



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA DE FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL**

**DESARROLLO *in vitro* DE MICROPLANTAS DE *Oncidium tigrinum* Y  
*Laelia autumnalis* ILUMINADAS CON DIODOS EMISORES DE LUZ  
(LEDs)**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**MARTHA MIRIAM MURILLO TALAVERA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TUTORA**

**MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS  
DOCTORA EN CIENCIAS EN FISIOLOGÍA VEGETAL**

**URUAPAN, MICHOACÁN. FEBRERO 2016**



## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>I. RESUMEN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>II. SUMMARY.....</b>	<b>4</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL.....</b>	<b>12</b>
4.1 Generalidades de <i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i> .....	12
4.1.1 <i>Oncidium tigrinum</i> .....	12
4.1.2 <i>Laelia autumnalis</i> .....	13
4.2 Micropropagación.....	15
4.3 Condiciones de incubación.....	16
4.4 Luz tubular fluorescente (LTFs).....	17
4.5 Diodos emisores de luz (LEDs).....	17
4.6 Iluminación LED en tejidos <i>in vitro</i> .....	20
4.7 Tipos de foto-receptor y otras moléculas que absorben la energía lumínica.....	22
4.7.1 Clorofilas.....	24

4.7.2 Carotenoides.....	25
4.7.3 Criptocromos.....	25
4.7.4 Fitocromos.....	26
4.8 Instrumentos de medición de la luz.....	26
<b>V. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO I. GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i></b>	
<b>BAJO DIFERENTE CALIDAD DE LUZ LED</b>	
RESUMEN.....	36
SUMMARY.....	37
I. INTRODUCCIÓN.....	38
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.1 Material vegetal.....	40
2.2 Medio de cultivo.....	40
2.3 Establecimiento del experimento.....	40
2.4 Tratamientos evaluados y diseño experimental.....	41
2.5 Etapas de germinación de las semillas.....	42
2.6 Variables evaluadas.....	43

2.7 Análisis de datos.....	43
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.1 Imbibición de las semillas.....	44
3.2 Diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares.....	44
IV. CONCLUSIONES.....	53
V. BIBLIOGRAFÍA.....	54
 <b>CAPÍTULO II. CALIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO <i>in vitro</i> DE <i>Oncidium tigrinum</i> Y <i>Laelia autumnalis</i> (ORCHIDACEAE)</b>	
RESUMEN.....	58
SUMMARY.....	59
I. INTRODUCCIÓN.....	60
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
2.1 Material vegetal.....	62
2.2 Medio de cultivo.....	62
2.3 Establecimiento del experimento.....	62
2.4 Diseño experimental y tratamientos.....	63
2.5 Variables evaluadas.....	64

2.6 Análisis de datos.....	65
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
3.1 Desarrollo de <i>Oncidium tigrinum</i> .....	66
3.2 Desarrollo de <i>Laelia autumnalis</i> .....	70
IV. CONCLUSIONES.....	76
V. BIBLIOGRAFÍA.....	77
<b>CAPÍTULO III. INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LA GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE</b>	
<b><i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i></b>	
RESUMEN.....	81
SUMMARY.....	82
I. INTRODUCCIÓN.....	83
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
2.1 Material vegetal.....	85
2.2 Medio de cultivo.....	85
2.3 Establecimiento del experimento.....	85
2.4 Tratamientos evaluados y diseño experimental.....	85
2.5 Etapas de germinación de semillas.....	86

2.6 Variables evaluadas.....	87
2.7 Análisis de datos.....	87
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
3.1 Efecto de la intensidad de la luz en la germinación de semillas de <i>Oncidium tigrinum</i> .....	89
3.1.1 Imbibición de las semillas.....	89
3.1.2 Diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares.....	89
3.2 Efecto de la intensidad de la luz en la germinación de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> .....	92
3.2.1 Imbibición de las semillas.....	92
3.2.2 Diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares.....	93
IV. CONCLUSIONES.....	97
V. BIBLIOGRAFÍA.....	98
 <b>CAPÍTULO IV. INTENSIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO <i>in vitro</i> DE PLÁNTULAS DE <i>Oncidium tigrinum</i> Y <i>Laelia autumnalis</i></b>	
RESUMEN.....	103
SUMMARY.....	104

I. INTRODUCCIÓN.....	105
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
2.1 Material vegetal.....	107
2.2 Medio de cultivo.....	107
2.3 Establecimiento del experimento.....	107
2.4 Diseño experimental y tratamientos.....	107
2.5 Variables evaluadas.....	108
2.6 Análisis de datos.....	109
III. RESULTADOS.....	110
3.1 En <i>Oncidium tigrinum</i> .....	110
3.2 En <i>Laelia autumnalis</i> .....	113
IV. CONCLUSIONES.....	117
V. BIBLIOGRAFIA.....	118
<b>IV. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>122</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### II. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

<b>Cuadro 1.</b> Efectos de diferentes longitudes de onda sobre el desarrollo <i>in vitro</i> de orquídeas.....	20
<b>Cuadro 2.</b> Efectos de diferentes longitudes de onda sobre el desarrollo <i>in vitro</i> de diferentes cultivos.....	21
<b>Cuadro 3.</b> Longitudes de onda de los diferentes colores del espectro y su receptor en las plantas.....	23

### CAPÍTULO I. GERMINACIÓN *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*

#### BAJO DIFERENTE CALIDAD DE LUZ LED

<b>Cuadro 1.</b> Lista de tratamientos para evaluar el efecto de la calidad de luz LED en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i> .....	41
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de la calidad de luz en la velocidad, días a final y periodo de diferenciación de protocormos de <i>Oncidium tigrinum</i> .....	46
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de la calidad de luz en los días al inicio, al final y en el periodo de formación de primordios foliares de <i>Oncidium tigrinum</i> .....	48
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de la calidad de luz en los días al inicio, al final y el tiempo empleado (periodo) en la diferenciación de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i> .....	49
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de la calidad de luz en los días al final de formación de primordios foliares y su duración (periodo) en <i>Laelia autumnalis</i> .....	52

**CAPÍTULO II. CALIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE)**

<b>Cuadro 1.</b> Lista de tratamientos para evaluar el efecto de la calidad de la luz LED en el desarrollo <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i> .....	63
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de diferente calidad de luz en la longitud de plántula y de raíz, número de raíces y porcentaje de materia seca de plántulas de <i>O. tigrinum in vitro</i> .....	67
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de diferente calidad de luz en la acumulación de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y total de plántulas <i>in vitro</i> de <i>L. autumnalis</i> .....	74

**CAPÍTULO III. INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis***

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto de la intensidad de la luz, en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i> .....	86
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de la intensidad de luz en la formación de primordios foliares de semillas de <i>Oncidium tigrinum</i> y el tiempo requerido para lograrlo.....	92
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de la intensidad de luz en el tiempo requerido en la diferenciación de protocormos de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> .....	94
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de la intensidad de luz en el tiempo requerido en la formación de primordios foliares de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> .....	96

**CAPÍTULO IV INTENSIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO *in vitro* DE PLÁNTULAS DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis***

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto de la intensidad de la luz	
---	--

en el desarrollo <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> y <i>Laelia autumnalis</i> .....	108
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de la intensidad de luz LED blanca en la acumulación de clorofilas y porcentaje de materia seca de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> .....	113
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el peso fresco y la acumulación de clorofila <i>a, b</i> y total de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> .....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

### REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

<b>Figura 1.</b> Orquídea <i>Oncidium tigrinum</i> dentro del área de distribución natural.....	13
<b>Figura 2.</b> Orquídea <i>Laelia autumnalis</i> en un ambiente natural. Cortesía de Fidel Carrillo Quiroz.....	14
<b>Figura 3.</b> Longitudes de onda emitidas por diferentes fuentes de iluminación (A) y pigmentos de plantas que las absorben (B).....	24
<b>Figura 4.</b> Propiedades foto-reversibles del fitocromo.....	26

### CAPÍTULO I. GERMINACIÓN *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*

#### BAJO DIFERENTE CALIDAD DE LUZ LED

<b>Figura 1.</b> Características de las longitudes de onda emitidas por focos LED (azul, rojo y blanco) y lámpara fluorescente, medidas con un espectro radiómetro de marca “Advanced Spectral Device”.....	41
<b>Figura 2.</b> Etapas de germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de semillas de orquídeas. Imbibición (A), diferenciación de protocormo (B) y formación de primordio foliar (C).....	42
<b>Figura 3.</b> Cinética de diferenciación de protocormos (A) y formación de primordios foliares (B) de <i>Oncidium tigrinum</i> bajo diferente calidad de iluminación. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).....	45
<b>Figura 4.</b> Efecto de la calidad de luz en la velocidad (A) y porcentaje máximo (B) de formación de primordios foliares de <i>Oncidium tigrinum</i> . T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2	

(LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 47

**Figura 5.** Cinética de diferenciación de protocormos (A) y formación de primordios foliares (B) en *Laelia autumnalis* bajo diferente calidad de iluminación. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 48

**Figura 6.** Efecto de la calidad de luz en el porcentaje máximo (A) y la velocidad (B) de diferenciación de protocormos de *Laelia autumnalis*. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 50

**Figura 7.** Efecto de la calidad de luz en el porcentaje máximo (A) y velocidad (B) de formación de primordios foliares de *Laelia autumnalis*. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 51

## **CAPÍTULO II. CALIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE)**

**Figura 1.** Características de las longitudes de onda emitidas por focos LED (azul, rojo y blanco) y lámpara fluorescente, medidas con un espectro radiómetro de marca “Advanced Spectral Device”..... 63

**Figura 2.** Plántulas *in vitro* de *Oncidium tigrinum* irradiadas durante 30 días con diferentes combinaciones de luz: T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente)..... 66

<b>Figura 3.</b> Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en la incidencia de plántulas blancas (A) y necróticas (B) de <i>Oncidium tigrinum</i> cultivadas <i>in vitro</i> . DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, $p \leq 0.05$ ).....	69
<b>Figura 4.</b> Plántulas <i>in vitro</i> de <i>Laelia autumnalis</i> irradiadas durante 90 días con diferentes combinaciones de luz: T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente).....	70
<b>Figura 5.</b> Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en la longitud (A) y número de hojas por plántula (B) de <i>L. autumnalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> . DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).....	71
<b>Figura 6.</b> Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en el peso fresco (A) y materia seca (B) de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Laelia autumnalis</i> . DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, $p \leq 0.05$ ).....	72
<b>Figura 7.</b> Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en la longitud (A) y número de raíces (B) de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Laelia autumnalis</i> . DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, $p \leq 0.05$ ).....	75

### **CAPÍTULO III. INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis***

**Figura 1.** Etapas de germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas.

Imbibición (A), diferenciación de protocormo (B) y formación de primordio foliar (C)..... 86

**Figura 2.** Cinética de germinación de semillas de *Oncidium tigrinum* cultivadas *in vitro* bajo diferente intensidad de luz LED blanca. A) Diferenciación de protocormos B) Formación de primordios foliares. LTF=Luz blanca fluorescente (testigo). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 90

**Figura 3.** Cinética de diferenciación de protocormos de semillas de *Laelia autumnalis* cultivadas *in vitro* bajo diferente intensidad de luz LED blanca. LTF=Luz blanca fluorescente (testigo). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 94

**Figura 4.** Cinética de formación de primordios foliares de semillas de *Laelia autumnalis* cultivadas *in vitro* bajo diferente intensidad de luz LED blanca. LTF=Luz blanca fluorescente (testigo). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 96

#### CAPÍTULO IV. INTENSIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO *in vitro* DE PLÁNTULAS DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis*

**Figura 1.** Plántulas de *Oncidium tigrinum* iluminadas durante 90 días con cuatro tratamientos de luz: T1 (LED blanca a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T2 (LED blanca a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T3 (LED blanca a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y T4 (Fluorescente blanca a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )..... 110

**Figura 2.** Efecto de la intensidad de luz LED blanca en la longitud de plántula (A) y de raíz (B) de *Oncidium tigrinum*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 111

**Figura 3.** Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el número de raíces (A) y hojas (B) de plántulas de *Oncidium tigrinum*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05)..... 111

<b>Figura 4.</b> Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el peso fresco de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> . LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).....	112
<b>Figura 5.</b> Plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> iluminadas durante 90 días con cuatro tratamientos de luz: T1 (LED blanca a $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T2 (LED blanca a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T3 (LED blanca a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y T4 (Fluorescente blanca a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	114
<b>Figura 6.</b> Efecto de la intensidad de luz LED blanca en la longitud (A) y número de hojas (B) de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> . LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).....	115
<b>Figura 7.</b> Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el número de raíces (A) y su longitud (B) en plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> . LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).....	115

## I. RESUMEN GENERAL

El objetivo de esta investigación fue evaluar, mediante cuatro experimentos, la influencia de diferentes colores e intensidades de iluminación LED, comparada con luz fluorescente, sobre la germinación asimbiótica de semillas y el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. En todos los experimentos se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con tiamina (0.4 mg L<sup>-1</sup>), inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), agar (6 g L<sup>-1</sup>) a pH 5.7, sin fitohormonas.

Para el primer experimento se recolectaron cápsulas de las dos especies de orquídeas, de las cuales se obtuvieron las semillas que se desinfectaron y se establecieron en cajas Petri con 10 mL de medio de cultivo. Éstas, se incubaron en cajas de madera con cinco tratamientos de luz: LEDs rojos y azules en proporción 3:1 (1), 2:2 (2) y 1:3 (3), LEDs blancos (4) y luz blanca fluorescente (5). El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con seis repeticiones y la unidad experimental consistió de 1 cm<sup>2</sup> de área de la caja Petri con semillas. Se evaluaron los días al inicio y al final, así como el periodo, la velocidad y el porcentaje máximo alcanzado de imbibición, diferenciación de protocormos (rompimiento de la testa y embrión color verde) y formación de primordios foliares. En este y en los demás experimentos se realizaron análisis de varianza y las pruebas de medias correspondientes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Los resultados indicaron que la luz blanca, tanto LED como fluorescente, fue más eficiente y rápida para la diferenciación de protocormos y la formación de primordios foliares (93-100 %); por ello, se asume que los LEDs blancos son una alternativa eficaz para la germinación asimbiótica *in vitro* de *O. tigrinum* y *L. autumnalis*.

En el segundo experimento se cultivaron plántulas de tres meses de edad, provenientes de cultivo *in vitro*, en frascos de vidrio con el medio MS y se incubaron en cajas de madera con los cinco tratamientos ya descritos en el experimento 1. También se utilizó el diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones, pero en este caso la unidad experimental consistió de un frasco con 30 plántulas. Se evaluaron la longitud de plántulas y de raíces (cm), el número de hojas, de raíces y de pseudobulbos, materia fresca (mg/plántula) y seca (%), además del contenido de clorofila *a*, *b* y total ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Los resultados mostraron que la iluminación con LEDs blancos fue más eficiente en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *L. autumnalis* al obtener el doble o más de clorofila *a*, *b* y total, y hasta 2 % más de biomasa en comparación con los demás tratamientos. En *O. tigrinum* la luz LED blanca indujo el desarrollo de plantas vigorosas, de color verde intenso y sin daño por fotooxidación. Así se confirma una vez más que los LEDs blancos son una alternativa eficaz para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas de *O. tigrinum* y *L. autumnalis*.

En el tercer experimento se incubaron semillas de las dos especies de orquídea en cuatro tratamientos de luz: tres con LED blanca de diferente intensidad ( $15$ ,  $30$  y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) más un testigo con luz fluorescente blanca ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las demás especificaciones experimentales así como las variables evaluadas fueron similares a las del experimento 1. Los resultados muestran que durante la imbibición y diferenciación de protocormos *O. tigrinum* es insensible a los tratamientos de luz; pero durante la formación de primordios foliares  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz LED favorecen este proceso (88.33 %). *L. autumnalis* también resultó insensible a los tratamientos durante la imbibición; sin embargo, la diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares se incrementó significativamente con  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz LED. Estos

resultados indican que la luz LED blanca de intensidad baja proporciona condiciones favorables para la germinación *in vitro* de semillas de *O. tigrinum* y *L. autumnalis*.

En el cuarto experimento se establecieron plántulas procedentes de cultivo *in vitro* en frascos de vidrio y se incubaron con los mismos tratamientos de luz indicados en el experimento anterior. Las otras especificaciones experimentales así como las variables evaluadas fueron similares a la del experimento 2. Los resultados indicaron que *O. tigrinum* se desarrolla favorablemente con  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz LED blanca, que induce mayor longitud y número de hojas y raíces, así como alta acumulación de pigmentos fotosintéticos y biomasa. En *L. autumnalis*  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz LED blanca inducen mayor número y tamaño de raíces; así como los más altos contenidos de clorofila *a*, *b* y total. En ambas especies,  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz LED blanca promovieron la generación de hojas y la longitud de plántula. Por lo tanto, el uso de luz LED es altamente eficiente como fuente alternativa de iluminación para el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

Palabras clave: Calidad de luz, desarrollo de plántulas, germinación asimbiótica, intensidad de luz, LEDs

## II. SUMMARY

The objective of this research was to evaluate, through four experiments, the influence of different colors and intensities of LED lighting, compared with fluorescent light on asymbiotic germination of seeds and the *in vitro* development of plantlets of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*, in all experiments we use the culture medium Murashige and Skoog (MS) supplemented with thiamine ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sucrose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) at pH 5.7, without phytohormones.

For the first experiment were collected capsules of the two species of orchids, of which we obtained the seeds that were disinfested and were established in Petri dishes with 10 mL of culture medium. These were incubated in wooden boxes with five treatments of light: red LEDs and blue in proportion 3:1 (1), 2:2 (2) and 1:3 (3), white LEDs (4) and white fluorescent light (5). The experimental design used was the completely randomized with six replications and the experimental unit consisted of  $1 \text{ cm}^2$  of the Petri dish with seeds. We evaluated the days at the beginning and at the end, as well as the period, the speed and the maximum percentage reached of imbibition, differentiation of protocorms (breaking of the testa and embryo color green), and formation of leaf primordial. In this and in other experiments we performed analyses of variance and means tests (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). The results indicated that white light, both LED as well as fluorescent, was faster and more efficient for the differentiation of protocorms and the formation of leaf primordial (93-100%).

In the second experiment were cultured seedlings of three months of age, cultured *in vitro*, in glass jars with MS medium and incubated in wooden boxes with the five treatments as describe in experiment 1. We also used the experimental design completely randomized with six repetitions, but in this case the experimental unit consisted of a flask with 30 seedlings. We

evaluated the length of seedlings and roots (cm), number of leaves, roots and pseudobulbs, cool stuff (mg/seedling) and dry (%), in addition to the content of chlorophyll *a*, *b* and total ((mg g<sup>-1</sup>). The results showed that the illumination with white LEDs was more efficient in the *in vitro* development of seedlings of *L. autumnalis* to get double or more of chlorophyll *a*, *b* and total, and up to 2% more biomass in comparison with the other treatments. In *O. tigrinum* is the white LED light induced the development of plants vigorous, of intense green color and without damage by photooxidation. This confirms once more that the white LEDs are an effective alternative to the growth and development of *in vitro* seedlings of *O. tigrinum* and *L. autumnalis*.

In the third experiment we incubated seeds of the two species of orchid in the four light treatments: three with LED white of different intensity (15, 30 and 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) over a witness with white fluorescent light (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). The other specifications of experimental as well as the evaluated variables were similar to those of experiment 1. The results show that during the imbibition and differentiation of protocorms *O. tigrinum* is insensitive to the light treatments; but during the formation of leaf primordia 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  LED light favor this process (88.33%). *L. autumnalis* was also insensitive to the treatments during imbibition; however, the differentiation of protocorms and formation of leaf primordia was significantly increased with 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  LED light. These results indicate that the white LED light intensity low provides favorable conditions for the germination *in vitro* of seeds of *O. tigrinum* and *L. autumnalis*.

In the fourth experiment was established with seedlings from *in vitro* culture glass jars and were incubated with the same light treatments as indicated in the previous experiment 2. The results indicated that *O. tigrinum* develops favorably with 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of white LED light, which induces increased length and number of leaves and roots, as well as high accumulation of photosynthetic pigments and biomass. In *L. autumnalis* 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of white LED light

induce a greater number and size of roots; as well as the highest contents of chlorophyll *a*, *b* and total. In both species,  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of white LED light promoted the generation of leaves and the length of seedling. Therefore, the use of LED light is highly efficient as an alternative source of lighting for the *in vitro* development of plantlets of *O. tigrinum* and *L. autumnalis*.

Key words: Asymbiotic germination, development of plantlets, LEDs, light intensity, light quality.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* ampliamente distribuidas en México tienen un valor comercial alto (Szeszko, 2011). La belleza de sus flores las hacen muy atractivas, por lo que las poblaciones silvestres son objeto de extracción de ejemplares de manera ilegal para satisfacer la demanda de los mercados; lo anterior aunado a la destrucción de su hábitat por deforestación y al cambio de uso de suelo, son las principales causas de la disminución de las poblaciones silvestres de estas especies de orquídeas (Lee *et al.*, 2007; Mengxi *et al.*, 2011).

La germinación es afectada por factores internos y externos; los internos se relacionan con la latencia y longevidad; los externos están directamente relacionados a las condiciones del ambiente (Gomes *et al.*, 2009); además en el caso específico de las orquídeas, para su germinación de forma natural necesitan de la asociación simbiótica con un hongo. Dentro de los factores externos, la intensidad de luz es uno de los factores más importantes, no solo como fuente energética, sino como regulador de procesos fisiológicos en los vegetales (Pimentel *et al.*, 2007). Los vegetales poseen mecanismos fotoselectivos sofisticados para capturar la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis (400 a 700 nm). La luz azul es absorbida por los criptocromos, la luz roja por los fitocromos (Schäfer y Nagy, 2006) y se ha reportado la presencia de un compuesto a base de zeaxantina como receptor de luz verde (Casierra-Posada *et al.*, 2011).

Para la fijación de carbono, las plantas utilizan la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que está en el intervalo de 400 a 700 nm (Huertas, 2008) y corresponde a los espectros azul y rojo que son absorbidos por los vegetales. La combinación del resto de espectros es reflejada y genera en su conjunto una tonalidad que les da a éstos el color verde.

La micropropagación vegetal es una técnica viable utilizada en la reproducción masiva de cultivos de importancia económica y preservación de especies en vías de extinción o difíciles de propagar por otros métodos, como es el caso de las orquídeas de los géneros *Laelia* y *Oncidium* (Lee *et al.*, 2007; Mengxi *et al.*, 2011)

En el laboratorio de micropropagación comercial, el control de las condiciones físico-químicas, nutricionales y de ambiente (temperatura, humedad y luz) son factores críticos, ya que determinan el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Mejorar la calidad e intensidad de la luz, afecta el crecimiento y el desarrollo de las plantas, al provocar cambios fisiológicos y anatómicos para adaptarse a las condiciones del ambiente; además, al reducir los carbohidratos del medio de cultivo y mantener un intercambio de gases efectivo se promueve el desarrollo del aparato fotosintético de las plantas y se reduce la tasa de contaminantes en la micropropagación de plantas (Damon *et al.*, 2004; Loberant y Altman, 2010).

Las lámparas tubulares fluorescentes son la fuente de luz tradicional usada en el cultivo *in vitro*, aunque proporcionan luz para la fotosíntesis tienen un elevado costo energético ya que también proveen de longitudes de onda innecesarias para las plantas y los efectos fisiológicos en los vegetales son menos específicos (Kurilcik *et al.*, 2008). Además, su uso en un laboratorio de cultivo de tejidos representa el 65% del total del costo (Ruey-Chi y Wei, 2004). Esto hace necesario encontrar fuentes alternativas de energía y formas de iluminar los cultivos más eficientes (Loberant y Altman, 2010).

Los diodos emisores de luz (LEDs) tienen un elevado potencial para ser utilizados como fuente de luz en la micropropagación (Gomes *et al.*, 2010). Sus ventajas son la conversión eficiente de energía, volumen pequeño, vida más larga, longitud de onda específica que elimina las longitudes de onda que son inactivas para la fotosíntesis, intensidad/calidad de luz ajustable y

bajas emisiones térmicas (Ming-Chang *et al.*, 2007); además su costo de mantenimiento es bajo y protege el medio ambiente al reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> (Young *et al.*, 2010).

Generalmente se asocia la luz LED azul como inductora de la diferenciación en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas como *Dendrobium officinale* (Lin *et al.*, 2011); mientras que la luz LED roja induce mayor germinación y formación de primordios foliares a partir de semillas de *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011) y de *Cymbidium* (Huan y Tanaka, 2004; Hamada *et al.*, 2011).

El efecto de la luz LED ha sido investigado en la organogénesis de cultivos *in vitro* de orquídeas de los géneros *Dendrobium*, *Cymbidium* y *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011). LEDs azules promueven el desarrollo y diferenciación de protocormos (PLBs) en *Dendrobium officinale in vitro*, además incrementa la producción de clorofila y materia seca; mientras que LEDs rojos aumentan el diámetro y peso seco de los PLBs (Lin *et al.*, 2011). Bajo LEDs rojos y azules se ha reportado un incremento en el crecimiento y desarrollo de los PLBs *in vitro* de plantas de *Spathiphyllum* (Tan *et al.*, 2005), además de promover la proliferación y el contenido de carbohidratos de los PLBs de *Oncidium in vitro* y mayor crecimiento de las plantas, mientras que el espectro azul promovió la diferenciación, acumulación de proteínas, pigmentos, actividad enzimática y desarrollo de los PLBs (Mengxi *et al.*, 2011).

Existe muy poca información disponible acerca del efecto del espectro azul sobre el metabolismo de plantas superiores. Frecuentemente se le relaciona con crecimiento vigoroso, diferenciación y altos contenidos de clorofila/carotenoides en plantas *in vitro* (Lin *et al.*, 2011; Mengxi *et al.*, 2011).

Se desconoce el efecto de la calidad e intensidad de luz LED óptima para el desarrollo *in vitro* de semillas y plántulas de *Laelia autumnalis* y falta información acerca de los efectos provocados

en *Oncidium tigrinum*; por lo que se hace necesario evaluar su influencia sobre el desarrollo *in vitro* de estas orquídeas para encontrar formas eficaces y menos contaminantes para la reproducción de las mismas.

Esta investigación consta de cuatro capítulos donde se estudió el efecto de la iluminación sobre la micropropagación *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. Se probaron diferentes calidades de luz LED sobre la germinación de semillas (capítulo 1) y en el desarrollo *in vitro* de plántulas (capítulo 2) de *O. tigrinum* y *L. autumnalis*; además, se determinó la intensidad de luz LED blanca más favorable para la germinación de semillas (capítulo 3) y sobre el desarrollo *in vitro* de plántulas (capítulo 4) de las mismas especies.

### **1.1 Objetivo General**

Determinar el efecto de la luz irradiada por diodos emisores de luz (LEDs) en la germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, comparada con la luz emitida por lámparas tubulares fluorescentes.

### **1.2 Objetivos específicos**

1. Establecer la calidad de luz favorable para la imbibición, diferenciación de protocormos y formación *in vitro* de primordios foliares, a partir de semillas de las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

2. Especificar la calidad de luz idónea para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas de las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

3. Definir la intensidad de luz LED apropiada para la imbibición, diferenciación de protocormos y formación *in vitro* de primordios foliares, a partir de semillas de las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

4. Precisar la intensidad de luz LED conveniente para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas de las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

### **1.3 Hipótesis**

La calidad e intensidad de la luz irradiada por diodos emisores durante el cultivo *in vitro* resultará en cambios significativos en la germinación, formación de protocormos y desarrollo de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, respecto a la luz emitida por las lámparas tubulares fluorescentes tradicionales.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

### 4.1 Generalidades de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*

México cuenta con una gran variedad de orquídeas con flores muy atractivas, distribuidas a lo largo y ancho del territorio. *Oncidium* y *Laelia* son géneros de orquídeas que enfrentan una disminución en sus poblaciones, debido principalmente a la extracción ilegal de ejemplares, a la destrucción de su hábitat por desastres naturales y al cambio de uso de suelo (Szeszko, 2011).

**4.1.1 *Oncidium tigrinum*.** Del griego *ogkidion*, en referencia a las verrugosidades o tubérculos que tienen las especies del género en el callo del labio; del latín *tigrinum*, rayado como un tigre en referencia a la coloración de los tépalos de las flores que se asemeja a las rayas de un tigre (Szeszko, 2011).

Pertenece a la división Magnoliophyta, de la clase Liliopsida, orden Asparagales, familia Orchidaceae, género *Oncidium* y especie *tigrinum* (Jiménez *et al.*, 1998). Es una especie epífita que llega a medir hasta 40 cm. Sus pseudobulbos, agrupados, elipsoides a ovoides, lateralmente aplanados y de verdes a verde-amarillentos. Con dos a tres hojas terminales, lanceoladas a elípticas y dos vainas basales dísticas. La inflorescencia es una panícula de 60 a 100 cm, poco ramificada, erecta a arqueada, que emerge de la parte basal del pseudobulbo entre las vainas que lo cubren; lleva de 5 a 25 flores grandes y vistosas, de 4 a 7 cm de diámetro. El labio es trilobado con el lóbulo medio mucho mayor que los lóbulos laterales; con un callo carnoso que tiene tres dientes en la parte distal (Szeszko, 2011; Jiménez *et al.*, 1998).

Sus poblaciones son pequeñas y crece en bosques de encino y pino-encino, en donde los árboles están espaciados, en altitudes de 2000 a 2350 m. Prefiere colonizar en lugares con alta intensidad

lumínica e incluso puede desarrollarse a pleno sol. Florece al terminar las lluvias, entre octubre y diciembre, por lo que le conocen como flor de muertos (Szeszko, 2011).

Existen muy pocos registros históricos de herbario para esta especie. Su rareza y la colecta inmoderada que sufre hoy en día, han ocasionado que sus poblaciones sean seriamente afectadas. En consecuencia, *Oncidium tigrinum* está incluida en la NOM-059-SEMARNAT-2001 como una especie “amenazada” (Figura 1) (Szeszko, 2011).



**Figura 1. Orquídea *Oncidium tigrinum* dentro del área de distribución natural.**

**4.1.2 *Laelia autumnalis*.** Debe su nombre a la virgen Laelia del templo de Vesta en la mitología romana; *autumnalis* del latín, que quiere decir otoño, en referencia a su época de floración (Szeszko, 2011).

Pertenece a la división Magnoliophyta, de la clase Liliopsida, orden Asparagales, familia Orchidaceae, género *Laelia* y especie *autumnalis* (Jiménez *et al.*, 1998). Puede ser tanto litófito como epífita, en bosques templados de pino o pino-encino ubicados de 1800 a 2300 msnm;

aunque puede crecer directamente sobre rocas y acantilados, expuesta al sol y a fuertes vientos, es más común encontrarla sobre los árboles. Son plantas que pueden medir más de 1 m de altura. Sus pseudobulbos son de fusiformes a ovoides, y compuestos de varios entrenudos. Posee de dos a tres hojas terminales oblongo-lanceoladas muy coriáceas, de color verde oscuro cuando las plantas se desarrollan bajo sombra, y con pigmentaciones de rojo a morado si están expuestas a pleno sol. Las inflorescencias miden de 50 a 100 cm y producen de 4 a 12 flores de color rosa pálido o lila (Jiménez *et al.*, 1998; Szeszko, 2011).

La especie es bastante común, se le conoce como Catarina, plátano del encino o flor de muertos, gracias a su época de floración que es de septiembre a noviembre (Figura 2) (Szeszko, 2011).



**Figura 2. Orquídea *Laelia autumnalis* en un ambiente natural. Cortesía de Fidel Carrillo Quiroz.**

## 4.2 Micropropagación

El impacto del cambio climático, el uso cotidiano de agroquímicos, fuertes tormentas, inundaciones, plagas y enfermedades representan grandes amenazas para la agricultura, por esto cada vez aumenta más la agricultura protegida; estos cultivos en ocasiones requieren de iluminación adicional para lograr una buena producción (Yeh y Jen-Ping, 2009).

Las técnicas de cultivo de tejidos permiten la propagación clonal a gran escala de materiales vegetativos escasos o de reproducción sexual no viable, así como, propagar rápidamente nuevas variedades, obtener material libre de patógenos, generar material para bancos de germoplasma *in vitro*, fusionar protoplastos y producir plantas transgénicas (Loberant y Altman, 2010). La morfogénesis *in vitro* de plantas superiores es controlada por la etapa fisiológica del donador del explante, la nutrición, la interacción entre fitohormonas y factores ambientales, incluida la luz (De Melo *et al.*, 2011).

La micropropagación vegetal es utilizada en cultivos de importancia económica para preservar especies en vías de extinción, multiplicar plantas difíciles de propagar por otros métodos y/o en plantas con crecimiento muy lento, como es el caso de las orquídeas. Gracias al avance de esta tecnología se ha logrado la germinación asimbiótica de semillas *in vitro* y su propagación, actualmente es el primer cultivo florícola exitosamente propagado de forma masiva mediante cultivo de tejidos (Loberant y Altman, 2010; Servín *et al.*, 2013).

La germinación *in vitro* de semillas de orquídea es específica para cada especie y depende de muchos factores como la maduración de la cápsula, componentes del medio de cultivo, la luz y las condiciones de temperatura (Mascia *et al.*, 2007; Servín *et al.*, 2013).

### 4.3 Condiciones de incubación

Las condiciones de temperatura y humedad del laboratorio deben ser monitoreados constantemente. El cuarto de incubación debe tener control de las zonas sanitizadas, temperatura, humedad, flujo y circulación del aire, calidad e intensidad de la luz y fotoperiodo. El microambiente del frasco de crecimiento también debe ser considerado en cuanto a asepsia, temperatura, humedad, nutrición, intensidad y calidad de la luz (Loberant y Altman, 2010).

En el laboratorio de micropropagación comercial, el medio de cultivo, las técnicas de cultivo y las condiciones del ambiente y su control son elementos críticos (Tan *et al.*, 2005; Loberant y Altman, 2010), por controlar el desarrollo de los tejidos vegetales. Entre los factores ambientales, la luz y/o flujo fotónico fotosintético (PPF) es una de las variables más importantes porque controla la organogénesis de plantas *in vitro*, como *Chrysanthemum* (Sun-Ja *et al.*, 2004), *Cymbidium* y *Phalaenopsis* (Hamada *et al.*, 2009) y *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011); por ello en años recientes el estudio de los efectos del espectro (principalmente azul y rojo) de luz en el crecimiento y desarrollo de orquídeas ha despertado gran interés.

La duración, intensidad y calidad de la luz controla la germinación de semillas y el crecimiento y morfología (longitud del tallo, área foliar y peso) de plántulas, funciona en los vegetales como estímulo para la biosíntesis de componentes celulares y expresión genética a través del ciclo de vida de una planta (Bornwaber y Tantau, 2012; Nahar *et al.*, 2012). El desarrollo y número de horas de actividad de una planta depende de la duración (fotoperiodo), calidad e intensidad de luz que ésta recibe. Al mejorar la intensidad y calidad de la luz (longitud de onda) se obtiene mayor desarrollo de plantas, sobre todo cuando son iluminadas (irradiadas) con fotones de las regiones roja y azul del espectro (Raj *et al.*, 2008).

#### **4.4 Luz Tubular Fluorescente (TFLs)**

A la fecha existen muy pocos reportes acerca de la influencia del espectro de luz en *Oncidium* y *Laelia* debido a la dificultad en la modulación de espectro emitido por las LTFs. Algunos de estos reportes son inconsistentes ya que la intensidad de la luz no ha sido uniforme, lo que sugiere que los LEDs son una fuente de luz alternativa atractiva en la fotomorfogénesis de plantas *in vitro* para su propagación a gran escala (Mengxi *et al.*, 2011; Pop y Cachita 2011).

Las lámparas tubulares fluorescentes son la fuente de luz tradicional usada en el cultivo *in vitro*, pero proporcionan luz para fotosíntesis con un elevado costo energético ya que proveen de longitudes de onda innecesarias para las plantas (Seabrook, 2005). Su uso en un laboratorio de cultivo de tejidos representa 65 % del total del costo de la electricidad (Ruey-Chi y Wei, 2004), su espectro de onda bastante ancho (320 a 800 nm) y los efectos fisiológicos en los vegetales son menos específicos (Sun-Ja *et al.*, 2004; Kurilcik *et al.*, 2008), por lo que se hace necesario encontrar fuentes alternativas de energía y formas más eficientes de iluminar los cultivos (Loberant y Altman, 2010).

Antes de que el uso de LEDs estuviera disponible para estudiar los efectos fisiológicos de diferentes longitudes de onda en los tejidos cultivados, se obtenían combinaciones de las lámparas fluorescentes con filtros de poliéster azul y rojo, el rojo lejano se obtenía de lámparas incandescentes con muchos otros filtros de poliéster (Hamada *et al.*, 2011; Werbrouck *et al.*, 2012). La longitud de onda azul y roja siempre coexiste cuando se usa luz solar o TFLs (Ruey-Chi y Wei, 2004).

#### **4.5 Diodos emisores de luz (LEDs)**

Los diodos emisores de luz (LEDs) consisten de un chip de material semiconductor que genera un puente de unión de flujo que se produce por la recombinación de electrones y de iones

positivos bajo la influencia de un campo eléctrico continuo. Los primeros LEDs desarrollados fueron el infrarrojo y el rojo pero los avances en la ciencia de los materiales hicieron posible la producción de longitudes de onda más cortas (verde, naranja y amarillo). Los LEDs estuvieron comercialmente disponibles a finales de los años 60, pero a esa fecha no existía aún el color azul. Fue hasta 1993 que los LEDs azules fueron introducidos, pues su fabricación es complicada debido a su alta energía fotónica y relativamente baja sensibilidad ocular. Los LEDs blancos se logran mediante una combinación de los colores rojo, verde y azul (Fillipo *et al.*, 2010).

Los sistemas de iluminación LED ocupan menos espacio para ser instalados, además ofrecen una mejor resolución con colores más nítidos al poder controlar la luminosidad por zonas. Sin embargo, los costos de su implementación se consideran altos, lo cual a medida que se masifique y exista más demanda se compensará con los beneficios que la tecnología ofrece (Fillipo *et al.*, 2010).

Los LEDs emiten fotones de forma lineal, por lo que esta fuente de luz es ideal para su uso en sistemas de iluminación específicos para aumentar producción de plantas y potenciar características deseadas de algún cultivo específico (Fillipo *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). La eficiencia energética de los LEDs aumenta cuando la distancia entre la iluminación y la superficie iluminada disminuye (Bornwaber y Tantau, 2012).

El primer trabajo en plantas con LEDs como fuente de iluminación fue a mediados de 1980 en *Lactuca sativa*. Ahora los LEDs son continuamente incorporados en investigaciones referentes a la fisiología y fotosíntesis de plantas (Morrow, 2008). Con el uso de los LEDs se ha logrado manejar la composición espectral y ajustar la intensidad para simular los cambios de intensidad del sol que suceden durante un día; además pueden producir altos niveles de iluminación con bajas emisiones de calor (Yeh y Jen-Ping, 2009). Los LEDs permiten a los

investigadores eliminar las longitudes de onda que normalmente se encuentran en la luz blanca (LTF) y generan la posibilidad de tener un verdadero control para el espectro de luz en el futuro, además de eliminar las longitudes de onda que son inactivas para la fotosíntesis y así ahorrar energía con respecto a las lámparas tradicionales (Hemming, 2011).

La Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio, más conocida como NASA (National Aeronautics and Space Administration), ha realizado investigaciones sobre las proporciones de longitudes de onda azul, roja y roja lejana requeridas en el crecimiento de las plantas, como fuente exclusiva de iluminación en el espacio. La calidad espectral de los LEDs puede disminuir la incidencia de patógenos, además al mantener las plantas libres de radiaciones ultra violeta y otras ondas de estímulos menos estudiados se favorece al desarrollo de las mismas (Masa *et al.*, 2008).

Los LEDs prenden y apagan instantáneamente (Yeh y Jen-Ping, 2009) y tienen una longitud de onda específica con un diseño adecuado, por lo que se pueden crear ambientes con luz roja y azul continua o alternada (Ruey-Chi y Wei, 2004), controlar la fotomorfogénesis de plantas y favorecer el crecimiento, acumulación de materia seca, actividad enzimática y generación de raíces (Mengxi *et al.*, 2011).

La calidad de la luz, el fotoperiodo y la posición de las fuentes de luz en cuanto a las superficies fotosintéticas de las plantas ejercen gran efecto en la productividad; al reducir la distancia el impacto de la incidencia de luz es más grande. Los LEDs pueden colocarse mucho más cerca de los tejidos de las plantas (Morrow, 2008; Bornwaber y Tantau, 2012), mientras que lámparas incandescentes o fluorescentes no se puede debido a que causan foto-estrés en los tejidos (Dutta y Jatothu, 2013).

Los LEDs blancos son combinaciones de azul, verde y rojo con un revestimiento de fósforo y por su naturaleza son menos eficientes, esto hace necesario realizar estudios en plantas con esta fuente de luz para probablemente redescubrir la importancia de la luz blanca (Masa *et al.*, 2008).

#### 4.6 Iluminación LED en tejidos *in vitro*

Existen diversas investigaciones del efecto de longitudes de onda específicas en la anatomía, fisiología y habilidad fotosintética de diferentes especies de orquídeas (Cuadro 1) y otros cultivos (Cuadro 2).

**Cuadro 1. Efectos de diferentes longitudes de onda sobre el desarrollo *in vitro* de orquídeas.**

Especie	Color de radiación	Efectos	Cita
<i>Cymbidium</i>	Rojo y azul	Luz azul plantas más largas y mayor contenido de materia seca y pigmentos fotosintéticos	Tanaka <i>et al.</i> (1998)
<i>Cymbidium</i>	Rojo y azul	Máxima formación de PLBs con espectro rojo pero menor concentración de clorofila	Huan y Tanaka (2004)
<i>Cymbidium finlaysonianum</i>	Rojo	Espectro rojo incrementó proliferación de PLBs	Hamada <i>et al.</i> (2009)
<i>Oncidium</i>	Rojo y azul	Rojo induce proliferación de PLBs, mientras que LEDs azules tienen efecto contrario.	Xu <i>et al.</i> (2009)
<i>Dendrobium</i>	Blanco y oscuridad	Oscuridad inhibe formación de raíces, mientras que la luz blanca induce proliferación de brotes y raíces	De Melo <i>et al.</i> (2011)
<i>Bletilla ochracea</i>	Blanco, rojo, azul, verde y naranja	Germinación máxima del 74 % con verde y naranja. Blanco y azul hojas más anchas y delgadas en luz roja	Godo <i>et al.</i> (2011)
<i>Cymbidium</i> y <i>Phalaenopsis</i>	Rojo, azul y amarillo	Rojo y azul incrementan peso fresco y número de PLBs	Hamada <i>et al.</i> (2011)
<i>Paphiopedilum</i>	Blanco, rojo, azul y verde	Luz azul generó las plantas más compactas con menor contenido de clorofila	Lee <i>et al.</i> (2011)
<i>Dendrobium officinale</i>	Rojo y azul	85 % de PLBs en luz azul y la luz roja obtuvo el máximo peso fresco y plántulas etioladas, rojo+azul mayor peso seco	Lin <i>et al.</i> (2011)
<i>Oncidium</i>	Rojo, azul, amarillo y verde	Rojo mayor peso fresco, 96.7% de PLBs y plántulas más altas. Azul alto contenido clorofila <i>a</i> y <i>b</i> .	Mengxi <i>et al.</i> (2011)
<i>Cymbidium</i>	Blanco, rojo, azul y verde	Luz verde indujo máximo porcentaje de PLBs, peso fresco y formación de raíces, mientras que los más bajos porcentajes se obtuvieron en blanco, rojo y azul	Nahar <i>et al.</i> (2012)
<i>Coelogyne breviscapa</i> , <i>Dendrobium aquenum</i> y <i>Flickingeria nodosa</i>	Blanco	<i>C. breviscapa</i> y <i>D. aquenum</i> germinaron a los 60 días de inoculadas, mientras que <i>F. nodosa</i> germinó a los 90 días.	Servín <i>et al.</i> (2013)

PLBs= protocormos, LEDs= diodos emisores de luz

**Cuadro 2. Efectos de diferentes longitudes de onda sobre el desarrollo *in vitro* de diferentes cultivos.**

Especie	Color de radiación	Efectos	Cita
<i>Avena sativa</i>	Azul	Aumenta peso seco y fotosíntesis	Blaauw y Blaauw-Jansen (1970)
<i>Lilium sp</i>	Rojo y azul	Mayor peso seco y fresco con combinación rojo-azul. Rojo monocromático indujo alargamiento	Lian <i>et al.</i> (2002)
<i>Pyrus malus</i>	Rojo, rojo lejano y azul	Rojo y rojo lejano inducen formación de callo, mientras que espectro azul tiene efecto contrario	D'Onofrio y Molini (2004)
<i>Solanum tuberosum</i>	Rojo y azul	Combinación rojo+azul continua máximo crecimiento y alternada menor crecimiento	Ruey-Chi y Wei (2004)
<i>Chrysanthemum</i>	Rojo y azul	Aumenta tasa fotosintética, peso fresco, seco y área foliar	Sun-Ja <i>et al.</i> (2004)
<i>Chrysanthemum</i>	Rojo, rojo lejano y azul	Azul inhibió crecimiento y aumentó peso seco y pigmentos fotosintéticos. Rojo indujo alargamiento	Kurilcik <i>et al.</i> (2008)
<i>Vitis vinifera</i>	Rojo y azul	No hubo diferencias significativas entre tratamientos, aunque la luz roja indujo mayor alargamiento y la azul mayor número de hojas	Raj <i>et al.</i> (2008)
<i>Solanum tuberosum</i>	Blanco, rojo, amarillo, verde y azul	Testigo y LED blanco crecimiento y desarrollo similar, más del doble que la luz roja, amarilla, verde y azul.	Pop y Cachita (2011)
<i>Ficus benjamina</i>	Rojo, rojo lejano y azul	Luz azul indujo mayor número de brotes aunque de menor tamaño., mientras que la luz roja indujo menos brotes de mayor tamaño	Werbrouck <i>et al.</i> (2012)
<i>Jatropha curcas</i>	Rojo y azul	Máxima formación de raíces adventicias.	Daud <i>et al.</i> (2013)

LED= diodo emisor de luz

El efecto de la luz LED sobre las plantas cambia entre especies y la etapa de desarrollo en que se encuentran, por lo que se hace necesario estudiar el efecto de diferentes espectros de luz para cada especie con el propósito de promover o inhibir brotes, raíces, bulbos y controlar floración, entre otros (Sun-Ja *et al.*, 2004; Raj *et al.*, 2008). Las diferencias de las especies a la radiación de luz LED se debe a un efecto sinérgico de los receptores de luz roja y azul (fitocromos y criptocromos) en la inducción o inhibición (Dutta y Jatothu, 2013) de protocormos a partir de semillas o tejidos vegetales y desarrollo de plántulas. Lo que sugiere la necesidad de suplementar la luz LED roja con luz azul para obtener mejor crecimiento de plantas (Morrow, 2008), pues siempre que la luz azul y roja están juntas desde el principio del fotoperiodo dan como resultado

un crecimiento óptimo (Tan *et al.* 2005; Lin *et al.*, 2011). La combinación de LEDs azules y rojos (1:2) promueven significativamente la producción de brotes a partir de protocormos al incrementar el contenido de materia seca en *Dendrobium officinale* (Lin *et al.*, 2011) y en *Chrysanthemum* aumenta la tasa fotosintética, peso fresco, seco y área foliar (Sun-Ja *et al.*, 2004).

La combinación de luz LED azul y roja debe ser continua, pues al investigar su efecto con la alternancia de estos dos espectros las plantas tuvieron menor peso fresco y seco en *S. tuberosum*, lo cual puede ser atribuido al estrés temporal causado cuando la intensidad y calidad de las fluctuaciones de luz cambian repentinamente (Ruey-Chi y Wei, 2004). La tendencia de la luz roja es a inhibir, mientras que la tendencia de la luz azul es a incrementar (Lin *et al.*, 2011), sin embargo, otros estudios indican que al adicionar luz LED azul a la iluminación LED roja, el crecimiento en plantas es aún mejor que bajo condiciones de luz blanca (Nahar *et al.*, 2012). Las plantas de *S. tuberosum* bajo condiciones de luz LED blanca y LTFs presentan un crecimiento y desarrollo similar (Pop y Cachita, 2011).

Otras investigaciones en especies leñosas, *Pyrus malus*, *Chrysanthemum*, *Fragaria* y *Paphiopedilum* han sugerido que la luz roja y roja lejana aumentan el crecimiento de plantas y que el espectro azul tiene efecto contrario (D'Onofrio y Molini, 2004; Sun-Ja *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011). En *Jatropha curcas* los resultados han mostrado que los LEDs son menos eficientes en la generación de raíces que las LTFs (Daud *et al.*, 2013).

#### **4.7 Tipos de foto-receptor y otras moléculas que absorben la energía lumínica**

La biósfera recibe radiación solar comprendida entre los 290 y los 3000 nm de longitud de onda, pero la mayor proporción de energía (45 %) está concentrada entre los 380 y 710 nm, que constituye el intervalo de absorción de clorofilas, carotenoides, fitocromos y criptocromos (Manrique, 2003; Casierra-Posada *et al.*, 2011) (Cuadro 3). Estos foto-receptores captan la luz y

envían señales de traducción que permiten a las plantas responder a los estímulos (Gyula *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2011).

**Cuadro 3. Longitudes de onda de los diferentes colores del espectro y su receptor en las plantas.**

Color	Longitud (nm)	Foto-receptor
Ultravioleta	290 - 380	ADN y ARN
Violeta	380 - 440	Criptocromo y foto-receptor UV
Azul	440 - 495	Criptocromo, fototropina y fotosistemas (clorofila <i>a</i> y <i>b</i> )
Verde	495 - 570	Carotenos y zeaxantina
Amarillo	570 - 595	Carotenos
Naranja	595 - 625	Carotenos, fitocromos y fotosistemas (clorofila <i>a</i> y <i>b</i> )
Rojo	625 - 700	Fitocromos y fotosistemas (clorofila <i>a</i> y <i>b</i> )
Infra-rojo	> 700	Fitocromos

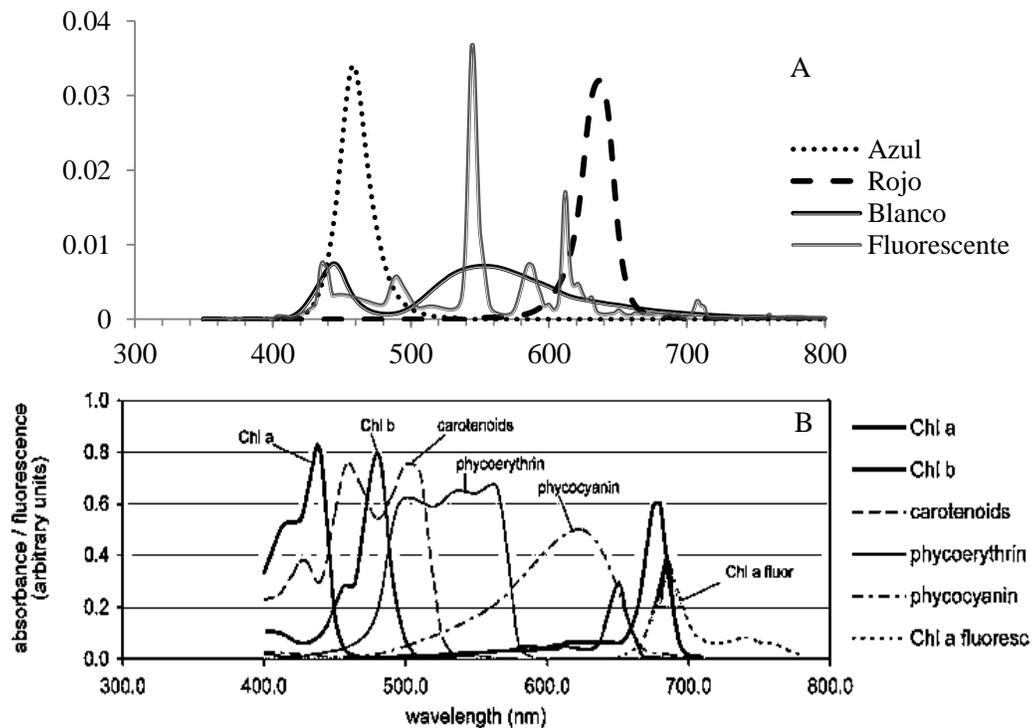
Fuente: Meisel *et al.*, 2011.

La luz es un factor imprescindible para llevar a cabo la serie de procesos fisiológicos indispensables de las plantas, entre los cuales el más importantes es la fotosíntesis (Caldari, 2007); porque convierte la energía de la radiación solar en energía química, para que puede ser usada por todas las formas de vida. Para la fotosíntesis, las plantas utilizan la radiación fotosintéticamente activa (PAR) comprendida entre 400 a 700 nm (Huertas, 2008). Este proceso comprende dos reacciones globales bien diferenciadas; en la primera se realiza la transducción de energía, y en la segunda la reducción y fijación del carbono (Solarte *et al.*, 2010).

Los principales pigmentos responsables de la absorción energética son las clorofilas. Por ello se puede asegurar, sin duda alguna que los pigmentos fotosintéticos son la base de la vida sobre la tierra; sin embargo, existe una gran variedad de pigmentos con función fotorreceptora, que se diferencian por su biogénesis, composición y estructura molecular (Manrique, 2003).

### 4.7 1 Clorofilas

Las clorofilas *a* y *b* son los pigmentos más abundantes en la tierra y deben su color verde a su capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar (Figura 3), mientras que refleja los demás colores cuya mezcla se aprecia en diversos tonos de verde. Su función primordial es absorber energía lumínica, por lo tanto, depende en gran medida de la concentración de clorofila, pero también la cantidad de luz disponible y de la calidad de la misma (Manrique, 2003).



Fuente: Papageorgiou y Govind, 2004

**Figura 3. Longitudes de onda emitidas por diferentes fuentes de iluminación (A) y pigmentos de plantas que las absorben (B).**

Las características de la luz afectan significativamente el contenido de clorofila *a* (*Cl a*), clorofila *b* (*Cl b*) y clorofila total (*Cl a + b*) (Solarte *et al.*, 2010). La intensidad de la luz influye en la fotosíntesis, mientras que el espectro de luz causa diversas respuestas fotomorfogénicas

(Hemming, 2011). El exceso de luz en las plantas afecta directamente al fotosistema II (PSII); en ambientes cálidos las plantas requieren un mayor potencial fotoprotector pero presentan menor de concentración clorofila, para reducir la sobreexcitación (Manrique, 2003).

#### **4.7.2 Carotenoides**

Son pigmentos, accesorios de las plantas superiores (carotenos y xantofilas), de color amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro. La coloración se encuentra directamente relacionada con su estructura: los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación. Mientras el número de enlaces dobles conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Se encuentran asociados a proteínas de membrana, forman parte de los complejos antena junto con las clorofilas, absorben entre 400 y 500 nm (Figura 3); su función es ampliar el espectro de absorción de energía luminosa y servir como sistemas de protección frente a luz excesiva (Solarte *et al.*, 2010).

#### **4.7.3 Criptocromos**

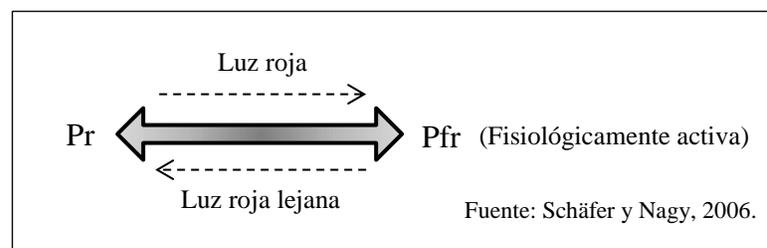
Son receptores de la región azul del espectro lumínico, su función es mediar las respuestas de fototropismo, acortamiento de entrenudos, desetiolamiento, alargamiento radical, expansión foliar, activación del reloj biológico, acumulación de clorofila, apertura de estomas e inducción floral (Schäfer y Nagy, 2006; Meisel, 2011). También podrían ser los responsables de regular la actividad de los canales aniónicos y los cambios en la expresión de genes; sin embargo, esta proteína receptora no se ha logrado purificar (Lin, 2000).

#### 4.7.4 Fitocromos

Son receptores de la región roja y rojo-lejana del espectro de luz, su función es mediar las respuestas de germinación de semillas, desetiolamiento, “huida de la sombra”, activación del reloj biológico e inducción floral fotoperiódica (Schäfer y Nagy, 2006).

El fitocromo tiene propiedades fotorreversibles; fue purificado por primera vez en 1983, en extractos de plántulas de avena. Resultó ser una proteína soluble con dos subunidades equivalentes, cada subunidad tiene dos componentes: el cromóforo que absorbe la luz y una cadena peptídica llamada apoproteína. El cromóforo más la apoproteína forman la holoproteína (Meisel, 2011).

La forma Pr (proteína color azul) absorbe la radiación roja y es convertida a la forma Pfr (proteína azul-verdoso) absorbe luz rojo lejana y vuelve a formar Pr (Figura 4), además posee actividad quinásica por lo que desencadenan vías de traducción de señales que activan la expresión de factores de transcripción para generar respuestas en las plantas (Schäfer y Nagy, 2006).



**Figura 4. Propiedades foto-reversibles del fitocromo.**

#### 4.8 Instrumentos de medición de la luz

Se debe contar con un sensor fotoeléctrico o fotodiodo con una respuesta lineal de 400 a 700 nm de longitud de onda para realizar determinaciones precisas de las condiciones lumínicas que inciden sobre las plantas. Este debe tener un tamaño adecuado para poder ser instalado, ser insensible a cambios térmicos y tener una respuesta rápida a las variaciones de radiación

fotosintéticamente activa. Ningún sensor cuántico comercial es perfecto; sin embargo, el error espectral se minimiza fácilmente al calibrar el fotodiodo bajo la luz solar (Barradas *et al.*, 2006).

El fotodiodo recibe una señal luminosa que se transforma en una corriente eléctrica, la señal es dirigida al módulo detector del circuito, pasa al módulo amplificador y se emite como una señal eléctrica que puede ser evaluada directamente o bien almacenarse en un *datalogger* (Barradas *et al.*, 2006).

En los últimos años se utilizan con mayor frecuencia los radiómetros multicanal para medir la radiación. Estos instrumentos dan información completa en varios canales del espectro UV y visible y son capaces de simular con gran facilidad y fiabilidad el espectro para determinar radiación biológicamente activa (Barradas *et al.*, 2006).

La ventaja de estos instrumentos es que son completamente automáticos y fáciles de calibrar. Están formados por dos módulos: la óptica de medida (filtro de alta calidad y detector fotosensible para cada canal) y la memoria interna de almacenamiento de datos. El detector transforma la radiación filtrada en impulsos eléctricos que son amplificados, digitalizados y convertidos a valores absolutos de irradiancia (Barradas *et al.*, 2006).

Los espectros de emisión y absorción de un átomo son característicos de cada uno de ellos, por ello es posible identificar la presencia o ausencia de un elemento específico en una fuente luminosa a través de su análisis espectral (Heredia, 2009). Los LEDs pueden ser utilizados en investigaciones con radiación fotosintéticamente activa para alimentar modelos de crecimiento vegetal, modelos de simulación de erosión, de predicción de cosechas, de potencial productivo, de fenología y de fisiología vegetal (Barradas *et al.*, 2006).

## V. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Barradas V., L. M. V. Tapia, E. V. Nicolás, A. Torrecillas y J. Alarcón (2006)** Prototipo de sensor cuántico para medición de la radiación fotosintéticamente activa en doseles vegetales. *Revista Terra Latinoamericana* 24:293-297.
- Blaauw O. and G. Blaauw-Jansen (1970)** The phototrophic responses of avena coleoptiles. *Acta Botanica* 19:755-763.
- Bornwaber T. and H. J. Tantau (2012)** Evaluation of LED lighting systems in *in vitro* cultures. *Acta Horticulturae*. 956:555-562.
- Caldari J. P. (2007)** Manejo de la luz en invernaderos. Los beneficios de la luz de calidad en el cultivo de hortalizas. *In: Memorias Simposio Internacional de Invernaderos Ciba México*. pp: 1-5.
- Casierra-Posada F., J. E. Peña-Olmos y C. Ulrichs (2011)** Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 14:43-53.
- D'Oonofrio C. and S. Molini (2004)** Effects of light quality on induction and growth MM106 apple callus cultures. *Advances in Horticultural Science* 16:47-52.
- Damon A., E. Aguilar-Guerrero, L. Rivera y V. Nikolaeva (2004)** Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticulttura* 10:195-203.

- Daud N., A. Faizal and D. Geelen (2013)** Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49:183-190.
- De Melo F. W., R. M. Suzuki, R. Pescador, R. L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbauy (2011)** Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47:420-427.
- Dutta G. S. and B. Jatothu (2013)** Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports* 7:211-220.
- Espejo S. A. y A. R. López-Ferrari (1998)** Las Monocotiledóneas Mexicanas una Sinopsis Florística 1. *In: Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Universidad Autónoma Metropolitana-Ixtapalapa. México, DF. 90 p.*
- Fillipo R. V. H., H. B. G. Cano y J. C. Andrés (2010)** Aplicaciones de iluminación LED. *Scientia Et Technica* 16:13-18.
- Flores-Escobar G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez y M. T. Colinas-León (2008)** Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:347-353.
- Godo T., K. Fujiwara, K. Guan and K. Miyoshi (2011)** Effect of wavelength of LED-light on *in vitro* asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochraceae* Schltr (Orchidaceae). *Plant Biotechnology* 28:397-400.

- Gomes A. A., M. Pasqual, L. M. Yuriko, E. C. Mauro e H. R. Souza (2009)** Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plantulas de *Cattleya loddigessi* L. (Orchidaceae) micropropagadas. *Ciencia Rural* 39:2506-2511.
- Gomes da R. P. S., R de O. Pedroso, W. S. Bueno e U. dos S. Lira (2010)** Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciencia Rural* 40:1922-1928.
- Gyula P., E. Schafer and F. Nagy (2003)** Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6:446-452.
- Hamada K., K. Shimassaki, Y. Nishimura, H. Oyama-Egawa and K. Yoshida (2009)** Effect of red fluorescent films on the proliferation of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. PLB cultured *in vitro*. *Horticulture Environment and Biotechnology* 50:319-323.
- Hamada K., K. Shimasaki, Y. Nishimura, H. Oyama-Egawa and K. Yoshida (2011)** Effects of red, blue and yellow fluorescent films on proliferation and organogénesis in *Cymbidium* and *Phalaenopsis* PLB *in vitro*. In: 6<sup>th</sup> IS on Light in Horticulture *Acta Horticulturae* 907:381-384.
- Hemming S. (2011)** Use of natural and artificial light in horticulture – interaction of plant and technology. *Acta Horticulturae*. 907:25-35.
- Heredia A. S. (2009)** Como construir un espectroscopio casero con un CD. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*. 6:491-495.
- Huan L. V. and M. Tanaka (2004)** Effects of red and blue light emitting diodes on callus induction, callus proliferation and protocorm like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. *Environmental Control in Biology* 42:57-64.

- Huertas L. (2008)** El control ambiental en invernaderos: radiación. *Horticultura International* 61:54-55.
- Jiménez M. R., L. M. Sánchez y J. C. García (1998)** Orchidaceae Tribu Maxillarieae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 67. Instituto de Ecología, A. C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán México 83 p.
- Kurilcik A., R. Miklusite-Canova, S. Dapkuniene, S. Zilinskaite, G. Kurilcik, G. Tamulaitis, P. Duchovskis and A. Zukauskas (2008)** *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes. *Central European Journal of Biology* 3:161-167.
- Lee E. H. E., A. C. Laguna, J. G. Murguía, P. M. Elorza, L. A. Iglesias, B. R. García, F. A. P. Barredo y N. B. Santana (2007)** Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista UDO Agrícola* 7:59-67.
- Lee Y. I., W. Fang and C. C. Chen (2011)** Effect of six different LED light qualities on the seedling growth of *Paphiopedilum* Orchid *in vitro*. *Acta Horticulturae* 907:389-391.
- Lian M. L., H. H. Murthy and K. Y. Paek (2002)** Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid “Pesaro”. *Scientia Horticulturae* 94:365-370.
- Lin C. (2000)** Plant blue light receptors. *Trends in Plant Science*. 5:337-342.
- Lin Y., J. Li, B. Li, T. He and Z. Chun (2011)** Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:329-335.

- Loberant B. y A. Altman (2010)** Micropropagation of plants. *In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*. Michael C. Flickinger (ed). Jerusalem, Israel pp: 1-16.
- Manrique R. E. (2003)** Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente* 12:1-11p.
- Masa G. D., H. H. Kim, R. M. Wheeler and C. A. Mitchell (2008)** Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience* 43:1951-1956.
- Mascia V. D. C., F. Socolowski e M. Takaki (2007)** Germinacao de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell) Berr (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. *Brasileira Botanica* 30:183-188.
- Meisel L. A., D. C. Urbina y M. E. Pinto (2011)** Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. *In: Fisiología Vegetal*. F. A. Squeo & L. Cardemil (eds). pp. 1-10.
- Mengxi L., X. Zhigang, Y. Yang and F. Yijie (2011)** Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106:1-10.
- Ming-Chang W., H. Chi-Yao, J. Chii-Ming, W. Yuh-Tai, W. Chih-Yu, C. Ho-Hsien and C. Hung-Ming (2007)** A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chemistry* 101:1753-1758.
- Morrow R. C. (2008)** LED lighting in horticulure. *Hortscience* 43:1947-1950.

- Nahar S. J., K. Shimasaki and S. M. Haque (2012)** Effect of different light and two polysaccharides on the proliferation of protocorm-like-bodies of *Cymbidium* cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae* 956:307-131.
- Papageorgiou G. C. and Govindjee (2004)** Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer. U.S.A. 861 p.
- Pimentel V. C., R. K. Machado e C. L. Salgueiro (2007)** Qualidade de luz e producao de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Revista Brasileira de Biociencias* 5:213-215.
- Pop L. and D. Cachita (2011)** Contribution to *Solanum tuberosum* L. tubergensis, vitrocultivated under ultrabright color LED. *Analele Universitatii din Oradea-Fascicula Biologie* 18:124-127.
- Raj P. P., I. Kataoka and R. Mochioka (2008)** Effect of red and blue light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 147-153.
- Rengifo M. A. y C. Vargas (2012)** Caracterización óptica de diodos emisores de luz mediante su espectro de emisión y patrones de radiación. *Scientia et Technica* 51:66-71.
- Ruey-Chi J. and F. Wei (2004)** Growth of potato plantlets *in vitro* is different when provided concurrent vs alternating blue and red light photoperiods. *HortScience* 39:380-382.
- Schäfer E. and F. Nagy (2006)** Photomorphogenesis in Plants and Bacteria. 3er. Edition. Springer, Netherland. 662 p.
- Seabrook A. J. E. (2005)** Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review. *American Journal of Potato*. 82:353-367.

- Servin W. P., B. D. Chitra, B. S. Sahaya and S. Moin (2013)** *In vitro* propagation of *Coelogyne breviscapa* Lindl., *Dendrobium aqueum* Lindl., and *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf. via asymbiotic seed germination. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 21:26-32.
- Solarte M. E., L. Moreno y L. M. Melgarejo (2010)** VI. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. In: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia (ed). pp. 107-122.
- Sun-Ja K., H. Eun-Joo, H. Jeong-Wook and P. Kee-Yoeup (2004)** Effects of LED on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 101:143-151.
- Szeszko F. D. R. (2011)** La Orquideoflora Mexiquense. Primera edición. Consejo Editorial de la Administración Pública Estatal. México 362 p.
- Tan N. D., T. Takamura and H. Watanabe (2003)** Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73:43-52.
- Tan N. D., T. Takamura, H. Watanabe and M. Tanaka (2005)** Artificial light source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. *Acta Horticulturae* 692:137-142.
- Tanaka M., T. Takamura, H. Watanabe, M. Endo, T. Yanagi and K. Okamoto (1998)** *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Journal Horticulture Scientia Biotechnology* 73:39-44.

- Werbrouck S., H. Buyle and D. Geelen (2012)** Effect of red, far-red and blue light emitting diodes on in vitro growth of *Ficus benjamina*. *Acta Horticulturae* 961:533-538.
- Xu Z. G., J. Cui and X. R. Di (2009)** Effects of different spectral energy distribution on tissue culture of *Oncidium in vitro*. *International Journal of Automation. Computing.* 31:45-50.
- Yeh N. and C. Jen-Ping (2009)** High rightness LEDs energy efficient lighting sources and their potencial in indoor plant cultivation. *Elsevier Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:2175-2180.
- Young L. N. A., L. Mi-Ja, K. Yang-Kil, P. Joung-Chul, P. Hong-Kyu, C. Jae-Seong, H. Jong-Nae, K. Kee-Jong, P. Ki-Hun, K. Jae-Kwon and K. Jung-Go (2010)** Effect of Light Emitting Diode Radiation on Antioxidant Activity of Barley Leaf. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53:685-590.

# **CAPÍTULO I. GERMINACIÓN *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis* BAJO DIFERENTE CALIDAD DE LUZ LED**

## **RESUMEN**

El proceso de germinación de semillas cambia entre especies en función de la temperatura y calidad de la luz incidente sobre ellas. Se conoce muy poco acerca de los factores físicos que afectan la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la influencia de la calidad de la luz en la germinación de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. Cápsulas cerradas de las dos especies de orquídeas fueron recolectadas, se obtuvieron las semillas que se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (15 % v/v durante 15 min) más tres enjuagues con agua estéril y se establecieron en el medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con tiamina (0.4 mg L<sup>-1</sup>), inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), agar (6 g L<sup>-1</sup>) a un pH ajustado de 5.7. Los cultivos se incubaron en los tratamientos con LEDs rojo y azul en proporción 3:1, 2:2 y 1:3, LEDs blancos y luz blanca fluorescente (testigo) con seis repeticiones para cada uno. Las longitudes de onda emitidas por las fuentes de iluminación fueron: LEDs rojos de 590 a 670 nm, LEDs azules de 430 a 480 nm y luz LED blanca y fluorescente con un rango de 400 a 700 nm. Para la evaluación se identificaron tres etapas de germinación en las semillas (imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares). Los resultados obtenidos mostraron que los espectros de luz blanca tanto LEDs como fluorescente fueron más eficientes en la diferenciación de protocormos (100 %) y formación de primordios foliares (93 %), al obtener los mayores porcentajes en el menor tiempo posible en comparación con los tratamientos de combinaciones de luz roja y azul, por lo que los LEDs blancos representan una alternativa eficaz para la propagación *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

Palabras clave: Germinación asimbiótica, LEDs, orquídeas, protocormos.

## SUMMARY

The process of germination of seeds changes between species as a function of the temperature and quality of light incident on them. Very little is known about the physical factors that affect asymbiotic germination of seeds of orchids. The aim of the present investigation was to evaluate the influence of light quality on the germination of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*. Capsules closed of the two species of orchids were collected, we obtained the seeds disinfested with sodium hypochlorite, commercial (15 % v/v for 15 min) and three rinses with sterile water and settled in the culture medium Murashige and Skoog (MS) supplemented with thiamine (0.4 mg L<sup>-1</sup>), inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (6 g L<sup>-1</sup>) at a pH adjusted to 5.7. The cultures were incubated in the treatments with LEDs of red and blue in the ratio 3:1, 2:2 and 1:3, white LEDs and white fluorescent light (witness) with six replications for each one. The wavelengths emitted by the light sources were: red LEDs from 590 to 670 nm, blue LEDs 430 to 480 nm and light with white LED and fluorescent with a range of 400 to 700 nm. For the evaluation we identified three stages of germination in the seeds (imbibition, differentiation of protocorms and formation of leaf primordia). The results obtained showed that the spectra of white light both LEDs as well as fluorescent were the most efficient in the differentiation of protocorms (100 %) and formation of leaf primordia (93 %), to obtain the highest percentages in the shortest possible time in comparison with the treatments of combinations of red and blue light, so that the white LEDs represent an effective alternative for the *in vitro* propagation of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*.

Key words: Asymbiotic germination, LEDs, orchids, protocormos.

## I. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas de los géneros *Oncidium* y *Laelia* se distribuyen en México y tienen un alto valor comercial (Ullrich, 2012; Mengxi *et al.*, 2011). La belleza de sus flores las hacen muy atractivas, por lo que las poblaciones silvestres son objeto de extracción de ejemplares de manera ilegal para satisfacer la demanda de los mercados, lo anterior aunado a la deforestación de su hábitat y al cambio de uso de suelo, son las principales causas de la disminución de las poblaciones silvestres de estas especies de orquídeas (Szeszko, 2011).

Las semillas de orquídeas se caracterizan por ser diminutas y carecer de reservas de nutrientes requeridos para su germinación y desarrollo de plántulas (Servin *et al.*, 2013); por lo que de forma natural necesitan de la asociación simbiótica con un hongo. En el laboratorio de micropropagación la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas permite desarrollar sistemas de propagación y conservación *ex situ*, sin perder variabilidad genética como en el cultivo de tejidos (Servin *et al.*, 2013).

La germinación *in vitro* de semillas es afectada por factores internos y externos. Los internos son intrínsecos de las semillas, como longevidad y viabilidad; los factores externos están directamente relacionados a las condiciones ambientales (Alves *et al.*, 2012).

La luz es uno de los factores más importantes del entorno vegetal, no solo como fuente energética, sino como regulador de procesos fisiológicos en los vegetales (Casierra-Posada *et al.*, 2012). El material vegetal *in vitro* tiene una baja habilidad fotosintética, por lo que la presencia o ausencia de luz influencia en gran medida el crecimiento y desarrollo de plantas (De Melo *et al.*, 2011). Los vegetales poseen mecanismos fotoselectivos sofisticados para capturar la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis (400 a 700 nm). La luz azul es recibida por los criptocromos, la luz roja por los fitocromos y se ha reportado la presencia de un compuesto a base de zeaxantina como receptor de luz verde (Casierra-Posada *et al.*, 2011).

Las lámparas tubulares fluorescentes son la fuente de luz tradicional usada en el cultivo *in vitro*. Aunque proporcionan luz para la fotosíntesis tienen un elevado costo energético ya que proveen de longitudes de onda innecesarias para las plantas y los efectos fisiológicos en los vegetales son menos específicos (Kurilcik *et al.*, 2008). Esto hace necesario encontrar fuentes alternativas de energía y más eficientes formas de iluminar los cultivos (Loberant y Altman, 2010).

Los diodos emisores de luz (LEDs) tienen un elevado potencial para ser utilizados como fuente de iluminación en la micropropagación (Gomes *et al.*, 2010). Sus ventajas son la conversión eficiente de energía, volumen pequeño, vida más larga, longitud de onda específica que elimina las longitudes de onda que son inactivas para la fotosíntesis, intensidad/calidad de luz ajustable y bajas emisiones térmicas; además su costo de mantenimiento es bajo y protege el medio ambiente al reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> (Young *et al.*, 2010).

Generalmente se asocia la luz LED azul como inductor de los procesos fisiológicos de diferenciación de las orquídeas, como en el caso de *Dendrobium officinale* (Lin *et al.*, 2011), mientras que la luz LED roja induce mayor formación de protocormos a partir de semillas de *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011) y de *Cymbidium* (Hamada *et al.*, 2011).

Todas las especies tienen diferentes necesidades lumínicas, por tal motivo, es necesario estudiar las condiciones para cada especie (Salazar *et al.*, 2013). Debido a la importancia de generar información acerca del uso de esta tecnología en la germinación de semillas, esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de diferente calidad de luz en la imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares *in vitro* a partir de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

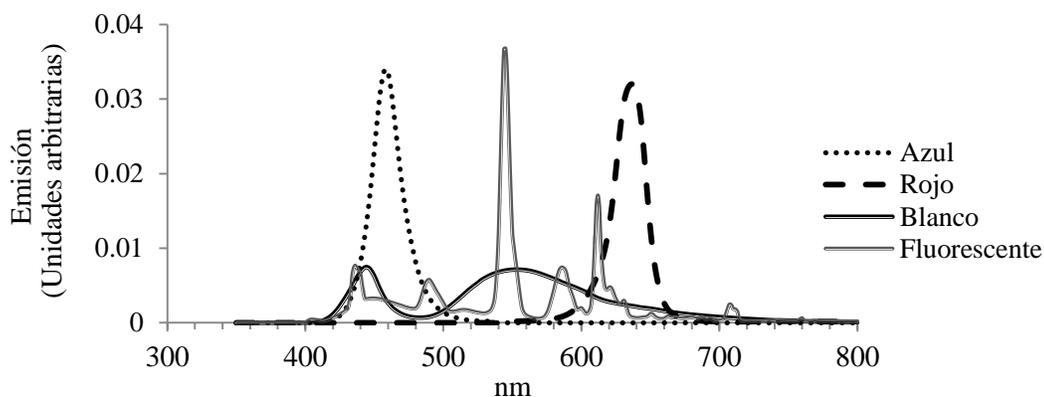
Como material biológico se utilizaron semillas de cápsulas cerradas provenientes de plantas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, pertenecientes al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos, bajo resguardo, en el invernadero de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan Michoacán.

### 2.2 Medio de cultivo

Como medio se utilizó el Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) a un pH de 5.7; esterilizado por 15 min a  $121^\circ\text{C}$ .

### 2.3 Establecimiento del experimento

La semilla se desinfectó y se colocó una gota de solución estéril con semillas en cajas Petri de  $60 \times 15 \text{ mm}$ , con 10 mL del medio MS. Las cajas Petri etiquetadas se incubaron en las unidades de experimentación que fueron cubos de triplay de 45 cm de ancho, 45 cm de alto y 50 cm de fondo pintados de color blanco en su interior, provistas con distintos tipos de lámparas LED, correspondientes a los tratamientos en estudio. Las longitudes de onda emitidas por las lámparas LED (Figura 1) se midieron con un espectro radiómetro de marca “Advanced Spectral Device”. La intensidad lumínica se determinó con un analizador infrarrojo de gases (IRGA-6400), fue de  $31 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , con fotoperiodo de 16 h y temperatura promedio de  $25^\circ\text{C}$ .



**Figura 1. Características de las longitudes de onda emitidas por focos LED (azul, rojo y blanco) y lámpara fluorescente, medidas con un espectro radiómetro de marca “Advanced Spectral Device”.**

#### **2.4 Tratamientos evaluados y diseño experimental**

Los tratamientos y la descripción de los mismos se presentan en el Cuadro 1. El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con seis repeticiones, donde la unidad experimental fue 1 cm<sup>2</sup> de área basal de la caja Petri con semillas.

**Cuadro 1. Lista de tratamientos para evaluar el efecto de la calidad de luz LED en la germinación *in vitro* de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	Lámparas LED (rojo y azul 3:1)
2	Lámparas LED (rojo y azul 2:2)
3	Lámparas LED (rojo y azul 1:3)
4	Lámparas LED (blanca)
5 (testigo)	Lámparas blancas fluorescentes

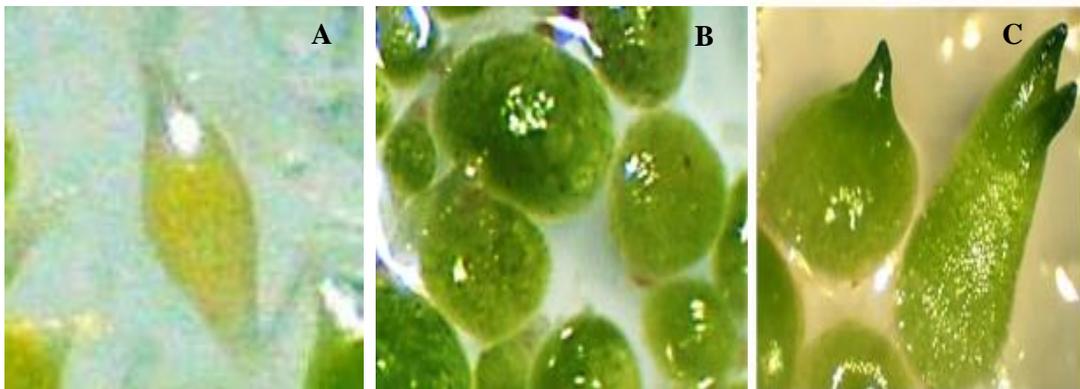
## 2.5 Etapas de germinación de las semillas

La germinación de las semillas para su estudio, se dividió en tres etapas: imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares.

Imbibición. Esta fase se consideró cuando las semillas aumentaron su volumen por absorber agua, aunque conservaron su forma alargada y se tornaron color amarillo cadmio medio (Figura 2A).

Diferenciación de protocormos. Esta etapa se consideró a partir de que la testa de las semillas se saturó de agua, el embrión aumentó de tamaño más del doble y su color cambió de amarillo cadmio medio a verde (Figura 2B).

Formación de primordios foliares. Esta es la última etapa del proceso de germinación *in vitro* de semillas y se consideró a partir de que se observó la formación de un primordio foliar en el ápice del protocormo (Figura 2C).



**Figura 2. Etapas de germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas. Imbibición (A), diferenciación de protocormo (B) y formación de primordio foliar (C).**

## **2.6 Variables evaluadas**

El desarrollo máximo se evaluó dos veces por semana mediante observaciones al microscopio estereoscópico. Se colocó la caja Petri con semillas y se ubicó el área ( $1\text{cm}^2$ ) previamente marcada para tener la seguridad de siempre contar las mismas semillas; una vez que el desarrollo llegó a su máximo valor se utilizó la transformación arcoseno  $\sqrt{x}$  (Godoi y Takaki, 2005).

A partir de los porcentajes máximos se obtuvo la velocidad de desarrollo para la imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares, al dividir el valor del desarrollo máximo alcanzado para cada repetición y tratamiento entre los días en que este se obtuvo.

## **2.7 Análisis de datos**

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004). Para ilustrar mejor las comparaciones de medias entre tratamientos, se utilizó el software “R” versión 3.1.1, que permite observar gráficamente las diferencias (R Core Team, 2014).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

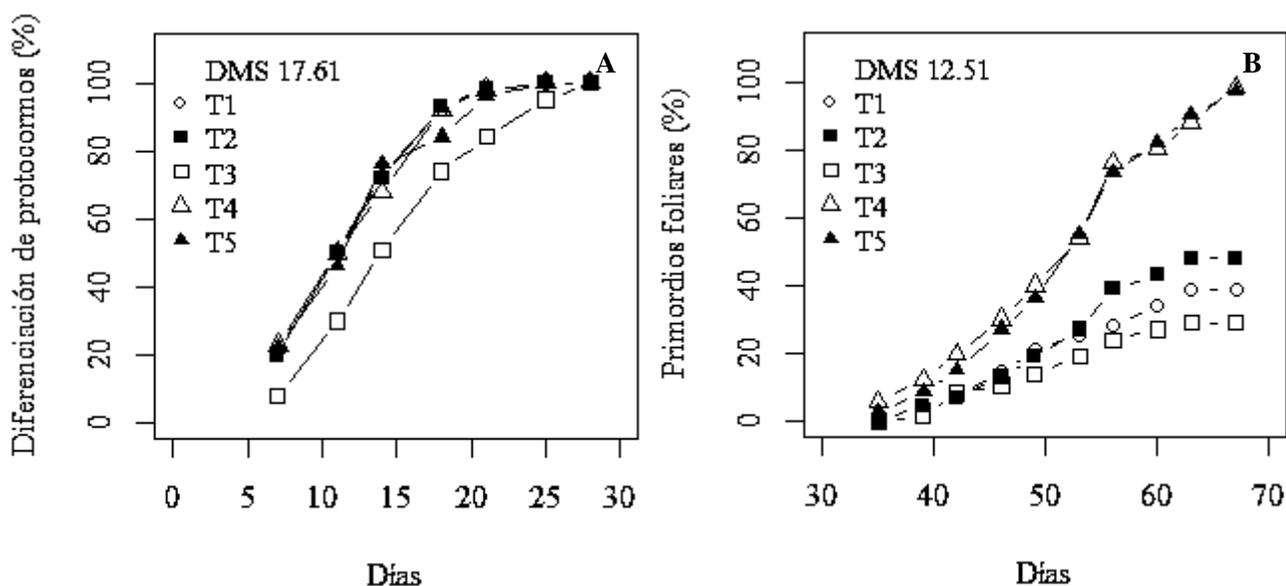
#### 3.1 Imbibición de las semillas

Los cinco tratamientos aplicados en *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* alcanzaron 100 % de imbibición en tres días, con el mismo día de inicio y final del proceso y, velocidad promedio de 33 de semillas imbibidas por día; resultados diferentes a los encontrados en *Phalaenopsis*, que con iluminación blanca fluorescente, sólo se imbibieron 57.33 % de las semillas (Salazar *et al.*, 2013).

La imbibición de las dos especies en estudio se reflejó con un hinchamiento del embrión y una coloración amarillo cadmio medio, posiblemente por el tratamiento de desinfección utilizado; pues Salazar-Mercado (2012) afirma que el hipoclorito de sodio erosiona la testa impermeable de la semilla y facilita la hidratación. Por su parte, Vasudevan y Staden (2010) indican que para explicar este fenómeno también debe tomarse en cuenta la disponibilidad de agua en el medio de cultivo.

#### 3.2 Diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares

En *Oncidium tigrinum*, la diferenciación de protocormos muestra una respuesta similar en todos los tratamientos; las semillas de *O. tigrinum* iniciaron la diferenciación de estas estructuras siete días después de la siembra (DDS), hasta alcanzar el 100 % en todos los tratamientos 22.6 DDS. Esta tendencia indica que la especie no es fotosensible en la etapa de diferenciación de protocormos, pero si lo es en la etapa de formación de primordios foliares (Figura 3), donde se evidencian las diferencias a partir de la quinta medición.



**Figura 3. Cinética de diferenciación de protocormos (A) y formación de primordios foliares (B) de *Oncidium tigrinum* bajo diferente calidad de iluminación. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

No se registraron diferencias estadísticas para día de inicio y porcentaje máximo de diferenciación de protocormos, por lo que se infiere que esta especie es poco exigente a condiciones específicas de iluminación para su germinación *in vitro*. Los porcentajes de diferenciación de protocormos en el presente trabajo superan a los obtenidos por Salazar-Mercado (2012) y Flores-Escobar (2008) quienes registraron 92.86 % de diferenciación en *Cattleya mendelii* y 47.69 % en *Oncidium stramineum*, respectivamente.

Los T1, T2 y T4 (estadísticamente iguales entre sí) resultaron diferentes al testigo (T5) en velocidad de diferenciación de protocormos ( $0.6 \text{ protocormos} \cdot \text{d}^{-1}$  mayor), días a diferenciación final (3.3 d menos) y periodo de diferenciación 5 días menor (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Efecto de la calidad de luz en la velocidad, días a final y periodo de diferenciación de protocormos de *Oncidium tigrinum*.**

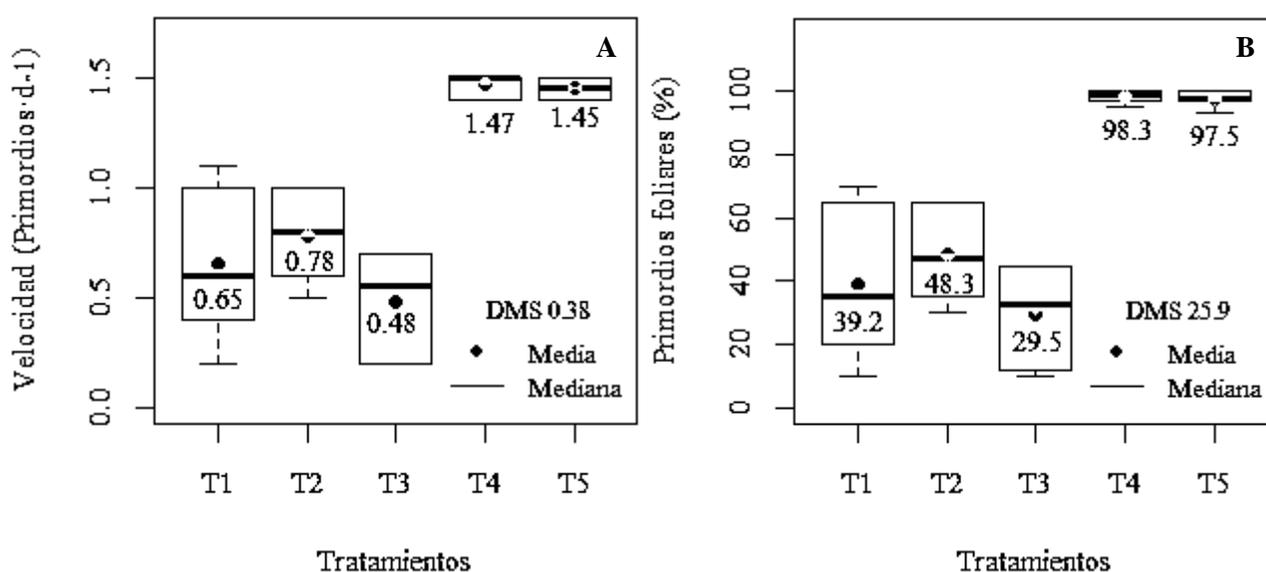
Tratamiento	Diferenciación de protocormos		
	Velocidad (protocormos·d <sup>-1</sup> )	Final (d)	Periodo (d)
1. LEDs rojo y azul 3:1	4.7a	21.0c	14.0c
2. LEDs rojo y azul 2:2	4.7a	21.0c	14.0c
3. LEDs rojo y azul 1:3	3.7c	26.5a	19.5a
4. LEDs blancos	4.7a	21.0c	14.0c
5. Luz blanca fluorescente	4.1b	24.3b	17.3b
DMS	0.3	1.7	1.7

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

Los resultados indican que la iluminación emitida en los tratamientos T1, T2 y T4 inducen positivamente la diferenciación de protocormos, porque la combinación de espectros que contienen se asemejan a un ambiente natural (Alves *et al.*, 2012) y activan los fitocromos, responsables de la germinación de semillas (Von Arnim y Deng, 1996). El T3 tuvo efectos significativos negativos sobre la diferenciación de protocormos, con una menor velocidad (3.7 protocormos·d<sup>-1</sup>), mayor número de días a diferenciación final (26.5 d) y por consiguiente, un periodo más largo (19.5 d).

La mayor velocidad (Figura 4A) y el porcentaje máximo de formación de primordios foliares hasta tres veces mayor que T3 (Figura 4B) se registró en los tratamientos con luz blanca, tanto LED (T4) como fluorescente (T5). La formación de primordios inició 4 días antes en los

tratamientos con luz LED blanca y luz blanca fluorescente que en el resto de los tratamientos; pero su periodo de formación fue 10 días más largo (Cuadro 3); situación que se justifica con los mayores porcentajes obtenidos de formación de primordios foliares (98 %). A diferencia de estos resultados, Lin *et al.* (2011) en *Dendrobium officinale* obtuvieron 85 % de formación de primordios con luz azul, 27 % más que con luz blanca fluorescente; en tanto que Mengxi *et al.* (2011) en *Oncidium* y Hamada *et al.* (2011) en *Cymbidium*, observaron que la luz roja aumenta la formación de estas estructuras.



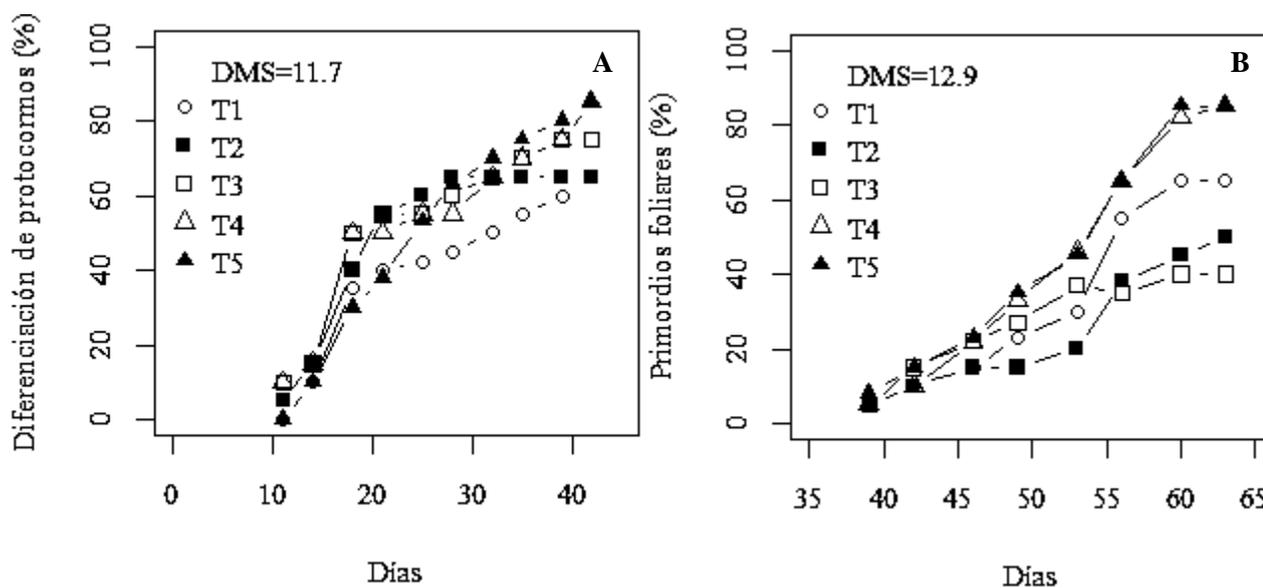
**Figura 4.** Efecto de la calidad de luz en la velocidad (A) y porcentaje máximo (B) de formación de primordios foliares de *Oncidium tigrinum*. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

En *Laelia autumnalis* la diferenciación de protocormos (Figura 5A) y formación de primordios foliares *in vitro* (Figura 5B) fueron negativamente afectados por las combinaciones de luz roja y azul, mientras que la mejor respuesta se obtuvo con luz LED blanca (T4) y el tratamiento testigo (T5).

**Cuadro 3. Efecto de la calidad de luz en los días al inicio, al final y en el periodo de formación de primordios foliares de *Oncidium tigrinum*.**

Tratamiento	Formación de primordios foliares		
	Inicio (d)	Final (d)	Periodo (d)
1. LEDs rojo y azul 3:1	39.0a	59.5b	20.5b
2. LEDs rojo y azul 2:2	37.6a	61.8ab	24.1b
3. LEDs rojo y azul 1:3	39.0a	57.1b	18.1b
4. LEDs blancos	35.0b	67.0a	32.0a
5. Luz blanca fluorescente	35.6b	67.0a	31.3a
DMS	1.9	6.3	6.8

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)



**Figura 5. Cinética de diferenciación de protocormos (A) y formación de primordios foliares (B) en *Laelia autumnalis* bajo diferente calidad de iluminación. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

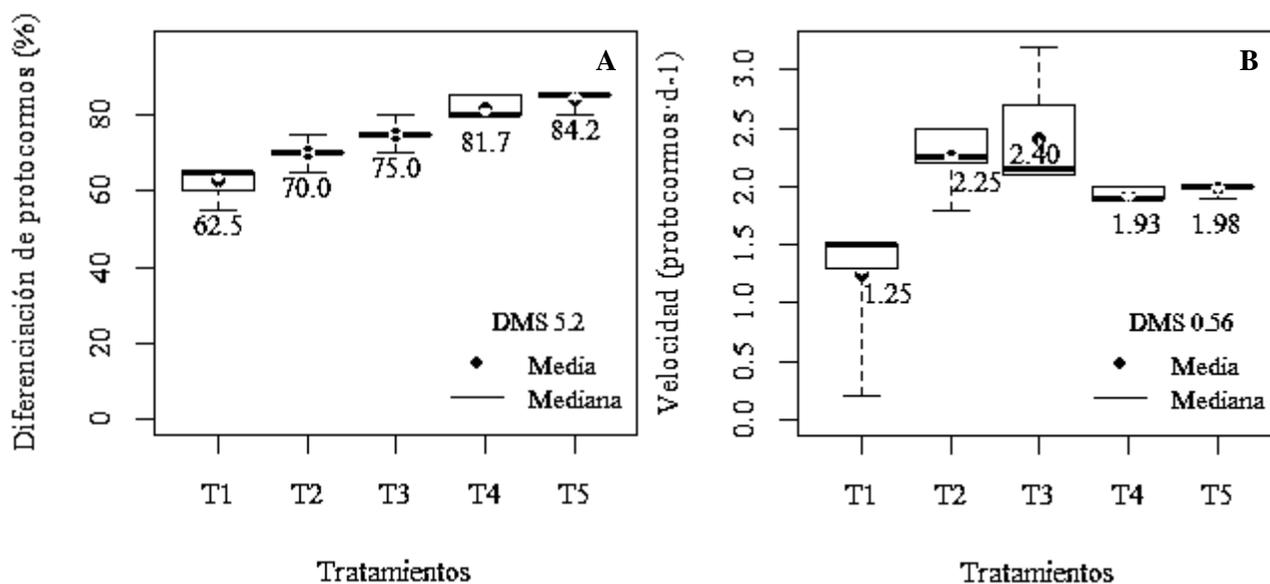
La germinación (diferenciación de protocormos) se activa cuando se hidratan los tejidos de la semilla y los fotorreceptores desencadenan eventos enzimáticos irreversibles (Cano-Vázquez *et al.*, 2015). Las semillas de *L. autumnalis* diferenciaron protocormos a los 11 DDS en los T2, T3 y T4; 3 días antes que T5, efecto atribuido a la luz azul sobre los criptocromos que activan la diferenciación celular. La diferenciación en T2 y T3 finalizó 10 días más rápido que en los T4 y T5, y por lo tanto, su duración fue menor (Cuadro 4); sin embargo, existe una relación directa entre los porcentajes de diferenciación y el tiempo empleado para ello. Se puede inferir que la luz azul acelera los procesos de diferenciación, como fue probado por Lin *et al.* (2011) en *Dendrobium officinale*, donde a mayor proporción de luz azul con relación a la roja, aumentó la diferenciación de tejidos.

**Cuadro 4. Efecto de la calidad de luz en los días al inicio, al final y el tiempo empleado (periodo) en la diferenciación de protocormos de *Laelia autumnalis*.**

Tratamiento	Diferenciación de protocormos		
	Inicio (d)	Final (d)	Periodo (d)
1. LEDs rojo y azul 3:1	14a	42.0a	28.8a
2. LEDs rojo y azul 2:2	11b	32.3b	21.3b
3. LEDs rojo y azul 1:3	11b	31.1b	20.1b
4. LEDs blancos	11b	42.0a	31.0a
5. Luz blanca fluorescente	14a	41.5a	27.5a
DMS	1.17	5.0	5.0

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

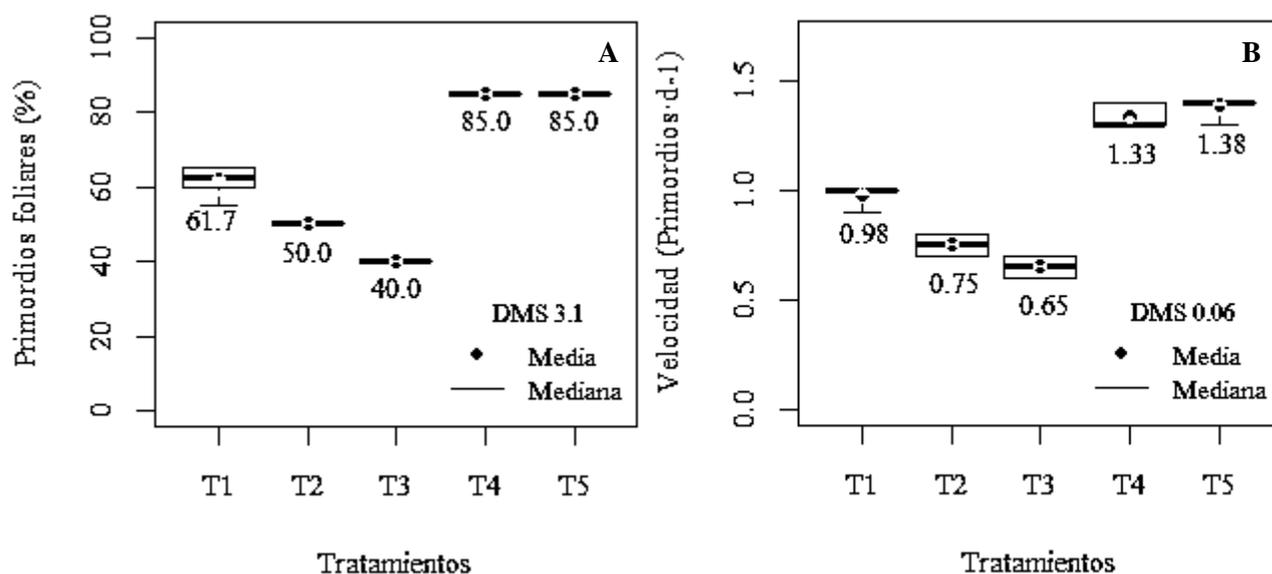
La germinación o diferenciación de protocormos está asociada a la acumulación de giberelinas como respuesta a la luz roja captada por los fitocromos (Schäfer y Nagy, 2006). Sin embargo, en esta investigación se observó que la luz roja inhibió la diferenciación *in vitro* de estas estructuras en *L. autumnalis*, pues a medida que se incrementó la proporción de rojo con relación al azul, el porcentaje de diferenciación disminuyó hasta 62.5 %. Los mayores porcentajes de diferenciación (>81 %) se observaron en los T4 (LED blanca) y T5 (fluorescente blanca) que resultaron estadísticamente iguales entre sí (Figura 6A). Flores-Escobar *et al.* (2011) en semillas de *Brassia verrucosa* registraron 56.70 % de diferenciación de protocormos, mientras que Salazar-Mercado (2012), en *Cattleya mendelii*, obtuvo 92.8 % con luz fluorescente. La velocidad de diferenciación para T2, T3, T4 y T5 (estadísticamente iguales entre sí) fue mayor de 2 protocormos·día<sup>-1</sup>; significativamente diferentes del T1 cuya velocidad fue de 1.2 protocormos·día<sup>-1</sup> (Figura 6B).



**Figura 6. Efecto de la calidad de luz en el porcentaje máximo (A) y la velocidad (B) de diferenciación de protocormos de *Laelia autumnalis*. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

Después de la diferenciación del protocormo se desarrollaron la radícula y el primordio foliar, lo que manifiesta la capacidad de la semilla para producir una planta bajo condiciones favorables (Coa *et al.*, 2014); esta fase de desarrollo en las orquídeas se denomina formación de primordios foliares, la cual inició en todos los tratamientos 39 DDS.

La mayor cantidad de primordios foliares formados (85 %) se obtuvo con luz blanca tanto LED (T4) como fluorescente (T5), tratamientos estadísticamente iguales entre sí (Figura 7A), con una velocidad de desarrollo de 1.35 primordios·día<sup>-1</sup> (Figura 7B). Resultados atribuibles a la similitud en cuanto a iluminación con un ecosistema natural (Alves *et al.*, 2012). Con iluminación blanca, Salazar-Mercado (2012) obtuvo sólo 12.79 % de primordios foliares formados en *Cattleya mendelii*, mientras que Hamada *et al.* (2011), por efecto del espectro rojo obtuvieron 73 % de estas estructuras en *Cymbidium*.



**Figura 7.** Efecto de la calidad de luz en el porcentaje máximo (A) y velocidad (B) de formación de primordios foliares de *Laelia autumnalis*. T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

Las semillas bajo el efecto de LEDs rojo y azul 3:1 (T1) terminaron la formación de primordios antes que el resto y en un periodo menor (Cuadro 5), sin embargo, no resulta importante puesto que sus porcentajes máximos de formación de primordios resultaron estadística y considerablemente menores que los T4 y T5 (luz blanca).

**Cuadro 5. Efecto de la calidad de luz en los días al final de formación de primordios foliares y su duración (periodo) en *Laelia autumnalis*.**

Tratamiento	Formación de primordios foliares	
	Al final (d)	Periodo (d)
1. LEDs rojo y azul 3:1	60.0c	21.0c
2. LEDs rojo y azul 2:2	63.0a	24.0a
3. LEDs rojo y azul 1:3	60.5bc	21.5bc
4. LEDs blancos	62.0ab	23.0ab
5. Luz blanca fluorescente	60.5bc	21.5bc
DMS	1.7	1.7

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

#### IV. CONCLUSIONES

La calidad de la luz no afecta la imbibición *in vitro* de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, mientras que la iluminación blanca, tanto LED como fluorescente favorecen la diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares.

*Oncidium tigrinum* mostró una gran plasticidad en la germinación al adaptarse a las condiciones de calidad de luz y *Laelia autumnalis* fue sensible a los diferentes espectros de iluminación, lo que indica que los requerimientos fisiológicos varían entre las dos especies.

La utilización de LEDs blancos como fuente de iluminación en la germinación asimbiótica *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* es una alternativa viable para obtener porcentajes altos de formación de primordios foliares.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Alves G. E., A. E. Ursulino, S. E. Bernado, B. L. Matos and M. S. Santos (2012)** Germination and vigor of *Crataeva tapia* L. seeds in different temperatures and light regimes. *Revista Ciencia Agronómica* 43:138-145.
- Cano-Vázquez A., M. C. López-Peralta, H. A. Zavaleta-Mancera, N. Cruz-Huerta, I. Ramírez-Ramírez, A. Gardea-Béjar y V. A. González-Hernández (2015)** Variación de grados de latencia en semillas entre colectas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*). *Botanical Sciences* 93:1-10.
- Casierra-Posada F., J. E. Peña-Olmos y C. Ulrichs (2011)** Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 14:43-53.
- Casierra-Posada F., P. J. Nieto y C. Ulrichs (2012)** Crecimiento, Producción y Calidad de flores en calas (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) expuestas a diferente calidad de luz. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 15:97-105.
- Coa U. M., N. J. R. Méndez, A. R. Silva y P. S. Mundarain (2014)** Evaluación de métodos químicos y mecánicos para promover la germinación de semillas y producción de fosforitos en café (*Coffea arabica*) var. Catuaí Rojo. *IDESIA* 32:43-53.
- De Melo F. W., R. M. Suzuki, R. Pescador, R. L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbauy (2011)** Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* doi: 10.1007/s11627-010-9311-x 47:420-427.

- Flores-Escobar G., I. Gil-Vázquez, M. T. Colinas-León y M. Mata-Rosas (2011)** Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman Ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17:5-8.
- Flores-Escobar G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vázquez y M. T. Colinas-León (2008)** Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:347-353.
- Godoi S. e M. Takaki (2005)** Efeito da temperatura e a participacao do fitocromo no controle da germinacao de sementes de embaúba. *Brasileira de Sementes* 27:87-90.
- Gomes da R. P. S., O. R. Pedroso, S. W. Bueno e S. U. Lira (2010)** Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciencia Rural Santa María* 40:1922-1928.
- Hamada K., K. Shimasaki, Y. Nishimura, H. Oyama-Egawa and K. Yoshida (2011)** Effects of red, blue and yellow fluorescent films on proliferation and organogénesis in *Cymbidium* and *Phalaenopsis* PLB *in vitro*. In: 6<sup>th</sup> IS on Light in Horticulture. *Acta Horticulturae* 907:381-384.
- Kurilcik A., R. Miklusite-Canova, S. Dapkuniene, S. Zilinskaite, G. Kurilcik, G. Tamulaitis, P. Duchovskis and A. Zukauskas (2008)** *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes. *Central European Journal of Biology* doi: 10.2478/s11535-008-0006-9 3:161-167.
- Lin Y., J. Li, B. Li, T. He and Z. Chun (2011)** Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* doi: 10.1007/s11240-010-9871-9 105:329-335.

- Loberant B. y A. Altman (2010)** Micropropagation of plants. *In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*. Michael C. Flickinger (ed). Jerusalem, Israel pp: 1-16.
- Mengxi L., X. Zhigang, Y. Yang and F. Yijie (2011)** Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* doi: 10.1007/s11240-010-9887-1 106:1-10.
- Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- R Core Team (2014)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. (Consulta: noviembre de 2014).
- Salazar M. S. A., N. A. Z. Amaya y R. F. Barrientos (2013)** Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15:97-105.
- Salazar-Mercado S. A. (2012)** Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelti* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica* 61:69-78.
- SAS Institute Inc. (2004)** SAS/STAT® 9.0 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schäfer E. and F. Nagy (2006)** Photomorphogenesis in Plants and Bacteria. 3er. Edition. Springer, Netherland. 662 p
- Servin W. P., D. B. Chitra, S. B. Sahaya and S. Molini (2013)** *In vitro* propagation of *Coelogyne breviscapa* Lindl., *Dendrobium aqueum* Lindl., and *Flickingeria nodosa* (Dalz.)

- Seidenf. *via* asymbiotic seed germination. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 21:26-32.
- Szeszko F. D. R. (2011)** La Orquideoflora Mexiquense. Primera edición. Consejo Editorial de la Administración Pública Estatal. México. 362 p.
- Ullrich B. (2012)** Catálogo de las Liliopsida endémicas de México. *Acta Botánica Mexicana* 100:195-257.
- Vasudevan R. and J. Staden (2010)** *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Journal Scientia Horticulturae* 123:496-504.
- Von Arnim A. and X. W. Deng (1996)** Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:215-243.
- Young L. N. A., L. Mi-Ja, K. Yang-Kil, P. Joung-Chul, P. Hong-Kyu, C. Jae-Seong, H. Jong-Nae, K. Kee-Jong, P. Ki-Hun, K. Jae-Kwon and K. Jung-Go (2010)** Effect of Light Emitting Diode Radiation on Antioxidant Activity of Barley Leaf. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* doi: 10.3839/jksabc.2010.104 53:685-590.

## CAPÍTULO II. CALIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO *in vitro* DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE)

### RESUMEN

La calidad, intensidad y duración de la luz afectan el desarrollo vegetal, porque promueven diferentes respuestas fisiológicas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de diferentes espectros de iluminación sobre el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. Plántulas de tres meses de edad se cultivaron en frascos de vidrio con 20 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog más tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) a un pH de 5.7, sin fitohormonas. Se incubaron en los tratamientos con LEDs rojo y azul en proporción 3:1, 2:2 y 1:3, LEDs blancos y luz blanca fluorescente (testigo) con seis repeticiones, el diseño experimental fue completamente al azar; la unidad experimental consistió de 30 plántulas. Las longitudes de onda fueron: rojo de 590 a 670 nm, azul de 430 a 480 nm y blanca de 400 a 700 nm; el flujo de fotones fotosintéticos se ajustó a  $31 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en todos los tratamientos. Con los datos se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compraron con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Las variables evaluadas fueron longitud de plántula y raíces, número de hojas y raíces, materia fresca y seca, y contenido de clorofila *a*, *b* y total. Los resultados mostraron que la iluminación con LEDs blancos fue más eficiente ( $p \leq 0.05$ ) en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *L. Autumnalis* con valores del doble o más de acumulación de clorofila *a*, *b* y total, y hasta 2% más acumulación de biomasa, en comparación con los demás tratamientos. En *O. tigrinum* la luz LED blanca indujo el desarrollo de plantas vigorosas color verde intenso, sin daño por fotoxidación. Se confirmó que los LEDs son una eficaz alternativa para para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas de *O. tigrinum* y *L. autumnalis*.

Palabras clave: Desarrollo *in vitro*, plántulas, irradiación dirigida *in vitro*, LEDs.

## SUMMARY

The quality, intensity and duration of light affect plant development, because they promote different physiological responses. The objective of this research was to evaluate the influence of different spectra of illumination on the *in vitro* development of plantlets of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*. Seedlings from three months of age were cultured in glass jars with 20 mL of culture medium Murashige and Skoog (MS) plus thiamine ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sucrose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) at a pH of 5.7, without phytohormones. Were incubated in the treatments with LEDs of red and blue in the ratio 3:1, 2:2 and 1:3, white LEDs and white fluorescent light (witness) with six repetitions, the experimental design was completely random, the experimental unit consisted of 30 seedlings. The wavelengths were: red of 590 to 670 nm, blue 430 to 480 nm, and white (400 to 700 nm); the photosynthetic photon flux was adjusted to  $31 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in all treatments. With the data we conducted an ANDEVA and the averages of the treatments were purchased with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The variables evaluated were length of seedling and roots, number of leaves and roots, raw fresh and dry, and contents of chlorophyll a, b and total. The results showed that the illumination with white LEDs was more efficient ( $p \leq 0.05$ ) in the *in vitro* development of seedlings of *L. Autumnalis*, with values of double or more of accumulation of chlorophyll a, b and total, and up to 2% more accumulation of biomass, in comparison with the other treatments. In *O. tigrinum* is the white LED light induced the development of plants that are vigorous, deep green color, without damage by photooxidation. It was confirmed that the LEDs are an effective alternative to the growth and development of *in vitro* seedlings of *O. tigrinum* and *L. autumnalis*.

Key words: *In vitro* development, seedlings, irradiation directed, LEDs

## I. INTRODUCCIÓN

En México se reconocen más de 1,200 especies y subespecies de orquídeas y se ubican al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico a las del Golfo, en regiones de hasta 3,500 msnm (Espejo y López-Ferrari, 1998). *Oncidium* y *Laelia* son dos géneros de orquídeas distribuidas en México y tienen alto valor comercial. La belleza de sus flores las hace muy atractivas, por lo cual en las poblaciones silvestres se extraen ejemplares de manera ilegal para satisfacer la creciente demanda de los mercados. Lo anterior, aunado a la deforestación de su hábitat y a cambios en el uso de suelo, son las causas principales de la disminución de sus poblaciones silvestres (Szeszko, 2011). La reproducción *in vitro* o micropropagación vegetal es una técnica viable para la multiplicación masiva de plantas y se usa para la propagación y preservación de orquídeas nativas importantes, como *Laelia* y *Oncidium* (Lee *et al.*, 2007; Mengxi *et al.*, 2011).

En un laboratorio de micropropagación comercial, el control de las condiciones físico-químicas, nutricionales y de ambiente (temperatura, humedad y luz) son factores críticos (Loberant y Altman, 2010), ya que determinan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Para la fijación de carbono, las plantas usan la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que está en el intervalo de 400 a 700 nm (Huertas, 2008) y corresponde a los espectros azul y rojo absorbidos por los vegetales. La combinación del resto de espectros se refleja y genera en conjunto una tonalidad que les da el color verde. Por esto, al mejorar la calidad e intensidad de la luz se acelera el desarrollo de las plantas, sobre todo cuando se iluminan al irradiarlas con las longitudes roja y azul del espectro (Casierra-Posada *et al.*, 2011).

La fuente de luz tradicional usada en cultivo *in vitro* son las lámparas tubulares fluorescentes (LTFs) (Lin *et al.*, 2011) que emiten un espectro amplio, por lo cual los efectos fisiológicos en

los vegetales son poco específicos (Gomes *et al.*, 2010). Su uso en un laboratorio de cultivo de tejidos representa 65 % del costo total de electricidad (Ruey-Chi y Wei, 2004) y provee las longitudes de onda innecesarias para las plantas. Por lo tanto, se debe buscar fuentes alternativas de energía y formas de iluminar los cultivos más eficientes (Loberant y Altman, 2010).

Los diodos emisores de luz (LEDs) tienen un potencial de uso como fuente de luz en la micropropagación (Loberant y Altman, 2010). Sus ventajas son la conversión eficiente de energía, su volumen pequeño, una vida más larga, el acceso a longitudes de onda específicas, que permiten eficientizar la fotosíntesis (Gomes *et al.*, 2009) y ajustar la intensidad/calidad de luz; además, sus emisiones térmicas son bajas, su costo de mantenimiento es bajo y protegen el medio ambiente al disminuir las emisiones de CO<sub>2</sub> (Young *et al.*, 2010). En la micropropagación la luz LED roja generalmente se asocia con el crecimiento de las plantas (alargamiento de entrenudos), como se observó en *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011) y con la baja concentración de pigmentos fotosintéticos probada en *Dendrobium officinale* (Lin *et al.*, 2011).

Existe muy poca información disponible acerca del efecto del espectro azul sobre el metabolismo de plantas superiores. Frecuentemente se le relaciona con el crecimiento vigoroso, la diferenciación y los contenidos altos de clorofila y carotenoides en plantas *in vitro* (Lin *et al.*, 2011; Mengxi *et al.*, 2011).

El efecto de la luz LED sobre las plantas cambia entre especies y su etapa de desarrollo, por lo que es necesario estudiar el efecto de diferentes espectros de luz en cada especie para lograr determinados propósitos: promover o inhibir brotes, raíces, bulbos y controlar floración (Sun-Ja *et al.*, 2004; Raj *et al.*, 2008). Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la calidad de luz favorable, a partir de diferentes combinaciones de luz LED, requerida para el desarrollo óptimo *in vitro* de plántulas de las orquídeas *O. tigrinum* y *L. autumnalis*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

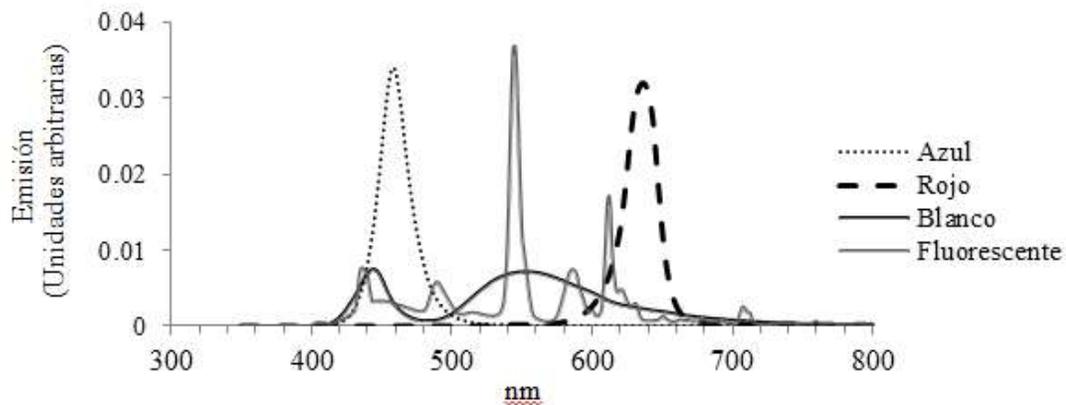
En este estudio se usaron plántulas cultivadas *in vitro* de aproximadamente 1.0 cm de altura y tres meses de edad, obtenidas de la germinación de semillas de plantas de *O. tigrinum* y *L. autumnalis* pertenecientes al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI), bajo resguardo de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

### 2.2 Medio de cultivo

Para el cultivo de las plántulas se usó el medio Murashige y Skoog (MS) más tiamina (0.4 mg L<sup>-1</sup>), inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>) y agar (6 g L<sup>-1</sup>) ajustado a pH 5.7, sin fitohormonas. Este medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C.

### 2.3 Establecimiento del experimento

Se usaron frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio MS, a los cuales se colocaron 30 plántulas por recipiente, el procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar. Los frascos, etiquetados, se incubaron en cajas de triplay de 0.10125 m<sup>3</sup> pintadas en su interior de color blanco y adaptadas con distintos tipos de LEDs, correspondientes a los tratamientos en estudio. Los paneles LED se construyeron con focos genéricos individuales, color rojo, azul y blanco, sobre bases de aluminio, conectadas a una fuente con salida de 12 V para conectarse a la toma de corriente. La lámpara tubular fluorescente utilizada fue de la marca “Phillips” Las longitudes de onda emitidas por las fuentes (Figura 1) se midieron con un espectro radiómetro de marca “Advanced Spectral Device”. La intensidad lumínica se determinó con un analizador infrarrojo de gases (IRGA-6400), fue de 31±2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, con fotoperiodo de 16 h y temperatura promedio de 25 °C.



**Figura 1. Características de las longitudes de onda emitidas por focos LED (azul, rojo y blanco) y lámpara fluorescente, medidas con un espectro radiómetro de marca “Advanced Spectral Device”.**

#### **2.4 Diseño experimental y tratamientos**

Los tratamientos y la descripción de los mismos se presentan en el Cuadro 1. El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con seis repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco con 30 plántulas.

**Cuadro 1. Lista de tratamientos para evaluar el efecto de la calidad de la luz LED en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	Panel LED (rojo y azul 3:1)
2	Panel LED (rojo y azul 2:2)
3	Panel LED (rojo y azul 1:3)
4	Panel LED (blanca)
5 (testigo)	Lámparas blancas fluorescentes

## 2.5 Variables evaluadas

Longitud de plántula y de raíz (cm). Se midió la distancia entre la base y el ápice de la plántula o de la raíz, en su caso, con papel milimétrico, en 10 plántulas de cada tratamiento y repetición.

Número de hojas y raíces. Como en el caso anterior, también se registraron en 10 plántulas por tratamiento y repetición.

Peso fresco de plántulas (mg). 10 plántulas de cada tratamiento y repetición, se pesaron en una balanza analítica digital marca OHAUS®.

Materia seca de plántulas (%). Se determinó a partir de una muestra de 100 mg de tejido fresco de las plántulas de cada tratamiento y repetición, mediante el método gravimétrico. El secado se llevó a cabo en una estufa marca FELISA, a 70 °C durante 72 h. Las muestras secas se pesaron en una balanza analítica digital marca OHAUS® y los resultados se expresaron como porcentaje de materia seca en proporción a su peso fresco.

Contenido de pigmentos en las plántulas ( $\text{mg g}^{-1}$ ). La concentración de clorofila *a*, *b* y total se determinó en muestras de 100 mg de cada tratamiento y repetición, mediante su extracción de las hojas y su medición espectrofotométrica (Porra *et al.*, 1989). Las hojas se colocaron en frascos de vidrio con 3 mL de N-Dimetilformamida cubiertos con papel aluminio, los cuales se almacenaron a 4 °C durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se colocó 1 mL de muestra en una celda para medir su absorbancia en un espectrofotómetro JENWAY 6320D; las longitudes de onda utilizadas en la medición fueron: 664 nm para clorofila *a* y 647 nm para clorofila *b*. Los datos de absorbancia se utilizaron para calcular la concentración de cada una de las clorofilas con las siguientes ecuaciones: clorofila *a* =  $12.70 (A_{664}) - 2.97 (A_{647})$ ; clorofila *b* =  $20.70 (A_{647}) - 4.62 (A_{664})$  y clorofila total =  $17.90 (A_{647}) - 8.08 (A_{664})$ .

Porcentaje de necrosis y de plántulas blancas. Se contabilizaron el número de plantas necróticas, blancas y normales en cada frasco y tratamiento de *Oncidium tigrinum*; con base en estos datos se determinaron las proporciones de plantas afectadas con respecto al total.

El registro de variables en *O. tigrinum* se realizó 30 d después de iniciar los tratamientos, mientras que para *L. autumnalis* fue a los 90 d.

## **2.6 Análisis de datos**

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) usando SAS versión 9.0. Para ilustrar mejor las comparaciones de medias entre tratamientos, se usó el software R versión 3.1.1, que permite observar gráficamente las diferencias. Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos se aplicó la prueba Shapiro (R Core Team, 2014).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Desarrollo de *Oncidium tigrinum*

No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en los contenidos de clorofila *a*, *b* y total, ni en el peso de materia fresca y el número de hojas en las plántulas de *O. tigrinum* (Figura 2). Aunque era de esperarse que las plántulas expuestas a los espectros rojo y azul tuvieran mayor concentración de pigmentos y peso fresco; debido a: 1) que la luz influye considerablemente en la multiplicación celular y el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* (Gomes *et al.*, 2009), 2) las clorofilas *a* y *b* tienen su máxima absorción en el rango de azul y rojo (Pimentel *et al.*, 2007) y 3) que contrario a los resultados aquí obtenidos, Mengxi *et al.* (2011) en *Oncidium* encontró que la luz azul incrementó la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y total).



**Figura 2.** Plántulas *in vitro* de *Oncidium tigrinum* irradiadas durante 30 días con diferentes combinaciones de luz: T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente).

En la longitud de plántulas no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos, a excepción de la significancia entre el T2 (rojo y azul 2:2) y el T3 (rojo y azul 1:3) (Cuadro 2). La iluminación rojo y azul 1:3 generó plantas hasta 0.46 cm más grandes con respecto al tratamiento rojo y azul 2:2, debido a la influencia del color azul, que induce la multiplicación celular *in vitro* (Gomes *et al.*, 2009). Contrario a lo aquí observado, Oliveira *et al.* (2009) en plantas de *Zantedeschia aethiopica*, encontraron que la luz azul indujo la pérdida de dominancia apical, originando plantas pequeñas.

**Cuadro 2. Efecto de diferente calidad de luz en la longitud de plántula y de raíz, número de raíces y porcentaje de materia seca de plántulas de *O. tigrinum in vitro*.**

Tratamiento	Longitud de plántula (cm)	Longitud de raíz (cm)	Número de raíces	Materia seca (%)
1. LEDs rojo y azul 3:1	1.42ab	0.03bc	0.30ab	12.2a
2. LEDs rojo y azul 2:2	1.18b	0.02c	0.23b	11.0ab
3. LEDs rojo y azul 1:3	1.64a	0.13abc	0.53ab	8.16b
4. LEDs blancos	1.56ab	0.21 <sup>a</sup>	0.93ab	8.8ab
5. Luz blanca fluorescente	1.57ab	0.16ab	1.03a	10.0ab
DMS	0.44	0.13	0.74	3.4

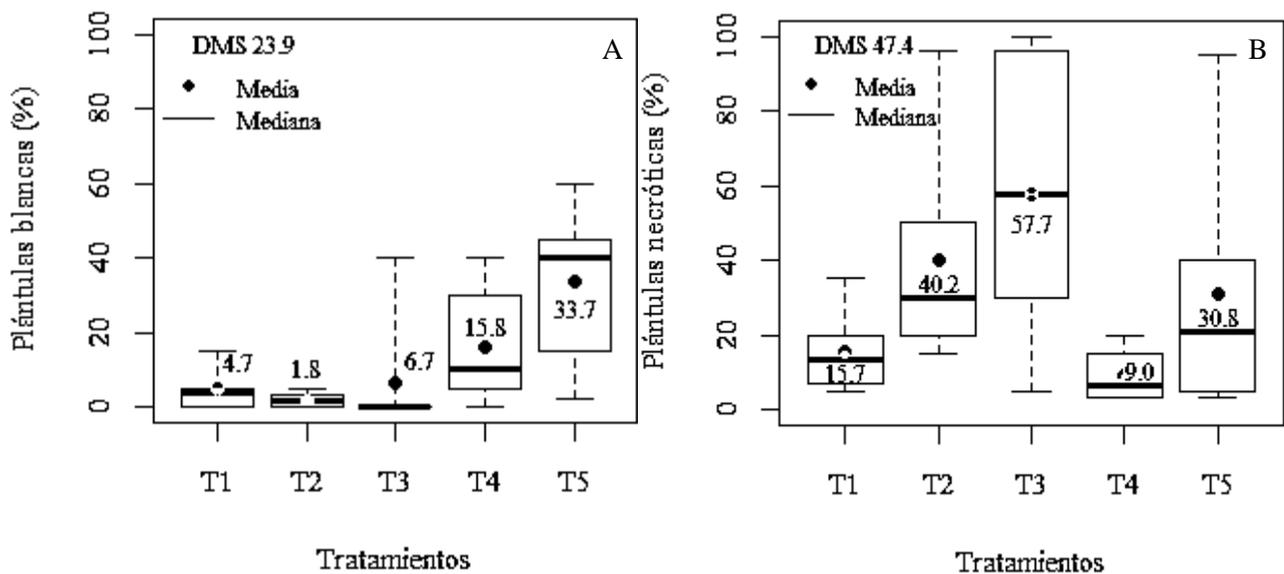
Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes ( Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La inducción de raíces y su longitud fue favorecida por los tratamientos de luz blanca, tanto fluorescente (T5) como con LEDs (T4) (Cuadro 2); esto podría deberse a la amplitud de emisión de su espectro, desde los 400 a 700 nm, por lo que activan efectivamente todos los pigmentos

receptores de luz en las plantas *in vitro* para inducir morfogénesis (Lazo y Ascencio, 2010; Oliveira *et al.*, 2009). Los resultados aquí obtenidos, concuerdan con lo señalado por Gomes *et al.* (2009) en *Cattleya loddigessi*, donde la longitud de raíces iluminadas con luz blanca fue hasta 1.73 cm mayor que con iluminación roja y azul; sin embargo, difieren con lo observado por Lee *et al.* (2011) en *Paphiopedilum*, donde la mejor calidad de luz para el desarrollo de raíces fue la roja y azul.

El mayor porcentaje de materia seca (12.2%) por tratamiento se obtuvo con el T1 (rojo-azul 3:1) estadísticamente superior al T3 (rojo-azul 1:3) al cual superó con 4% de biomasa (Cuadro 2), y fue estadísticamente igual al T2, T4 y T5, probablemente por la influencia de la longitud de 620 a 670 nm (roja), misma que también emiten en mayor proporción respecto a la azul los tratamientos antes mencionados, donde la clorofila *a* y *b* presentan su máximo pico de absorción de luz, sin la interferencia de otros pigmentos (Pimentel *et al.*, 2007) lo que aumenta la acumulación de biomasa. Resultados similares se observaron en *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011), *Dendrobium officinale* (Lin *et al.*, 2011) y *Paphiopedilum* (Lee *et al.*, 2011), donde la luz roja promovió elevados porcentajes de materia seca, como en este estudio.

En *O. tigrinum* el menor porcentaje de plántulas blancas (1.8%) se observó en el tratamiento T2 con luz roja y azul (2:2), significativamente igual a los T1, T3 y T4, todos, diferentes al T5 (testigo) con el cual se registró 33.7% de plántulas blancas (Figura 3A). Por lo que se infiere que esta especie es fotosensible al espectro de iluminación incidente y, éste, puede modificar la morfogénesis de las plántulas a través de procesos mediados por los receptores de luz, principalmente en la región roja y azul (Oliveira *et al.*, 2009), además como lo menciona Young *et al.* (2010), la luz blanca fluorescente puede causar estrés a los tejidos *in vitro*.



**Figura 3.** Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en la incidencia de plántulas blancas (A) y necróticas (B) de *Oncidium tigrinum* cultivadas *in vitro*. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Aunque en estudios anteriores no se informa de necrosis de tejidos por efecto de la calidad de luz, en este caso, las combinaciones de luz roja-azul (3:1, 2:2 y 1:3) y la luz fluorescente, se asociaron con los mayores porcentajes de tejidos afectados (hasta 48.7% más); mientras que la iluminación LED blanca presentó 9% de afectación y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (Figura 3B). Lo anterior probablemente se deba a daños por fotoinhibición o fotooxidación, como lo han señalado algunos autores (Gomes *et al.*, 2009 y Casierra-Posada *et al.*, 2011). Los cloroplastos contienen cuatro complejos proteínicos, el citocromo  $b_6f$ , la ATP sintasa y los fotosistemas I y II (PSI y PSII); esto dos últimos son capaces de absorber y transformar la energía fotónica en energía electroquímica redox. En el PSII se encuentra la proteína D1, que tiene la mayor tasa de recambio de todas las proteínas del cloroplasto y está implicada en los primeros pasos de transferencia electrónica fotosintética. Cuando la energía que llega al PSII es excesiva, ocurre daño fotoquímico (fotoinhibición) y la antena LHCII se desensambla a la lamela

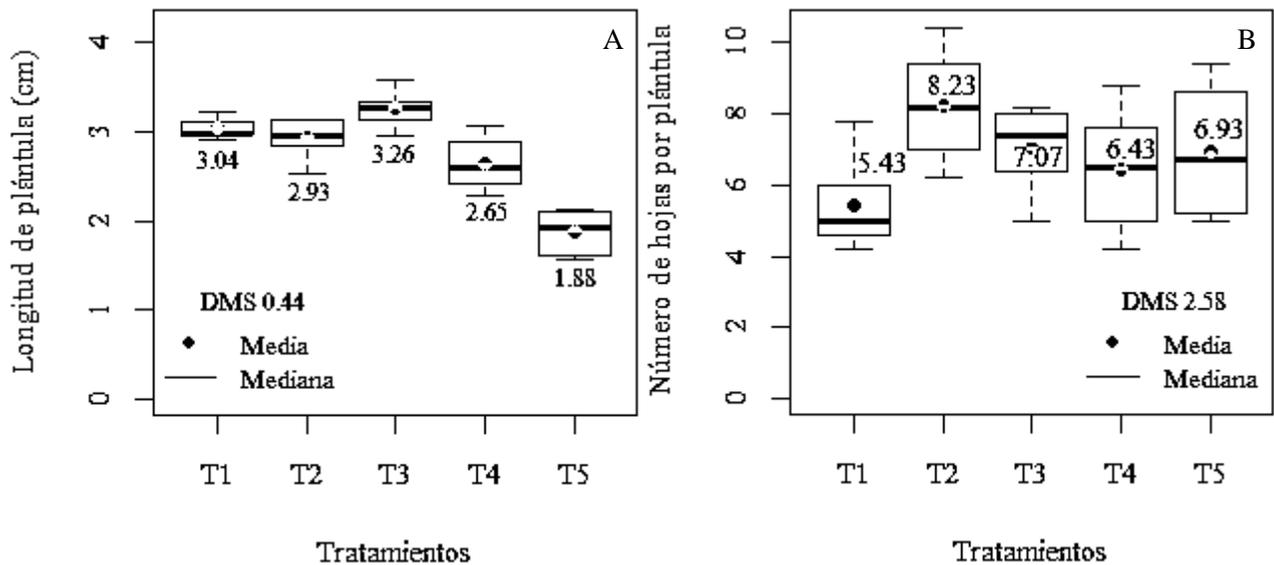
estromática, donde una nueva D1 recién sintetizada sustituye a la inactivada. El PSII reparado, todavía no activo regresa a la lamela grana y se reconecta con la LHCII para reiniciar su actividad foto electroquímica (Azcón-Bieto y Talón, 2003; Dietzel *et al.*, 2015). Cuando el flujo de fotones es constante, como ocurre en el laboratorio micropropagación, el proceso de reparación del fotosistema no es suficiente, por lo que ocurre el daño permanente sobre el tejido.

### 3.2 Desarrollo de *Laelia autumnalis*

Plántulas de *L. autumnalis* (Figura4), hasta 1.38 cm más grandes se obtuvieron con el T3 (rojo y azul 1:3), significativamente diferentes a los tratamientos con luz LED blanca (T4) y fluorescente (T5 testigo) (Figura 5A). Contrario a lo aquí observado, Oliveira *et al.* (2009) afirmaron que en plantas de *Paphiopedilum* existió una pérdida de dominancia apical (plantas pequeñas) por efecto de la luz azul; sin embargo, el mayor tamaño en las plantas de *L. autumnalis* puede explicarse en parte porque la luz azul, aumenta el consumo de agua por las plantas hasta su máxima capacidad celular, lo cual puede incidir en mayor alargamiento de los tejidos (Oliveira *et al.*, 2009), además, induce la multiplicación celular (Gomes *et al.*, 2009).



**Figura 4. Plántulas *in vitro* de *Laelia autumnalis* irradiadas durante 90 días con diferentes combinaciones de luz: T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente).**

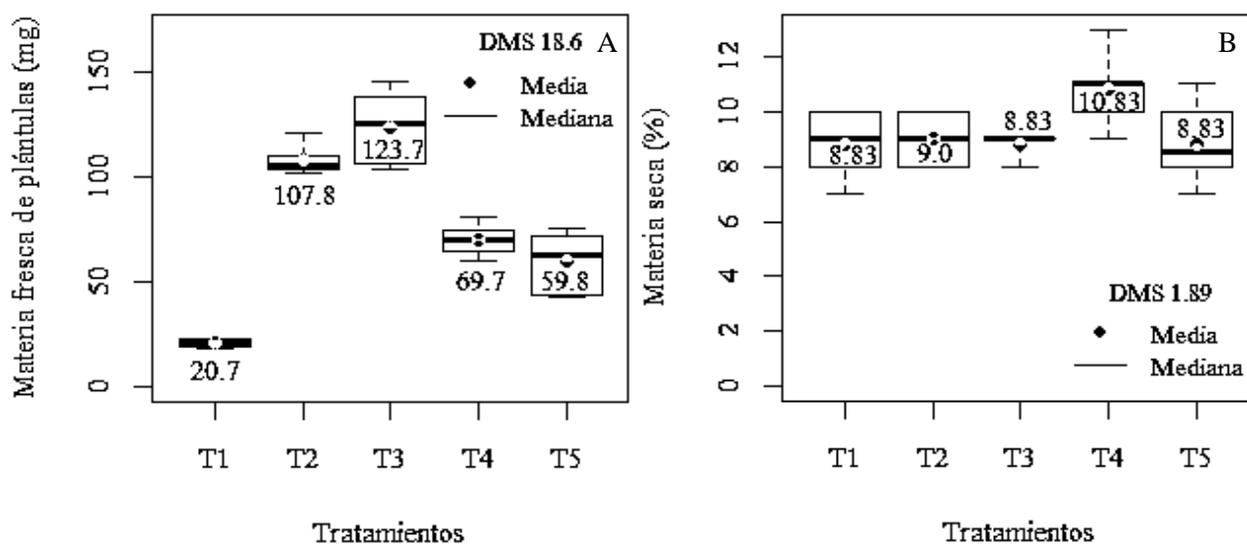


**Figura 5. Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en la longitud (A) y número de hojas por plántula (B) de *Laelia autumnalis in vitro*. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).**

Conforme a los resultados, la luz roja inhibe y la azul induce la formación de hojas de *Laelia autumnalis*; el número de hojas promedio de todos los tratamientos fue mayor de seis, excepto en el T1 (rojo y azul 3:1) que sólo tuvo cinco, aunque estadísticamente sólo resultó diferente del T2 (Figura 5B). Este efecto es reflejo de la baja proporción del espectro azul en el T1, lo cual fue determinante en la inducción de brotes laterales de *Zantedeschia aethiopica*, donde la luz azul indujo hasta 1.5 más hojas por planta (Oliveira *et al.*, 2009).

El mayor peso de materia fresca se obtuvo con el T3 (rojo y azul 1:3) y el T2 (rojo y azul 2:2), que fueron superiores ( $p \leq 0.05$ ) a los demás tratamientos (Figura 6A). Estos resultados difieren de lo reportado por Hamada *et al.* (2011), quienes indican que la luz roja emitida por filtros a  $34 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  de intensidad, promovió la acumulación de peso fresco en plántulas en *Cymbidium*

y *Phalaenopsis*; Nahar *et al.* (2012), atribuyeron el incremento del peso fresco de plantas de *Cymbidium* a la luz verde.



**Figura 6. Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en el peso fresco (A) y materia seca (B) de plántulas *in vitro* de *Laelia autumnalis*. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).**

La luz LED 100 blanca (T4) incrementó la acumulación de materia seca (10.83%) respecto a los demás tratamientos, excepto el T3 (rojo y azul 1:3) (Figura 6B). Esto podría deberse a que las hojas irradiadas con luz blanca absorben longitudes de onda de los 400 a los 700 nm, por lo que se incrementa la tasa de energía luminosa que puede ser captada por los pigmentos de las plantas. Las regiones roja y azul del espectro se absorben en la parte superior de la hoja (Oliveira *et al.*, 2009). La luz roja es recibida por los fitocromos y las clorofilas, región donde éstas presentan su máximo pico de absorción (Schafer y Nagy, 2006). La luz azul es captada por las fototropinas, criptocromos y en menor medida por las clorofilas (Meisel *et al.*, 2011). Por otro lado la luz verde y rojo lejano penetran más profundamente a la hoja (Oliveira *et al.*, 2009), con lo que la

eficiencia fotosintética se maximiza y aumenta su biomasa. Los resultados obtenidos en *L. autumnalis* son similares a los reportados por Lin *et al.* (2011) en *Dendrobium officinale*, quienes encontraron que después de 90 días bajo la influencia de luz fluorescente y la combinación de espectros rojo y azul (1:2), la acumulación de biomasa aumentó.

La luz LED 100 blanca (T4) y el testigo (T5) incrementaron estadísticamente la acumulación de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total respecto a los demás tratamientos (Cuadro 3), con hasta 16.65 mg g<sup>-1</sup> más clorofila total en T1 (rojo y azul 3:1); observándose una disminución en la concentración de éstos pigmentos conforme aumenta la proporción de la luz roja del espectro utilizado. Efecto contrario a lo reportado por Pimentel *et al.* (2007), donde describen que las clorofilas absorben mayoritariamente en esta porción del espectro visible. Esto puede deberse a que *L. autumnalis* es una orquídea preferentemente epífita (Szeszko, 2011), pero que puede adaptarse como litófito expuesta a iluminación total (400 a 770 nm); con longitudes de onda cortas como la azul, verde y roja (<690 nm) que absorbe el fotosistema II (PSII), y largas, como el rojo lejano (700 nm) que capta el fotosistema I (PSI), pues para una máxima eficiencia deben participar ambos fotosistemas (Solarte *et al.*, 2010). También se debe considerar que las hojas absorben fotones principalmente de los espectros azul y rojo, pero también lo hacen en el verde, aunque de manera más débil (Lazo y Ascencio, 2010). Como en este caso, Lee *et al.* (2011) observaron una disminución en el contenido de clorofila total bajo condiciones de luz azul en *Paphiopedilum*; mientras que Lin *et al.* (2011), en *Dendrobium officinale*, encontraron que el espectro azul incrementó más del doble la concentración de pigmentos fotosintéticos.

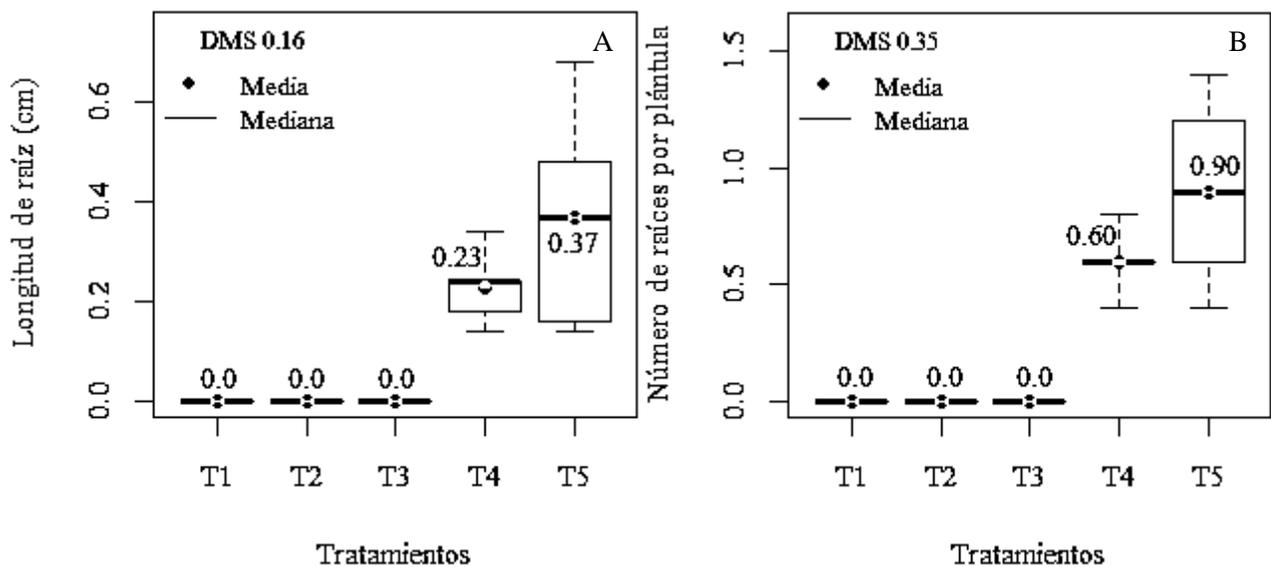
**Cuadro 3. Efecto de diferente calidad de luz en la acumulación de clorofila *a*, *b* y total de plántulas *in vitro* de *L. autumnalis*.**

Tratamiento	Clorofila <i>a</i> (mg)	Clorofila <i>b</i> (mg)	Clorofila total (mg)
1. LEDs rojo y azul 3:1	1.5c	0.9c	2.3c
2. LEDs rojo y azul 2:2	2.3c	1.0bc	3.3c
3. LEDs rojo y azul 1:3	5.6bc	2.0bc	7.5bc
4. LEDs blancos	13.9a	5.0a	19.0a
5. Luz blanca fluorescente	10.2ab	3.5ab	14.0ab
DMS	7.0	2.6	9.5

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes ( Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La longitud y número de raíces de plántulas de *Laelia autumnalis*, se promovieron favorablemente con luz LED blanca (T4) y fluorescente (T5), tratamientos estadísticamente iguales entre sí y diferentes a las combinaciones de rojo y azul 3:1, 2:2 y 1:3, lo cuales no lograron inducir la formación de éstos órganos (Figuras 7A y 7B). La calidad de la luz afecta la morfogénesis de los vegetales al desencadenar una serie de respuestas como alteraciones en su anatomía, alargamiento de plantas, funcionamiento del aparato fotosintético, acumulación de carbohidratos, cambios en las concentraciones de hormonas, inhibición y/o estímulo de brotes laterales, diferenciación de tejidos y generación de raíces (Gomes *et al.*, 2009); la longitud y número de raíces son muy importantes en plantas *in vitro*, ya que de estos órganos dependerá en gran medida su éxito durante la aclimatación (De Melo *et al.*, 2011) Entre los estudios realizados con plantas *in vitro* para determinar la efectividad de diferentes espectros de iluminación en la

inducción de raíces, Nahar *et al.* (2012) en *Cymbidium* y Gomes *et al.* (2009) en *Cattleya loddigessi* encontraron que el espectro de luz verde fue altamente efectivo para este propósito.



**Figura 7. Efecto de los tratamientos de luz T1 (LEDs rojo y azul 3:1), T2 (LEDs rojo y azul 2:2), T3 (LEDs rojo y azul 1:3), T4 (LEDs blancos) y T5 (Luz blanca fluorescente), en la longitud (A) y número de raíces (B) de plántulas *in vitro* de *Laelia autumnalis*. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).**

#### IV. CONCLUSIONES

Se logró promover procesos de la micropropagación de *O. tigrinum* y *L. autumnalis* con el uso de LEDs rojos, azules y blancos, por lo que es posible reemplazar el uso de la luz fluorescente por esta tecnología.

La luz LED blanca fue altamente efectiva como fuente de radiación fotosintética en la micropropagación de estas dos especies de orquídeas, porque indujo el desarrollo de plántulas con altos contenidos de pigmentos fotosintéticos, acumulación biomasa y diferenciación de hojas y raíces.

La luz blanca fluorescente estimuló la formación de pigmentos verdes en plántulas de *O. tigrinum*, originando plantas blancas. La luz roja y azul (1:3) logró inducir la pigmentación casi la totalidad de estas plántulas *in vitro*; sin embargo, esta combinación de luz originó daños en los tejidos por necrosis.

En las dos especies de orquídeas la combinación roja y azul (1:3), desarrolló las plántulas de mayor tamaño.

La luz roja y azul (3:1) indujo los mayores porcentajes de acumulación de materia seca en plántulas de *O. tigrinum*; mientras que para este efecto en *L. autumnalis* la iluminación blanca fue la más efectiva.

En *L. autumnalis*, la luz roja y azul (1:3) promovió la formación de hojas y el mayor peso fresco; mientras que la combinación roja y azul (3:1) tuvo efecto contrario.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Azcón-Bieto J. y M. Talón (2003)** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Tercera edición. McGraw-Hill Interamericana (ed). España. 522 p.
- Casierra-Posada F., J. E. Peña-Olmos y C. Ulrichs (2011)** Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 14: 43-53.
- De Melo F. W., R. M. Suzuki, R. Pescador, R. L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbauy (2011)** Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cell Develop. Biology-Plant* 47: 420-427.
- Dietzel L., C. Glaber, M. Liebers, S. Hiekel, F. Courtois, O. Czarnecki, H. Schlicke, Y. Zubo, T. Borner, K. Mayer, B. Grimm and T. Pfannschmidt (2015)** Identification of early nuclear target genes of plastidial redox signals that trigger the long-term response of *Arabidopsis* to light quality shifts. *Molecular Plant* 8:1237-1252.
- Espejo S. A. y A. R. López-Ferrari (1998)** Las Monocotiledóneas Mexicanas una Sinopsis Florística 1. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Universidad Autónoma Metropolitana-Ixtapalapa. México, DF. 90 p.
- Gomes A. A., M. L. Pasqual, M. Yuriko, E. C. Mauro y H. R. Souza (2009)** Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plantulas de *Cattleya loddigessi* L. (Orchidaceae) micropropagadas. *Ciencia Rural* 39: 2506-2511.

- Gomes da R. P. S., R. O. Pedroso, W. S. Bueno y U. S. Lira (2010)** Diodos emisores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciencia Rural Santa Maria* 40:1922-1928
- Hamada K., K. Shimasaki, Y. Nishimura, H. Oyama-Egawa and K. Yoshida (2011)** Effects of red, blue and yellow fluorescent films on proliferation and organogénesis in *Cymbidium* and *Phalaenopsis* PLB *in vitro*. *Acta Horticulturae* 907: 381-384.
- Huertas L. (2008)** El control ambiental en invernaderos: radiación. *Horticultura Int.* 61: 54-55.
- Lazo J. V. y J. Ascencio (2010)** Efecto de diferentes calidades de luz sobre el crecimiento de *Cyperus rotundus*. *Bioagro* 22: 153-158.
- Lee E. H. E., A. C. Laguna, J. G. Murguía, P. M. Elorza, L. A. Iglesias, B. R. García, F. A. Barredo y N. B. Santana (2007)** Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista UDO Agrícola* 7: 59-67.
- Lee Y. I., W. Fang and C. C. Chen (2011)** Effect of six different LED light qualities on the seedling growth of *Paphiopedilum* Orchid *in vitro*. *Acta Horticulturae* 907: 389-391.
- Lin Y., J. Li, B. Li, T. He and Z. Chun (2011)** Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 329-335.
- Loberant B. y A. Altman (2010)** Micropropagation of plants. *In*: Flickinger, M. C. (ed). Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technol. pp: 1-16.

- Meisel L. A., D. C. Urbina y M. E. Pinto (2011)** Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. *Fisiología Vegetal*. Universidad de la Serena. pp: 1-10.
- Mengxi L., X. Zhigang, Y. Yang and F. Yijie (2011)** Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 1-10.
- Nahar S. J., K. Shimasaki and S. M. Haque (2012)** Effect of different light and two polysaccharides on the proliferation of protocorm-like-bodies of *Cymbidium* cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae* 956: 307-131.
- Oliveira R. M., M. Pasqual, A. B. da Silva y V. A. Rodrigues (2009)** Multiplicao *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. *Ciencia Rural* 39: 2388-2393.
- Pimentel V. C., R. K. Machado e C. L. Salgueiro (2007)** Qualidade de luz e producao de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Rev. Bras. Biocien.* 5: 213-215.
- Porra R. J., A. Thompson and P. Kreidemann (1989)** Determination of accurate extinctions coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standars by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 957: 384-394.
- R Core Team (2014)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. (Consulta: noviembre de 2014).
- Raj P. P., I. Kataoka and R. Mochioka (2008)** Effect of red and blue light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 147-153.

- Ruey-Chi J. and F. Wei (2004)** Growth of potato plantlets *in vitro* is different when provided concurrent vs alternating blue and red light photoperiods. *HortScience* 39: 380-382.
- Schäfer E. and F. Nagy (2006)** Photomorphogenesis in Plants and Bacteria. 3er. Edition. Springer, Netherland. 662 p.
- Solarte M. E., L. Moreno y L. M. Melgarejo (2010)** VI. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. pp: 107-122.
- Squeo F. A. y M. F. León (2007)** III. Transpiración. Fisiología Vegetal. Universidad de la Serena. Squeo y León (Eds) 3: 67-84.
- Sun-Ja K., H. Eun-Joo, H. Jeong-Wook and P. Kee-Yoeup (2004)** Effects of LED on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 101: 143-151.
- Szeszko F. D. R. (2011)** La Orquideoflora Mexiquense. Primera edición. Consejo Editorial de la Administración Pública Estatal. México. 362 p.
- Young L. N. A., L. Mi-Ja, K. Yang-Kil, P. Joung-Chul, P. Hong-Kyu, C. Jae-Seong, H. Jong-Nae, K. Kee-Jong, P. Ki-Hun, K. Jae-Kwon and K. Jung-Go (2010)** Effect of Light Emitting Diode Radiation on Antioxidant Activity of Barley Leaf. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53: 685-590.

## CAPÍTULO III. INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE

### *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis*

#### RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la intensidad de luz sobre la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* obtenidas de cápsulas colectadas en invernadero. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (15 % v/v durante 15 min), se enjuagaron tres veces con agua estéril y se establecieron en cajas Petri con 10 mL del medio de cultivo Murashige y Skoog con tiamina ( $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), el pH se ajustó a 5.7. Posteriormente, se incubaron bajo cuatro tratamientos de iluminación: tres con luz LED blanca de diferente intensidad ( $15, 30$  y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) más un testigo con luz fluorescente blanca ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en diseño completamente al azar con seis repeticiones. Se evaluaron tres etapas de germinación de semillas: imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares. Los resultados obtenidos muestran que durante la imbibición y diferenciación de protocormos *Oncidium tigrinum* es insensible a los tratamientos evaluados; pero durante la formación de primordios foliares la intensidad de luz LED baja ( $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) favorece este proceso (88.33 %). *Laelia autumnalis* también resultó insensible a los tratamientos durante la imbibición; sin embargo, la diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares se incrementó significativamente por el tratamiento con menor intensidad de luz LED ( $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Estos resultados indican que la luz LED blanca de intensidad baja proporciona condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, además de que el uso de lámparas LED disminuye los costos de su micropropagación.

**Palabras clave:** Germinación asimbiótica, luz fluorescente, luz LED, Orquídeas.

## SUMMARY

The aim of the present research was to evaluate the effect of the intensity of the light on asymbiotic germination of seeds of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis* obtained from capsules collected in the greenhouse. The seeds were disinfested with sodium hypochlorite, commercial (15 % v/v for 15 min), which they rinsed three times with sterile water and were established in Petri dishes with 10 mL of culture medium Murashige and Skoog (MS) with thiamine ( $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sucrose ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and agar ( $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), the pH was adjusted to 5.7. Subsequently, incubated under four treatments lighting: three white LED light of different intensity ( $15$ ,  $30$  and  $60 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) over a witness with white fluorescent light ( $30 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), in completely randomized design with six repetitions. We evaluated three stages of seed germination: imbibition, differentiation of protocorms and formation of leaf primordia. The results obtained show that during the imbibition and differentiation of protocorms *Oncidium tigrinum* is insensitive to the treatments evaluated; but during the formation of leaf primordia, the light intensity of LED is low ( $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) favors this process (88.33 %). *Laelia autumnalis* was also insensitive to the treatments during the imbibition; however, the differentiation of protocorms and formation of leaf primordia was significantly increased by the treatment with a lower intensity of LED light ( $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). These results indicate that the white LED light of low intensity provides optimal conditions for the *in vitro* germination of seeds of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*, in addition to the use of LED lamps reduces the cost of micropropagation.

Key words: Asymbiotic germination, fluorescent light, LED light, Orchids.

## I. INTRODUCCIÓN

*Oncidium* y *Laelia* son dos géneros de orquídeas que se distribuyen en México y tienen un alto valor comercial. La belleza de sus flores las hacen muy atractivas, por lo que las poblaciones silvestres están amenazadas debido a su demanda en los mercados; lo anterior aunado a la deforestación de su hábitat y al cambio de uso de suelo, son las principales causas de la disminución de las poblaciones de estas especies (Szeszko *et al.*, 2011).

Las semillas de orquídeas son diminutas y carecen de las reservas de nutrientes requeridos para su germinación y desarrollo de plántulas (Servin *et al.*, 2013); por ello, para su germinación natural necesitan de la asociación simbiótica con un hongo. En el laboratorio de micropropagación, la germinación se puede obtener de manera asimbiótica, lo que permite la conservación y propagación de estas especies, ya que mantiene la variabilidad genética de las poblaciones naturales y no solamente clones, como en el cultivo de tejidos (Flores-Escobar *et al.*, 2008).

Existen factores internos y externos que afectan la germinación; los internos se relacionan con la latencia y la longevidad de las semillas; los externos están directamente relacionados a las condiciones del ambiente (Gomes *et al.*, 2009). La intensidad de luz es uno de los factores más importantes del entorno vegetal, no solo como fuente energética, sino como regulador de procesos fisiológicos en los vegetales (Anders y Essen, 2015). Aunque el material vegetal *in vitro* tiene baja habilidad fotosintética, la presencia o ausencia de luz modifica en gran medida el crecimiento y desarrollo de las plantas (De Melo *et al.*, 2011; Nguy-Robertson *et al.*, 2015). Además de las clorofilas, responsables de la absorción de las longitudes de onda utilizadas en la fotosíntesis (azul de 440-495 nm y rojo de 625-700 nm), las plantas poseen otros pigmentos sensibles a diferentes longitudes de onda. La luz azul (380-440 nm) se recibe por las fototropinas y los criptocromos (Stroch *et al.*, 2015), la roja (625-700nm) por los fitocromos (Anders y Essen,

2015) y se ha señalado la presencia de un compuesto a base de zeaxantina como receptor de luz verde (495-570) (Casierra-Posada *et al.*, 2011; Esteban *et al.*, 2015).

Las lámparas tubulares fluorescentes son la fuente de luz tradicional para el cultivo *in vitro*. Aunque proporcionan luz para la fotosíntesis, su costo energético es alto ya que proveen de longitudes de onda innecesarias para las plantas durante este proceso y sus efectos fisiológicos en los vegetales son poco específicos (Kurilcik *et al.*, 2008). Esto crea la necesidad de encontrar fuentes alternativas de energía y formas más eficientes de iluminar los cultivos (Loberant y Altman, 2010).

Los LEDs blancos usados como fuente de iluminación en la micropropagación de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, inducen efectos fisiológicos estadísticamente iguales a los obtenidos con luz blanca fluorescente (Murillo-Talavera *et al.*, 2015); sin embargo, los LEDs tienen grandes ventajas sobre las lámparas tubulares fluorescentes (Gomes *et al.*, 2010), como son: eficiencia energética alta, volumen pequeño, vida más larga, longitud de onda específica, bajas emisiones térmicas e intensidad y calidad de luz ajustable; además su costo de mantenimiento es bajo y protege el ambiente al reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> (Young *et al.*, 2010).

Se han realizado pocos estudios para comprender el efecto de la intensidad de la luz en el crecimiento y desarrollo de tejidos *in vitro*; pero debido a que todas las especies tienen diferentes necesidades lumínicas (Salazar *et al.*, 2013), es necesario conocer las condiciones óptimas para el desarrollo de cada especie. Dada la falta de información sobre el uso de esta tecnología en la germinación de semillas, esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de determinar el efecto de la intensidad de luz en la imbibición, germinación y formación de protocormos *in vitro* de semillas de las orquídeas *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Como material biológico base se utilizaron semillas de cápsulas cerradas provenientes de plantas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*, pertenecientes al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos, bajo resguardo de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

### 2.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina ( $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) el pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizar el medio en autoclave por 15 min a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.3 Establecimiento del experimento

Las semillas se desinfectaron mediante una inmersión en hipoclorito de sodio comercial (15 % v/v) durante 15 min y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Después, en una jeringa de 5 mL, se depositaron 0.8 mL de semillas con 3 mL de agua estéril y en la campana de flujo laminar, se colocó una gota del contenido de la jeringa en cajas Petri de 60 x 15 mm que contenían 10 mL del medio MS. Las cajas Petri etiquetadas se incubaron a temperatura promedio de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y fotoperiodo de 16 h.

### 2.4 Tratamientos evaluados y diseño experimental

La relación de tratamientos de este experimento, así como una breve descripción de los mismos se presentan en el Cuadro 1.

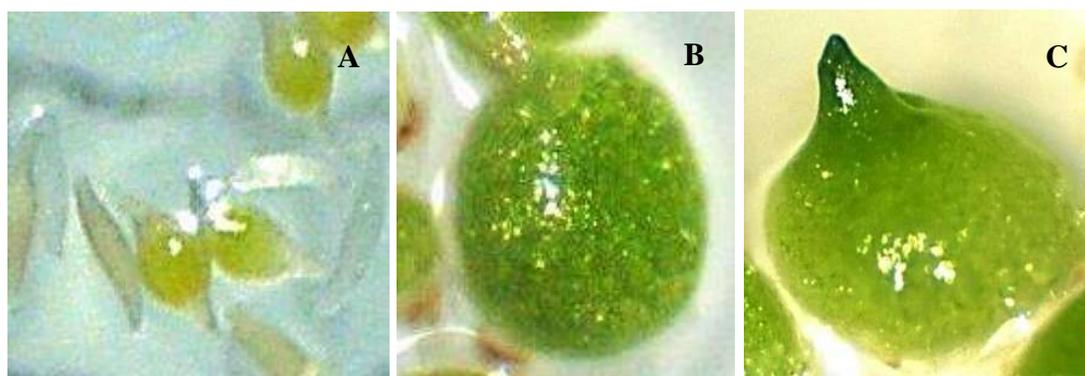
**Cuadro 1. Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto de la intensidad de la luz, en la germinación *in vitro* de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz LED blanca
2	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz LED blanca
3	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz LED blanca
4 (testigo)	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz fluorescente

El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con seis repeticiones, donde la unidad experimental fue 1 cm<sup>2</sup> de área de las cajas Petri con semillas.

### 2.5 Etapas de germinación de semillas

La germinación de las semillas para su estudio, se dividió en tres etapas: imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares (Figura 1).



**Figura 1. Etapas de germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas. Imbibición (A), diferenciación de protocormo (B) y formación de primordio foliar (C).**

Imbibición. Esta fase se consideró cuando las semillas aumentaron su volumen por absorber agua, aunque conservaron su forma alargada y se tornaron color amarillo cadmio medio.

Diferenciación de protocormos. Esta etapa se consideró a partir de que la testa de las semillas se saturó de agua, el embrión aumentó de tamaño más del doble y su color cambió de amarillo cadmio medio a verde.

Formación de primordios foliares. Esta es la última etapa del proceso de desarrollo de semillas *in vitro* y se consideró a partir de que se observó la formación de un primordio foliar en el ápice del protocormo.

## **2.6 Variables evaluadas**

Se midieron los días al inicio y al final de cada etapa, así como su duración (periodo), porcentajes acumulados y velocidad (por día).

Las mediciones se realizaron dos veces por semana durante 80 días, mediante observaciones y conteos directos con microscopio estereoscópico, en el área ( $1\text{cm}^2$ ) de la caja Petri previamente marcada, para tener la certeza de contar siempre las mismas semillas.

A partir de los porcentajes máximos de cada variable se obtuvo la velocidad de imbibición, diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares, al dividir el valor máximo alcanzado entre el tiempo utilizado (días).

## **2.7 Análisis de datos**

Los datos en porcentaje se transformaron con la función arcoseno  $\sqrt{x}$  (Godoi y Takaki, 2005), para su posterior análisis de varianza y pruebas de medias respectivas ( $P \leq 0.05$ ), con el software SAS 9.0 (SAS, 2004).

Además de representar gráficamente la cinética de las etapas de germinación, para tratar de detectar diferencias en el tiempo, se realizó un análisis estadístico combinado de todas las mediciones de los cuatro tratamientos en un diseño de parcelas divididas, con el programa SAS versión 9.0 (SAS, 2004). Para ilustrar algunas comparaciones de medias entre tratamientos, se utilizó el software “R” versión 3.1.1, que permite observar gráficamente las diferencias (R Core Team, 2014).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Efecto de la intensidad de la luz en la germinación de semillas de *Oncidium tigrinum*

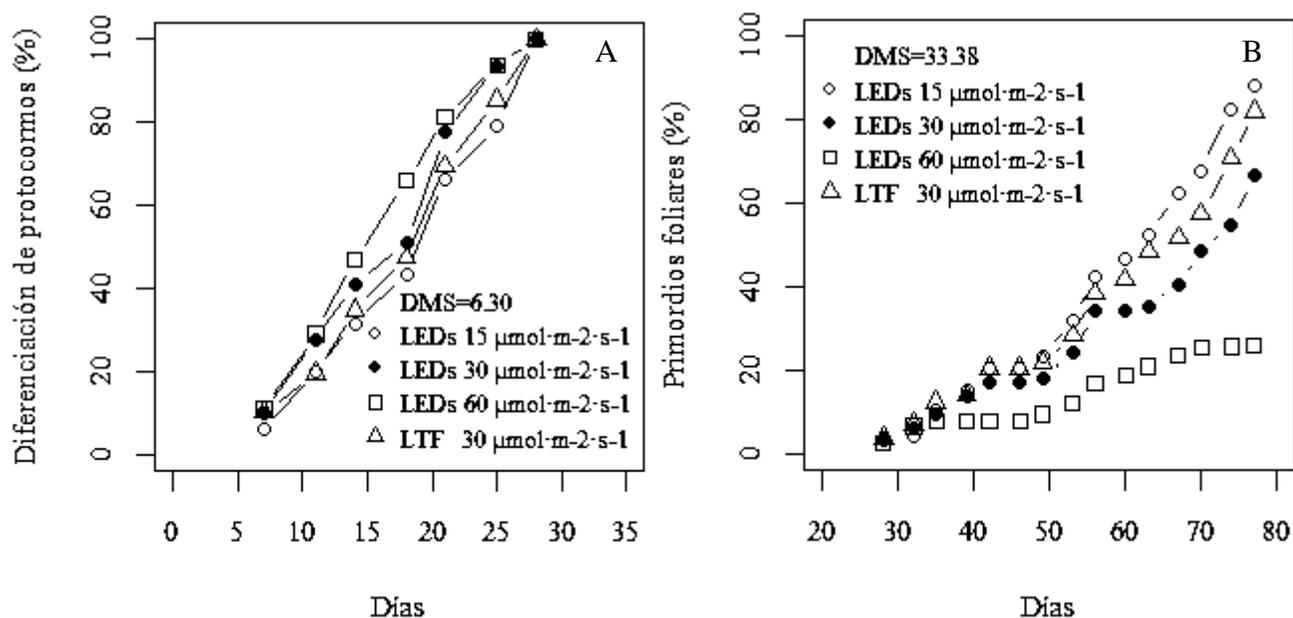
##### 3.1.1 Imbibición de las semillas

Fue evidente que la imbibición de las semillas de *Oncidium tigrinum* no estuvo influenciada por la intensidad de luz a la que fueron expuestas, ya que durante esta etapa solo se rehidratan los tejidos mediante un proceso físico de absorción de agua (Salazar *et al.*, 2013; Rangel-Fajardo *et al.*, 2014). El 100 % de las semillas de esta especie de orquídea alcanzaron el estado de imbibición en todos los tratamientos, 7 días después de la siembra (DDS) sin diferencias significativas entre estos. Estos resultados difieren de los observados por Salazar *et al.* (2013), quienes en *Phalaenopsis* con iluminación blanca fluorescente, solo alcanzaron el 57.33 % de semillas imbibidas.

##### 3.1.2 Diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares

En estas etapas de germinación, los análisis de varianza indicaron diferencias significativas atribuidas a los tratamientos, fechas (DDS) y a la interacción tratamientos por fechas.

En la cinética de diferenciación de protocormos, que corresponde a la representación de la interacción significativa tratamiento por fecha, se observa que ésta inició a los 7 DDS y concluyó a los 28 en todos los tratamientos. Con el tratamiento de mayor intensidad ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se aceleró la diferenciación con relación a los otros tratamientos entre los 12 y 23 días, con diferencias significativas a los 18 días. Estas diferencias no se mantuvieron hasta la última medición, fecha en la cual todos los tratamientos alcanzaron el 100 % de protocormos diferenciados (Figura 2A).



**Figura 2. Cinética de germinación de semillas de *Oncidium tigrinum* cultivadas *in vitro* bajo diferente intensidad de luz LED blanca. A) Diferenciación de protocormos B) Formación de primordios foliares. LTF=Luz blanca fluorescente (testigo). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

En la cinética de formación de primordios foliares se observó que este proceso inició a los 28 DDS prácticamente en todos los tratamientos y se fue incrementando gradualmente hasta superar el 80 % a los 80 DDS en los tratamientos LED con  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y en el testigo; a diferencia del tratamiento LED con  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , que escasamente alcanzó el 20 % de formación de primordios foliares. Al aplicar la prueba de medias se observa que todos los tratamientos, incluso el testigo, incrementaron significativamente la formación de primordios foliares al comparar la última medición contra la primera (Figura 2B). Entre tratamientos, se empezaron a observar diferencias significativas a los 42 DDS, en contra del tratamiento con mayor intensidad, comportamiento que se mantuvo hasta el final. Sin embargo, es importante mencionar que en la

medición final, los dos tratamientos con mayores porcentajes de formación de primordios foliares estadísticamente fueron superiores al resto. Respecto al inicio de la formación de primordios foliares, Flores-Escobar *et al.* (2008) en *Oncidium stramineum*, encontraron que con  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz fluorescente, ésta inició nueve días antes que en este caso.

Los tratamientos afectaron significativamente los días a la formación de primordios foliares final y su duración (periodo), pero no así el día de inicio de esta etapa de desarrollo, que sucedió a los 28 DDS en los cuatro tratamientos probados. En el tratamiento con  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica, la formación de primordios foliares, la duración y el porcentaje de desarrollo, resultaron significativamente menores que los demás tratamientos (Cuadro 2). Se infiere que el alto flujo de fotones sobre los tejidos provocó daños por fotoinhibición (Gomes *et al.*, 2009); ya que el proceso de reparación del fotosistema II no es suficiente ante la iluminación constante de un laboratorio de cultivo de tejidos. Los cloroplastos contienen cuatro complejos proteínicos, el citocromo  $b_6/f$ , la ATP sintasa y los fotosistemas I y II (PSI y PSII); esto dos últimos son capaces de absorber y transformar la energía fotónica en energía electroquímica redox. En el PSII se encuentra la proteína D1, que tiene la mayor tasa de recambio de todas las proteínas del cloroplasto y está implicada en los primeros pasos de transferencia electrónica fotosintética. Cuando la energía que llega al PSII es excesiva, ocurre daño fotoquímico (fotoinhibición) y la antena LHCII se desensambla a la lamela estromática, donde una nueva D1 recién sintetizada sustituye a la inactivada. El PSII reparado, todavía no activo regresa a la lamela grana y se reconecta con la LHCII para reiniciar su actividad foto electroquímica (Azcón-Bieto y Talón, 2003; Dietzel *et al.*, 2015).

**Cuadro 2. Efecto de la intensidad de luz en la formación de primordios foliares de semillas de *Oncidium tigrinum* y el tiempo requerido para lograrlo.**

Tratamiento	Primordios foliares		
	Formación (%)	Final (d)	Periodo (d)
1) LEDs blancos a 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	88.33a	76.00a	48.00a
2) LEDs blancos a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	66.83a	77.00a	49.00a
3) LEDs blancos a 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	25.83b	53.83b	25.83b
4) Luz fluorescente a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	82.17a	76.50a	48.50a
DMS	33.10	10.04	10.04

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

### 3.2 Efecto de la intensidad de la luz en la germinación de semillas de *Laelia autumnalis*

#### 3.2.1 Imbibición de las semillas

El 100 % de las semillas de *Laelia autumnalis* alcanzaron el estado de imbibición en todos los tratamientos, a los 11 DDS, sin diferencias significativas entre éstos. Este porcentaje alto de desarrollo en esta etapa no está relacionado con los tratamientos probados, ya que durante la imbibición la testa de la semilla se reblandece, por lo que permite la absorción de agua al interior de la semilla; sin embargo, la testa de las semillas de orquídeas son impermeables, lo que dificulta el inicio de esta fase (Salazar *et al.*, 2013). Por tal motivo el éxito de esta fase *in vitro* depende directamente de la cantidad de agua disponible en el medio de cultivo (Vasudevan y Staden, 2010), aunque Salazar *et al.* (2013) afirman que el NaOH utilizado para la desinfección de la semilla previa a su incubación en el medio de cultivo, es un compuesto que estimula este proceso, mediante la erosión de la cubierta de la semilla y el aumento en la permeabilidad del oxígeno.

### 3.2.2 Diferenciación de protocormos y formación de primordios foliares

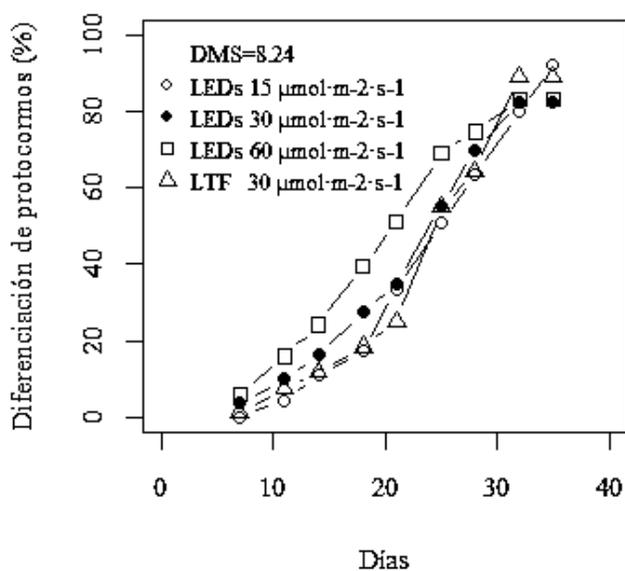
En estas etapas de germinación, los análisis de varianza indicaron diferencias significativas atribuidas a los tratamientos, fechas (DDS) y a la interacción tratamientos por fechas.

En la diferenciación de protocormos, se observó que ésta inició a los 7 DDS y concluyó a los 32 en los tratamientos con LED a 30, 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , mientras que los tratamientos con LED a 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y luz fluorescente a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  el inicio fue a los 11 y 9.6 DDS, respectivamente (Cuadro 3). Con el tratamiento de mayor intensidad (60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se aceleró significativamente la diferenciación de protocormos con relación a los otros tratamientos a partir del día 18, manteniendo este comportamiento hasta el día 25. Estas diferencias no se mantuvieron hasta la última medición, fecha en la el tratamiento con LED a 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  alcanzó 92.33 % de diferenciación, estadísticamente igual al testigo, pero diferente al resto de los tratamientos que obtuvieron en promedio 82.91 % (Figura 3). Este resultado se debe a que la diferenciación de protocormos sucede en función de la temperatura y la calidad e intensidad de la luz, misma que es percibida a través de los fitocromos para proveer de información ecológica del medio ambiente a las semillas, y así generar respuestas (Schafer y Nagy, 2006; Anders y Essen, 2015). La luz favorece la germinación (en esta investigación se ha denominado diferenciación de protocormos) de muchas especies de semillas, designándose a este efecto como fotoblastismo positivo; sin embargo otras especies, como *Laelia autumnalis*, tienen un mejor comportamiento germinativo con intensidades bajas de luz o en ausencia total de ésta, a lo que se designa como fotoblastismo negativo (Alves *et al.*, 2012). Esto podría deberse a su adaptación natural de germinar mediante una asociación simbiótica con un hongo (Flores-Escobar *et al.*, 2008), mismo que recubre la testa de la semilla proporcionando un ambiente sombrío a la semilla, abundante de luz roja y roja lejana y carente de luz azul.

**Cuadro 3. Efecto de la intensidad de luz en el tiempo requerido en la diferenciación de protocormos de semillas de *Laelia autumnalis*.**

Tratamiento	Diferenciación de protocormos		
	Inicio (d)	Final (d)	Periodo (d)
1) LEDs blancos a $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	11.0a	35a	24.0ab
2) LEDs blancos a $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	7.0b	32b	25.0a
3) LEDs blancos a $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	7.0b	32b	25.0a
4) Luz fluorescente a $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	9.6a	32b	22.3b
DMS	1.6	0.88	1.6

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)



**Figura 3. Cinética de diferenciación de protocormos de semillas de *Laelia autumnalis* cultivadas *in vitro* bajo diferente intensidad de luz LED blanca. LTF=Luz blanca fluorescente (testigo). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa un efecto similar entre la iluminación con luz LED blanca a  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y el tratamiento testigo con luz blanca fluorescente con

intensidad de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , al no registrarse entre ellos diferencias significativas para las variables medidas, aun cuando la intensidad LED del tratamiento en cuestión es solo la mitad del testigo. Por esto, se comprueba la eficiencia energética alta de LEDs como fuente de iluminación en el cultivo de tejidos, como fue señalado por Loberant y Altman (2010), además sus emisiones térmicas son bajas por lo que se pueden utilizar más cerca de los tejidos vegetales (Gomes *et al.*, 2010).

Con base en los resultados obtenidos y a diversas investigaciones, se observa que el efecto cambia entre especies de orquídeas, por lo que las condiciones de iluminación que más se asemejan a su medio ambiente natural se reflejarán en un efecto positivo sobre las diferentes fases que integran proceso de germinación. Posiblemente a esto se debe que bajo intensidad de luz fluorescente de  $41 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Flores-Escobar *et al.* (2011) en *Brassia verrucosa* reportaron 57 % de germinación, Salazar-Mercado (2012) en *Cattleya mendeli*, Vasudevan y Staden (2010) en *Phalaenopsis* y Kalimuthu *et al.* (2007) en *Oncidium stramineum* a  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  observaron una germinación de 92, 94 y 47 %, respectivamente.

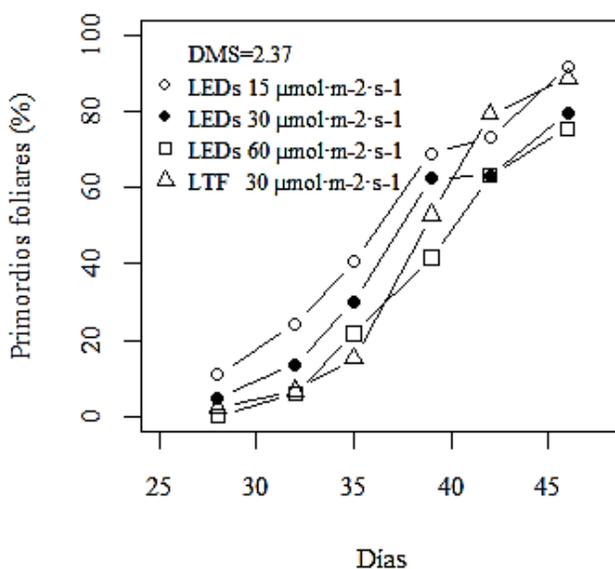
La formación de primordios foliares inició a los 28 DDS en todos los tratamientos, excepto con LED a  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en el que inició a los 32 DDS, por lo que su periodo fue menor (Cuadro 4), ya que los cuatro tratamientos probados terminaron esta fase a los 46 DDS. La formación de primordios foliares alcanzó el 90 % en los tratamientos con LED a  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y luz fluorescente a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; a diferencia de los tratamientos con LED a 30 y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , que no lograron superar el 80 %. Entre los tratamientos, se empezaron a observar diferencias significativas desde el primer día, manteniéndose así hasta el final (Figura 4). Estos resultados muestran que la exposición a elevado flujo de fotones fotosintéticos, provoca daños por fotoinhibición del aparato fotosintético (Gomes *et al.*, 2009), como consecuencia de la

disminución en la eficiencia del fotosistema II por disipación fotoquímica (Casierra-Posada *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2014).

**Cuadro 4. Efecto de la intensidad de luz en el tiempo requerido en la formación de primordios foliares de semillas de *Laelia autumnalis*.**

Tratamiento	Primordios foliares	
	Inicio (d)	Periodo (d)
1) LEDs blancos a $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	28b	18a
2) LEDs blancos a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	28b	18a
3) LEDs blancos a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	32a	14b
4) Luz fluorescente a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	28b	18a
DMS	0.88	0.88

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)



**Figura 4. Cinética de formación de primordios foliares de semillas de *Laelia autumnalis* cultivadas *in vitro* bajo diferente intensidad de luz LED blanca. LTF=Luz blanca fluorescente (testigo). DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

#### IV. CONCLUSIONES

El requerimiento de luz para la germinación fue diferente entre las dos especies de orquídeas.

La imbibición de semillas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* no fue influenciada por la intensidad de luz a la que fueron expuestas.

*Oncidium tigrinum* no es fotosensible a la intensidad de luz durante la etapa fenológica de diferenciación de protocormos; mientras que presenta gran sensibilidad a elevado flujo de fotones durante la formación de primordios foliares.

*Laelia autumnalis* tiene un desarrollo óptimo en condiciones de baja intensidad lumínica, durante la diferenciación de protocormos y la formación de primordios foliares.

Con base en los resultados del presente trabajo, para la germinación *in vitro* de semillas de *O. tigrinum* y *L. autumnalis* se recomienda utilizar iluminación LED blanca a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , debido a que los porcentajes de desarrollo fueron mayores.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Alves G. E. E., A. Ursulino, K. S. Bernado, L. B. Matos and S. M. Santos (2012)** Germination and vigor of *Crataeva tapia* L. seeds in different temperatures and light regimes. *Revista Ciencia Agronómica* 43:138-145.
- Anders K. and L. O. Essen (2015)** The family of phytochrome-like photoreceptors : Diverse, complex and multi-colored, but very useful. *Current Opinion in Structural biology* 35:7-16.
- Azcón-Bieto J. y M. Talón (2003)** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Tercera edición. McGraw-Hill Interamericana (ed). España. 522 p.
- Casierra-Posada F., J. E. Peña-Olmos y C. Ulrichs (2011)** Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 14:43-53.
- Casierra-Posada F., P. J. Nieto y C. Ulrichs (2012)** Crecimiento, Producción y Calidad de flores en calas (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) expuestas a diferente calidad de luz. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 15:97-105.
- De Melo F. W., R. M. Suzuki, R. Pescador, R. L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbauy (2011)** Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47:420-427.

- Dietzel L., C. Glaber, M. Liebers, S. Hiekel, F. Courtois, O. Czarnecki, H. Schlicke, Y. Zubo, T. Borner, K. Mayer, B. Grimm and T. Pfannschmidt (2015)** Identification of early nuclear target genes of plastidial redox signals that trigger the long-term response of *Arabidopsis* to light quality shifts. *Molecular Plant* 8:1237-1252.
- Dong C., Y. Fu, G. Liu and H. Liu (2014)** Growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to LED light sources with different spectra combinations. *Journal of Agronomy and Crop Science* 200:219-230.
- Esteban R., J. F. Morán, J. F. Becerril, J. I. García-Plazaola (2015)** Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany* 119:63-75.
- Flores-Escobar G., I. Gil-Vázquez, M. T. Colinas-León y M. Mata-Rosas (2011)** Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman Ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17: 5-8.
- Flores-Escobar G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez y M. T. Colinas-León (2008)** Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:347-353.
- Godoi S. e M. Takaki (2005)** Efeito da temperatura e a participacao do fitocromo no controle da germinacao de sementes de embaúba. *Brasileira de Sementes* 27:87-90.
- Gomes A. A., M. Pasqual, L. Yuriko, E. C. Mauro e H. R. Souza (2009)** Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plantulas de *Cattleya loddigessi* L. (Orchidaceae) micropropagadas. *Ciencia Rural* 39:2506-2511.

- Gomes da R. P. S., R de O. Pedroso, W. S. Bueno e U. Lira (2010)** Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciencia Rural* 40:1922-1928.
- Kalimuthu K., R. Senthilkumar and S. Vijayakumar (2007)** *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium sp.* (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology*. 6:1171-1174.
- Kurilcik A., R. Miklusite-Canova, S. Dapkuniene, S. Zilinskaite, G. Kurilcik, G. Tamulaitis, P. Duchovskis and A. Zukauskas (2008)** *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes. *Central European Journal of Biology* 3:161-167.
- Loberant B. y A. Altman (2010)** Micropropagation of plants. *In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*. Michael C. Flickinger (ed). Jerusalem, Israel pp: 1-16.
- Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murillo-Talavera M. M., Pedraza-Santos M. E., Gutiérrez-Rangel N., Rodríguez-Mendoza M. N., Lobit P. y Martínez-Palacios A. (2015)** Calidad de luz LED y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Revista Agrociencia* (en prensa).
- Nguy-Robertson A., A. Suyker and X. Xiangming (2015)** Modeling gross primary production of maize and soybean croplands using light quality, temperatura, wáter stress, and phenolgy. *Agricultural and Forest Meteorology* 213:160-172.

**R Core-Team (2014)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. (noviembre de 2014).

**Rangel-Fajardo M. A., L. Córdova-Téllez y E. Cárdenas-Soriano (2014)** Pérdida de la tolerancia a la desecación durante la imbibición-germinación en semillas de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:833-845.

**Salazar M. S. A., A. Z. Amaya y F. R. Barrientos (2013)** Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15:97-105.

**Salazar-Mercado S. A (2012)** Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelti* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronómica* 61:69-78.

**SAS Institute Inc. (2004)** SAS/STAT<sup>®</sup> 9.0 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

**Schäfer E. and F. Nagy (2006)** Photomorphogenesis in Plants and Bacteria. 3er. Edition. Springer, Netherland. 662 p.

**Servin W. P., B. D. Chitra, B. S. Sahaya and S. Moin (2013)** *In vitro* propagation of *Coelogyne breviscapa* Lindl., *Dendrobium aqueum* Lindl., and *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf. via asymbiotic seed germination. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 21:26-32.

**Stroch M., Z. Materova, D. Vrábl, V. Karlicky, L. Sigut, J. Nezval and V. Spunda (2015)** Protective effect of UV-A radiation during acclimation of the photosynthetic apparatus to UV-B treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 96:90-96.

**Szeszko F. D. R. (2011)** La Orquideoflora Mexiquense. Primera edición. Consejo Editorial de la Administración Pública Estatal. México. 362 p.

**Vasudevan R. and J. Staden (2010)** *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Journal Scientia Horticulturae* 123:496-504.

**Young L. N. A., L. Mi-Ja, K. Yang-Kil, P. Joung-Chul, P. Hong-Kyu, C. Jae-Seong, H. Jong-Nae, K. Kee-Jong, P. Ki-Hun, K. Jae-Kwon and K. Jung-Go (2010)** Effect of light emitting diode radiation on antioxidant activity of barley leaf. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53:685-590.

## CAPÍTULO IV. INTENSIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO *in vitro* DE PLÁNTULAS DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis*

### RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de la intensidad de iluminación en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. Se utilizaron plántulas de orquídea de aproximadamente 2.6 (*O. tigrinum*) y 1.4 cm de altura (*L. autumnalis*) provenientes de cultivo *in vitro*, las cuales se establecieron en frascos de vidrio con 40 mL del medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) a pH de 5.7. Éstos, se incubaron con cuatro tratamientos de luz; tres con LED blanca a 15, 30 y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y un testigo con luz blanca fluorescente a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con seis repeticiones y la unidad experimental consistió de un frasco con 30 plántulas. Se evaluó la longitud de plántulas y raíces, el número de hojas, de raíces y de pseudobulbos, así como la materia fresca y seca y el contenido de clorofila *a*, *b* y total. Se realizaron análisis de varianza y pruebas de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Las orquídeas mostraron plasticidad morfológica adaptándose a las condiciones de luz evaluadas. *Oncidium tigrinum* se desarrolla favorablemente con  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de luz LED blanca, que induce mayor longitud, número de hojas y raíces, así como acumulación de pigmentos fotosintéticos y biomasa. En *Laelia autumnalis*,  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de luz LED blanca inducen mayor número y tamaño de raíces; así como los más altos contenidos de clorofila *a*, *b* y total. En ambas especies,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de luz LED blanca promovieron la generación de hojas y la longitud de plántula. El uso de luz LED es altamente eficiente como fuente alternativa de iluminación para el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

Palabras clave: Desarrollo *in vitro*, plántulas, intensidad lumínica, LEDs.

## SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the influence of the illumination intensity on the *in vitro* development of plantlets of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*. We used seedlings of orchid of approximately 2.6 (*O. tigrinum*) and 1.4 cm high (*L. autumnalis*) from *in vitro* culture, which were established in glass vials with 40 mL of culture medium Murashige and Skoog (MS) supplemented with thiamine (0.4 mg L<sup>-1</sup>), inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (6 g L<sup>-1</sup>) at pH of 5.7. These, were incubated with four treatments of light; three with white LED, 15, 30 and 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and a witness, with white fluorescent light at 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . The experimental design used was the completely randomized with six replications and the experimental unit consisted of a flask with 30 seedlings. We evaluated the length of seedlings and roots, number of leaves, roots and pseudobulbs, as well as the stuff fresh and dry, and the contents of chlorophyll *a*, *b* and total. We conducted analyses of variance and means tests (Tukey,  $p\leq 0.05$ ). The orchids showed morphological plasticity to adapt to light conditions evaluated. *Oncidium tigrinum* develops favorably with 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of white LED light, which induces a greater length, number of leaves and roots, as well as accumulation of photosynthetic pigments and biomass. In *Laelia autumnalis*, 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of white LED light to induce a greater number and size of roots; as well as the highest contents of chlorophyll *a*, *b* and total. In both species, 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of white light LED to promoted the generation of leaves and the length of seedling. The use of LED light is highly efficient as an alternative source of lighting for the *in vitro* development of plantlets of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis*.

Key words: *In vitro* development, seedlings, light intensity, LEDs.

## I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran variedad de orquídeas con flores muy atractivas, distribuidas a lo largo y ancho del territorio nacional. *Oncidium* y *Laelia* son géneros de orquídea que enfrentan una disminución en sus poblaciones, debido principalmente a la extracción ilegal de ejemplares, a la pérdida de su hábitat por desastres naturales y al cambio de uso de suelo (Szeszko, 2011).

La micropropagación es una técnica utilizada en cultivos de importancia económica, preservación de especies en vías de extinción y/o en plantas con crecimiento muy lento, como es el caso de las orquídeas; es necesario promover un desarrollo *in vitro* más rápido (Lin *et al.*, 2011) y obtener características morfológicas deseadas en las plantas para cada una de sus etapas (Werbrouck *et al.*, 2012).

Las condiciones nutricionales y de ambiente (temperatura, humedad y luz) de un laboratorio de micropropagación, son factores críticos (Loberant y Altman, 2010); ya que determinan el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Para la fijación de carbono la planta utiliza la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que está en el rango entre 400 a 700 nm (Huertas, 2008) y corresponde a los espectros emitidos por la iluminación blanca, mismos que son absorbidos por las plantas.

La fuente de luz tradicional usada en cultivo *in vitro* es la luz blanca fluorescente (Lin *et al.*, 2011); la cual aporta luz roja y azul, lo que unido a la alta intensidad luminosa activa los fotoreceptores de los tejidos e inducen morfogénesis (Pérez *et al.*, 2012). Su uso en un laboratorio de cultivo de tejidos resulta en 65% del total del costo de la electricidad; por lo que se hace necesario encontrar fuentes alternativas de energía y más eficientes formas de iluminar los cultivos (Loberant y Altman, 2010).

Los diodos emisores de luz (LEDs) tienen un elevado potencial para ser utilizados como fuente de luz en la micropropagación (Gomes *et al.*, 2010), sus ventajas son la conversión eficiente de energía, volumen pequeño, vida más larga, intensidad de luz ajustable y bajas emisiones térmicas (Ming-Chang *et al.*, 2007); además su costo de mantenimiento es bajo y protege el medio ambiente al reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> (Young *et al.*, 2010).

El material vegetal *in vitro* tiene baja habilidad fotosintética (D e Melo *et al.*, 2011); pero al mejorar las condiciones de iluminación aumenta la eficiencia de los fotosistemas I (PSI) y II (PSII); además, manipulando la iluminación también se pueden promover o inhibir brotes, raíces, bulbos y controlar floración, entre otros (Raj *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a que el efecto de la intensidad de luz en las plantas varía entre especies y por la etapa de desarrollo en que se encuentran, se hace necesario estudiar el efecto de diferentes intensidades de luz en estas dos especies, con el objetivo de determinar la intensidad de luz LED blanca adecuada para el desarrollo *in vitro* de plántulas de ambas especies.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* cultivadas in vitro, de 10 meses de edad y aproximadamente 2.6 y 1.4 cm de altura, respectivamente. Estas orquídeas pertenecen al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos y están bajo el resguardo de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan Michoacán.

### 2.2 Medio de cultivo

Para el cultivo de las plántulas se utilizó el medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) más tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) ajustado a pH 5.7; el cual se esterilizó por 15 min a  $121^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Establecimiento del experimento

En la campana de flujo laminar, se colocaron 30 plántulas por recipiente, en frascos de vidrio de 200 mL de capacidad con 40 mL del medio MS. Estos frascos etiquetados se incubaron bajo diferentes intensidades de luz LED blanca, correspondientes a los tratamientos en estudio.

### 2.4 Diseño experimental y tratamientos

La relación de tratamientos de este experimento, así como una breve descripción de los mismos se presentan en el Cuadro 1.

El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con seis repeticiones, donde la unidad experimental consistió de un frasco con 30 plántulas. La temperatura promedio fue de  $25^{\circ}\text{C}$  con fotoperiodo de 16 h.

**Cuadro 1. Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto de la intensidad de la luz en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz LED blanca
2	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz LED blanca
3	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz LED blanca
4 (testigo)	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz fluorescente

### 2.5 Variables evaluadas

Se midieron la longitud de plántulas y raíces, el número de hojas, de raíces y de pseudobulbos, así como la materia fresca y seca, y el contenido de clorofila *a*, *b* y total. El registro de variables se realizó a los 90 días de incubación de las plántulas bajo el efecto de los tratamientos, de la siguiente forma:

Longitud de plántula y de raíz. Se midieron en 10 plántulas de cada unidad experimental, desde la base y el ápice de la plántula o de la raíz, en su caso.

Número de hojas, raíces y pseudobulbos. Se contaron el número total de estos órganos por cada plántula.

Materia seca de plántulas. Se determinó a partir de una muestra de 100 mg de tejido fresco de las plántulas, mediante el método gravimétrico. El secado se llevó a cabo en una estufa marca “FELISA”, a 70 °C durante 72 h. Las muestras secas se pesaron en una balanza analítica digital marca OHAUS®. Los resultados se expresaron como % de materia seca en proporción a su peso fresco.

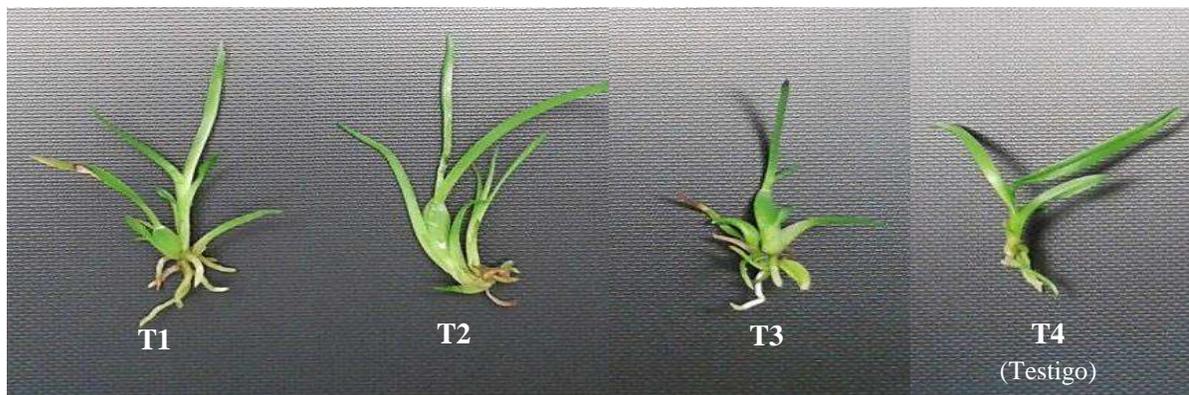
Contenido de pigmentos en plántulas. La concentración de clorofila *a*, *b* y total también se determinó en muestras de 100 mg de hojas, con medición espectrofotométrica (Porra *et al.*, 1989). Las hojas se colocaron en frascos de vidrio con 3 mL de N-Dimetilformamida cubiertos con papel aluminio, los cuales se almacenaron a 4 °C durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se colocó 1 mL de muestra en una celda para medir su absorbancia en un espectrofotómetro JENWAY 6320D; las longitudes de onda utilizadas en la medición fueron: 664 nm para clorofila *a* y 647 nm para clorofila *b*. Los datos de absorbancia se utilizaron para calcular la concentración de cada una de las clorofilas con las siguientes ecuaciones: clorofila *a* = 12.70 ( $A_{664}$ ) - 2.97 ( $A_{647}$ ); clorofila *b* = 20.70 ( $A_{647}$ ) - 4.62 ( $A_{664}$ ) y clorofila total = 17.90 ( $A_{647}$ ) - 8.08 ( $A_{664}$ ).

## **2.6 Análisis de datos**

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y prueba de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004). Para ilustrar mejor las comparaciones de medias entre tratamientos, se usó el software R versión 3.1.1, que permite observar gráficamente las diferencias. Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos se aplicó la prueba Shapiro (R Core Team, 2014).

### III. RESULTADOS

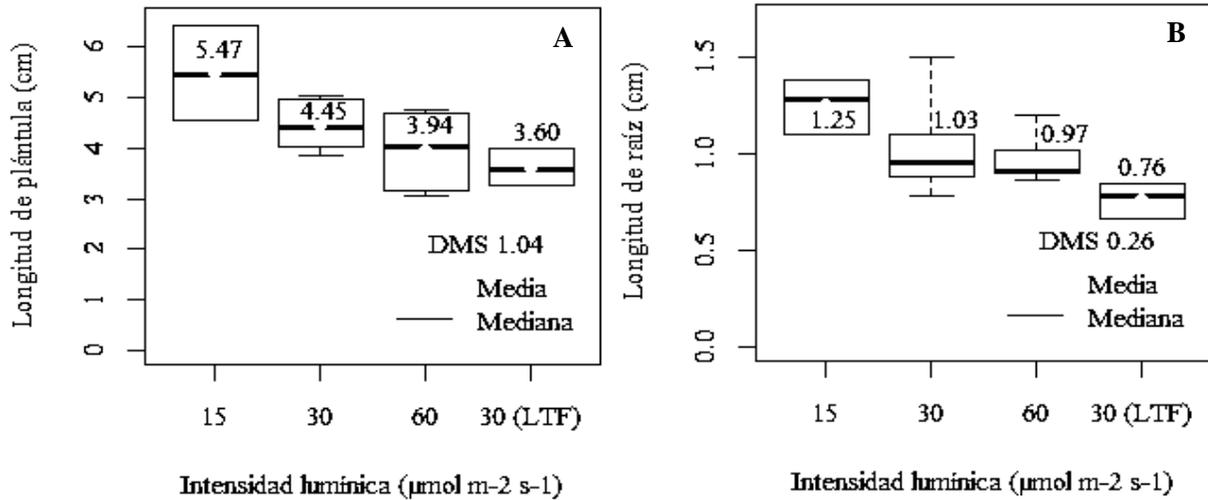
**3.1 En *Oncidium tigrinum*.** Todos los tratamientos tuvieron en promedio el mismo número de bulbos por plántula (1.04), por lo que para esta variable no se detectaron diferencias significativas atribuidas a la intensidad de luz utilizada (Figura 1).



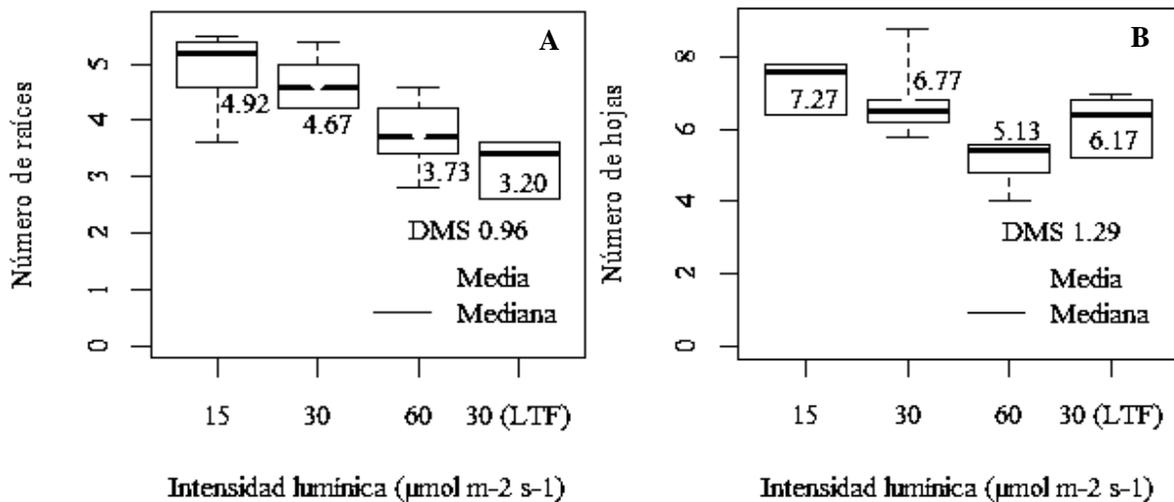
**Figura 1.** Plántulas de *Oncidium tigrinum* iluminadas durante 90 días con cuatro tratamientos de luz: T1 (LED blanca a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T2 (LED blanca a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T3 (LED blanca a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y T4 (Fluorescente blanca a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

La máxima longitud de plántulas (5.47) cm y raíces (1.25 cm), así como el mayor número de raíces (4.92) y hojas (7.27) por plántula (Figuras 2 y 3), se obtuvieron con luz LED a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (T1). Excepto en el número de hojas, todas las diferencias resultaron significativas con relación al testigo (T4). La menor cantidad de hojas (5.13) se registró con el T3, estadísticamente diferente del T1. El incremento del área foliar es una estrategia de las plantas para aumentar la superficie fotosintéticamente activa. Así se mejora la eficiencia en los procesos de captación de energía con el fin de garantizar la producción con intensidades luminosas bajas (Valladares *et al.*, 2004; Casierra-Posada *et al.*, 2011). Debido a que *Oncidium tigrinum* es una planta epífita, que crece en lugares sombríos, con gran cobertura vegetal (Szeszko, 2011), la intensidad lumínica baja ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), es muy probable que haya generado un ambiente similar al natural que

activó los fotoreceptores de los tejidos para inducir morfogénesis (Pérez *et al.* 2012) y producir así la mayor cantidad de hojas y raíces.

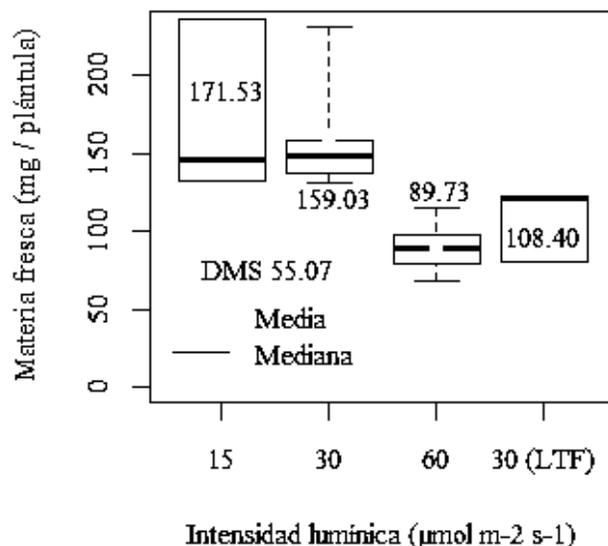


**Figura 2.** Efecto de la intensidad de luz LED blanca en la longitud de plántula (A) y de raíz (B) de *Oncidium tigrinum*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).



**Figura 3.** Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el número de raíces (A) y hojas (B) de plántulas de *Oncidium tigrinum*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

La iluminación con luz LED blanca a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (T1) también indujo el mayor peso fresco de plántulas, con 81.8 mg más que el T3 (Figura 4). Estos resultados, además de deberse a la activación efectiva de los fotorreceptores (Pérez *et al.* 2012), también pueden ser consecuencia de la regulación de la apertura estomática por efecto de la baja intensidad luminosa, que evita la pérdida excesiva de agua a través de la transpiración (Squeo y León, 2007).



**Figura 4. Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el peso fresco de plántulas de *Oncidium tigrinum*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).**

El menor contenido de clorofila *a*, *b* y total se observó con la intensidad más alta (T3), estadísticamente diferente al tratamiento testigo (Cuadro 2); en todos los casos, por la fotoinhibición y/o fotooxidación celular, a causa de la exposición a elevadas densidades de flujo de fotones (Gomes *et al.*, 2009). Las mayores concentraciones de estos pigmentos (*a*:  $11.30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , *b*:  $7.67 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y total:  $18.97 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se registraron con el tratamiento testigo (T4), que resultó estadísticamente igual que T2 y T1.

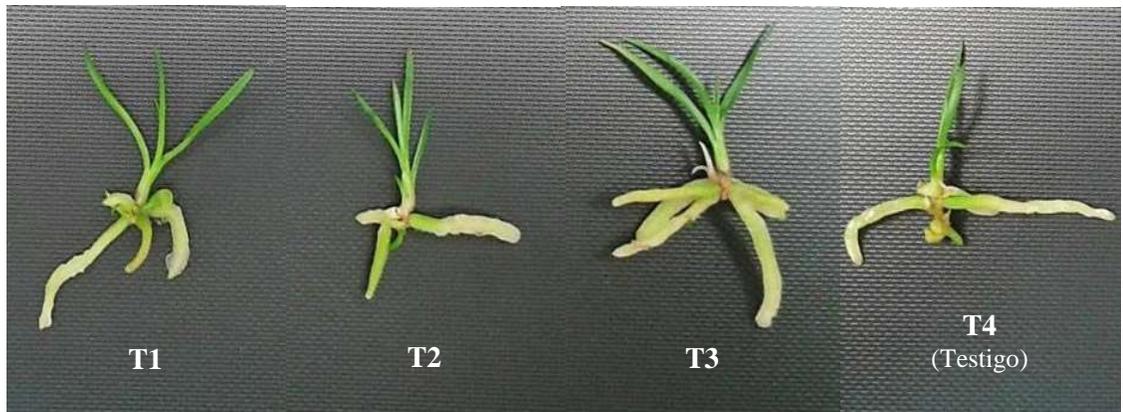
**Cuadro 2. Efecto de la intensidad de luz LED blanca en la acumulación de clorofilas y porcentaje de materia seca de plántulas de *Oncidium tigrinum*.**

Tratamiento	Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i> (mg·g <sup>-1</sup> )	Cl total	Materia seca (%)
1) LEDs blancos a 15 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	8.70b	6.13a	14.82a	9.67a
2) LEDs blancos a 30 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	10.94ab	7.31a	18.24a	8.83ab
3) LEDs blancos a 60 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	4.57c	3.55b	8.12b	10.33a
4) Luz fluorescente a 30 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	11.30a	7.67a	18.97a	8.0b
DMS	2.59	1.79	4.37	1.59

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

Los mayores porcentajes de materia seca se registraron en los tratamientos con LED a 15, 30 y 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, que resultaron estadísticamente iguales entre sí, aunque sólo T1 y T3 fueron significativamente diferentes con el testigo(Cuadro 2). Estos datos demuestran que, como lo señalaron Pimentel *et al.* (2007) y Gomes *et al.* (2009), los LEDs son energéticamente más eficientes que las lámparas fluorescentes y por consecuencia inducen a una acumulación de biomasa mayor.

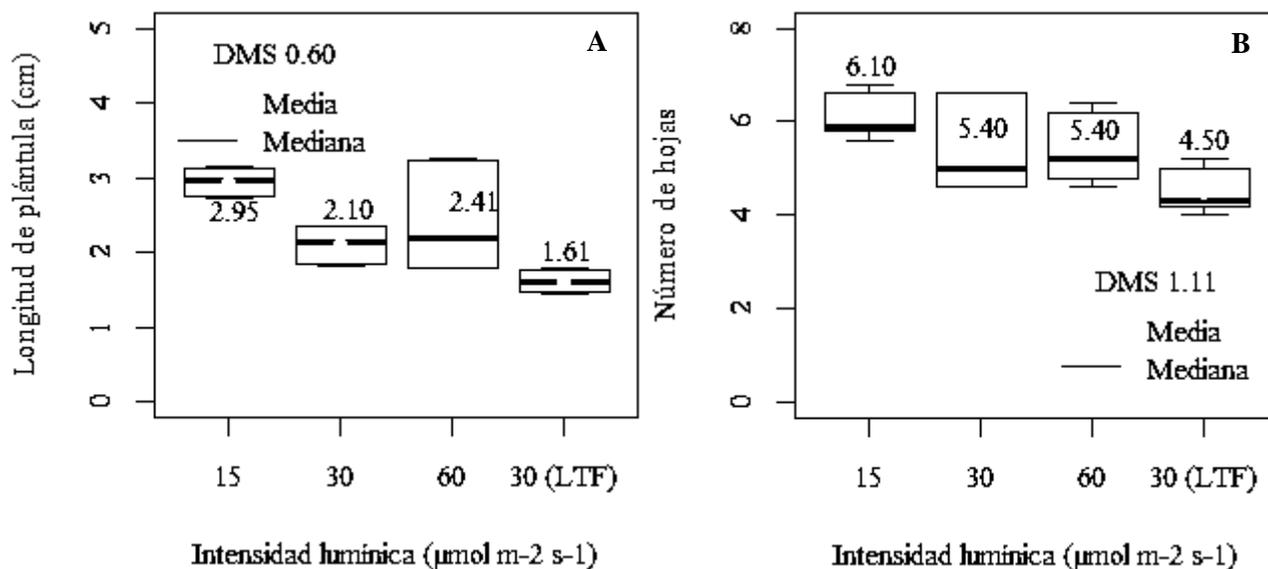
**3.2 En *Laelia autumnalis*.** No se registró la formación de pseudobulbos en ninguna plántula (Figura 5) y el porcentaje acumulado de biomasa, fue estadísticamente igual en la totalidad de los tratamientos.



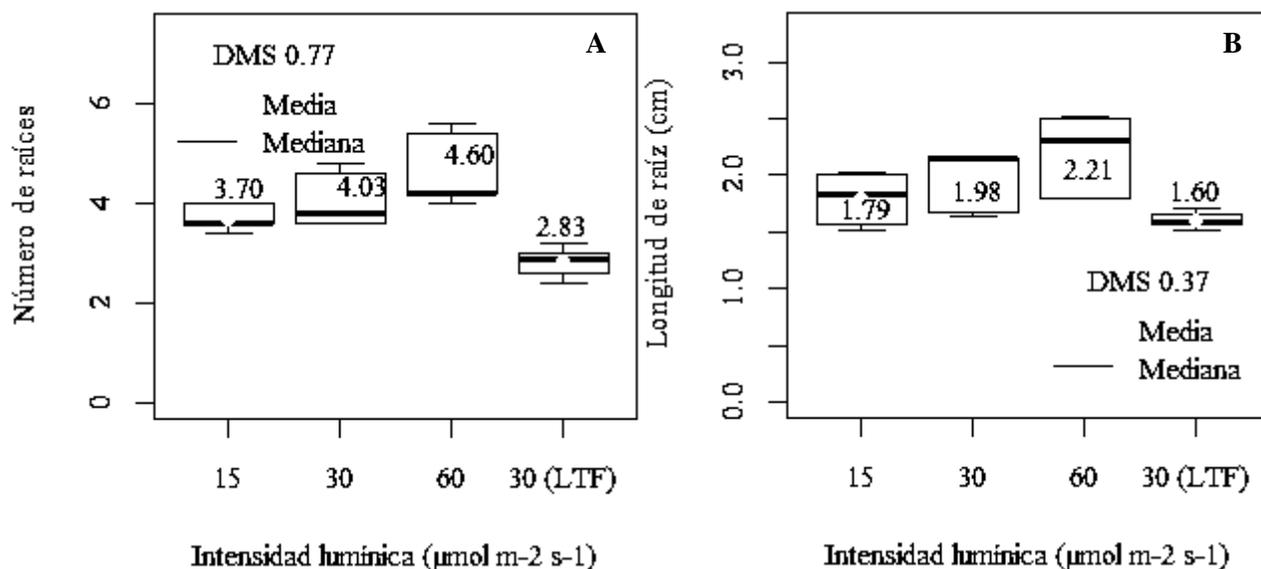
**Figura 5. Plántulas de *Laelia autumnalis* iluminadas durante 90 días con cuatro tratamientos de luz: T1 (LED blanca a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T2 (LED blanca a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), T3 (LED blanca a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y T4 (Fluorescente blanca a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).**

La longitud de plántulas máxima (2.95 cm) y el número de hojas mayor (6.10) se obtuvo con el T1 (LED a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) estadísticamente superior al T4 (testigo con luz fluorescente a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) que produjo plántulas de 1.61 cm de longitud y 4.50 hojas (Figura 6), probablemente porque es la intensidad de iluminación que más se asemeja a un ambiente natural y a que la especie tiene capacidad adaptativa para compensar la deficiencia de luz ocasionada por el sombreado, mediante un incremento en el área foliar, con lo cual se logra la absorción máxima de luz incidente (Lazo y Ascencio, 2010).

La generación de raíces de plántulas cultivadas *in vitro*, requiere de abundante flujo de fotones sobre los tejidos (Flores-Escobar *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2007). Los LEDs son fuentes de energía eficientes y no provocan foto-estrés en los tejidos (Lin *et al.*, 2011); por este motivo, la intensidad a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tuvo efecto positivo, estadísticamente significativo, en la inducción de raíces y su longitud, al registrar raíces hasta 0.61 cm más largas y 1.77 más raíces por plántula, en comparación con el tratamiento testigo iluminado con luz fluorescente a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 7).



**Figura 6.** Efecto de la intensidad de luz LED blanca en la longitud (A) y número de hojas (B) de plántulas de *Laelia autumnalis*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).



**Figura 7.** Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el número de raíces (A) y su longitud (B) en plántulas de *Laelia autumnalis*. LTF=Lámpara tubular fluorescente DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

La materia fresca acumulada (185.70 mg/plántula), así como el contenido de clorofila *a* (10.46 mg g<sup>-1</sup>), *b* (8.50 mg g<sup>-1</sup>) y total (18.95 mg g<sup>-1</sup>) fueron favorecidos por la alta intensidad luminosa emitida por el T3, que estadísticamente resultó diferente al T4 (Cuadro 3), pero similar con respecto al T1. *Laelia autumnalis* es una planta epífita, pero también puede crecer como litófito (Szeszko, 2011), por lo que soporta elevados flujos de fotones fotosintéticos, que inducen la multiplicación celular en vegetales cultivados *in vitro*, con lo cual, consecuentemente habrá mayor producción de biomasa y mayor peso (Gomes *et al.*, 2009). Por otro lado, aunque el material vegetal *in vitro* tiene baja habilidad fotosintética, la presencia y ausencia de luz influye en gran medida en el crecimiento y desarrollo de plantas (De Melo *et al.*, 2011); a esto se debe que la eficiencia energética proporcionada por el tratamiento de luz LED a 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> incrementó la acumulación de pigmentos fotosintéticos.

**Cuadro 3. Efecto de la intensidad de luz LED blanca en el peso fresco y la acumulación de clorofila *a*, *b* y total de plántulas de *Laelia autumnalis*.**

TRATAMIENTO	Peso fresco (mg/plántula)	Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i> (mg·g <sup>-1</sup> )	Cl total
1) LEDs blancos a 15 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	139.60a	9.02ab	6.36ab	15.38ab
2) LEDs blancos a 30 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	159.03a	7.08bc	4.99bc	12.07bc
3) LEDs blancos a 60 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	185.70a	10.46a	8.50a	18.95a
4) Luz fluorescente a 30 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	80.77b	5.20c	3.62c	8.81c
DMS	53.25	2.38	2.50	4.67

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

#### IV. CONCLUSIONES

El uso de luz LED es altamente eficiente como fuente alternativa de iluminación para el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.

*Oncidium tigrinum* desarrolla favorablemente con  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz LED blanca, que induce la acumulación de pigmentos fotosintéticos y biomasa, así como mayor longitud y número de hojas y raíces.

En *Laelia autumnalis*  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz LED blanca inducen mayor número y tamaño de raíces; así como los más altos contenidos de clorofila *a*, *b* y total.

En ambas especies,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz LED blanca afectaron positivamente la generación de hojas y la longitud de plántula.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Casierra-Posada F., J. E. Peña-Olmos y C. Ulrichs (2011)** Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 14:43-53.
- De Melo F. W., R. M. Suzuki, R. Pescador, R. L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbauy (2011)** Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47:420-427.
- Flores-Escobar G., I. Gil-Vázquez, M. T. Colinas-León y M. Mata-Rosas (2011)** Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman Ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17:5-8.
- Gomes A. A., M. Pasqual, L. Yuriko M., E. Mauro C. e H. Souza R (2009)** Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plantulas de *Cattleya loddigessi* L. (Orchidaceae) micropropagadas. *Ciencia Rural* 39:2506-2511.
- Gomes da R. P. S., R. Pedroso de O., W. Bueno S. e U. Lira dos S (2010)** Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciencia Rural* 40:1922-1928.
- Huertas L. (2008)** El control ambiental en invernaderos: radiación. *Horticultura International* 61:54-55.

- Lazo J. V. y J. Ascencio (2010)** Efecto de diferentes calidades de luz sobre el crecimiento de *Cyperus rotundus*. *Bioagro* 22:153-158.
- Lin Y., J. Li, B. Li, T. He and Z. Chun (2011)** Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:329-335.
- Loberant B. y A. Altman (2010)** Micropropagation of plants. *In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*. Michael C. Flickinger (ed). Jerusalem, Israel pp: 1-16.
- Ming-Chang W., H. Chi-Yao, J. Chii-Ming, W. Yuh-Tai, W. Chih-Yu, C. Ho-Hsien and C. Hung-Ming (2007)** A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chemistry* 101:1753-1758.
- Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Pérez P. J. L., T. S. Blanco T, L. García R., N. Veitía R, I. Bermúdez C., R. Collado, D. Torres y C. Romero (2012)** Influencia del tipo en intensidad de luz en la formación y multiplicación de embriones somáticos de soya. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14:139-146.
- Pimentel V. C., R. Machado K. e C. L. Salgueiro L. (2007)** Qualidade de luz e producao de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Revista Brasileira de Biociencias* 5:213-215.
- Porra R. J., A. Thompson and P. Kreidemann (1989)** Determination of accurate extinctions coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with

four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standars by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 957:384-394.

**R Core Team (2014)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. (consulta noviembre de 2014).

**Raj P. P., I. Kataoka and R. Mochioka (2008)** Effect of red and blue light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92:147-153.

**SAS Institute Inc. (2004)** SAS/STAT<sup>®</sup> 9.0 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

**Squeo F. A. y M. F. León (2007)** III. Transpiración. *In: Fisiología Vegetal*. Universidad de la Serena (ed). 3:67-84.

**Szeszko F. D. R. (2011)** La Orquideoflora Mexiquense. Primera edición. Consejo Editorial de la Administración Pública Estatal. México 362 p.

**Valladares F., I. Aranda y D. Sánchez (2004)** La luz como factor ecológico y evolutivo para las plantas y su interacción con el agua. *In: Valladares, F (Ed). Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministerio del Medio Ambiente. EGRAF. Madrid Pp. 335-369.

**Werbrouck S., H. Buyle and D. Geelen (2012)** Effect of red, far-red and blue light emitting diodes on in vitro growth of *Ficus benjamina*. *In: 7<sup>th</sup> IS on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Acta Horticulturae* 961:533-538.

**Young L. N. A., L. Mi-Ja, K. Yang-Kil, P. Joung-Chul, P. Hong-Kyu, C. Jae-Seong, H. Jong-Nae, K. Kee-Jong, P. Ki-Hun, K. Jae-Kwon and K. Jung-Go (2010)** Effect of Light Emitting Diode Radiation on Antioxidant Activity of Barley Leaf. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53:685-590.

#### IV. CONCLUSIONES GENERALES

*O. tigrinum* y *Laelia autumnalis* tienen diferentes requerimientos de calidad e intensidad de luz y éstos varían con la etapa de desarrollo en la que se encuentren.

Aunque la germinación asimbiótica de semillas y el desarrollo *in vitro* de plántulas de *O. tigrinum* y *L. autumnalis* son afectados por la calidad e intensidad de la luz, las dos especies son insensibles a éstas durante la imbibición.

*O. tigrinum* tiene capacidad de diferenciar protocormos y formar primordios foliares en todos los tratamientos de calidad de luz probados; pero su mejor respuesta se obtiene luz LED blanca a  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

*O. tigrinum* es insensible a la intensidad de luz durante la diferenciación de protocormos pero tiene gran sensibilidad al flujo de fotones alto durante la formación de primordios foliares. En la etapa de plántula, su mejor desarrollo se obtiene con  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz LED blanca, que induce mayor longitud y número de hojas y raíces, así como alta acumulación de pigmentos fotosintéticos y biomasa.

*L. autumnalis* fue sensible a los tratamientos de calidad de luz evaluados durante la diferenciación de protocormos, formación de primordios foliares y desarrollo de plántulas; los más altos porcentajes de germinación, la mayor concentración de pigmentos fotosintéticos, acumulación de biomasa y número de hojas y raíces se obtuvieron con la iluminación LED blanca.

*L. autumnalis* produce más raíces, de mayor tamaño, así como los más altos contenidos de clorofila *a*, *b* y total con  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz LED blanca, pero  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  del mismo tipo de luz también tienen efecto positivo en el número de hojas y la longitud de las plántulas.

La luz LED blanca es una fuente efectiva de radiación fotosintética para la micropropagación de *O. tigrinum* y *L. autumnalis* porque favorece la germinación y el desarrollo de las plántulas y es factible regular su intensidad con base en el proceso que se pretenda modificar.