

EVALUACIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN CAPSULAS DE SPATHOGLOTTIS PLICATA INTRODUCIDAS AL CULTIVO IN VITRO ARTESANAL

William Alexander Hernández Acosta , Avigail Peña García2.

1,2Servicio Nacional de aprendizaje SENA, Centro Agroindustrial del Meta, GRUINVCAM, Semillero de investigación CienciaTec.

Resumen

Colombia cuenta con el mayor número de especies de orquídeas en el mundo, con un total de 4.270 registradas, agrupadas en 274 géneros distribuidos en casi todo el territorio nacional; un total de 1.572 especies son exclusivas del país, lo que representan el 36,8% de las especies totales en el territorio nacional (Betancur et al., 2015); destacando la orquídea *Spathoglottis plicata*, conocida como la “orquídea de tierra filipina”, siendo esta especie vegetal identificada en el municipio de Puerto López, Meta. El proyecto tiene como objetivo evaluar la concentración del hipoclorito de sodio más eficiente en capsulas de *Spathoglottis plicata* introducidas al cultivo in vitro artesanal, con un enfoque metodológico mixto. Se recolectó doce cápsulas maduras provenientes del Vivero Juanchito. Se realizó el diseño de una caja simuladora de flujo laminar, para los procesos de siembra, se rediseñó una jeringa de 10 ml para el pesaje de sustancias solidas. Se ajustó la solidificación del medio básico casero con 22.5 g de gelatina sin sabor, con 2.4 g de azúcar, 1 mg de tiamina con 80 ml de agua esterilizada. Se identificó que el mejor tratamiento para la desinfección de cápsulas de *Spathoglottis plicata*, aplicando técnicas artesanales para la iniciación de cultivos in vitro, es el T4 con un 99.9% de efectividad del NaClO al 5.25% con 10 minutos de inmersión, y el tratamiento menos eficiente fue el T11 con un 52.36% de efectividad del NaClO al 1.25% con 5 minutos de inmersión.

Palabras Claves: Artesanal, cultivo in vitro, desinfección, hipoclorito de sodio, *Spathoglottis plicata*.

Introducción

La familia *Orchidaceae* es una de las más extensas del reino vegetal; se estima que existen entre 30 mil y 35 mil especies distribuidas en todo el mundo, número que crece cada año conforme se exploran nuevos territorios (Castillo, 2019); estas plantas se caracterizan por ser muy exóticas, por su diversidad de colores, formas, tamaño de sus flores, lo misterioso de sus relaciones bióticas, la capacidad de adaptarse a diferentes ecosistemas y sus distintas formas de crecimiento, lo que hace que este sea uno de los grupos de plantas más apetecidos y fascinantes del planeta.

Para el 2015 el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, a través del Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SIB), afirmó que Colombia cuenta con el mayor número de especies de orquídeas en el mundo, con un total de 4.270 registradas, agrupadas en 274 géneros distribuidos en casi todo el territorio nacional; un total de 1.572 especies son exclusivas del país, lo que representan el 36,8% de las especies totales en el territorio nacional. La región Orinoquia ocupa el tercer puesto

en diversidad, con un total de 143 especies de orquídeas, con 15 especies de orquídeas endémicas a nivel nacional después de la región Pacífica (Betancur et al., 2015).

Dentro de la variedad de orquídeas que alberga Colombia, podemos destacar en el municipio de Puerto López Meta, la orquídea *Spathoglottis plicata*, comúnmente conocida como la “orquídea de tierra filipina”. Es una orquídea terrestre nativa de Malasia, se encuentra desde Asia tropical y subtropical hasta Australia y el Pacífico Occidental, incluidos Tonga y Samoa. (Jones, 2006).

Spathoglottis plicata fue descrita formalmente por primera vez en 1825 por Carl Ludwig Blume, quien publicó la descripción en *Bijdragen tot de flora van Nederlandsch Indië* (Blume, 1825).

Esta orquídea tiene hojas perennes. Tiene pseudobulbos apiñados de 40 a 60 mm (1,6 a 2,4 pulgadas) de largo y 20 a 40 mm (0,8 a 2 pulgadas) de ancho, cada uno con tres o cuatro hojas plisadas

de 50 a 90 mm (2 a 4 pulgadas) de largo y 8 a 15 mm (0,3 a 0,6 pulgadas) de ancho en un tallo de 80 a 150 mm (3 a 6 pulgadas) de largo. Genera hasta cuarenta flores resupinadas de color rosa intenso a púrpura de 35–55 mm (1–2 pulgadas) de largo y ancho nacen en un tallo floral peludo de 50–100 cm (20–40 pulgadas) de alto. El sépalo dorsal mide 20–30 mm (0,8–1 pulg.) De largo y los sépalos laterales son un poco más estrechos (Jones, 2006).

El fruto es una cápsula de unos 3 mm (0,1 pulgadas) de largo, verde y cilíndrica (Jones, 2010). carecen de endosperma, presentan solo una testa y un embrión inmaduro (Pierik, 1990; Arditti y Ernst, 1993) y se produce en grandes cantidades por cápsulas.

Después de fertilizar la flor, las semillas tardan unas seis semanas en desarrollarse. Cuando está madura, la cápsula se abre y miles de semillas diminutas son arrastradas por el viento (Jones, 2010).

Luego de que las semillas son trasportadas por el viento, su tasa de germinación en condiciones naturales es del 2 – 3% (Luan, 2006), esto debido a que se necesita de una relación obligada con hongos micorríticos, proceso denominado simbiosis, pues al carecer de un endosperma el embrión obtiene sus nutrientes a través de esta asociación para lograr su germinación (Arditti, 1984).

Es así como la técnica de cultivos in vitro se presenta como una estrategia para la germinación de semillas de orquídeas, al ser cultivadas en un medio rico en nutrientes dentro de un frasco de vidrio, en condiciones ambientales controladas (luminosidad, temperatura y humedad relativa); genera la obtención de material vegetal libre de microorganismos, como bacterias y hongos, lo cual permite la recuperación, conservación y propagación de orquídeas (Chávez, et al., 2014).

Uno de los principales problemas al usar estas técnicas es la contaminación microbiana, debido a la presencia de microorganismos endógenos y exógenos, como bacterias, hongos y esporas presentes en la cápsula de las orquídeas, limitando su preparación y crecimiento en medios nutritivos asépticos (Stubblefield et al., 2015); debido al éxito limitado en los protocolos de desinfección en los cultivos in vitro, se deben hacer ensayos con desinfectantes como el hipoclorito de calcio y sodio,

el cloruro de mercurio, los antibióticos y fungicidas para eliminar a los microorganismos sin afectar el material vegetal (Mng'omba et al., 2012 y Yildiz et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo mencionado, una limitante para la investigación, es no contar con un laboratorio de biotecnología vegetal en la zona, para asegurar eficazmente los procesos de asepsia, como también el uso de instrumentos, reactivos y equipos.

Al identificar que hay escasos trabajos de investigación publicados para el establecimiento de la técnica de cultivo in vitro artesanal, se planteó la presente investigación que tuvo como objetivo evaluar la concentración del hipoclorito de sodio más eficiente en cápsulas de *Spathoglottis plicata* introducidas al cultivo in vitro artesanal. Se busca que, con los métodos y resultados aquí expuestos, se puedan brindar bases para la iniciación de procesos en cultivo in vitro artesanal de *Spathoglottis plicata*.

Metodología

Recolección y procesamiento de cápsulas

Las semillas de *Spathoglottis plicata* fueron obtenidas a partir de cápsulas maduras, recolectadas en el vivero “Juanchito” del municipio de Puerto López, Meta, Colombia. En la recolección del material vegetal, se procedió a desinfectar las tijeras con alcohol al 70% para proceder a cortar las cápsulas. Posteriormente, las cápsulas fueron almacenadas en bolsas plásticas para su traslado a la finca Villa Adriana, ubicada en la Vereda Río Negro, Puerto López, Meta, Colombia.

En la figura 1 se observa el procedimiento para la recolección y selección del material vegetal.



Figura 1 Recolección material vegetal: A. Corte de capsulas. B. Selección de cápsulas de orquídeas

Diseño caja simuladora de flujo laminar, mechero de alcohol y jeringa gramera.

En la elaboración de la caja simuladora de flujo laminar, se utilizó una caja de cartón de 50 cm de ancho x 45 cm de profundidad x 40 cm de alto. Esta se forro con papel aluminio, utilizando como pegante silicona en barra, como se observa en la figura 2.



Figura 2 Diseño caja simuladora de flujo laminar: A. Montaje prototipo. B. Construcción caja simuladora de flujo laminar:

En la fabricación del mechero de alcohol se usó un frasco de compota, al cual se le realizó un orificio en la tapa metálica, para lograr introducir una mecha de trapero al interior del mechero, según figura 3.



Figura 3 Diseño mechero de alcohol: A. Perforación de tapa. B. Elaboración mechero de alcohol.

Se rediseño una jeringa de 10 ml, con el fin de cumplir la función de una gramera, para ello se procedió a cortar la boquilla de la jeringa, permitiendo el pesaje de sustancias sólidas, como observa en la figura 4.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal, fue el medio básico casero (MBC). Se utilizó 2.4 g de azúcar, 1 mg tiamina y 80 ml de agua esterilizada. Se empleó tres

concentraciones de 7.5g, 15 g y 22.5 g de gelatina sin sabor para determinar la gelificación del MBC en condiciones ambientales naturales.



Figura 4 Diseño jeringa gramera: A. Corte de jeringa. B. Rediseño de jeringa

Los compuestos (azúcar, tiamina y gelatina sin sabor) se pesaron mediante el uso de una jeringa de 10 ml modificada.

Para cada concentración se utilizó 15 ml de medios básico casero en diez frascos de compota con capacidad de 113 ml, esterilizados a 15 psi a 121 °C **durante 15 minutos en una olla pitadora. Se evaluó durante siete días la gelificación de los medios nutritivos, con una temperatura variable de 22 °C a 33 °C** propias del municipio de Puerto López -Meta.

Para el proceso de esterilización en la olla pitadora, se introdujo un trapo en el fondo del equipo, para evitar que los frascos se estallen, luego se adicionó 200 ml de agua potable (bolsa) y se procedió a introducir los MBC **y se tapó el equipo. Se llevó a fuego alto en una estufa de gas, una vez pitó la olla a presión por primera vez, se puso a fuego bajo durante 15 minutos; pasado el tiempo se retiró del fuego, se dejó enfriar el equipo para posteriormente retirar los MBC y almacenar en una zona fresca de la vivienda (Olga et al., 1992).**

Esterilización de agua, instrumentos de laboratorio y EPP

Los instrumentos de laboratorio, como el depilador de cejas (pinzas), bisturí, plato de cerámica tintero y frasco de compota se envolvieron en papel reciclado.

Los EPP (elementos de protección personal) como la bata, tapabocas, cofia y polainas se envolvieron en papal reciclado. Se tomó agua potable (bolsa) y se almacenó en frascos de compota para ser

esterilizados.

Los instrumentos de laboratorio, los EPP y el agua potable se esterilizaron en la olla a presión a 15 psi a 121 °C durante 15 minutos. Terminado el proceso, los instrumentos de laboratorio y EPP, se guardaron en una estantería, para realizar la aplicación rutinaria de alcohol al 70%. El agua esterilizada se almacenó en la nevera bajo refrigeración.

Preparación y desinfección con hipoclorito de sodio

Se implementó la fórmula de dilución $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ para bajar la concentración del hipoclorito de sodio comercial 5.25% a 2.5% y 1.25%. Para hacer la medición del volumen de hipoclorito de sodio y agua, se usó una jeringa de 10 ml; luego se almacenó los desinfectantes diluidos en recipientes plásticos, como se ilustra en la figura 5.



Figura 5 Elaboración medios básicos caseros: A. Preparación desinfectante



B. Desinfección cápsula de orquídea

Se implementó los siguientes tratamientos con una variación de tiempo con respecto a cada concentración de hipoclorito de sodio, para la desinfección de las cápsulas de orquídeas de *Spathoglottis plicata*, como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 1

Tratamiento de NaClO con tiempos de inmersión.

Tratamiento	Hipoclorito de Sodio	Tiempo
T1	0%	10 minutos
T2	0%	5 minutos
T3	0%	2 minutos
T4	5.25%	10 minutos
T5	5.25%	5 minutos
T6	5.25%	2 minutos
T7	2.5%	10 minutos
T8	2.5%	5 minutos
T9	2.5%	2 minutos
T10	1.25%	10 minutos
T11	1.25%	5 minutos
T12	1.25%	2 minutos

Se implementó tres MBC por cada tratamiento, para la determinación del tratamiento más eficiente.

Siembra y evaluación de la concentración de Hipoclorito de sodio

La siembra y desinfección de las cápsulas se efectuó en la caja simuladora de flujo laminar. El equipo se ubicó en un lugar de la vivienda, donde el flujo de aire no ingresara directamente a la caja simuladora de flujo laminar. Luego, se desinfectó el equipo con

alcohol al 70% y posteriormente se introdujo un mechero de alcohol con etanol al 96% para asegurar la asepsia del proceso al momento de los cortes y de la siembra.

Los frascos de compota con los MBC esterilizados, son desinfectados con alcohol al 70%, a su vez se queman los frascos de vidrio para eliminar presencia microbiana en la pared de los mismos; luego, se procede a ingresar los frascos al equipo *caja cabina simuladora de flujo laminar*.

Con respecto al material vegetal, este fue sometido a un esquema de desinfección superficial establecido por Pérez-Martínez y Pacheco (2005) que consiste en colocar la cápsula en una solución jabonosa concentrada (2%) durante cinco minutos, aplicar tres enjuagues con agua estéril. Seguidamente, se desinfectó las cápsulas con los tratamientos planteados T1 a T12, culminado el tiempo de cada tratamiento, se realiza un triple lavado a las cápsulas con agua estéril.

Una vez desinfectada la cápsula, se le realizó un corte longitudinal para llevar a cabo la siembra uniforme de sus semillas en tres MBC estandarizados, como se observa en la figura 6.



Figura 6 Corte y siembra de semilla de *Spathoglottis plicata*.

Finalizada la siembra, las tapas de los frascos de compota, se sellaron con papel parafilm, y se rotularon los frascos con fecha de siembra. El material sembrado se ubicó en un lugar fresco de la vivienda, con un fotoperiodo natural de 12 h luz penumbra y 12 h oscuridad. Además, se realizó un registro durante siete días por observación directa para determinar la presencia de carga microbiana en cada uno de los tratamientos trabajados, registrando lo evidenciado.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se registraron y analizaron en el paquete estadístico Excel versión 2019 para la determinación del porcentaje de efectividad de los tratamientos T1 al T121.

Resultados y discusión

Diseño caja simuladora de flujo laminar, mechero de alcohol y jeringa gramera

La elaboración de la caja simuladora de flujo laminar, siendo un diseño artesanal que no cuenta con las condiciones necesarias que brinda una cabina de flujo laminar, como lo indica Rojas (2011):

Las cabinas de flujo laminar, son equipos que proporcionan una barrera de contención para trabajar de forma segura y en condiciones de esterilidad. Son equipos diseñados para mantener un área libre de partículas o de probables contaminantes denominada zona de trabajo. La protección se logra mediante la combinación de elementos electromecánicos/ electrónicos (motor, ventilador, filtro, conductos, iluminación, etc.) y procesos físicos (flujo laminar, diferencias de presiones, etc.), que impulsan el aire a través de unos filtros especiales de gran superficie (filtros HEPA) estratégicamente situados que poseen una eficiencia mínima de retención de partículas del 99.99%.

Este equipo artesanal es eficiente si se realizan procesos rigurosos de asepsia, tanto en el equipo como en el operario y en los instrumentos e insumos que se pretendan utilizar dentro de este equipo de laboratorio artesanal. Con respecto al mechero de alcohol, según Griffin (2018) manifiesta que un quemador o mechero de alcohol, es un equipo de laboratorio que se utiliza para producir una llama abierta, puede ser de latón, vidrio, acero inoxidable, aluminio, etc. La elaboración de esta herramienta nos permite esterilizar el área de trabajo y los instrumentos de laboratorio, como los depiladores de cejas (pinzas), cuchillas de corte, entre otros, asegurando la inocuidad de los procesos del cultivo in vitro.

De igual manera, se logró la modificación de una jeringa de 10 ml, para suplir la ausencia de una gramera. A pesar de que la unidad de medida de la gramera es en gramos, y la unidad de medida de la jeringa es en mililitros, estas unidades de masa y

volumen son equivalentes, en otras palabras, 1 g es equivalente a 1 ml, por este motivo, la modificación de la jeringa gramera, es de utilidad al no contar con el equipo requerido.

Preparación del medio de cultivo

Transcurridos diez días, se identificó que la concentración de 7.5 g de gelatina sin sabor no presentó gelificación al primer día haberse preparado, la concentración de 15 g de gelatina sin sabor al cabo de cuatro días perdió su textura gelatinosa, y la concentración de 22.5 g de gelatina sin sabor no perdió su consistencia física pasado los diez días en condiciones ambientales naturales. Lo anterior se puede confirmar con estudios reportados por Restrepo et al., (2016) que la gelatina sin sabor representa un valor significativo para la elaboración de medios nutritivos alternos.

EL MBC se estandarizó con 2.4 g de azúcar, 1 mg tiamina, 22.5 g de gelatina sin sabor/ 80 ml de agua estéril. Se procedió a preparar 540 ml de MBC para la dosificación de 36 frascos de compota correspondiente a los 12 tratamientos a tratar con hipoclorito de sodio.

Esterilización de agua, instrumentos de laboratorio y EPP

Se llevó a cabo la esterilización del agua, los instrumentos de laboratorio y EPP según lo expuesto metodológicamente; el agua esterilizada se puso a refrigeración, los instrumentos y EPP se almacenaron en una estantería para su posterior uso.

Preparación y desinfección con hipoclorito de sodio

Para la preparación del NaClO al 2.5% y 1.25%, se usó NaClO comercial al 5.25% para bajar la concentración del desinfectante, usando la fórmula de dilución $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ obteniendo los siguientes datos:

Se dispuso 50 ml de NaClO al 2.5%, tomando un volumen de 23.8 ml de NaClO al 5.25 % y 26.1 ml de agua estéril para reducir la concentración de NaClO.

Se preparó 50 ml de NaClO al 1.25%, tomando un volumen de 11.9 ml de NaClO al 5.25 % y 38 ml de

agua estéril para reducir la concentración de NaClO.

Los desinfectantes preparados se almacenaron en recipientes plásticos debidamente rotulados y se guardaron en un lugar fresco para su posterior uso.

Siembra y evaluación de la concentración de Hipoclorito de sodio

La desinfección y siembra de las cápsulas de orquídeas de *Spathoglottis plicata*, se puede observar en la gráfica 1 el comportamiento del desinfectante NaClO por tratamiento, generando los siguientes resultados:

Los tratamientos de control T1, T2 y T3 presentaron contaminación al tercer día, se observó presencia de un hongo de tamaño pequeño de color blanco, de consistencia mantecosa, con superficie lisa; también un hongo de tamaño mediano de color verde, de consistencia viscosa, con superficie algodonosa; y una bacteria de color café con forma irregular, de elevación umbonada y un margen lobulado. Los tratamientos control presentaron un 28.56% de efectividad.

T4: Presentó un 99.9% de efectividad al contaminarse un solo frasco al séptimo día de seguimiento, se identificó la presencia de un hongo de tamaño pequeño de color verde, de consistencia friable y superficie terrosa.

T5: Presentó un 71.4% de efectividad, se contaminaron los tres medios nutritivos en el quinto día por presencia de un hongo de tamaño pequeño de color verde, de consistencia friable y superficie granular.

T6: Presentó un 80.92% de efectividad, se contaminó un frasco en el día cinco y dos frascos al sexto día; se identificó la presencia de un hongo de tamaño pequeño de color amarillo, de consistencia dura, superficie rugosa, y una bacteria de color café con forma filamentosa, con elevación plana y un margen filamentoso.

T7: Presento un 76.16% de efectividad al contaminarse dos frascos en el día cinco y un frasco en el día seis; se identificó un hongo de tamaño mediano de color blanco, de consistencia viscosa y de superficie aterciopelada; también se encontró

una bacteria de color crema con forma circular, con elevación convexa, y margen ondulado.

T8: Presentó un 61.8% de efectividad al contaminarse dos frascos al cuarto día y un frasco al quinto día, se identificó una bacteria de color negro con forma puntiforme, con elevación plana y un margen entero. Se observó una bacteria de color gris con forma rizoide, con elevación elevada y un margen rizado.

T9: Presentó un 66.64% de efectividad al contaminarse un frasco al cuarto día y dos frascos en el quinto día; se identificó un hongo de tamaño pequeño de color verde, de consistencia dura y superficie lisa; también se observó una bacteria de color crema con forma puntiforme, con elevación plana y un margen ondulado.

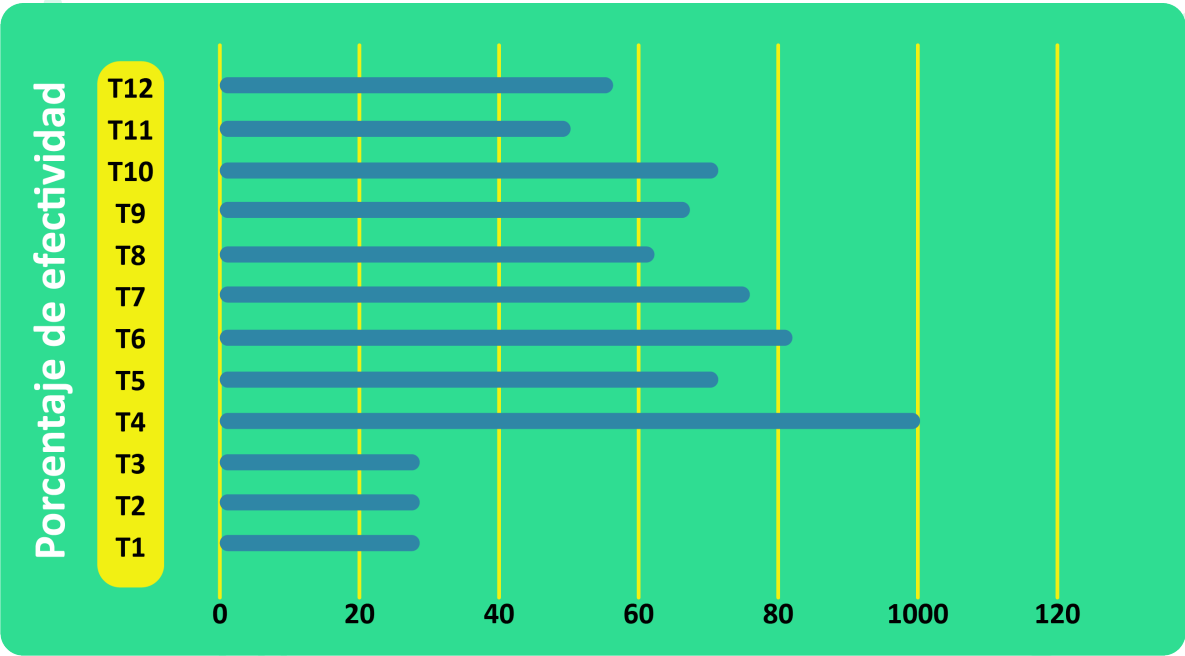
T10: Presentó un 71.4% de efectividad al contaminarse los tres frascos en el quinto día; se identificó un hongo mediano de color blanco, de consistencia friable y superficie algodonosa.

T11: Presentó un 52.36% de efectividad al contaminarse un frasco al tercer día y dos frascos al cuarto día; se identificó un hongo mediano de color verde, de consistencia friable y de superficie algodonosa; también, un hongo mediano de color blanco, de consistencia mantecosa y superficie aterciopelada.

T12: Presentó un 57.12% de efectividad al contaminarse los tres frascos al cuarto día se identificó un hongo de mediano de color verde, de consistencia viscoso y superficie algodonosa; también se observó un hongo pequeño de color blanco, de consistencia friable y superficie algodonosa.

Analizado la efectividad de cada tratamiento, se determinó que el de mayor efectividad es el T4 con un 99.9% de efectividad del NaClO al 5.25% con 10 minutos de inmersión, seguido del T6 con un 80.92% de efectividad del NaClO al 5.25% con 2 minutos de inmersión y el T7 con un 76.16% de efectividad del NaClO al 2.5% con 10 minutos de inmersión. Los tratamientos que presentaron menor efectividad fueron el T11 con un 52.36% de efectividad del NaClO al 1.25% con 5 minutos de inmersión, T12 con un 57.12% de efectividad del NaClO al 1.25% con 2 minutos de inmersión y T8 con un 61.8% de efectividad del NaClO al 2.5% con 5 minutos de inmersión.

Adicional, se logró identificar que al quinto día se presentó mayor contaminación del material sembrado para un total de 12 medios básicos caseros contaminados, correspondiente a los tratamientos T5 al T10, seguido del día cuarto con 8 medios básicos caseros contaminados, correspondiente a los tratamientos T8, T9, T10 y T11.



Grafica 1 Porcentaje de efectividad de los tratamientos durante siete días

Conclusiones

Se logró estandarizar la gelificación del medio nutritivo básico con 22.5 g de gelatina sin sabor/80 ml en condiciones naturales del entorno, sin la necesidad de contar con un área física con condiciones controladas.

El proceso de esterilización mediante el uso de la olla de presión fue exitoso para la destrucción de microorganismos en los medios nutritivos, instrumentos de laboratorio y EPP implementados.

El diseño artesanal de una caja simuladora de flujo laminar, fue un equipo de gran utilidad para el desarrollo de los ensayos realizados.

Debido a la falta de una gramera, se modificó una jeringa de 10 ml, permitiendo el pesaje de las sustancias sólidas, como el azúcar, tiamina y gelatina sin sabor.

Los tratamientos que presentaron mayor efectividad fueron el T4 con un 99.9% de efectividad del NaClO al 5.25% con 10 minutos de inmersión, seguido del T6 con un 80.92% de efectividad del NaClO al 5.25% con 2 minutos de inmersión y el T7 con un 76.16% de efectividad del NaClO al 2.5% con 10 minutos de inmersión.

Los tratamientos que presentaron menor efectividad fueron el T11 con un 52.36% de efectividad del NaClO al 1.25% con 5 minutos de inmersión, T12 con un 57.12% de efectividad del NaClO al 1.25% con 2 minutos de inmersión y T8 con un 61.8% de efectividad del NaClO al 2.5% con 5 minutos de inmersión.

El crecimiento microbiano fue mayor al quinto día, con una contaminación de 12 medios básicos caseros, correspondiente a los tratamientos T5 al T10.

Se recomienda aumentar las concentraciones del NaClO para lograr un mayor porcentaje de efectividad al momento de establecer procesos de desinfección en cultivos in vitro artesanal.

Agradecimientos

Avigail Peña García

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al facilitador e Ing. Biotecnológico William Hernández, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este proyecto de investigación, por el respeto a mis sugerencias e ideas.

Gracias a mi madre Mari García, quien me dio todo su apoyo en este nuevo proceso de mi vida; fue quien me mostró lo hermosa que es la vida y lo justa que puede llegar a ser, si me esfuerzo en ser una mejor persona cada día.

William Hernández

Agradezco a las directivas del Centro Agroindustrial del Meta por permitirme realizar este nuevo proyecto y al equipo de Tecnoacademia Itinerante del Meta, y a los funcionarios de la I.E. Pontón de Río Negro por el apoyo brindado.

Referencias

Aguilera, J. G., Zuffo, A. M., Pozo, R. G., Candó, E. V., Boix, Y. F. (2018) Magnetically treated irrigation water improved the adaptation of *Spathoglottis plicata* produced in vitro.

Arditti, J., & Ernst, R. (1993). *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 pp.

Arditti, J., (1984). *Orchid Biology: Reviews and perspectives* III. Cornell University Press. Ithaca, USA. 432 pp.

Betancur, J., Sarmiento, H., Toro-González, L., & Valencia, J. (2015). Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Colombia, y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Blume, C. L. (2018) *Spathoglottis plicata*". *Flora of China*. Retrieved 2 November 2018.

Blume, C. L. (1825) *Spathoglottis plicata*". *World Checklist of Selected Plant Families (WCSP)*. Royal Botanic Gardens, Kew.

Chávez, K., Mosquera, T., & Otero, J. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. y Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas. *SciELO*, 2.(64), 5. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a4.pdf>.

Griffin, J. J. (1838). Chemical Recreations: A Compendium of Experimental Chemistry, Part 1 (8th edición). Glasgow: Richard Griffin and Co. p.17–21

Jones, D. L. (2006). A complete guide to native orchids of Australia including the island territories. Frenchs Forest, N.S.W.: New Holland. pp. 363–364.

Jones, D.L., Hopley, T.; Duffy, S. M. (2010). Factsheet - *Spathoglottis plicata*". Australian Tropical Rainforest Orchids. Centre for Australian National Biodiversity Research (CANBR), Australian Government. Retrieved 27 May 2021.

Luan V. Q., Thien, N. Q., Khiem, D. V. & Nhut, D. T. (2006) In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. En: Thuy L T, Hau N V (eds) Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture, Nong Lam University, 20-21/10/2006, pp. 175 – 177. Ho Chi Minh City

MAD C (2015) Colombia, país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo | Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. <https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo>.

Mng'omba, S. A., Sileshi, G., du Toit, E. S. & Akinnifesi, F. K. (2012). Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. InTech Open Access Publisher. Fungicides for Plant and Animal Diseases. 13(1): 245-254.

Murashige, T., F. Skoog, (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". Phy. Plant., 15: 473-497.

Olga Patricia, A. L., Francisco, P. F., Alex E, B. P., & Marla Teresa, G. G. (1992). Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca de café. Cenicafé. Avances técnicos. Número 182.

Pérez, L. J. C., & Álvarez, C. C. (2019) ¿Como crecen y se relacionan las orquídeas? Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Luis-Castillo-Perez/publication/335001494_Como_crecen_y_se_relacionan_las_orquideas/links/5d499faf299bf1995b6a7b26/Como-crecen-y-se-relacionan-las-orquideas.pdf

Pérez-Martínez, B., Pacheco R (2005) Germinación in vitro de *Masdevallia ignea* Rchb.f (Orchidaceae) a partir del cultivo de semillas provenientes de diferentes tipos de polinización. Revista Pérez Arbelaezia 16:45-55.

Pierik, R.L.M. (1990). "Cultivo in vitro de las plantas superiores". Mundi Prensa, pp.301. Madrid.

Restrepo. C., Correa. A. (2016). Protocolo metodologías de cultivo in vitro de plantas, curso técnico de biotecnología moderna aplicada al desarrollo de la agricultura. Universidad EAFIT. 1 – 11 p.

Rojas, T. (2011) Concepto y Practica de Microbiología General Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Stubblefield, J. M., Newsome, A. L. & Cahoon, A. B. (2015). Surface decontamination of plant tissue explants with chlorine dioxide gas. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 51(2): 214-219.

Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T. Kahramanogullari C. & Tuna, E. (2012). The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and in vitro regeneration capacity of the Tissue. The Natural Products Journal. 2(4): 328-331.