2 y 5 de esta investigación, consiguieron desarrollar finalmente embriones somáticos, definidos por la presencia del estado plúmula. Ventajosamente, el tratamiento 1, lo obtuvo en menor número de días de 139. El agua de coco (T2) y la harina de plátano (T5) están presentes en tratamientos que, tomaron un mayor número de días en obtenerse los embriones somáticos.

Un medio de cultivo MS (como del T3 de esta investigación), suplementado con 2 mg·litro⁻¹ de ANA, BAP y AIA, fue usado para *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. Se consiguió embriones a tres meses a partir de la siembra *in vitro* (Lee et al., 2009). El no desarrollo de embriones en el T3 de esta investigación, muestra la importancia de la genética de la especie, y de los suplementos que pueden agregarse a los medios (como hormonas de crecimiento) en el desarrollo de un protocolo (Perea, 2009).

La germinación de embriones somáticos en orquídea ha registrado ser obtenidas en días récord. *Brassia verrucosa*, por ejemplo, germinó a los 6 días usando como componentes del medio a: M & S, Sacarosa 30 g/l, Agua de coco 100 ml/l, Manzana, plátano y jitomate 40 g/l, Carbón activado 1 g/l, Agar 6.5 g/l. A los 13 días, se consiguió embriones de *Oncidium stramineum* con M & S, sacarosa 30 g/l, agar 6.5 g/l, pH 5.7 (Flores et al., 2008). *Phragmipedium kovachii* consiguió la germinación de la semilla a los 60 días, con Murashige y Skoog al 100 %, ANA, BAP, Kin, y AIA a 2 mg/L (Gálvez, 2013).

Se puede afirmar que tecnología de las semillas sintéticas no es muy antigua (Levitus et al., 2010), los datos más antiguos son de la década de los 70 cuando el profesor Murashige menciona a sus alumnos de la universidad de California “algún día los embriones somáticos podrán ser encapsulados, convirtiéndose así en semillas artificiales” (González et al., 2004).

Los países que más desarrollada esta técnica son Japón, China, Estados Unidos, Francia, España, Canadá, y países en vía de desarrollo (González et al., 2004). La semilla artificial posee la capacidad de regenerar una planta idéntica a su progenitor; (González et al., 2004). La técnica de semilla artificial permite almacenar semillas, meristemos, ápices, polen, callos y suspensiones celulares, considerándose una herramienta útil para evitar variaciones somaclonales y permitir la conservación de explantes por tiempo de almacenamiento indefinido (Bonilla et al., 2015).

La tecnología para producir semillas sintéticas permite que plantas con bajos índice de germinación se obtengan en periodos cortos (E Morales & Cano, 2012). Actualmente, el germoplasma de muchas especies vegetales ya no están disponibles, por lo que el avance de esta investigación representa una alternativa optima de conservación (Morales & Cano, 2012).

La semilla artificial facilita producción, transporte y conservación de especies vegetales, teniendo una alternativa para mantener la biodiversidad; brindando protección al embrión de daños mecánicos, deben ser blandos para que al germinar se desarrollen sin inconvenientes, estos hidrogeles usados deben tener la capacidad de retener nutrientes para alimentar el embrión (Morales & Cano, 2012).

Las primeras investigaciones en semilla artificial, para encapsular usaron polioxietileno, luego se investigaron gelificantes como alginato, carragenina, goma guar y pectato de sodio; pero se descubrió que el alginato era óptimo para desarrollar esta técnica, debido a su espesor sensible, baja toxicidad con microorganismos, bajo costo y su rápida gelificación (Rihan et al., 2017).

Actualmente se usa el alginato de sodio es uno de las sustancias más utilizados para la encapsulación de la semilla artificial, ya que posee una dureza idónea (Morales & Cano, 2012).

La formación de la cápsula depende de los iones de intercambios entre el alginato de sodio más el cloruro de calcio, donde se produce cuando se deja caer una gota de alginato de sodio con el embrión a una solución de cloruro de calcio dihidratado, la solidez y la rigidez de la cápsula depende de los agentes gelificantes (Rihan et al., 2017).

En las investigaciones de Chandrasekhara et al., (2012), hace de conocimiento investigaciones que se realizaron en semilla artificial, encontrando 276 investigaciones a nivel mundial hasta ese momento.

V. CONCLUSIONES

Se caracterizó morfológicamente a la especie *Phragmipedium kovachii*, el herbario Kuelap validó la información sobre el material vegetal depositado, según características morfológicas mencionadas por Atwood en el año 2002. Se describió su forma, color y tamaño (cm) de cada una de las partes de la planta.

Se logró establecer en un medio *in vitro* las semillas de la especie *Phragmipedium kovachii*, desarrollándose mediante embriones somáticos con el tratamiento más eficiente a los 43 días, y llegando al estado plúmula a los 139 días con el tratamiento más eficiente.

Se conservó semilla artificial de *Phragmipedium kovachii* mediante la encapsulación del embrión somático en estado plúmula, se usó alginato de sodio al 2 y 3 % para la encapsulación, siendo la concentración de alginato de sodio al 3 % el más resistente a la deshidratación; lográndose conservar el embrión encapsulado hasta 123 días.

Se validó un protocolo para la producción y conservación *in vitro*, de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium kovachii*), a partir del embrión en estado plúmula, misma que se usó para encapsular con alginato de sodio al 3%, lográndose conservar el embrión encapsulado en un ambiente húmedo durante un año.

VI. RECOMENDACIONES

Para desarrollar una investigación en una especie poco estudiada en el ámbito de cultivo *in vitro*, se debe establecer un protocolo para la obtención de embriones o callos con diferentes partes de la planta, verificando cuál parte es la más eficiente para desarrollarlo *in vitro*.

Se recomienda que las cápsulas que contienen al embrión, se agreguen sustancias con reguladores de crecimiento, para inducir el rápido desarrollo o germinación del embrión, también se puede agregar fungicidas para ayudar en la parte de aclimatación directa en suelo a la semilla artificial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajú Upún, M. M. (2009). *Las orquídeas bases generales para su conocimiento y enseñanza*. 71. http://www.repositorio.usac.edu.gt/1621/1/07_2092.pdf
- Alcantara, J., Castilla, M., & Sanchez, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales in vitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1, 71–83. <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/viewFile/2222/2382>
- Arditti, J. (1996). Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122(3), 183–241. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1996.tb02073.x>
- Atwood, J. (2002). *PHRAGMIPEDIUM KOVACHII*, A NEW SPECIES FROM PERU. *Selbyana*, 1–4.
- Bonilla, M. M., Mancipe, C., & Aguirre, A. (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67–82.
- Cadena, J. (2017). Guía para Autores. In *Agro productividad* (Vol. 4, Issue 2). <https://doi.org/10.31984/oactiva.v4i2.348>
- Cavero, M; Collantes, B; Patroni, C. (1979). Orquídeas del Perú. *Orquideologia*, 14(1), 69-75 EP-.
- Chandrasekhara, R., Murthy, S., & Pullaiah, T. (2012). Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14254–14275. <https://doi.org/10.5897/ajb12.770>
- Changoluisa, Y., & Martínez, M. (201 C.E.). Elaboración de un Manual sobre la Estructura Floral de Catorce Especies Ornamentales, de Importncia Económica en los Cantones de Latacunga e la Maná [Universidad Técnica de Cotopaxi]. In *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad* (Vol. 1). <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>

- Christenson, E. (2002). *Phragmipedium kovachii*. FANDOM. https://orchids.fandom.com/wiki/Phragmipedium_kovachii
- CITES. (2019). Apendices I, II y III. *Convención Sobre El Comercio Internacional de Especies En Peligro de Extinción*, 41(80), 40–42.
- CITES. (2021). Visión Estratégica de la Cites 2021 - 2030. *Convención Sobre El Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres*, 1–6.
- Cribb, P. (2005). 511. *Phragmipedium Kovachii*. Orchidaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 22(1), 8–11. <https://doi.org/10.1111/j.1355-4905.2005.00454.x>
- DÍAZ, E., TORRES, C., ROJAS, A., & DE LA BARRERA, E. (2015). In vitro germination and development of two endangered endemic Colombian orchids *Cattleya mendelii* and *Cattleya quadricolor*. *Gayana. Botánica*, 72(2), 213–220. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432015000200005>
- Díaz, M. (2013). Manual de cultivo de orquídeas. *2013 III Encuentro Mexicano de Orquideología, 1a edición*, 68. www.sev.gob.mx/Difucion/Publicaciones
- Erick E. Arévalo Abello Alejandro Cuevas, Moreno, G. R. de la C. L. J. R., & Sánchez, J. V. (2013). *EBio, Biogerminados en Semilla Sintética*.
- Espinosa, H. E. L., Cerda, A. L., González, J. M., Iglesias-andreu, L., Rosas, B. G., López, D. E., Ocampo, Y. M. M., Pool, F. A. B., & Buzzy, S. N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 323–332.
- Eugenia, M. (1922). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (Cultivos de células vegetales). *ArgenBio*. <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos celulares II Euge.pdf>
- FAO. (2013). Material de propagación de calidad declarada - protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente. *Estudio FAO Producción y Protección Vegetal*, 157. <http://www.fao.org/3/a-i1195s.pdf>
- Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. (2008). PROPAGACIÓN in vitro DE *Oncidium stramineum* Lindl. UNA ORQUÍDEA

- AMENAZADA Y ENDÉMICA DE MÉXICO. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XIV(3), 347–353. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2007.02.009>
- Freudenstein, J. V., Harris, E. M., & Rasmussen, F. N. (2002). The evolution of anther morphology in orchids: Incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. *American Journal of Botany*, 89(11), 1747–1755. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1747>
- Freudenstein, J. V., & Rasmussen, F. N. (1996). Pollinium development and number in the Orchidaceae. *American Journal of Botany*, 83(7), 813–824. <https://doi.org/10.2307/2446258>
- Gálvez Panduro, R. A. (2013). *Desarrollo de protocolo para la propagación In Vitro del Phragmipedium kovachii Atwood Dalström & Fernández (Orchidaceae) a partir de semillas*. 6–70.
- González Paneque, O. S., Silva Pupo, J. J., & Espinosa Reyes, Á. (2004). La semilla artificial. Una solución en la biodiversidad mundial. *Cuadernos de Biodiversidad*, 15, 17–22. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2004.15.03>
- Haimovich, David; Rychter, Damián; Acosta, Juan; Martínez, C. (2012). Caracterización morfológica de plantas mediante procesamiento digital de imágenes. *Argentine Symposium on Technology*. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Herrera, L. (2019). *La Legalización del Germoplama como Garantía del Derecho de Propiedad Intelectual y Medida de Bioseguridad en el Perú*. Universidad Nacional Santiago Antúnez Mayolo.
- Higgins, W. E., & Benzing, D. H. (2007). Response to: Proposal to add Selbyana vol. 23 Supplement to the “opera utique oppressa” by Paul van Rijckevorsel. *Taxon*, 56(3), 968–969. <https://doi.org/10.2307/25065887>
- Lee-Espinosa, H Murguía-González, J Laguna-Cerda, A García-Rosas, B Gáamez-Pastrana, M Galindo-Tova, M Landero-Torres I, Iglesias-Andreu, L Santana-Buzzy, N. (2009). Encapsulación De Embriones Somáticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2), 33–40.

- Lee Espinosa, H. E., Laguna Cerda, A., Murguía González, J., Elorza Martínez, P., Iglesias Andreu, L., García Rosas, B., Barredo Pool, F. A., & Santana Buzzy, N. (2007). Regeneración in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7(1), 58–67.
- Levitus, G., Echennique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología Y Mejoramiento Vegetal II. *ArgenBio*, 26–33.
- Li, X., Ding, X., Chu, B., Zhou, Q., Ding, G., & Gu, S. (2008). Análisis de la diversidad genética y conservación de la hierba endémica china en peligro *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) basado en AFLP. *National Library of Medicine*, (2), 159–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17805978/>
- Manza, S. (2006). *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom y Fernandez. <http://www.slipperorchids.info/phragdatasheets/kovachii/index.html>
- Menchaca, R. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. In *Comision Nacional Forestal* (I). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/23/235202>
- Millán, B., Bravo, M., Chocce y Coz, A. (2007). Evaluación poblacional, distribución y estado de conservación de *Phragmipedium kovachii* en el Perú. *Instituto Nacional de Recursos Naturales*, 6.
- MINAM. (2013). *Manual De Orquideas, Identificación y Origen*.
- MINAM. (2015). *Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial* (I).
- MINAM. (2016). *Listado de especies peruanas de flora silvestre incluidas en los apéndice de CITES*. 155.
- MINAM. (2017). Orquídeas Del Perú Y Herramientas Para Su Identificacion. In *Ministerio del Ambiente* (I).
- MINAM. (2018). Listado de especies de fauna silvestre CITES-Perú. *CITES - PERÚ, 1*, 1–135.
- Morales, E, & Cano, J. (2012). Semillas Sintéticas, el Campo del Futuro. *Revista Ciencia y Desarrollo*.

- <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/263/1/articulo> en revista ciencia y desarrollo. Semilla sintetica.pdf
- Morales, Eddy. (2012). *Propragación in vitro de Bletia purpurea Lam para la producción de semillas sintéticas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Mroginski, L., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 20–40). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Ordóñez, J. (2016). *Investigación e Innovación Tecnología y Apropiación Social del Conocimiento Científico de Orquídeas Nativas de Cundinamarca*.
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro. In *Universidad Nacional de Colombia* (Vol. 9, Issue 19). http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Pérez, B., & Castañeda, S. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16(3), 143–151.
- Pérez Martínez, B. A. (2015). Establecimiento in vitro de *Hypericum goyanesii* Cuatrec. E *Hypericum juniperinum* Kunth, a partir del cultivo de semillas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 156–163. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54294>
- Pittman, C. (2005). *El caso de la orquídea robada*. <https://www.sarasotamagazine.com/news-and-profiles/2005/03/the-case-of-the-purloined-orchid>
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Rihan, H. Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M. E., & Fuller, M. P. (2017). Artificial seeds (Principle, aspects and applications). *Agronomy*, 7(4).

<https://doi.org/10.3390/agronomy7040071>

- Rivera, R. (2002). Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras. *Licenciatura Ingeniero En Desarrollo Socioeconómico y Ambiente*, 2(34), 96. [http://www.yuscaran.org/documentos/55Especies de orquideas de la reserva.pdf](http://www.yuscaran.org/documentos/55Especies%20de%20orquideas%20de%20la%20reserva.pdf)
- Rodriguez, M. (2018). Cultivo in vitro: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. *Universidad Complutense*, 1–20. [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL RODRIGUEZ AMARO.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf)
- SINGER, R. (2009). Morfología Floral y Polinización de Orquídeas: el Segundo Libro de Charles Darwin. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 337–348.
- Torres, C. P., Gamboa, F. M., & González, R. T. (2011). EFECTO INDUCTOR DEL AGUA DE COCO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y BROTAMIENTO DE LOS CORMOS DE LA HIERBA DE LA EQUIS *Dracontium grayumianum*. *Acta Biologica Colombiana*, 16(1), 133–142.
- Vaca, I., Marulanda, M., Verdesoto, J., Núñez, A., Acurio, R. D., & Chiluisa-Utreras, V. (2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de *Citrus limon* (L.) y su dinámica de crecimiento. *Bionatura*, 3(3).
- van Rijckevorsel, P. (2006). Proposal to add *Selbyana* vol. 23 Supplement to the “*opera utique oppressa*.” *Taxon*, 55(4), 1053–1053. <https://doi.org/10.2307/25065718>
- Vermeulen, P. (1966). The System of the Orchidales. *Acta Botanica Neerlandica*, 15, 224–253.
- Virginia, M., & Hugo, V. (2013). CULTIVO IN-VITRO Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE UN HÍBRIDO DEL GÉNERO *CATTLEYA* (ORCHIDACEAE). *XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores*, 23, 14–19.

ANEXOS

Anexo 01. Autorización del SERFOR para realizar la investigación en flora silvestre.



Firmado digitalmente por CERDAN
QUILIANO Miriam Mercedes FAU
2056230627 soft
Cargo: Directora General
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.03.2021 18:45:42 -05:00

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

Magdalena Del Mar, 03 de Marzo del 2021

CARTA N° D000252-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Senora

LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO

Investigadora

Calle Higos Urco, Calle Universitaria N° 304 Distrito Chachapoyas

ligia.garcia@untrm.edu.pe

Chachapoyas.-

Asunto : Remito RDG N° D000109-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Referencia : Solicitud S/N (07/01/2021)

Es grato dirigirme a usted, con relación al documento de la referencia, mediante el cual solicitó la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre como parte del proyecto de investigación titulado: "Elaboración de un protocolo para la producción de semillas artificiales de orquídea (*Phragmipedium kovachii*) mediante la encapsulación de embriones somáticos".

Al respecto y de acuerdo a lo solicitado, remito para su conocimiento y fines, la Resolución de Dirección General N° D000109-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS (02/03/2021), mediante la cual se resuelve otorgar a su favor la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, sin colecta, fuera de Áreas Naturales Protegidas, correspondiéndole el Código de Autorización N° **AUT-IFL-2021-020**, cuya vigencia se contabilizará desde el día siguiente hábil de su notificación.

Sin otro particular, expreso mis cordiales saludos.

Atentamente,

Documento firmado digitalmente

Miriam Mercedes Cerdán Quiliano

Directora General

Dirección General de Gestión Sostenible del

Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre

Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR

Exp. 2021- 003903



BICENTENARIO
PERÚ 2021

Av. Javier Prado Oeste N° 2442
Urb. Orrantía, Magdalena del Mar – Lima 17
T. (511) 225-9005
www.serfor.gob.pe

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: QAOK6GB

Anexo 02. Constancia de determinación botánica de la especie *P. kovachii* por el herbario Kuelap (ICNDMB).



UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
HERBARIO



FICA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y
CIENCIA AGRARIA

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN BOTÁNICA

A solicitud del **Bach. Osber Jhonel Cunia Guevara**, se proporciona la identidad del espécimen indicado, con la sigla consignada.

La información proporcionada por el solicitante sobre las muestras es:

Distrito : Yambrasbamba
Provincia : Bongará
Región : Amazonas
Altitud : 1752 m s.n.m
Coordenadas : Este: 178933
Norte: 9361353
Colector : Jhon Charles Valle Mas (Vivero "Kgory Thika")

N° COL	NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA
OC-001	<i>Phragmipedium kovachii</i> J.T.Atwood, Dalström & Ric.Fernández	ORCHIDACEAE



Determinador: **Ing. M.Sc. Eli Pariente Mondragón**
Profesor Auxiliar Dpto. Ingeniería y Ciencias Agrarias
Jefe del Laboratorio de Dendrología y Herbario
UNTRM (KUELAP).

Chachapoyas, 16 de abril de 2021

Herbario KUELAP, Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico (ICNDMB), Código de Autorización N° AUT-ICND-2020-001

Anexo 03. Constancia de muestra en depósito al herbario Kuelap (ICNDMB).



UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
HERBARIO



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

CONSTANCIA

N° 004-2021-H-FICA-UNTRM

EL JEFE DEL HERBARIO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS - UNTRM.

Da Constancia:

Que esta institución ha recibido del Sr. **Osber Jhonel Cunia Guevara**, 1 muestra botánica (según lista adjunta) en calidad de depósito.

Osber Jhonel Cunia Guevarase, identificado con DNI: 73443489, informa que el espécimen proviene del vivero "Kgory Thika", Anexo Shucuyacu, distrito de Yambrasbamba, provincia de Bongará, departamento de Amazonas, producto del trabajo de investigación "**Elaboración de un Protocolo para la Producción de Semillas Artificiales de Orquídea (*Phragmipedium kovachii*) Mediante la Encapsulación de Embriones Somáticos**" y que corresponde a la siguiente autorización:

- RDG N° D000109-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Se expide el presente documento a solicitud del interesado para los fines que hubiere lugar.

Ing. M.Sc. Eli Pariente Mondragón
Profesor Auxiliar Dpto. Ingeniería y Ciencias Agrarias
Jefe del Laboratorio de Dendrología y Herbario
UNTRM (KUELAP).

Chachapoyas, 16 de abril de 2021

Herbario KUELAP, Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico (ICNDMB), Código de Autorización N° AUT-ICND-2020-001

📍 Calle Higos Urco n° 342-350-356 Chachapoyas, Amazonas, Perú 📞 Telf. Cel: 51 975 768 056
✉️ eli.pariente@untrm.edu.pe 🌐 www.untrm.edu.pe/es/facultades/ingenieria-y-ciencias-agrarias.html



UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
HERBARIO



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

MUESTRAS EN DEPÓSITO

CÓDIGO HERBARIO	CÓDIGO DE INGRESO	NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA
KUELAP-988	OC-001	<i>Phragmipedium kovachii</i> J.T. Atwood, Dalström & Ric. Fernández	ORCHIDACEAE



Ing. M.Sc. Eli Pariente Mondragón
Profesor Auxiliar Dpto. Ingeniería y Ciencias Agrarias
Jefe del Laboratorio de Dendrología y Herbario
UNTRM (KUELAP).

Chachapoyas, 16 de abril de 2021

Herbario KUELAP, Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico (ICNDMB), Código de Autorización N° AUT-ICND-2020-001

Calle Higos Urco n° 342-350-356 Chachapoyas, Amazonas, Perú Telf. Cel: 51 975 768 056
el.pariente@untrm.edu.pe www.untrm.edu.pe/es/facultades/ingenieria-y-ciencias-agrarias.html

Anexo 04. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 0 horas, sin significancia entre tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.26	1	0.26	0.68	0.4140
TRATAMIENTOS	0.26	1	0.26	0.68	0.4140
Error	14.26	38	0.38		
Total	14.52	39			

Anexo 05. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a la primera hora, sin significancia entre tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.32	1	0.32	0.83	0.3684
TRATAMIENTOS	0.32	1	0.32	0.83	0.3684
Error	14.86	38	0.39		
Total	15.18	39			

Anexo 06. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 3 horas, sin significancia entre tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.60	1	0.60	1.52	0.2249
TRATAMIENTOS	0.60	1	0.60	1.52	0.2249
Error	14.99	38	0.39		
Total	15.59	39			

Anexo 07. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 6 horas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6.01	1	6.01	12.54	0.0011
TRATAMIENTOS	6.01	1	6.01	12.54	0.0011
Error	18.20	38	0.48		
Total	24.21	39			

Anexo 08. Test: Duncan Alfa=0.05 en la deshidratación a las 6 horas, con significancia estadística entre tratamientos.

Error: 0.4790 gl: 38

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
T1	3.85	20	0.15 A
T2	4.62	20	0.15 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 09. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 9 horas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10.30	1	10.30	26.18	<0.0001
TRATAMIENTOS	10.30	1	10.30	26.18	<0.0001
Error	14.96	38	0.39		
Total	25.26	39			

Anexo 10. Test: Duncan Alfa=0.05 en la deshidratación a las 9 horas, con significancia estadística entre tratamientos.

Error: 0.3936 gl: 38

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
T1	3.05	20	0.14	A
T2	4.07	20	0.14	B

Anexo 11. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 12 horas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14.04	1	14.04	36.23	<0.0001
TRATAMIENTOS	14.04	1	14.04	36.23	<0.0001
Error	14.73	38	0.39		
Total	28.77	39			

Anexo 12. Test: Duncan Alfa=0.05 en la deshidratación a las 12 horas, con significancia estadística entre tratamientos.

Error: 0.3876 gl: 38

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
T1	2.53	20	0.14	A
T2	3.72	20	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 13. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 15 horas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	17.82	1	17.82	42.64	<0.0001
TRATAMIENTOS	17.82	1	17.82	42.64	<0.0001
Error	15.88	38	0.42		
Total	33.70	39			

Anexo 14. Test: Duncan Alfa=0.05 en la deshidratación a las 15 horas, con significancia estadística entre tratamientos.

Error: 0.4179 gl: 38

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
T1	2.12	20	0.14	A
T2	3.46	20	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 15. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 18 horas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8.19	1	8.19	34.35	<0.0001
TRATAMIENTOS	8.19	1	8.19	34.35	<0.0001
Error	9.06	38	0.24		
Total	17.25	39			

Anexo 16. Test: Duncan Alfa=0.05 en la deshidratación a las 18 horas, con significancia estadística entre tratamientos.

Error: 0.2384 gl: 38

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
T1	1.87	20	0.11	A
T2	2.78	20	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 17. Tabla de análisis de la varianza en la deshidratación a las 21 horas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.02	1	1.02	11.95	0.0014
TRATAMIENTOS	1.02	1	1.02	11.95	0.0014
Error	3.26	38	0.09		
Total	4.28	39			

Anexo 18. Test: Duncan Alfa=0.05 en la deshidratación a las 21 horas, con significancia estadística entre tratamientos.

Error: 0.0857 gl: 38

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
T1	1.60	20	0.07	A
T2	1.92	20	0.07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 19. Tabla de prueba de Kruskal Wallis en el análisis de la varianza en la deshidratación a las 24 horas.

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
mm deshidratación hora	T1	24	20	1.53	0.19	1.508.85	0.0026
mm deshidratación hora	T2	24	20	1.81	0.31	1.75	