

## GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *Zigopetalum maculatum* CON DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN Y ADICIÓN DE AGUA DE COCO EN EL MEDIO DE CULTIVO

### *In vitro* germination of *Zigopetalum maculatum* with different disinfection protocols and addition of coconut water to the culture media

Beatriz Mamani Sánchez<sup>1</sup>, Máximo Nova Pinedo<sup>2</sup>, Jhimmy Alexander Espinal Coaquira<sup>3</sup>

#### RESUMEN

Las semillas de las orquídeas carecen de endospermo y en condiciones naturales deben asociarse a micorrizas, cuyo porcentaje de germinación no supera el 5 %. En ese sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de *Zigopetalum maculatum* mediante tres protocolos de desinfección en dos medios de cultivo. Los tratamientos desinfectantes consistieron, en sumergir las semillas en 0.5 % de NaClO por cinco minutos, de las cuales, la mitad se introdujo en sobres de té y la otra se colocó dentro la jeringa, y la cápsula (fruto) fue desinfectada en 1 % de NaClO durante cinco minutos. Posteriormente, se sembró en MS con 10 y 20 % de agua de coco. El diseño usado fue un DCA con 15 repeticiones. Se evaluó el porcentaje de viabilidad, germinación, contaminación y fases de desarrollo del proceso de germinación (F1, F2, F3 y F4). El porcentaje de viabilidad de *Z. maculatum* fue de 68.7 %. Los tratamientos de desinfección en las semillas en sobres de papel y los frutos fueron estadísticamente similares, de 5 y 10 % de contaminación en los medios con 10 y 20 % de agua de coco respectivamente. De los tratamientos desinfectantes, las semillas alcanzaron fases más avanzadas (F3 y F4) que las desinfectadas en el fruto. El mayor porcentaje de germinación fue 98 % en el medio MS con 10 % agua de coco y una desinfección de las semillas en sobre de té (0.5 % de NaClO durante cinco minutos). El empleo de cultivo *in vitro* resultó eficiente para la germinación y regeneración de *Z. maculatum* que proporciona una alternativa para reducir la presión que se ejerce sobre las poblaciones silvestres, contribuyendo a su conservación y aprovechamiento sustentable.

**Palabras clave:** Desinfección, viabilidad, germinación, *in vitro*, *Zigopetalum maculatum*.

#### ABSTRACT

Orchid seeds lack endosperm and under natural conditions must be associated with mycorrhizae, whose germination percentage does not exceed 5 %. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the viability and asymbiotic germination of *Zigopetalum maculatum* by means of three disinfection protocols in two culture media. The disinfectant treatments consisted of immersing the seeds in 0.5 % NaClO for five minutes, half of which were placed in tea bags and the other half in a syringe, and the capsule (fruit) was disinfected in 1 % NaClO for five minutes. Subsequently, it was seeded in MS with 10 and 20 % coconut water. The design used was a DCA with 15 replicates. The percentage of viability, germination, contamination and developmental stages of the germination process (F1, F2, F3 and F4) were evaluated. The viability percentage of *Z. maculatum* was 68.7%. The disinfection treatments on seeds in paper envelopes and fruits were statistically similar, 5 and 10 % contamination in the media with 10 and 20 % coconut water, respectively. Of the disinfectant treatments, the seeds reached more advanced stages (F3 and F4) than those disinfected in the fruit. The highest germination percentage was 98 % in MS medium with 10 % coconut water and seed disinfection in tea sachet (0.5 % NaClO for five minutes). The use of *in vitro* culture was efficient for the germination and regeneration of *Z. maculatum*, which provides an alternative to reduce the pressure exerted on wild populations, contributing to their conservation and sustainable use.

**Keywords:** Disinfection, viability, germination, *in vitro*, *Zigopetalum maculatum*.

<sup>1</sup> ✉ Departamento de Investigación y Proyectos, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP), Universidad Católica Boliviana "San Pablo", Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9513-6941>. [bmamani@uac-cp.edu.bo](mailto:bmamani@uac-cp.edu.bo)

<sup>2</sup> Carrera de Ingeniería Agronómica, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP), Universidad Católica Boliviana "San Pablo", Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1104-6402>

<sup>3</sup> Carrera de Ingeniería Agronómica, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP), Universidad Católica Boliviana "San Pablo", Bolivia. [jhocespinal@gmail.com](mailto:jhocespinal@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existen más de 30 000 especies de orquídeas, muchas de las cuales han fascinado por poseer características que las hacen únicas como el tiempo de duración, formas, colores variados que poseen sus flores, elegancia y aroma que son muy apreciados en decoración (Richard y Contreras, 2015). La región de Los Yungas, contiene 60 % de las especies de orquídeas, de las cuales 80 % son endémicas Vásquez e Ibisch (2004). Una de estas especies se destaca *Zigopetalum maculatum* de hábito terrestre posee alto potencial como ornamental (Jiménez et al., 2015). Las flores son muy fragrantísimas, en cada escapo floral posee entre seis a ocho flores y tiene una duración de la floración de octubre a noviembre en el Cerro de Uchumachi en el municipio de Coroico (observaciones en campo).

La biología reproductiva de las orquídeas es compleja. Las semillas carecen de endospermo y esto genera que su población sea reducida, razón por la cual no se puede extraer para su aprovechamiento. Además, las orquídeas tienen un bajo porcentaje de germinación debido a su dependencia con hongos micorrízicos (Karol et al., 2014) que la hace vulnerable a desaparecer de sus hábitats naturales por factores antropocéntricos, por lo cual la conservación y propagación *in vitro* es una alternativa socioeconómica, ecológica y ecoturística para la región yungueña (Richard y Contreras, 2015).

Las semillas de orquídeas terrestres tienen la característica de tener una testa tipo reticulada y fuerte, más que las orquídeas epífitas. Por otra parte, la testa y el embrión de diferentes taxones de Orchidaceae pueden variar sus dimensiones, forma, color y en la proporción de sus volúmenes, lo cual puede explicar su capacidad de dispersión (Arditti et al., 1980; Augustine et al., 2001).

La propagación *in vitro* es una alternativa viable, estratégica y recomendada para la conservación de las orquídeas (Bertolini et al., 2014) el uso de protocolos eficientes asegura la supervivencia de los embriones en el proceso de germinación de orquídeas y el desarrollo del protocormo, estructura que se forma durante la germinación y el desarrollo de la plántula

(Billard et al., 2014). El desarrollo de medios de cultivo permitió que la viabilidad de las semillas de la familia Orchidaceae sea alta, por tal razón a podido promover la recuperación de especies como *Cyrtopodium punctatum* Lindley y *Bletia purpurea* (Dutra et al., 2009). El uso de métodos generó mejoras en la conservación de especies raras como la *Habernaria macroceratitis* (Stewart y Kane, 2006). En ese sentido, el presente trabajo tiene como objetivo estandarizar el protocolo de desinfección y medios para la introducción en condiciones asépticas semillas de *Zigopetalum maculatum* en diferentes medios de cultivo suplementado con agua de coco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación de la zona de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica Campesina de Carmen Pampa, dependiente de la Universidad Católica Boliviana "San Pablo", en el municipio de Coroico, provincia Nor Yungas, departamento de La Paz, Bolivia, situada a una altura de 1 850 m s.n.m. a 16° 20' 30" de latitud sur y 67° 50' 30" de longitud oeste. La distancia de la ciudad de La Paz a Carmen Pampa es de 115.5 km.

### Metodología

El trabajo experimental se dividió en dos fases, una corresponde a realizar el seguimiento de floración y fructificación, y la otra consiste en la prueba de viabilidad y geminación en condiciones *in vitro*.

#### Fase 1: seguimiento fenológico

En una colina denominada Puerta del Viento dentro del cerro Uchumachi en el municipio de Coroico, localizada en coordenadas Longitud -67.68630859 Oeste y Latitud -16.26792842 Sur Google maps (2017) 640375.519E 8200976.641N 19K (UTM 2019) a una altitud de 1 850 m s.n.m. se realizó el seguimiento fenológico de 15 plantas adultas de crecimiento terrestre. En los meses de octubre a diciembre del 2020 se encontraron en floración y de enero a abril se encuentran con frutos y a finales de mayo del 2021 estos empezaron a madurar los frutos (Figura 1).

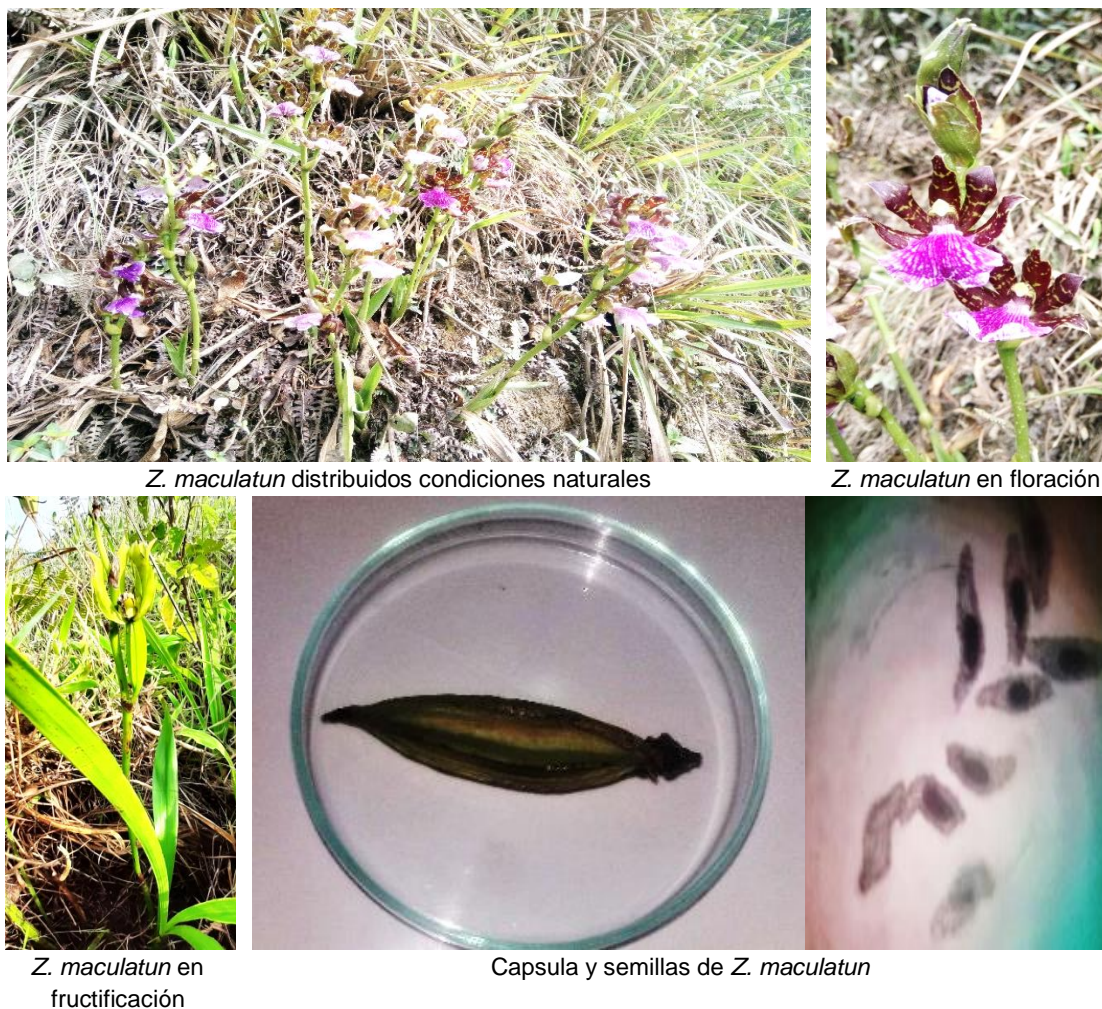


Figura 1. Seguimiento fenológico de *Zigopetalum maculatum* observado en el cerro Uchumachi del municipio de Coroico.

### Fase 2: germinación *in vitro*

Desinfección de las semillas o capsulas: se consideró tres tratamientos desinfectantes, la primera consistía en desinfectar las semillas en hipoclorito de sodio al 0.5 % durante cinco minutos en sobre de té, posteriormente se sometió a cinco enjuagues con agua destilada estéril. La segunda desinfección consistió en colocar la semilla dentro de la jeringa en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante cinco minutos seguido de enjuagues sucesivos. La tercera desinfección, la capsula madura e intacta fue sumergida en hipoclorito de sodio al 1 % durante cinco minutos y después se realizó enjuagues, para concluir con el flameado con alcohol al 70 % previo abrir las semillas (Figura 2).

Preparación de medio de cultivo: el medio de cultivo empleado fue el Murashige y Skoog (1962) se añadió 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2 g L<sup>-1</sup> de gelrite, el pH fue ajustado a 5.6. Para el trabajo se emplearon dos medios de germinación, al primero y segundo se añadió 10 y 20 % de agua de coco respectivamente. Los medios fueron dispensados en tubos de ensayo y después fueron autoclavados a 121° C (vapor a presión) a 15 PSI por 15 minutos. Siembra de las semillas en dos medios de cultivo: Las semillas previamente desinfectadas fueron colocadas en caja Petri con agua destilada para formar una solución de semillas y después con una jeringa se sembró a cada tubo de ensayo 1 ml de la solución con semillas. Los tubos sembrados permanecieron en la sala de crecimiento por 65 días a una temperatura de 23 °C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.





Figura 2. Procedimiento metodológico de la desinfección de semillas y fruto de *Z. maculatum*.

### Diseño y análisis estadístico

Resultado de las combinaciones de los factores de estudio (métodos de desinfección y suplementación de agua de coco en los medios de cultivo) cuyos tratamientos se encuentran descritos en la [Tabla 1](#). Cada tratamiento tenía 15 repeticiones y está representada por un tubo de ensayo. El diseño experimental corresponde a un diseño completamente al azar. El análisis de datos se realizó a través del programa estadístico INFOSTAT (2010), donde el ANVA (análisis de varianza) y la prueba Tukey fueron analizados a un nivel de significancia del 5 %.

Tabla 1. Tratamientos resultantes de la combinación de factores de estudio.

Tratamiento	Combinación de factores de estudio
T1	Desinfección semillas 0.5 % por 5 min y 10 % agua de coco
T2	Desinfección semillas 0.5 % por 5 min y 20% de agua de coco
T3	Desinfección semillas 0.5 % por 5 min jeringa y 10% agua de coco
T4	Desinfección semillas 0.5 % por 5 min jeringa y 20% de agua de coco
T5	Desinfección de la capsula 1 % por 5 min y 10% agua de coco
T6	Desinfección de la capsula 1 % por 5 min y 20% de agua de coco

### Variables de respuesta

Porcentaje de viabilidad: las semillas de orquídeas fueron sometidas a una solución de tetrazolium al 0.5 % durante 24 horas, pasado este tiempo se contabilizó el número de semillas teñidas de color rosado, a las cuales se las considero viables, para dicho cálculo se empleó la siguiente formula:

$$Viabilidad (\%) = \frac{\text{Número de semillas viables}}{\text{Número total de semillas}} \cdot 100 \quad [1]$$

Porcentaje de contaminación: de cada uno de los tratamientos se contabilizó el total de tubos contaminados ya sea por hongos o bacteria al cabo de 10 días pasada la siembra.

Fases del desarrollo de la germinación: en base al parámetro descrito por Dutra et al., (2009) se realizó la evaluación en valores porcentuales correspondientes: a) fase 1: el embrión se expande y se da la ruptura de la testa; b) fase 2: aparición del protocormo (germinación) y rizoides, c) fase 3: emergencia y elongación de la primera hoja y d) fase 4: aparición del primordio (primera hoja).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Porcentaje de viabilidad de las semillas

Las semillas de *Zigopetalum maculatum* con la prueba de terrazolium dieron como resultado  $68.7 \pm 11.9$  % de viabilidad y con 1.75 % de semillas vacías sin embrión ([Figura 3](#)). El porcentaje de viabilidad de las semillas se expresa con tetrazolium, esta se basa en una reacción que ocurre en las células vivas las cuales liberan hidrógeno por la actividad deshidrogenasa en el proceso de la respiración (Vujanovic et al., 2000).

Según Barthlott et al. (2014) la semilla viable, es decir la que dará origen a una nueva planta, puede ser pequeña o mediana, dependiendo del tamaño del fruto. Al respecto, Duarte et al. (2017) mencionan, que la baja viabilidad de las semillas y gran volumen de aire que poseen las semillas de orquídea terrestre, podrían dificultar la humectación de la misma y por ende su

germinación y este porcentaje registrado en *Z. maculatum* podría deberse a esta situación en porcentaje de viabilidad presentado en la presente investigación. Además, es importante considerar que el porcentaje de viabilidad es variable en función a la especie e incluso dentro del mismo género, así por ejemplo, en las capsulas de *Phragmipedium* reportó para *P. humboldtii* 34.3 %, en *P. longifolium* 44.7 % y *P. pearcei* 82.3 % de viabilidad de las semillas (Muñoz y Jiménez, 2008).

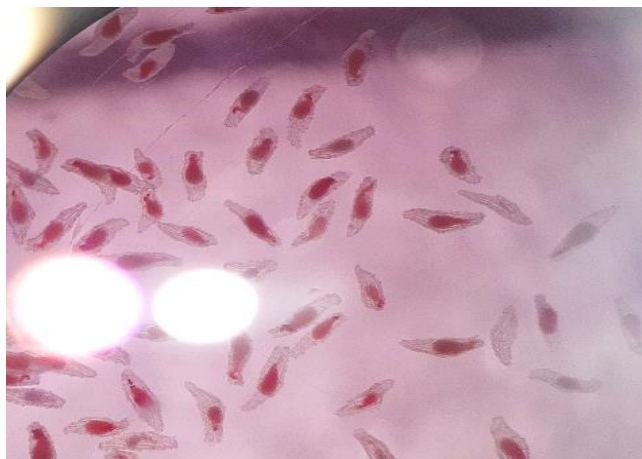


Figura 3. Semillas viables con tinción rojo (Tetrazolium) en el embrión y semillas sin embrión.

### Porcentaje de contaminación

Se observó que los tratamientos 3 y 4 presentaron mayor porcentaje de contaminación. Ambos corresponden al empleo de la técnica de desinfección del método de la jeringa. A pesar que la solución desinfectante y tiempo es similar en el T1 y T2 probablemente se debe que la jeringa requiere mayor tiempo de exposición, como señala Morales (2011) recomienda para la desinfección de semillas en *Catthea nobilior* por el método de la jeringa deben sumergirlas 2 % de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 15 minutos. Dependiendo de la disponibilidad de frutos o semillas se puede desinfectar empleando la desinfección en sobres con semillas al 0.5 % NaClO durante 5 a 10 minutos, en cambio los frutos deben ser desinfectados al 1 % de NaClO por 10 minutos. Los valores registrados de porcentaje de contaminación cuando se realizan las introducciones a condiciones *in vitro* son aceptables hasta un 20 % de pérdida por contaminación (Thompson et al., 2006), de lo contrario si se incrementa la concentración del desinfectante estos pueden ocasionar la mortalidad de las semillas o

del explante empleado. Dicha aseveración es corroborada por Borges et al. (2004) quienes trabajaron con explantes de *Guadua angustifolia* que a medida que se aumenta la concentración de hipoclorito de sodio incide favorablemente en desinfectar los explantes, no obstante, afecta a la mortalidad del mismo.

La concentración del desinfectante varía en función al material vegetal a desinfectar, en orquídeas se usa desde 0.1, 0.5 a 2.5 % de NaClO, al igual que el tiempo de desinfección varía desde 10 a 30 minutos. En este caso, se constata que a pesar de la diferencia entre 0.5 y 1 % de hipoclorito de sodio para desinfectar semillas y frutos, el porcentaje de contaminación es casi similar, que indica la concentración del desinfectante depende del material vegetal a desinfectar. Mientras más expuesto el material vegetal al medio ambiente, como el caso de las cápsulas están más propensas a contaminación, que cuando están cubiertas, es decir las semillas dentro del fruto y, por tanto, se recomienda que la desinfección este más concentrada. Esta afirmación concuerda con Mamani y García (2020) quienes mencionan que la desinfección varía en función al desarrollo del tejido, mientras más adulto o lignificado el tejido, éste requiere mayor concentración de desinfectante que cuando este menos desarrollo.

Para la desinfección por el método por la jeringa, Billard et al. (2014) señalan que las semillas *Oncidium* al 0.5 % de NaClO durante siete minutos no presentaron contaminación alguna, esta diferencia de resultados probablemente se deba, que aumentar dos minutos tiene un efecto en la desinfección de los frutos.

### Fases del desarrollo de la germinación

Fase 1: ruptura de la testa, el análisis de varianza (ANVA) para el porcentaje de semillas en fase 1 se observa que hay diferencias significativas para el factor A (tratamientos de desinfección) y la interacción de factores ( $F=43.98$ ;  $GL_{2,84}$ ;  $P<0.01$ ) y ( $F=18.340$ ;  $GL_{1,84}$ ;  $P<0.01$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para el factor de medios de cultivo ( $F=1.140$ ;  $GL_{1,84}$ ;  $P>0.05$ ). A través de la [Figura 4](#) se observa que las semillas que fueron desinfectadas en sobres y dentro de la jeringa fueron estadísticamente similares y presentaron menor porcentaje de individuos en la fase 1 de 14.36 y 12.36 % respectivamente.

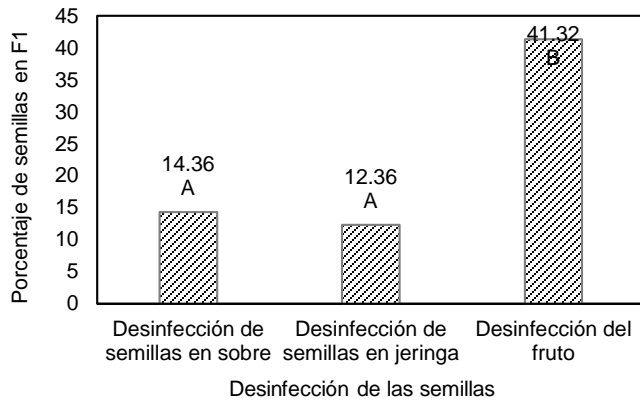


Figura 4. Porcentaje de semillas en fase 1 (el embrión se expande y se da la ruptura de la testa) con diferentes técnicas de desinfección.

Fase 2: aparición del protocormo o germinación (Figura 8), el análisis de varianza (ANVA) para el porcentaje de semillas que se encuentran en fase 2, muestra diferencias significativas para el factor A (tratamientos de desinfección) y la interacción de factores ( $F=32.27$ ;  $GL2,84$ ;  $P<0.01$ ) y ( $F=5.45$ ;  $GL2,84$ ;  $P<0.01$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para el factor de medios de cultivo ( $F=0.53$ ;  $GL1,84$ ;  $P>0.05$ ). En la Figura 5 se denota la desinfección de semillas dentro de la cápsula presentaron alto porcentaje de semillas germinadas. No obstante, las semillas desinfectadas dentro sobre y la jeringa mostraron menor porcentaje de germinación 10.38 y 14.13 respectivamente.

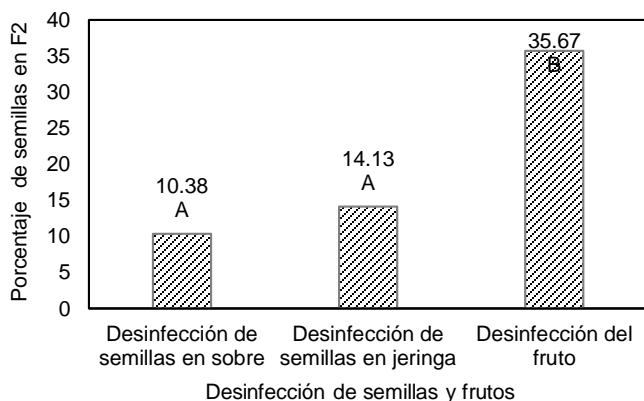


Figura 5. Porcentaje de semillas en fase 2 (aparición del protocormo o germinación y rizoides) con diferentes técnicas de desinfección.

Fase 3: emergencia y elongación de la primera hoja, El análisis de varianza muestra diferencias significativas con respecto al tratamiento desinfectante y la interacción entre el tratamiento desinfectante ( $F=8.16$ ;  $GL2,84$ ;  $P<0.01$ ) y ( $F=8.21$ ;  $GL2,84$ ;  $P<0.01$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas

para el factor de medios de cultivo ( $F=1.108$ ;  $GL1,84$ ;  $P>0.05$ ). En la Figura 6 se denota que la desinfección de semillas en sobres se encuentra mayor porcentaje en individuos en fase 3, pero las semillas desinfectadas dentro de la jeringa, al igual que los frutos son estadísticamente similares y, también el tratamiento de desinfección en jeringa indica que es similar a la desinfección al método de desinfección de semillas en sobre.

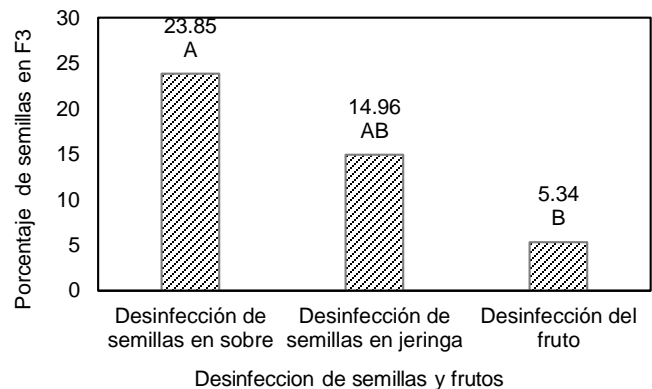


Figura 6. Porcentaje de semillas en fase 3 (emergencia y elongación de la primera hoja) con diferentes técnicas de desinfección.

Fase 4: Aparición del primordio foliar, el ANVA mostro diferencias significativas con respecto al tratamiento desinfectante y la interacción entre el tratamiento desinfectante ( $F=60.18$ ;  $GL2,84$ ;  $P<0.01$ ) y ( $F=8.17$ ;  $GL2,84$ ;  $P<0.01$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para el factor de medios de cultivo ( $F=0.23$ ;  $GL1,84$ ;  $P>0.05$ ). En la Figura 7 se evidencia que la desinfección de semillas desinfectadas en sobres de papel y desinfección en jeringa fueron estadísticamente similares con valores de 51.39 y 57.98 % de semillas en fase 4 respectivamente, a diferencia de las semillas fueron desinfectadas dentro del fruto.

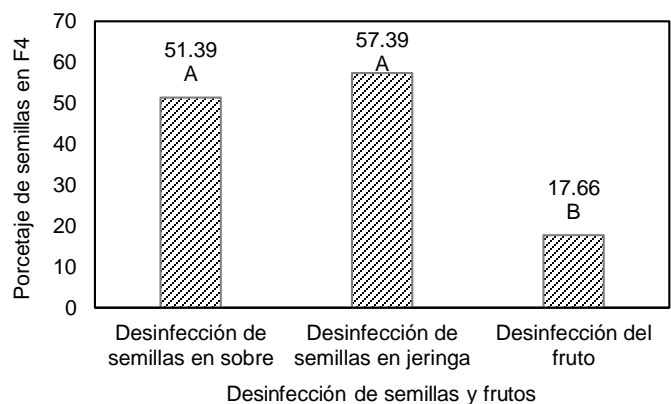


Figura 7. Porcentaje de semillas en fase 4 (aparición del primordio o primera hoja) con diferentes técnicas de desinfección.

De las Figuras precedentes 4, 5, 6 y 7 se observa, el tratamiento de desinfección de frutos, las semillas tuvieron mayor cantidad de individuos en las fases 1 y 2. No obstante, para este mismo tratamiento de desinfección en fases más avanzadas (3 y 4) disminuyen la cantidad de individuos. Lo contrario, sucede con las semillas desinfectadas, ya sean en sobre o dentro la jeringa, éstas de manera ascendente en fases 3 y 4 presenta mayor cantidad de semillas que las fases 1 y 2. Lo cual indica que los tratamientos de desinfección de semillas favorecen en una mejor respuesta en presentar fases más avanzadas durante el proceso de germinación en *Z. maculatum* al cabo de 65 días de evaluación.

La desinfección de las semillas a una mayor concentración de 1 % de NaClO dentro de las capsulas en *Z. maculatum* ocasionaron un bajo porcentaje de individuos en F3 y F4, las cuales corresponden a desarrollo avanzado después del proceso germinativo. Esta situación podría deberse a una concentración al 1 % haya afectado que las semillas lleguen a fases superiores al detener su crecimiento. Al respecto, Billard et al. (2014) mencionan, que al desinfectar las semillas de *Oncidium bifolium* con hipoclorito de sodio al 2 %, los protocormos presentaron una coloración amarilla y estructura transparente.

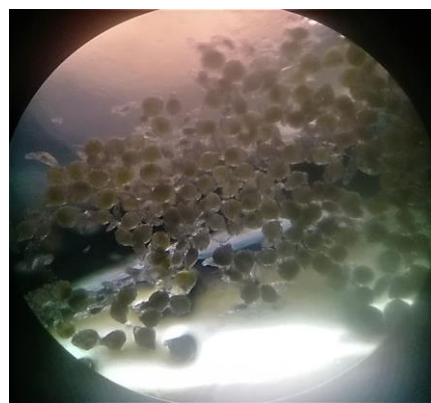


Figura 8. Fase protocormal de *Z. maculatum* (germinación).

### Porcentajes de semillas en fases de proceso de germinación

En general se observa en la Figura 9 y 10 que las semillas que fueron desinfectadas en sobre y dentro la jeringa en los dos medios de cultivo al 10 y 20 % de agua de coco respectivamente presentaron mayor porcentaje de individuos en fases más avanzadas de 3 y 4 en relación a las desinfectadas en frutos. También se observa que al 10 % de agua de coco fue superior de todas las fases en relación al 20 % de este aditamento.

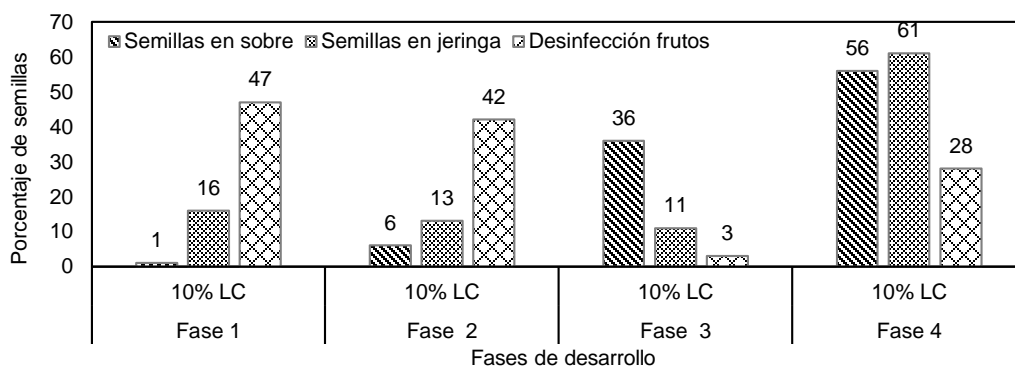


Figura 9. Porcentaje de semillas en fases de proceso germinativo en el medio MS con 10 % de agua de coco y distintos tratamientos desinfectantes.

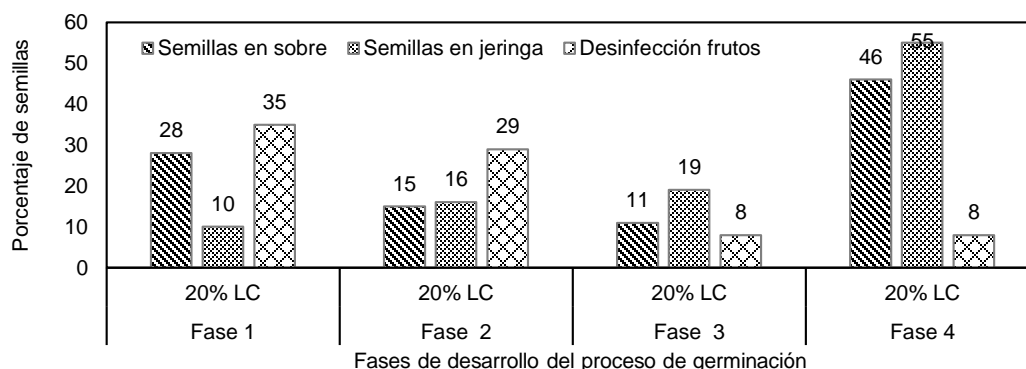


Figura 10. Porcentaje de semillas en fases de proceso germinativo en dos medios de cultivo de cultivo de MS con 20 % de agua de coco y distintos tratamientos desinfectantes.



El agua de coco es un inductor en la germinación, al igual que se emplea en promover la formación de brotes y también es empleado en orquídeas en reemplazo del endospermo líquido debido semillas carecen de endospermo. Al respecto, Patiño et al. (2011) señalan, que el agua de coco actúa como agente promotor de la germinación de semillas con alto nivel de latencia, que coloca este recurso como una alternativa adicional, altamente eficaz y de bajo costo, para ser utilizado en estrategias de propagación vegetal de especies con semillas de latencia profunda. En los resultados encontrados en *Z. maculatum* se podría indicar que hasta un nivel de 10 % es adecuado y no así duplicando esta concentración. En un estudio realizado por Santiago et al. (2015) en *Epidendrum falcatum* evidencio un mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento con MS con 10 % agua de coco, que el tratamiento control que solo contenía MS basal. Tal situación, atribuye Del Pozo et al. (2005) que el agua de coco contiene diversidad de hormonas con acción citoquinina, por ejemplo, del tipo isoprenoide, las cuales están implicadas en el proceso de división celular, y aromáticas, implicadas en procesos posgerminativos.

En orquídeas terrestres de los géneros *Habenaria* y *Ophrys* evidenció el efecto positivo del agua de coco en el medio de cultivo, en término de formación y desarrollo de los protocormos (Stewart y Kane, 2006; Kitsaki et al., 2004) lo cual se refleja en *Z. maculatum* debido a su hábito terrestre.

### Total de semillas germinadas

El ANVA mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento desinfectante y la interacción entre el tratamiento desinfectante ( $F=43.98$ ;  $GL2.84$ ;  $P<0.01$ ) y ( $F=18.34$ ;  $GL2.84$ ;  $P<0.01$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para el factor medios de cultivo ( $F=1.14$ ;  $GL1.84$ ;  $P>0.05$ ). En la Figura 11 se evidencia que la desinfección de semillas desinfectadas en sobres de papel y en la jeringa fueron estadísticamente similares de 85.63 y 87.07 % de semillas germinadas que las desinfectadas en el fruto.

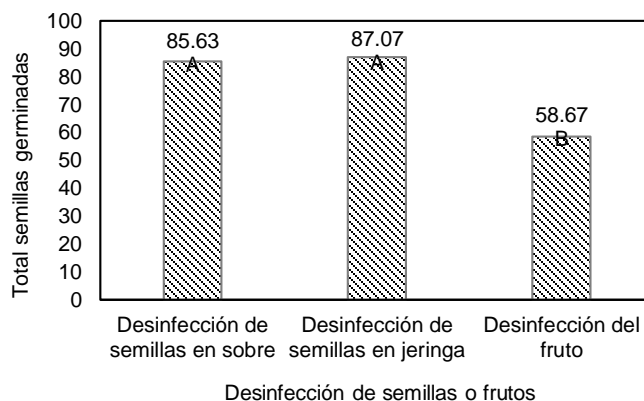


Figura 11. Total de semillas germinadas en diferentes tratamientos de desinfección.

En *Z. maculatum* las semillas que fueron desinfectas al 0.5 % de NaClO en sobres y en la jeringa presentaron un 85.63 y 87.07 % superior a los desinfectados en el fruto (85.67 %) (Figura 12). Esto puede atribuirse, que al incrementar la concentración al 1 % de desinfección afecto que las semillas expresen su potencia de germinación en condiciones *in vitro*, ya que se trata del mismo stock de semillas cosechadas en la misma época. Similares parámetros fueron obtenidos por Salazar et al. (2013) en un híbrido de *Phalenopsis* al incrementar la concentración de desinfección y tiempo de exposición repercute en un bajo porcentaje de viabilidad. De ello, Thompson et al. (2006) afirman que el uso adecuado de las concentraciones de NaClO en la desinfección, influye directamente en la inducción a la germinación de las semillas de orquídeas.

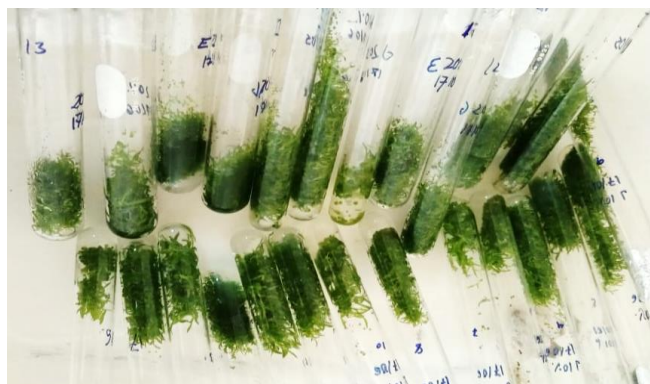


Figura 12. Semillas germinadas de *Z. maculatum* en la cámara de crecimiento.



## Efecto de interacción de la desinfección y concentración de agua de coco

Resultado de la interacción de los factores de estudio en la [Tabla 2](#) se observa que las semillas que fueron desinfectadas con 0.5 % de NaClO por cinco minutos en sobres de papel y jeringa con 10 y 20 % de agua de

coco alcanzaron un 98 y 90 % de germinación (protocormos) respectivamente. Comparando los resultados con los tratamientos de la desinfección de semillas en sobres de té resultan más favorables por su bajo pérdida de contaminación en relación al método de la jeringa, por lo que resulta más favorable por emplear que el T1 para *Z. maculatum*.

Tabla 2. Efecto de la interacción de los tratamientos de desinfección y concentración de agua de coco en el porcentaje total de semillas germinadas.

Tratamiento	F2 aparición del protocormo (germinación)	F3 emergencia y elongación de la primera hoja	F4 aparición del primordio (primera hoja y rizoides)	Total semillas germinadas
T1	6	36	56	<b>98</b>
T2	15	11	43	69
T3	13	11	61	85
T4	16	19	55	<b>90</b>
T5	42	3	28	73
T6	29	8	8	45

En orquídeas la germinación morfológicamente se la asigna fase protocormal, el cual puede diferenciarse en plántula o formar cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) Arditti y Ernst (1993). El protocormo se diferencia en una región apical, que consiste en pequeñas células que forman el ápice de brote y la parte basal conformada por grandes células parenquimatosas que funciona como un depósito orgánico (Free et al., 2003). El tiempo de germinación en *Z. maculatum* fue muy similar al reportado por Nagaraju y Mani (2005) en una especie del mismo género, *Z. intermedium* este último fue cultivado en el medio MS a la mitad de concentración con 1.5 g L<sup>-1</sup> agua de coco con 0.25 mg L<sup>-1</sup> PBZ y 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA permitió la formación de protocormos en 64 a 70 días.

## CONCLUSIONES

El porcentaje de viabilidad de las semillas de *Z. maculatum* fue de 68.7 %. Los tratamientos de desinfección aplicados en semillas en sobres de papel de té al 0.5 % de NaClO y la capsula al 1 % de NaClO durante cinco minutos de desinfección. De los tratamientos desinfectantes las semillas alcanzaron fases de desarrollo de germinación más avanzadas de F3 (emergencia y elongación de la primera hoja) y F4 (aparición del primordio con primera hoja y rizoides) que las procedentes de frutos, los cuales tuvieron un comportamiento inverso. El mayor porcentaje de germinación fue 90 % mediante la utilización del medio de cultivo MS con la adición 10 % agua de coco con el tratamiento de desinfección en sobre de té con una solución de 0.5 % de hipoclorito de sodio durante cinco minutos de inmersión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arditti, J; Michaud, JD; Healey, PL. 1980. Morphometry of orchid seeds: II Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera* (en línea), *Corallorhiza* and *Epipactis*. *Amer J Bot* 67:347-365. Disponible en <http://dx.doi.org/10.2307/2442345>.
- Arditti, J; Ernst, R. 1993. Micropropagation of orchids (en línea). New York: John Wiley and Sons. 87-607. Disponible en <https://www.worldcat.org/es/title/micropropagation-of-orchids/oclc/993762081>.
- Augustine, J; Kumar, Y; Sharma, J. 2001. Orchids of India-II: Biodiversity and status of *Bulbophyllum Thou* (en línea). Daya publishing house, Trinagar, New Delhi. 113. Disponible en <https://www.ompublishations.in/product/books/OM5448>.
- Barthlott, W; Große-Veldmann, B; Korotkova, N. 2014. Orchid seed diversity. A scanning electron microscopy survey (en línea). Turland NJ y Rodewald M, editores. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Englera. Disponible en: <https://www.nhbs.com/orchid-seed-diversity-book>.
- Bertolini, V; Damon, A; Rojas, A. 2014. Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae) (en línea). Mexico2-5. Disponible en [https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo\\_Bertolini\\_Ane\\_Damon\\_Ashby\\_y\\_%C3%81ngel\\_Natanael\\_Rojas\\_Vel%C3%A1zquez\\_Quelato\\_de\\_hierro\\_y\\_agua\\_de\\_coco\\_en\\_la\\_germinaci%C3%B3n\\_in\\_vitro\\_de\\_Rossioglossum\\_grande\\_Orchidaceae\\_https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo\\_Bertolini\\_Ane\\_Damon\\_Ashby\\_y\\_%C3%81ngel\\_Natanael\\_Rojas\\_Vel%C3%A1zquez\\_Quelato\\_de\\_hierro\\_y\\_agua\\_de\\_coco\\_en\\_la\\_germinaci%C3%B3n\\_in\\_vitro\\_de\\_Rossioglossum\\_grande\\_Orchidaceae\\_](https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo_Bertolini_Ane_Damon_Ashby_y_%C3%81ngel_Natanael_Rojas_Vel%C3%A1zquez_Quelato_de_hierro_y_agua_de_coco_en_la_germinaci%C3%B3n_in_vitro_de_Rossioglossum_grande_Orchidaceae_https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo_Bertolini_Ane_Damon_Ashby_y_%C3%81ngel_Natanael_Rojas_Vel%C3%A1zquez_Quelato_de_hierro_y_agua_de_coco_en_la_germinaci%C3%B3n_in_vitro_de_Rossioglossum_grande_Orchidaceae_).

- Billard, CE; Dalzotto, CA; Lallana, VH. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium* (en línea). Revista Polibotánica (38): 145-157. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n38/n38a8.pdf>.
- Borges, M.; Ros, C; Castellanos, Y; Milanes, S; Velásquez, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth (en línea). Biotecnología Vegetal 4(4): 237-242. Disponible en <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/download/434/402>.
- Del Pozo, JC; López-Matas, MA; Ramírez-Parra, E; Gutiérrez, C. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle (en línea). Plant Physiol 123:173-183. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00420.x>.
- Duarte, ER; Mangeon, V; Koppers, G; Rocha, P; Niellia, F. 2017. Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) (en línea). Revista conservación 39(2):388-399.2017. Disponible en <https://dx.doi.org/10.1544/6/caldasia.v39n2.62184>.
- Dutra, D; Kane, M; Richardson, L. 2009. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid (en línea). Plant Cell Tissue and Organ Culture 96:235-243. Disponible en <https://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9480-z>.
- Free, A; Pasternak TP; Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. Plant Cell (en línea). Tissue and Organ Culture 74: 202-228. Disponible en: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000183325700001?SID=USW2EC0ABBUxi69xCsjAYZffht4cX>.
- Jiménez, I; Quezada, J; Bermejo, J. 2015. Orquídeas de Cotapata (en línea). Universidad Mayor de San Andrés 1-7. Disponible en [https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/361\\_bolivia-orquideas\\_de\\_cotapata.pdf](https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/361_bolivia-orquideas_de_cotapata.pdf).
- Kitsaki, C; Zigouraki, S; Ziobora, M; y Chintziest, S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys species* (Orchidaceae) (en línea). Plant Cell Rep. 23: 284-290. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/8203654\\_In\\_vitro\\_germination\\_protocorm\\_formation\\_and\\_plantlet\\_development\\_of\\_mature\\_versus\\_immature\\_seeds\\_from\\_several\\_Ophrys\\_species\\_Orchidaceae](https://www.researchgate.net/publication/8203654_In_vitro_germination_protocorm_formation_and_plantlet_development_of_mature_versus_immature_seeds_from_several_Ophrys_species_Orchidaceae).
- Karol, H; Mosquera, AT; Otero JT. 2014. Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas (en línea). Acta Agronómica 13. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a4.pdf>.
- Mamani, B; García, R. 2020. Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) en diferentes medios de cultivo (en línea). Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales 7(1): 69-78. Disponible en <http://riarn.agro.umsa.bo/index.php/RIARN/article/view/146>.
- Morales I. 2011. Manual para el cultivo in vitro de la orquídea *Catleya nobilior* Flor símbolo de Concepción (en línea). Santa Cruz, Bolivia. Disponible en <https://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>.
- Murashige, Y; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-97.
- Muñoz, M; Jiménez, Víctor M. 2008. Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. Pearcei* (en línea). Lankesteriana International Journal on Orchidology (8): 23- 31. Disponible en [https://pdfs.semanticscholar.org/ff6a/94716e305ecc39eba5408ab645a736e53368.pdf?\\_ga=2.220402520.1973194725.1661194507-1493397883.1661194507](https://pdfs.semanticscholar.org/ff6a/94716e305ecc39eba5408ab645a736e53368.pdf?_ga=2.220402520.1973194725.1661194507-1493397883.1661194507).
- Nagaraju, V; Mani, SK. 2005. Rapid in vitro propagation of orchid *Zygopetalum intermedium* (en línea). Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14(1). Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03263220>.
- Patiño, C; Mosquera, F; Tulio R. 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* (en línea). Acta Biol. Colomb. 16(1): 133-142. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027887010.pdf>.
- Richard, E; Contreras, DI. 2015. Orquídeas de los Yungas (La Paz, Bolivia): una alternativa socioeconómica sostenible y ecológica al cultivo de hoja de coca. UMSA, Bolivia Revista Tribuna Docente (1): 83-88.
- Stewart, S; Kane, M. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid plant (en línea). Cell. Tiss. Organ Cult. 86:147-158 Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-006-9098-y>.
- Santiago, T; Carballar, S; Chávez, V. 2015. Germinación y regeneración in vitro de *Epidendrum falcatum* LINDL (en línea). Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I. -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México. Disponible en [https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias-BIO-T\\_I/Handbook\\_Biologia\\_y\\_Agronomia\\_T1\\_V1\\_160\\_169.pdf](https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias-BIO-T_I/Handbook_Biologia_y_Agronomia_T1_V1_160_169.pdf).
- Salazar, SA; Nieto, A; Zulay, V; Barrientos F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología 15(2): 97-105. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n2/v15n2a12.pdf>.
- Thompson, D; Trevor, E; Van, S. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability in vitro: relationships, requirements and first-time reports (en línea). Plant Growth Regul 49:269-284. Disponible en

<https://doi.org/10.1007/s10725-006-9137-z>.

Vázquez, R; Ibisch P. (Eds). 2004. Orquídeas de Bolivia. Ed. FAN. Vol I y Vol II. Santa Cruz, Bolivia.

Vujanovic, V; St-Arnaud, M; Barabé, D; y Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination (en línea). Annals of Botany. 86(1):79-86. Disponible en <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1162>.

Artículo recibido en: 14 de febrero 2022

Aceptado en: 08 de agosto 2022