



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Chiná

TESIS

“Efecto de iluminación led en la micropropagación de *Catasetum integerrimum* Hook”.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN AGROECOSISTEMAS SOSTENIBLES

PRESENTA

María del Pilar Márquez Álvarez

Chiná, Campeche, México a abril de 2022



Calle 11 s/n entre 22 y 28, C.P. 24520 Chiná, Campeche. Tel. (981) 82-72052 y 82-72082

e-mail: dir_china@tecnm.mx tecnm.mx | china.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Chiná

TESIS

“Efecto de iluminación led en la micropropagación de *Catasetum integerrimum* Hook”.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN AGROECOSISTEMAS SOSTENIBLES

PRESENTA

María del Pilar Márquez Álvarez

Chiná, Campeche, México a abril de 2022



Calle 11 s/n entre 22 y 28, C.P. 24520 Chiná, Campeche. Tel. (981) 82-72052 y 82-72082
e-mail: dir_china@tecnm.mx tecnm.mx | china.tecnm.mx





División de Estudios de Posgrado e Investigación
Chiná, Campeche, **14/marzo/2022**
OFICIO: **Tesis MCAGS-12**
ASUNTO: **Aprobación**

C. MARÍA DEL PILAR MÁRQUEZ ÁLVAREZ
PRESENTE

El que suscribe, manifiesta que el Dictamen emitido por el Comité de Revisión que integra el sínodo del trabajo de tesis denominado "Efecto de iluminación led en la micropropagación de *Catsetum integerrimum* Hook". Es aprobado como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Agroecosistemas Sostenibles.

Sin más por momento le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
Aprender Produciendo



JOSE JAVIER PERALTA COSGAYA
DIRECTOR
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHINÁ



JJPC/MGRA/JFMP



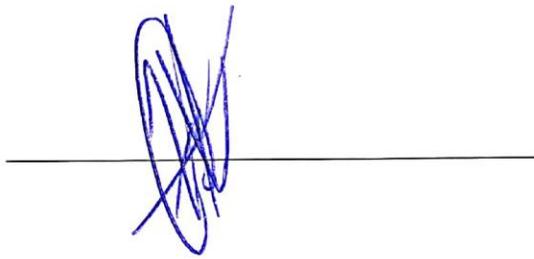
COMITÉ REVISOR

Este trabajo fue revisado y aprobado por este Comité y presentado por la C. María del Pilar Márquez Álvarez como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Agroecosistemas Sostenibles el día 14 del mes de marzo del año 2022 en Chiná Campeche.

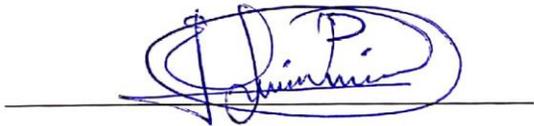
Dra. Norma Laura Rodríguez Ávila
Presidente



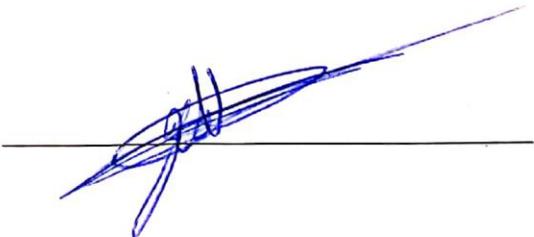
Dr. José Humberto Caamal Velázquez
Secretario



Dr. José Efraín Ramírez Benítez
Vocal

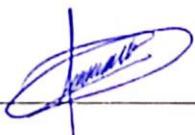


Vocal suplente
MC. Jesús Froylan Martínez Puc



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en el presente documento deriva de los estudios realizados para alcanzar los objetivos planteados en mi trabajo de tesis, en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Chiná. De acuerdo a lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Chiná. Por otra parte, de acuerdo a lo manifestado, reconozco de igual manera que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de la información generada en el desarrollo del presente estudio, le pertenecen patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Chiná de manera que si se derivasen de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  _____

Nombre: María del Pilar Márquez Álvarez

Resumen

La especie de orquídea *Catasetum integerrimum* se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica y es usada como agente medicinal para tratar heridas y tumores. Por su bajo porcentaje de germinación (entre el 2 y 3%) y multiplicación en su ambiente natural, se busca incrementar su propagación con el cultivo de tejidos. La luz representa un factor crucial en el proceso de fotosíntesis, interviniendo indirectamente en la multiplicación de brotes y en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto de distintos colores de luz LED sobre la micropropagación de *C. integerrimum*. Se seleccionaron plántulas de entre 1-1.5 cm de longitud, cultivadas en medio MS suplementado con BAP y carbón activado; incubándose por 90 días bajo cinco tratamientos de luz LED roja (LR); roja y azul (LR+A); azul (LA); roja y blanca (LB+R) y blanca (LB). Para el análisis de su efecto en el crecimiento de las plantas, se cuantificó el número de brotes, peso fresco y clorofilas *a*, *b* y totales.

Los resultados demostraron mayor número de brotes (6 brotes/explante) en el tratamiento LR, así como plantas de mayor peso fresco con el tratamiento de LR+B, siendo este último uno de los tratamientos en donde se presentó la mayor concentración de clorofilas, postulándose como el tratamiento más viable para favorecer la propagación de esta especie de orquídea y obtener plantas libres de enfermedades en un menor tiempo que bajo las condiciones de cultivo *in vitro* convencionales.

PALABRAS CLAVE: micropropagación, *Catasetum integerrimum*, Diodo Emisor de Luz (LED), *in vitro*

Effect of led lighting on the micropropagation of *Catasetum integerrimum*

HOOK

Abstract

The orchid species *Catasetum integerrimum* is widely distributed in Central America and is used as a medicinal agent to treat wounds and tumors. Due to its low percentage of germination (between 2 and 3%) and multiplication in its natural environment, for this reason it is sought to increase its propagation with tissue culture. Light represents a crucial factor in the photosynthesis process, intervening directly in the multiplication of shoots, in the growth and development of plants. That is why in this study the effect of different colors of LED light on the micropropagation of *C. integerrimum* was evaluated. Seedlings between 1-1.5 cm in length were selected, cultivated in MS medium supplemented with BAP and activated carbon; incubating for 90 days under five treatments of red LED light (LR); red and blue (LR+B); blue (LB); red and white (LW+R) and white (LW). For analysis, the plants were extracted, quantifying the number of shoots, fresh weight and chlorophylls *a*, *b* and total. The results showed a higher number of shoots (6 shoots/explant) in the LR treatment, as well as plants with a higher fresh weight with the LR+B treatment, the latter being one of the treatments with the highest concentration of chlorophylls, postulating itself as the most viable treatment to promote the propagation of this species of orchid and obtain disease-free plants in less time than under conventional in vitro culture conditions.

Keywords: Micropropagation, *Catasetum integerrimum*, Light Emitting Diode (LED), in vitro

Agradecimientos

Esta tesis represento un trabajo arduo y lleno de dificultades para su término, sin embargo, la participación y aporte de personas e instituciones han facilitado su conclusión, por esta razón me es grato compartir esta satisfacción y felicidad.

Agradezco a Dios por permitirme tener la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida.

Debo agradecer muy especialmente a la Dra. Norma Rodríguez Ávila, quien me apoyo desde el inicio del proyecto, y me brindo la confianza y la oportunidad de trabajar en un proyecto pese a la situación que se vivía por la pandemia.

Al Dr. Humberto Caamal y al Dr. Efraín Ramírez quienes me ayudaron, me orientaron, pero sobre todo estuvieron en todo momento para solucionar mis inquietudes y brindarme su apoyo profesional.

Agradezco de igual manera al Instituto Tecnológico de Chiná, y a los profesores investigadores por todo el apoyo brindado.

Quiero expresar también mi agradecimiento al programa de becas CONACYT, por el apoyo que brinda a jóvenes que tienen inquietudes de seguir preparándose profesionalmente.

Pero sobre todo agradezco a mi esposo, mi hijo quienes me acompañaron durante todo este tiempo que duró la maestría.

De igual manera, agradezco a mis padres por enseñarme y sembrar en mí el deseo de superación personal y profesionalmente, además de apoyarme en cumplir mis sueños.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi hijo Ricardo, mi esposo y mis padres

Índice de contenido

Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Dedicatoria.....	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Uso de las orquídeas	3
2.2. El cultivo <i>in vitro</i> como alternativa de micropropagación de las plantas	4
2.3. Importancia de la luz para las plantas	5
2.4. Contribución de la luz LED en el cultivo <i>in vitro</i>	6
2.5. Trabajos realizados en orquídeas bajo las influencias de luz LED.....	7
3. Justificación	9
4. Hipótesis	10
4.1. Hipótesis específicas	10
5. Objetivos	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos específicos.....	11
6. Referencias.....	12
7. Capítulos	15
7.1 Capítulo 1. Estrategias para la conservación de orquídeas	15
Introducción	15
Clasificación de las orquídeas.....	15
Importancia de las orquídeas	16
Problemáticas que enfrentan las orquídeas en el proceso de germinación y crecimiento	17
Factores que intervienen en la micropropagación	18
La iluminación en el proceso de crecimiento de las plantas	19
La iluminación LED.....	20
Conclusión	21
Referencia	22

7.2 Capítulo 2	25
EVALUATION OF THE <i>IN VITRO</i> RESPONSE OF <i>Catasetum integerrimum</i> UNDER DIFFERENT LED LIGHT TREATMENTS	25
8. Conclusión	42
9. Anexos	43

1. Introducción

Las orquídeas pertenecen a una de las mayores familias de angiospermas; por sus características florales, son comercializadas en todo el mundo, brindándole alto valor económico (Wang, et al., 2019) además de que en muchos lugares tienen importancia cultural. En la Península de Yucatán se ha reportado el tráfico ilegal de algunas especies, para ser vendidas como plantas de ornato; otras forman parte de ceremonias tradicionales. Por ejemplo, las flores de algunos géneros; como *Laelia*, *Prosthechea* y *Bletia* se usan para fabricar calaveritas en las celebraciones del día de muertos (Hágsater *et al.* 2005). De igual manera el material vegetativo de plantas de la especie *Cyrtopodium punctatum* se emplea como bálsamo y la parte carnosa del tallo de *Myrmecophila christinae* y *Rhyn-cholaelia digbyana* se usa para tratar heridas. Otro género que es usado por sus características medicinales es *Catasetum integerrimum*, la cual es conocida en lengua maya como Ch'it ku'uk (inflamado por dentro), esta especie se usa para curar tumores y sanar heridas. Por su gran diversidad y características particulares muchas orquídeas sobresalen como plantas de ornato, ya que no solo son usadas para adornar los hogares sino también para embellecer altares, y crear ambientes agradables por sus olores, además de ser usadas en la elaboración de artesanías, coronas y guirnaldas (Cox, 2013).

Una de las problemáticas reproductivas de las orquídeas se presenta en la etapa de la germinación ya que en condiciones naturales solo llegan a germinar un 2-3% (Pérez & Castañeda, 2016), y de estas muy pocas llegan a etapa adulta. Por tal motivo es necesario desarrollar proyectos que contrarresten la problemática de baja producción.

El cultivo *in vitro* ofrece ventajas y diferentes alternativas para la propagación de especies cuya reproducción en ambientes naturales es baja o muy lenta. En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Tecnológico Nacional de México campus I.T. Chiná se han establecido protocolos para la germinación, desarrollo de plántulas y multiplicación de brotes de diversas especies de orquídeas, entre ellas *C. integerrimum*. Sin embargo, se ha observado que aun en el ambiente controlado del cultivo *in vitro*, es necesario esperar al menos 90 días para el subcultivo de protocromos y 180 días más para la obtención de plántulas de tamaño

deseable para realizar el subcultivo en el medio de enraizamiento. Adicionalmente, con dichas metodologías no es frecuente la obtención de brotes en las plántulas cultivadas. Por tanto, es necesario plantear nuevas estrategias experimentales que promuevan el crecimiento de las plántulas y la multiplicación de brotes, para desarrollar un protocolo de micropropagación eficiente.

En la actualidad se ha observado que el uso de lámparas de luz LED en el proceso productivo representa grandes ventajas en costo de inversión y reducción de costo energético, además de caracterizarse por su bajo índice de radiación calorífica. Se ha observado en otras especies vegetales, que la exposición a luz LED de diferente composición espectral induce respuestas morfogénicas de nivel y características diversas, lo cual puede tener impacto en la eficiencia del proceso de micropropagación.

Al implementar estos sistemas de luz LED en ambientes controlados, se pueden determinar las condiciones óptimas requeridas para las orquídeas que posibiliten su desarrollo y crecimiento en menores tiempos a los obtenidos en los sistemas de micropropagación convencionales.

De acuerdo con lo anterior, se planteó como objetivo del presente estudio determinar el efecto de la luz LED en la micropropagación de *C. integerrimum*. Para ello se plantarán su crecimiento, plantas de *C. integerrimum* crecidas previamente en medios MS semisólido a medio fresco suplementado con 1mg.L^{-1} de BAP, 30 g.L^{-1} de sacarosa y 5g de carbón activado. Se colocaron en anaqueles, donde estarán expuestos a diferentes tratamientos de luz LED blanca, roja, azul y una combinación de luz roja/azul y blanca/roja, para posteriormente caracterizar el crecimiento de las plántulas en cada unidad experimental.

En el presente documento se describen los resultados obtenidos tras la aplicación de los distintos tratamientos luminosos antes descritos y se discute el papel favorable de la luz roja y blanca en el cultivo *in vitro* de *C. integerrimum*.

2. Antecedentes

2.1. Importancia de las orquídeas

Las orquídeas son plantas que se han podido establecer en casi todos los ambientes del planeta, esto por medio de su capacidad de adaptarse a cualquier condición; la mayoría de estas orquídeas se desarrollan sobre los árboles (epífitas) (Kromer, et al., 2014)

De igual manera estas plantas llevan a cabo funciones ecológicas ya que las plantas epífitas resultan ser muy sensible a la perturbación, por lo que resultan ser muy útil como un grupo indicador del estado de perturbación en los ambientes naturales, por consiguiente, la presencia de las orquídeas epífitas indica un buen estado de salud de los ecosistemas (Kromer, et al., 2014), (Duarte, et al., 2015)

Otra de las funciones que tienen las orquídeas es que brindan refugio animales como pájaros, serpientes, y muchas especies de hormigas, además de brindar un ecosistema óptimo para la reproducción de microorganismos como hongos y bacterias, de igual manera esta planta es consumida como alimento para insectos como mariposas y abejas (Ávila, 2015).

El uso de las orquídeas en la antigüedad se basaba en preparar un mucílago con la parte aglutinante de la planta. Este mucílago se encuentra en los pseudobulbos y se emplea para fabricar instrumentos musicales (Cox, 2013), por esta razón eran usadas como pago de tributos por su gran valor cultural entre las poblaciones.

Las orquídeas también destacan por su uso medicinal; en la época de la Colonia Felipe II, un médico llamado Francisco Hernández viajó a la nueva España donde se interesó por la flora medicinal de la época, plasmando en dibujos algunos géneros como: *Bletia*, *Encyclia*, *Laelia*, *Stanhopea* y *Vanilla planifolia* (Hágsater, et al., 2005). Además del uso medicinal también eran empleadas en las ceremonias para fabricar guirnaldas, ramilletes y coronas ya que sobresalían por sus colores, formas y olores muy particulares, los géneros más usados eran: *Laelia*, *Oncidium*, *Phosthechea* y *Rhynchostele* (Solano, et al., 2011).

2.2. El cultivo *in vitro* como alternativa de micropropagación de las plantas

En la propagación de las plantas por cultivo *in vitro*, es posible utilizar fragmentos vegetales o explante como secciones de hojas, parte de la flor, secciones de tallos, meristemos etc. Con estos explante se puede inducir la morfogénesis y así obtener plantas completas (Fay, 1994)

La micropropagación de plantas es una técnica que ha sido utilizada en éxito desde los años 60. (Cañal, et al., 2001) La principal ventaja de esta técnica es obtención de mayor número de plántulas en menor tiempo y libre de enfermedades. Conforme se ha ido haciendo uso de esta técnica se ha mejorado y por tal razón el cultivo *in vitro* conforma una vía de propagación con múltiples beneficios en la multiplicación de plantas, con altas posibilidades de éxito de las plantaciones forestales en el exterior (Daquita, et al., 2000). El método de cultivo *in vitro* de las orquídeas fue revolucionado gracias a la contribución de Knudson (1922) quien trabajó con semillas germinándolas en un medio simple con azúcar. Existen reportes en donde se expone que las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* de manera simbiótica y a simbióticamente (Ávila & Salgado, 2006). Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Flores, et al., 2008).

La técnica de cultivo *in vitro* es una multiplicación asexual de las plantas, y resulta ser muy útil para propagar plantas, manteniendo su fidelidad genética. Esta multiplicación puede llevarse a cabo por dos vías, éstas pueden ser por organogénesis y embriogénesis somática. Las plántulas regeneradas deben llevar un proceso de aclimatación para finalmente transferirse a condiciones *ex vitro* para un mayor crecimiento.

Existen trabajos enfocados en la producción comercial de algunos géneros de orquídeas como *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, y *Paphiopedilum* las cuales se ven incrementadas sus producciones de 51% a un 85% en el caso de Taiwán (Flores, et al., 2008). Además de que se han ido haciendo investigaciones para mejorar los medios de cultivos y adecuarlos a las necesidades únicas de cada género.

A principios del siglo XXI se ha venido realizando estudios sobre los efectos de la fotosíntesis de las plantas mediante fuentes de luz, se menciona que para poder llevar a cabo el suministro de luz en el proceso de cultivo *in vitro* era un proceso artificial difícil de lograr, esto pasaba al emplear tungsteno, luego lámparas fluorescentes y en la actualidad la tecnología de Diodos Emisores de Luz (Ramos & Ramírez, 2016) que ha permitido obtener longitudes de ondas cercanos a los pico de absorción de los fotorreceptores de las plantas además de muchas otras ventajas sobre sus antecesores.

2.3. Importancia de la luz para las plantas

La luz resulta ser uno de los factores más importantes que influyen en el proceso de cultivo de tejidos vegetales. Para que la planta cumpla funciones vitales como síntesis y producción de energía, para su crecimiento y desarrollo, sobre todo por el proceso de la fotosíntesis. Las longitudes de ondas del espectro no todas son aprovechadas por las plantas, los fotorreceptores absorben la luz violeta, azul, naranja, y rojo que van desde los 390-750 nm en el espectro electromagnético (Zhang & Folta, 2012).

Existen algunas condiciones importantes de acuerdo con la iluminación en cultivo *in vitro*, estas pueden ser la calidad, intensidad y el fotoperiodo. En el caso de la calidad se entiende como las longitudes de ondas lumínicas que inciden sobre las plantas para que pueden llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis; la intensidad es la cantidad del flujo de fotones que pasan en una determinada área en un segundo, esta condición puede influir en el aumento y velocidad en la acumulación de biomasa (Li & Kubota, 2009), y por ultimo tenemos el fotoperiodo que es el tiempo expresado en unidad de mediada horas de exposición a la iluminación ya sea natural o artificial.

En el crecimiento de las plantas la luz tiene dos funciones importantes, le brinda energía para la fotosíntesis, y como un estímulo ya sea para el control del crecimiento. De esta manera un cambio en la intensidad de la iluminación conllevaría a una alteración. Se ha estudiado que los cambios en la calidad y la intensidad de la luz inducen modificaciones en ellos estados de oxidación y reducción de la cadena transportadora de electrones para el proceso de la fotosíntesis (Momokawa, et al., 2011)

La ventaja de usar lámpara LEDs es que se genera un filtro fotoselectivo de iluminación que permite manipular y controlar la radiación directa, permitiendo a la planta obtener radiación parecida a la radiación fotosintéticamente activa (PAR) disponible para las plantas (Casierra & Rojas, 2009).

2.4. Contribución de la luz LED en el cultivo *in vitro*

En el proceso de producción de plántulas *in vitro* y en invernaderos se han venido utilizando distintos tipos de luces artificiales, como: lámparas fluorescentes, lámparas de vapor de sodio de alta presión (HPSL), incandescentes, y de haluro metálico. Con el objetivo de aumentar la fotosíntesis y controlar el fotoperiodo.

En la actualidad los investigadores y productores han empezado a emplear las luces LEDs (diodos emisores de luz) (LEDs) ya que estas tienen la facilidad de producir longitudes de ondas deseadas o requeridas por las plantas (Tamayo, 2014). Los diodos están en la conversión eficiente de energía, volumen pequeño, larga vida, emiten una radiación con longitudes específicas que son eficientes para la fotosíntesis (Araujo, et al., 2009), además de ahorros en costos de mantenimiento y menos emisión térmica lo cual resulta ser más amigables con el ambiente (Lee, et al., 2010).

En los últimos años se ha estudiado la influencia de la iluminación LED en la organogénesis *in vitro*, así como en la embriogénesis somática, en diferentes variedades de plantas, y existen trabajos donde se está empleando luces LEDs roja y azul, comprándolos con luces fluorescente; esto porque se sabe que los fotorreceptores de las plantas son estimulados significativamente por las regiones azules y rojas del espectro de luz (Gupta & Agarwal, 2017).

Por esta razón se sabe que la luz azul y roja contribuyen notablemente en el crecimiento de las plantas (Yorio, et al., 2001). Según sus fotorreceptores las plantas responden a las diferentes intensidades y el color de la luz, es decir; los fitocromos tienen sus picos de sensibilidad en la región roja (660 nm) e infrarroja (730 nm); en donde sus respuestas

fisiológicas se denotan con: la expansión de la hoja, evitar la sombra, elongación del tallo, germinación de la semilla y la inducción de la floración (Paniagua, et al., 2015).

Respecto al uso de LED de color rojo lejano combinado con LED rojos y azules también mejora la respuesta regenerativa en varias especies de plantas, esto puede deberse a la naturaleza variable de las interacciones sinérgicas de los diferentes fotorreceptores captadores de luz en sintonía con la composición genética de la especie vegetal. En el caso de la iluminación LED rojo y azul pueden estimular la proliferación de brotes *in vitro*. A diferencia de la iluminación LED azul la cual promueve la inducción de brotes y la proliferación de algunas especies estudiadas (Dutta & Agarwal, 2017).

2.5. Trabajos realizados en orquídeas bajo las influencias de luz LED

Lin et al, (2011), realizaron un trabajo para conocer el efecto de la calidad de la luz sobre los protocormos de *Dendrobium officinale*. en este se mostró que la luz azul, y luz RB (Roja y Blanca) promueven significativamente la producción de brotes en los protocormos.

De igual forma se realizó una investigación en *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* en donde el objetivo principal era evaluar de influencia de distintos espectros de iluminación sobre el crecimiento y desarrollo de estas orquídeas. A los resultados que se llegó fue que la iluminación de LEDs blanca promueve la acumulación de clorofilas en *L. autumnalis*; y en *O. tigrinum* induce el desarrollo de plantas más vigorosas, sin daños por fotooxidación (Murillo, et al., 2016).

A lo largo de los años se han ido realizando estudios sobre los efectos que los diodos emisores de luz (LED) tiene sobre la proliferación de plantas *in vitro*. Tal es el caso del Banano (*Musa acuminata*), especie que se le analizo el efecto de varias intensidades de luz en cultivo *in vitro*, resolviendo que con luz roja la tasa de proliferación fue mayor en comparación a los otros tratamientos (Ankita, et al., 2017). Otra planta que se ha estudiado es la *Stevia reubadiana Betoni*, la cual mostro mejor tasa de proliferación de brotes bajo los LED rojos, aunque la máxima elongación de brotes de observo en la combinación de LEDs Blanco con

Rojo (Ramírez, et al., 2017a), por lo cual se podría decir que las diferentes intensidades de luz producen diferentes efectos en las plantas de cultivo *in vitro*.

Otro estudio donde se encontraron que las diferentes intensidades de luz reflejan diferentes efectos en las plantas expuestas es el que se realizó en *Eugenia involucrata*, en el cual se encontró que la luz azul produce más número de hojas y el mayor número de brotes, en luz blanca menos contaminación bacteriana (Moro, et al., 2020).

3. Justificación

Las orquídeas conforman una de las mayores familias de plantas existentes en el país, es por tal razón que muchas especies son usadas en múltiples tareas dentro de la sociedad, ya sea con fines culturales, económicos y medicinales. En condiciones naturales las orquídeas se enfrentan a problemas de germinación, al manejo erróneo de estos recursos (los traficantes de plantas de ornatos), el cambio de suelo para construir espacios urbanizados, además de que muchas especies ya han sido declaradas en estado de peligro de extinción, por tal motivo es necesario buscar alternativas que puedan contrarrestar estas problemáticas. Para ello, es necesario implementar métodos o diseñar protocolos eficientes que mejoren el porcentaje de germinación y crecimiento de estas plantas en mayor porcentaje, a bajo costo de reproducción y en grandes cantidades, así como lograr plantas más resistentes y vigorosas, para que, al ser llevadas al proceso de la aclimatación en el exterior, puedan adaptarse en un menor tiempo evitando así la muerte.

Por otra parte, la luz resulta ser un factor muy importante en el proceso de micropropagación de plantas o cultivo *in vitro* ya que influencia en la productividad fotosintética, que se traduce en biomasa. Por esta razón, es de gran relevancia implementar un sistema de iluminación de alta eficiencia, con menor consumo de energía, mayor vida útil, poca emisión de calor; y control de intensidad lumínica; con el objetivo de mejorar la calidad de las plántulas y obtener el mayor número de ejemplares de orquídeas. De esta manera, se generarán conocimientos que mejoren el campo de la micropropagación buscando ser más eficiente la producción de orquídeas haciendo uso de la biotecnología contemporánea.

4. Hipótesis

La iluminación con LEDs rojos mejorará el proceso de micropropagación *in vitro* de la orquídea *Catasetum integerrimum*, ya que las longitudes de onda de este color son muy bien absorbidas las clorofilas.

4.1. Hipótesis específicas

El mayor número de brotes se obtendrá en los explante expuestos al tratamiento de luz roja.

El peso fresco de las plantas se verá afectado de forma diferencial por las diferentes calidades lumínicas a las que estarán expuestas.

El uso de iluminación LED de color azul y rojo incrementará la concentración de clorofilas en las plantas expuestas a dichos tratamientos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la propagación y crecimiento de *Catasetum integerrimum* en cultivo *in vitro* en medio semisólido, bajo efectos de Diodos Emisores de Luz (LED) de alta intensidad.

5.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la luz LEDs en la tasa de multiplicación de brotes en la micropropagación de *Catasetum integerrimum* utilizando medios semisólidos.

Evaluar el efecto de la luz LEDs en el proceso decrecimiento de *Catasetum integerrimum*.

6. Referencias

- Ankita, T., Sengar , R., Bijender , S., Muskesh, K., & Singh, S. (2017). Effect of various light-emitting diodes on growth and photosynthetic pigments of banana (*Musa acuminata*) CV. grande naine *in vitro* plantlets. *Biotech Today: An International Journal of Biological Sciences*, 7(1), 58-61.
- Araujo, A., Pasqual, M., de Castro, E., & Yuriko, L. (2009). Light quality in the biometrics and leaf anatomy of *Cattleya loddigesii* L. seedlings (Orchidaceae) micropropagated. *Ciencia Rural*, 9(39), 2506-2511.
- Ávila , I., & Salgado, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación . *Biológicas*(8), 138-149.
- Ávila, I. (2015). *La importancia de las Orquídeas en el medio ambiente* . Recuperado el Enero de 2022, de <http://www.proyectogmmexico.blogspot.com>
- Cañal, M., Rodríguez, R., Fernández, B., & Sánchez, T. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 1, 3-9.
- Casierra , P., & Rojas, J. (2009). Efecto de la exposición del semillero a coberturas de colores sobre el desarrollo y productividad del brócoli (*Brassica oleracea* var. italica). *Agronomía Colombiana*, 49-55.
- Cox, L. (2013). Orquídeas: importancia y uso en México. *Facultada de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Yucatán*.
- Daquita , M., Ramos , L., & Lezcano , Y. (2000). *Algunos elementos en la micropropagación de la teca* . Biotecnología vegetal.
- Duarte, D., Gómez, S., & Monsalve, H. (2015). *Orquídeas*. Cundinamarca: Fundación Zoológico Santacruz.

- Dutta , S., & Agarwal, A. (2017). Influence of LED Lighting on *in vitro* plant regeneration and associated cellular redox balance. En *Light emitting diodes for Agriculture* (págs. 273-303). India : Springer Nature.
- Fay, M. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation. *Biodiversity and Conservation*, 3, 176-183.
- Flores, G., Legaria, J., Gil, I., & Colinas, M. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo*.
- Gupta, S., & Agarwal, A. (2017). Artificial lighting system for plant growth and development: Chronological Advancement, Working Principles, and Comparative Assessment. En D. S., *Light Emitting Diodes for Agriculture* (págs. 1-25). Springer.
- Hágsater, E., Soto, A., Salazar, C., Jiménez, M., López, R., & Dressler, R. (2005). Las Orquídeas de México. *Instituto Chinoín, México.D.F.*, 304.
- Kromer, T., García, J., & Toledo, T. (2014). Epífitas vasculares como bioindicadoras de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y composición. *HONGOS Y PLANTAS TERRESTRES*, 605-623.
- Lee, H., Murguía , J., Iglesias , L., García, B., Escobedo, D., Martínez, Y.,Santana, N. (2010). Un protocolo de embrogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsinii*. *Revista fitotecnia mexicana*, 3(105), 323-332.
- Li, Q., & Kubota, C. (2009). Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany*, 59-64.
- Momokawa, N., Kadono, Y., & Kudoh, H. (2011). Effects of light quality on leaf morphogenesis of a heterophyllous amphibious plant, *Rotala hippuris*. *Annals of Botany*, 1299-1306.

- Moro, C., Silveira, L., Dutra, L., & Dos Santos, S. (2020). Diodos emisores de luz (LED) usados no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 40, 1-5.
- Murillo, M., Pedraza, M. E., Gutiérrez, N., Rodríguez, M., Lobit, P., & Martínez, A. (2016). Calidad de la luz LED y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. *Agrociencia*, 50(8).
- Paniagua, G., Hernández, C., Rico, F., Domínguez, F., Martínez, E., & Martínez, C. (2015). Efecto de la luz LED de alta intensidad sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de brócoli (*Brassica Oleracea* L.). *POLIBOTÁNICA*(40), 199-212.
- Ramírez, M., Iglesias, A., & Bautista, A. (2017a). The Effect of Light Quality on Growth and Development of *in vitro* Plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech*, 19(3), 331-336.
- Ramos, Y., & Ramírez, E. (2016). Desarrollo de un sistema de iluminación artificial LED para cultivos en interiores - Vertical Farming (VF). *Informador Técnico*, 2(80), 111-120.
- Solano, G., Jiménez, M., & Damon, A. (2011). Two new records and one rediscovery for Orchidaceae of Mexico. *Acta Bot. Mex.*, 96, 57-70.
- Tamayo, A. (2014). Tasa de incremento lumínico óptimo durante la aclimatación *in vitro* de *Nothofagus alpina* (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)). Valdivia: Universidad Austral de Chile.
- Yorio, N., Goins, G., & Kagie, H. (2001). Improving Spinach, Radish, and Lettuce Growth under Red Light-emitting Diodes (LEDs) with Blue Light Supplementation. *HortScience*, 35(2), 380-383.
- Zhang, T., & Folta, K. (2012). Green light signaling and adaptive response. *Plant signaling y Behavior*, 7(1), 1-4.

7. Capítulos

7.1 Capítulo 1. Estrategias para la conservación de orquídeas

Introducción

La familia Orchidaceae conforman unas de las familias más numerosas con aproximadamente 25 mil especies conocidas alrededor del mundo, que difieren en tamaño, formas, aromas y colores. Así mismo son consideradas las plantas más evolucionadas del reino vegetal y crecen en casi todos los hábitats y en los diferentes ambientes (Gaudencio, et al., 2015). Su nombre deriva del griego “orchis” que significa “testículo” debido a la forma de los pseudobulbos que fungen como órganos de almacenamiento (Fischer, 2007). Las orquídeas son plantas que se encuentran dispersas en casi todos los lugares de mundo excepto en los polos y en los desiertos (Tamay, 2016). Por esta razón se dice que son plantas cosmopolitas.

En México, existen más de 1,200 especies y subespecies de orquídeas, distribuidas en todo el país; pero son más abundantes en zonas cálido-húmedas (Lecoufle, 2006)). Se estima que alrededor del 40% de las orquídeas mexicanas son endémicas (Flores, et al., 2008). Ahora en lo que respecta a la Península de Yucatán; principalmente en el estado de Campeche se sabe que existen las orquídeas de tipo epífitas con un 70% del total y las terrestres con 30 % de total de las orquídeas (Fernández, et al., 2012).

Clasificación de las orquídeas

Existen diferentes tipos de orquídeas las cuales se pueden clasificar en epífitas, las que crecen y desarrollan en los troncos y ramas de los árboles, litófitas las que crecen en suelos rocosos y en condiciones extremas, las que crecen en el suelo, llamadas terrestres, por ultimo las saprófitas que crecen en bosques oscuros y obtienen sus nutrientes de la materia orgánica en descomposición (Ochoa, 2003). Otra manera de clasificar las orquídeas es de acuerdo con su eje de crecimiento; entre esta clasificación se encuentran las plantas monopodiales: que crecen de forma vertical o hacia arriba, y no cuentan con pseudobulbos por lo cual para

sobrevivir dependen exclusivamente de un ápice vegetativo. Las que crecen de manera horizontal o hacia los lados reciben el nombre de plantas simpodiales estas si cuentan con varios ápices vegetativos y pseudobulbos, que le sirven como órganos de reserva (Fischer, 2007).

Importancia de las orquídeas

Las orquídeas son consideradas de gran importancia cultural, ambiental, social y económica ya que poseen un gran valor ornamental el cual puede alcanzar precios muy altos en el mercado internacional.

En un ambiente natural las orquídeas funcionan como refugios para animales como serpientes, pájaros y muchas especies de hormigas, ofrecer alimento a insectos como mariposas y abejas, es proveedora de fragancias u olores para que abejas macho puedan atraer a las hembras. También brinda un ecosistema óptimo para la reproducción de microorganismos como hongos y bacterias (Ávila, 2015).

Alrededor del mundo las plantas de orquídeas han sido usada con fines ornamentales y medicinales, en países como China las han cultivado desde el año 500 a.C., los griegos les daban usos medicinales; en América civilizaciones como los aztecas las empleaban como medicina, ornamentales y especias, como la vainilla (*Vanilla planifolia*), utilizada para aromatizar el chocolate (Ossenbach, 2005)

En México las orquídeas son usadas para la fabricación de instrumentos musicales y de plumería. Además, son empleadas para elaborar las calaveritas en el día de los muertos o simplemente colocarlas como adornos en ceremonias; específicamente en lo que es la Península de Yucatán es empleada con fines medicinales por sus propiedades únicas (Tamay, 2013).

En la actualidad existe un mercado de aficionados con las orquídeas por lo cual su demanda se ve incrementada; Estados Unidos es uno de los mayores consumidores de orquídeas, ya que recibe importaciones de Países Bajos con 47 millones de dólares, seguido de Tailandia

con 14 millones de dólares y en tercer lugar está Alemania con 2 millones de dólares. Otro punto importante es el comercio ilegal, se tiene un registro de los mayores consumidores a nivel mundial, en estos están los países desarrollados de Norte América, Unión Europea y China con valor de 7.8 a 10 billones de dólares (Tejada , et al., 2017). En lo que concierne a México estos datos no se tienen muy claros ya que las estadísticas de producción, exportación e importación no están documentadas. A nivel mundial existe una alta productividad y competitividad en la floricultura, existen empresas como Orquídeas Eva, Orquídeas de las Andes, Orquídeas Pereira que producen y comercializan plantas de orquídeas híbridas y de especies (Barajas, et al., 2016).

Problemáticas que enfrentan las orquídeas en el proceso de germinación y crecimiento

Las orquídeas se desarrollan mejor en los ambientes húmedos y tropicales. Una de las problemáticas que enfrentan las orquídeas en su estado natural son la pérdida y transformación de los ecosistemas, además, de que estos cambios también disminuyen la población de los polinizadores y la disminución del número de la población de la orquídea (Garay, et al., 2018). La germinación de manera natural depende de las actividades de hongos micorrícicos ya que el embrión carece de endospermo y gracias a los hongos micorrícicos puede obtener todos los nutrientes necesarios, es también por esta asociación que puede obtener características que las hacen únicas entre todas las demás plantas; estas actividades se llevan a cabo por selección natural e incluso determinan su diversificación (Billard, et al., 2014), (Chávez , et al., 2014),. Estos factores tienen gran relación con el tamaño de las semillas ya que al ser estas muy pequeñas (1.0-2.0 mm de largo y 0.5-1.0 mm de ancho) (Billard, et al., 2014) se ven en desventajas de poder germinar. En condiciones naturales solo llegan a germinar un 2-3%, por eso es necesario hacer uso de técnicas de micropropagación que faciliten y permitan la propagación clonal o sexual masiva de orquídeas en una conservación *ex situ* obteniéndose un mayor número de plantas; reduciendo en un 85% el tiempo de germinación (Pérez & Castañeda, 2016). Obteniéndose plantas sanas, libres de plagas y enfermedades. Además, por el tamaño de las plántulas se reduce los requerimientos de espacios y costos de mantenimiento.

Factores que intervienen en la micropropagación

La técnica de cultivo *in vitro* es un componente fundamental de los programas de propagación y conservación de las orquídeas. Esta técnica de siembra *in vitro* consiste en cultivar un inóculo dentro de un recipiente que contiene una dieta balanceada de nutrientes y hormonas preparada previamente (Abdelnour & Vicent, 1994), para llevar a cabo su crecimiento.

Lo que se busca en el proceso de micropropagación *in vitro* es inducir procesos morfogénicos que suceden de manera natural, como lo son la producción de ramas y raíces y la producción de embriones. Esto mediante el fenómeno llamado totipotencia que es la capacidad que tienen las células vegetales de producir plantas completas a partir de semillas, o partes pequeñas de la planta (Santacruz, et al., 2008).

El proceso de micropropagación comprende las siguientes etapas: en la etapa uno crece el embrión (protocormo) y se rompe la testa, en la etapa dos se da el desarrollo del protocormo y aparición de rizoides, en la etapa tres continua el crecimiento del protocormo y se desarrolla la yema apical, por último, aparecen las hojas y las raíces (Billard, et al., 2014).

De igual manera, para llevar a cabo el manejo de cultivo es necesario mantener la sanidad tanto de las plantas como de todo el equipo a utilizar, ya sea durante la propagación y crecimiento, para esto se debe tomar en cuenta el ambiente que los rodea o factores bióticos (microorganismos, insectos, etcétera), condiciones climáticas (temperatura, iluminación, humedad, gases) y factores edáficos (nutrición mineral, agua, suelo) (Santacruz, et al., 2008).

También existen factores que intervienen y pueden ser controlados en la micropropagación de las plantas; tales como el medio de cultivo, pH, luminosidad, humedad y temperatura (Peña, et al., 2018). Uno de los factores que pueden ser controlados y tiene un papel fundamental en los procesos de regulación de crecimiento y desarrollo de las plantas es la luz. Lo que es la calidad, la intensidad y el fotoperíodo, resultan importantes para la morfogénesis de las plantas, esto se lleva a cabo gracias a los sistemas de fotorreceptores que responden a la luz y, por lo tanto, regulan los cambios morfogénicos de las plantas, el funcionamiento del

aparato fotosintético y la tendencia de las reacciones metabólicas. Por esta razón el uso de iluminación para aplicaciones en la micropropagación resulta un componente clave en ambiente controlados ya que se puede obtener crecimiento de cultivos en cualquier época del año y permite aumentar la cantidad de producción (Gupta, 2017). Numerosos estudios sugieren el uso de la iluminación LED para generar plantas y la acumulación de metabolitos; pero también se ha concluido que las respuestas de las diferentes plantas varían dependiendo de los tratamientos de luz, y no se ha encontrado un patrón específico que relacionen las diferentes especies (Dutta & Agarwal, 2017).

La iluminación en el proceso de crecimiento de las plantas

La luz es igualmente utilizada como fuente de energía para transformar el CO₂ en compuestos orgánicos, además de que influye en procesos como la floración, maduración de frutos, germinación, elongación de los tallos, apertura de estomas etc. (Gustavo, 2011). Los pigmentos fotosintéticos son los encargados de captar la energía lumínica y poderla transformar en energía química gracias al proceso de la fotosíntesis. La luz es uno de los factores ambientales que presenta la mayor heterogeneidad espacio temporal, esto trae como consecuencia una composición pigmentaria distinta en las hojas de las plantas. Los pigmentos clorofílicos deben su color verde a la capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar, transmitiendo los demás colores dando como consecuencia los diversos tonos de color verde que podemos apreciar en las hojas de los árboles (Manrique, 2003).

Las plantas generalmente responden al color e intensidad de la luz a la que son expuestas, lo que significa que los espectros del haz de luz que utilizan son específicos (Zhang & Folta, 2012) esto lo hacen por medio de sus fotorreceptores llamados: fitocromos, criptocromos y fototropinas; estos solo pueden ser activados bajo longitudes de ondas específicas. Por tal motivo los sistemas de iluminación en ambientes controlados para la producción de plantas resultan de gran importancia (Kozal, 2007). La luz es un factor de gran importancia en la inducción de diferenciación de células vegetales y la regeneración de órganos a partir de tejidos vegetales se han llevado a cabo investigaciones para poder esclarecer los efectos que se llevan a cabo en las plantas al ser tratadas con diferentes intensidades de luz LED.

La iluminación LED

Muchos científicos están empleando sistemas de luz LED para el óptimo crecimiento de plantas ya que este sistema de iluminación produce altos niveles de luz con un índice de radiación calorífica bajo, y proporciona control de la composición espectral y se ha observado que tienen una larga vida útil (Bourget, 2008); (Gupta & Jatothu, 2013), además de que permiten eficientizar la fotosíntesis, y disminuye la emisión de CO₂ protegiendo al ambiente (Murillo, et al., 2016).

Para poder evaluar los efectos que tiene la luz LED sobre las plantas se puede medir la cantidad de clorofila en las células y / o tejidos en cultivo, ya que el contenido de clorofila es un indicador confiable del estado de las plantas. Sería un resultado positivo si el contenido de clorofila es alto, esto implicaría que se está llevando a cabo una actividad fotosintética óptima y también indica el estado de los nutrientes de la planta (Dutta & Agarwal, 2017).

La ventaja que presentan los LED sobre las lámparas de descarga de gas convencionales es que los LED tienen la capacidad de regular los niveles de radiación fotosintéticamente activa y fotomorfogénica que requiere el cultivo para llevar a cabo la morfogénesis de la planta, son de menor tamaño, brindan de una vida útil más larga y existe una baja producción de energía térmica (Thanh, et al., 2017).

Un LED (Diodos emisores de luz) es un dispositivo semiconductor de estado sólido, el cual emite luz sobre el flujo de electricidad o bien cuando los electrones son impulsados por un campo eléctrico o magnético y entran en un orbital de menor energía liberando energía en forma de radiaciones electromagnéticas a este fenómeno se le conoce como el principio de electroluminiscencia. Con estudios anteriores se ha descubierto que los LEDs emiten una longitud de onda de 450 nm resultando muy adecuados para su uso en estudios sobre crecimiento y desarrollo de plantas, eso coincide con el pico de absorción máximo de los fotorreceptores de carotenoides de las plantas; por ello el uso de los LED resulto de gran importancia (Thanh, et al., 2017). Una de las ventajas que tiene los LEDs es que representan una fuente de luz muy versátil y eficiente, ya que se puede controlar la intensidad de luz en

el sistema, permitiendo adaptarse a los requerimientos de las plantas (Dutta & Agarwal, 2017).

Los LED tienen los atributos espectrales para estimular respuestas organogénicas y embriogénicas en plantas; los espectros de emisión coinciden con los espectros de absorción de los fotorreceptores de plantas por lo cual se obtiene una alta productividad *in vitro*, al tener influencia en la morfogénesis y el metabolismo de las plantas. También se ha estudiado el impacto de la iluminación LED en la embriogénesis somática, en el desarrollo de brotes y raíces *in vitro*, lo que resulta en una mejor adaptabilidad y crecimiento de las plántulas después de la transferencia al suelo (Dutta & Agarwal, 2017)

Conclusión

La técnica de cultivo *in vitro* tiene como su principal objetivo contribuir a la conservación de los recursos genéticos de las orquídeas, ya que se ha logrado multiplicar masivamente ejemplares de especies raras o en peligro de extinción. Además, resulta muy útil cuando las condiciones de reproducción *in situ* no es posible por el estado del ambiente es una buena alternativa como técnica de conservación *ex situ*. Un factor de gran importancia en esta técnica la luz resulta ser un factor primordial el cual puede ser manipulado de acuerdo con los requerimientos y necesidades de las plantas con el fin de mejorar su crecimiento y reproducción. Asimismo, la iluminación LED presenta múltiples ventajas como emisión de longitudes específicas deseadas, bajo consumo de energía, emisión mínima de calor y una larga vida útil comparada a las lámparas fluorescentes.

Referencias

- Abdelnour, E. A. & Vicent, E. J., 1994. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. CATIE.
- Ávila, I., 2015. *La importancia de las Orquídeas en el medio ambiente*. Disponible en línea: <http://www.proyectogmmexico.blogspot.com>
- Barajas, C. K., Carrillo, C. N. & Chaparro, S. O., 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas para exportación. *Universidad de La Salle. Ciencia Unisalle*.
- Billard, C., Dalzotto, C. & Lallana, V., 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *POLIBOTANICA*, pp. 145-157.
- Bourget, M., 2008. An introduction to Light-emitting Diodes. *HortScience*, 43(7), pp. 1944-1946.
- Chávez , H., Mosquera, A. & Otero, J. T., 2014. Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. y Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Agronomía*.
- Dutta , S. & Agarwal, A., 2017. Influence of LED Lighting on *in vitro* plant regeneration and associated cellular redox balance. En: *Light emitting diodes for Agriculture*. India : Springer Nature, pp. 273-303.
- Fernández, G. y otros, 2012. La flora en la Península de Yucatán Mexicana: 250 años de conocimiento florístico. *Biodiversitas*, pp. 6-10.
- Fischer, A. L., 2007. *Cultivo de Orquídeas*. Buenos Aires : imaginador.

- Flores, G., Legaria, J., Gil, I. & Colinas, M., 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo*.
- Garay, E., Treviño, J. & Hernández, T., 2018. Las orquídeas endémicas mexicanas en categoría de amenazadas. *Ciencia UANL*.
- Gaudencio, S., Manzo, A., Roldán, R. & Castellanos, J. A., 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, pp. 451-456.
- Gupta, D. & Jatothu, B., 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), pp. 211-220.
- Gupta, S. D., 2017. Light Emitting diodes for agriculture: Smart Lighting. En: S. D. Gupta, ed. *Light emitting diodes for Agriculture*. India : Springer.
- Gustavo, V., 2011. *Botánica General*. Primera Edición ed. Costa Rica: EUNED Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Kozal, T., 2007. Propagation, grafting and transplant production in closed systems with artificial lighting for commercialization in Japan. *Propagation of Ornamental Plants*, 7(3), pp. 145-149.
- Lecoufle, M., 2006. *Orquídeas*. Barcelona, España: Editorial Omega.
- Manrique, E., 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1).
- Murillo, M. y otros, 2016. Calidad de la luz LED y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*. *Agrociencia*, 50(8).

- Ochoa, M. M., 2003. *El gran libro de las Orquídeas*. Barcelona: De Vecchi.
- Ossenbach, C., 2005. History of orchids in Central America. Part I: from prehispanic times to the independence of the new republics. The History of *Vanilla*. *Harvard Papers in Botany*, Volumen 2, pp. 197-202.
- Peña , J. J. y otros, 2018. Análisis computacional de factores intrínsecos en cultivo *in vitro* de la Stevia Rebaudiana Morita II. *PISTAS EDUCATIVAS*, 40(130), pp. 2266-2275.
- Pérez , B. & Castañeda, S. L., 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*, pp. 143-151.
- Santacruz, F., Torres , M. I. & Portillo, L., 2008. Micropropagación de Agave tequila Weber cv. Azul: problemas y perspectivas. *Scientia CUCBA*, 10(1-2), pp. 7-20.
- Tamay, L. D. C., 2013. Orquídeas: importancia y uso en México. *Bioagrobiencias*.
- Tamay, L. D. C., 2016. Diversidad y uso de las Orquídeas. *Bioagrobiencias*.
- Tejada , O., Téllez, M. & Escobar , J., 2017. Estado de conservación de Orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agroproductividad*, pp. 3-12.
- Thanh, T., Tan, D., Phuc, N. & Quoc , V., 2017. LEDs and their potential in somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.. En: D. G. S., ed. *Light emitting diodes for agriculture*. India: Springer, pp. 321-330.
- Zhang, T. & Folta, K., 2012. Green light signaling and adaptive response. *Plant signaling y Behavior*, 7(1), pp. 1-4

1 **7.2 Capítulo 2**

2 **EVALUATION OF THE *IN VITRO* RESPONSE OF *Catasetum integerrimum***
3 **UNDER DIFFERENT LED LIGHT TREATMENTS**
4

5 Márquez-Álvarez Pilar¹, Caamal-Velázquez José Humberto², Ramírez-Benítez

6 José Efraín³ & Rodríguez-Ávila Norma Laura¹

7
8 ¹ National Technology of Mexico/I. T. Chiná, Master of Science Programme in Sustainable
9 Agroecosystems. 11th street between 22nd and 28th streets, China, Campeche, Mexico, C.P.
10 24050.

11 ² Postgraduate College Campus Campeche. Km 17.5 Federal highway Haltunchen-Edzna,
12 Sihochac, Champotón Campeche, México, C.P. 24450

13 ³ Faculty of Chemical-Biological Sciences, Autonomous University of Campeche. Agustín
14 Melgar avenue, no number, between Juan de la Barrera and 20 streets, Buenavista,
15 Campeche, Campeche, Mexico, C.P. 24039.

16
17 * Corresponding author: norma.ra@china.tecnm.mx

1 **ABSTRACT**

2 Orchids of the genus *Catasetum integerrimum* are widely distributed in Central America and
3 have recognized medicinal properties. Given its low germination percentage (between 2 and
4 3%) and multiplication in its natural environment, it is necessary to develop strategies that
5 enable its propagation for conservation purposes. Light is a crucial factor in the
6 photosynthesis process, intervening directly in the growth and development of plants as well
7 as in the multiplication of shoots. According to the above, in this study, the effect of different
8 LED light treatments on the micropropagation of *C. integerrimum* was evaluated. Seedlings
9 between 1-1.5 cm long were chosen, cultivated in MS medium supplemented with BAP (1
10 mgL⁻¹) and activated carbon (5 gL⁻¹); incubating for 90 days under five LED light treatments:
11 Red (LR); red/blue (LR+B); blue (LB); red/white (LW+R) and white (LW). For its analysis,
12 the plants were extracted from the medium, quantifying the number of shoots, fresh weight,
13 and chlorophylls *a*, *b* and total. The results showed a higher number of shoots (6
14 shoots/explant) in the LR treatment, as well as plants with a higher fresh weight with the
15 LR+B treatment, the latter being one of the treatments with the highest concentration of
16 chlorophylls, postulating itself as the most viable treatment to favor the multiplication of this
17 species and obtain more vigorous plants in less time than under conventional *in vitro* culture
18 conditions with white fluorescent light.

19

20 **KEYWORDS**

21 Micropropagation, *Catasetum integerrimum*, orchid, Light Emitting Diode (LED), *in vitro*
22 culture.

1 **RUNNING TITLE**

2 Role of LEDs in the *in vitro* culture of *Catasetum integerrimum*

3 **INTRODUCTION**

4 Orchids are plants with a wide global distribution, found in various ecosystems, except in
5 poles and deserts (Tamay, 2016). The *Catasetum integerrimum* species are distributed in
6 Central America (Guatemala, Belize, Honduras, El Salvador, Nicaragua) and in several
7 regions of Mexico such as Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche,
8 Yucatán and Quintana Roo (Morales, et al., 2016). In the Yucatan peninsula, *Catasetum*
9 *integerrimum* is widely used to treat wounds and tumors (Cox, 2013).

10 The *Catasetum* genus includes epiphytic or semi-epiphytic plants, which have thick, fleshy
11 pseudobulbs covered with tunicate scales. Its leaves are wide and folded, with nerves clearly
12 marked with shoots in clusters (Morales, et al., 2016).

13 Orchids stand out for their exotic beauty. Among the main threats to these species is illegal
14 extraction, destruction of their habitats and reproductive problems. In its natural state, the
15 germination rate is 2-3% (Pérez & Castañeda, 2016) and very few seedlings reach the adult
16 stage. In this context, *in vitro* culture has been reported as an effective strategy to propagate
17 different orchid species such as *Dendrobium* (Sedano, et al., 2015), *Epidendrum oxysepalum*,
18 *E. chioneum*, *E. nocturnum*, *Oncidium pyramidale*, *Cyrtorchilum revolution* (Pérez &
19 Castañeda, 2016), *Cattleya harrisoniana* and *C. forbesii* (Schneiders, et al., 2012),
20 establishing the optimal culture conditions for their micropropagation.

1 Currently, different types and sources of lighting are added to the tissue culture process, since
2 light is considered a crucial factor in the photosynthesis process of plants, contributing to
3 their good growth and development. Different plant species have photoreceptors
4 (phytochromes, cryptochromes and phototropins) that respond differently to the color and
5 intensities of light to which they are exposed (Zhang & Folta, 2012) (Kozal, 2007).
6 Consequently, LED (Light Emitting Diodes) systems turn out to be a very good lighting
7 option, since they produce high levels of light with a low heat radiation index, with good
8 control of the spectral composition, in addition to their long shelf life (Bourget, 2008; Gupta
9 & Jatothu, 2013); In addition, they produce a lower CO₂ emission, making the
10 photosynthesis of plants more efficient (Murillo, et al., 2016).

11 It is well known that photosynthetic pigments have a greater absorption of light in the blue
12 and red spectra, so it is possible to expect that *Catasetum integerrimum* plants grown *in vitro*
13 under LED light of blue and red colors present a greater growth than those subjected to other
14 light regimes. However, different plant species can interact differently with respect to light
15 quality or wave intensity, depending on the type and concentration of their photosynthetic
16 pigments (Lindao, et al., 2021).

17 Due to the above, in the present study it is proposed to use the conventional *in vitro* culture
18 techniques in semi-solid MS medium, coupling a system of LED lights with different lighting
19 spectra in the incubation shelves of the cultures, with the objective of establishing a
20 methodology that favors the micropropagation and development of *Catasetum integerrimum*,
21 by determining the optimal multiplication and growth conditions required by these orchids,

1 in order to obtain plants in less time than under conventional *in vitro* culture conditions with
2 fluorescent white light.

3 **MATERIALS AND METHODS**

4 *Vegetal material*

5 The plant material was taken from the germplasm bank originating from previous work
6 carried out at the Plant Biotechnology Laboratory of the National Technology of Mexico/I.
7 T. Chiná.

8 *Subcultures*

9 Seedlings between 1-1.5 cm tall were chosen, which were cultivated in Murashige and Skoog
10 (MS) medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) (0.02 gL^{-1}), sucrose (30 gL^{-1}),
11 Phytigel (Sigma, Cat. No. P8169; 5 gL^{-1}) and activated carbon (5 gL^{-1}). The medium was
12 sterilized in an autoclave for 20 min at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ and 15 pounds of pressure. The pH of the
13 medium was adjusted to 5.6 with 1N NaOH and/or 1N HCl. The seedlings were planted in
14 this culture medium for 90 days, incubated at a temperature of 25°C , at a photoperiod of 16/8
15 light hours with white, red or blue LED lamps (Tianla, 18W) and combinations of these.

16 *Experimental design and statistical analysis*

17 For the experimental design and analysis, five treatments were established: Red light
18 ([LR]:100%); combination of red and blue light ([LR+B]:50/50%); blue light ([LB]:100%);
19 combination of red and white light ([LW+R]:50/50%) and white light alone ([LW]:100%)
20 (Figure 1), with 10 repetitions each. In each bottle (repetition) 4 seedlings were planted,
21 obtaining a total of 40 experimental units per treatment. An average of 16 seedlings were

1 evaluated for each treatment. The variables analyzed were: number of shoots, fresh weight,
2 percentage of chlorophylls a, b, and total, after 90 days of experimentation. For the analysis
3 of the collected data, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with the
4 SIGMAPLOT program (V. 14.0). To compare the means between the different treatments,
5 the Tukey test was used ($p < 0.05$).

6 **RESULTS AND DISCUSSION**

7 *Effect of light quality on shoot proliferation.*

8 Significant differences were observed in the red light and white light treatments. The highest
9 number of shoots per explant occurred in the LR and LW+R treatments (Figure 2); these
10 treatments produced more than 6 shoots per explant. In contrast, in the treatments with LB,
11 LR+B and LW, less than 2 shoots per explant were produced (Figure 1B).

12 Our results were very different from those obtained with *Vanilla planifolia* Andrews (Bello,
13 et al., 2016), where treatment with red and blue LED light induced shoot proliferation and
14 white light, greater shoot growth.

15 *Effect of light quality on fresh weight and number of roots of seedlings.*

16 The different LED light treatments had variable effects on the development of *C.*
17 *integerrimum* seedlings. Regarding the weight of the plants, the largest amount of fresh
18 biomass were obtained with the combination of light LW+R (1:1); this combination was
19 designed to provide plants with a full spectrum of light (416-715nm). The white LED emits
20 a dim spectrum of red wavelengths; In this way, adding red light to the experiment would
21 enrich the spectrum of daylight, which should translate into an increase in photosynthetic

1 activity with biomass gain since the red wavelengths (660 nm) are very well absorbed by
2 chlorophyll *a*, responsible for photosynthetic efficiency (Pimentel, et al., 2007), in addition
3 to the fact that red light has a greater influence on the photomorphogenesis of plants (Santos,
4 et al., 2017). The results obtained were statistically like the other treatments, except in blue
5 light, where the plants presented the lowest weight found in the experiment (Figure 3).
6 Similarly, more vigorous plants were obtained in the treatments with red light or combined
7 with white light (LR and LW+R) (Figure 1A).

8 In a particular case, the treatment with LR+B light represented an increase in the
9 concentration of pigments; the above, because chlorophylls *a* and *b* have two critical
10 absorption points in the red and blue range (Pimentel, et al., 2007). In addition, the blue color
11 favors the opening of the stomata (Squeo & Cardemil, 2007), with the consequent increase
12 in the rate of gas exchange that favors the fixation of CO₂, stimulating the photosynthesis
13 process. This phenomenon was also present in *Protea cynaroides* (Wu & Lin, 2012) and
14 *Laelia autumnalis* (Murillo, et al., 2016) seedlings, where the greatest weight gain was
15 obtained in the combination of red and blue light. In general, the use of the combination of
16 blue and red lights is very efficient in the development of plants; however, it will always
17 depend on the species to be studied.

18 Regarding the number of roots, no significant differences were observed between the
19 treatments, presenting a similar number of roots per explant (Figure 1C).

20 *Quantification of chlorophylls a, b and total chlorophylls*

21 Regarding the results of chlorophyll *a*, it was observed that there was a statistically significant
22 increase in the concentration of chlorophyll *a* (0.74 mg/mg) of the seedlings exposed to blue

1 wavelengths (<400-500 nm) and the lowest concentration of chlorophylls (0.23) in those
2 exposed to red wavelengths (Figure 4A). Blue light, turns out to be very important in the
3 synthesis of chlorophyll, improves the adaptability of plants to light, photomorphogenesis
4 and the regulation of anthocyanin synthesis (Walters, 2004). Considering that chlorophyll *a*
5 is the main pigment responsible for transforming light energy into chemical energy, favoring
6 plant growth (Garcia, et al., 2006), and given the induction that occurred in this pigment with
7 blue light, it could be inferred that these plants accumulate a greater amount of biomass.
8 However, our results showed that the seedlings with the highest weight and number of shoots
9 were obtained with the LW+R and LR treatments.

10 Regarding chlorophyll *b*, a higher concentration (0.65 mg/mg) was observed in the LW+R
11 treatment while the lowest concentration (0.30 mg/mg) was observed with the treatment with
12 only red light LR (Figure 4B). With the use of monochromatic blue light (BL) a median
13 concentration of chlorophyll *b* (0.59 mg/mg) was observed.

14 Unexpectedly, the highest concentration of total chlorophylls was observed in plants
15 subjected to blue monochromatic light, with 1.33 mg/mg fresh weight, followed by 1.24
16 mg/mg FW observed in plants under the LW + R treatment and the lowest concentration in
17 those exposed to red light, with 0.53 mg/mg. The concentration of total chlorophylls is
18 controlled by light and at high irradiation intensities, the chlorophyll molecules enter photo-
19 oxidative processes (Kozłowski & Kramer, 1991), which could explain the lower weight gain
20 observed in seedlings subjected to blue light, despite the high concentration of photosynthetic
21 pigments detected in these specimens (Figure 3). In fact, in tomato and habanero pepper
22 plants exposed to monochromatic blue light, a lower concentration of total chlorophylls is

1 observed (Liu, et al., 2018; Mendoza et al., 2021), possibly also due to the photooxidation of
2 those pigments.

3 The low concentration of total chlorophylls detected in plants subjected to red light (LR)
4 were similar to those observed in lettuce (Wang, et al., 2016). However, there are species in
5 which there is a direct correlation between the amount of radiation received and the
6 concentration of quantified photosynthetic pigments. In a study carried out with palm trees
7 (*Euterpe edulis* Mart), this behavior was observed, decreasing the concentration of pigments
8 the lower the amount of light irradiated on the plants, with the consequent slowdown in the
9 growth of said plants (Matsuno, et al., 2001). Due to the above, it is necessary to carry out
10 new studies in this species, evaluating the effect of applying different light intensities of each
11 color of LED lamp, to verify the possible effect of the photo-oxidation of its photosynthetic
12 pigments in light stress.

13 **CONCLUSIONS**

14 Based on the results obtained, the different conditions of the light treatments translate into
15 highly variable growth parameters in *Catasetum integerrimum* plants. Red LED lighting (LR)
16 and the combination of red and white light (LW+R) promote the production of shoots, which
17 are also more vigorous, as is the case with many other species. Specifically, the combination
18 of white and red light led to high concentrations of pigments, which could translate into a
19 better physiological response of the plants as the rate of photosynthesis increased, so this
20 treatment turns out to be ideal for the micropropagation of this species of orchid.

21 It is important to emphasize the importance of evaluating the effect of the different light
22 treatments on each species that is desired to micropropagate with greater efficiency, since

1 each species reacts very differently depending on its physiological particularities,
2 characteristics of its taxonomic group.

3 **ACKNOWLEDGEMENTS**

4 We thank the National Technological Institute of Mexico (TecNM) for the financial support
5 (9985.21-P)

6 **REFERENCES**

- 7 Bello, J., Martínez, E., Caamal, J., & Morales, V. (2016). Effect of LED light quality on *in*
8 *vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Revista*
9 *fricana de Biotecnología*, 272-277.
- 10 Bourget, M. (2008). An introduction to Light-emitting Diodes. *HortScience*, 43(7), 1944-
11 1946.
- 12 Cox, L. (2013). Orquídeas: importancia y uso en México. *Facultada de Ciencias Biológicas*
13 *y Agropecuarias. Universidad de Yucatán*.
- 14 Garcia, B., Rosello, C., & Santamarina, S. (2006). Introducción al funcionamiento de las
15 plantas. *Editorial: Universidad Politécnica de Valencia. España*, 181.
- 16 Gupta, D., & Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes
17 (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3),
18 211-220.

- 1 Kozal, T. (2007). Propagation, grafting and transplant production in closed systems with
2 artificial lighting for commercialization in Japan. *Propagation of Ornamental Plants*,
3 7(3), 145-149.
- 4 Kozlowski, T., & Kramer, P. (1991). *Physiology of Woody plants* (3era Edición ed.). San
5 Diego: Academic Press.
- 6 Liu, X., Jiao, X., Chang, T., Guo, S., & Xu, Z. (2018). Photosynthesis and leaf development
7 of cherry tomato seedlings under defferent LED- based blue and red photon flux
8 ratios. *PHOTOSYNTHEtica*, 4(56), 1212-1217.
- 9 Lindao Córdova, V. A., Estrada Orozco, J. A., Mantilla Cabrera, C. E., & Carpio Coba, C. F.
10 (2021). Efecto de la iluminación LEDs de 150 W en la producción aeropónica de
11 acelga (*Beta vulgaris Subsp. Vulgaris L.*) Var Ford Hook Giant en invernadero.
12 *Dominio de las Ciencias*, 7(1), 155-178.
- 13 Matsuno, N., Da, C., Futatsugi, K., & Silveira, P. (2001). Crescimento inicial de *Euterpe*
14 *edulis* Mart. em diferestes regimes de luz. *Revista Brasileira de Botânica*, 24(2), 173-
15 179.
- 16 Mendoza, J., Castillo, A., Avitia, E., Valdéz, L., & García, M. (2021). Efecto de diferentes
17 proporciones de luz LED azul: roja en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*
18 Jacq). *Biotechnia*, 23(1), 110-119.
- 19 Morales, M., Salinas Castro, A., Bello, D., Cadena, M., Fernández, A., & Trigos, A. (2016).
20 *Stethobaroides nudiventris* (Coleoptera: Curculionidae), the Curculionid Cause of

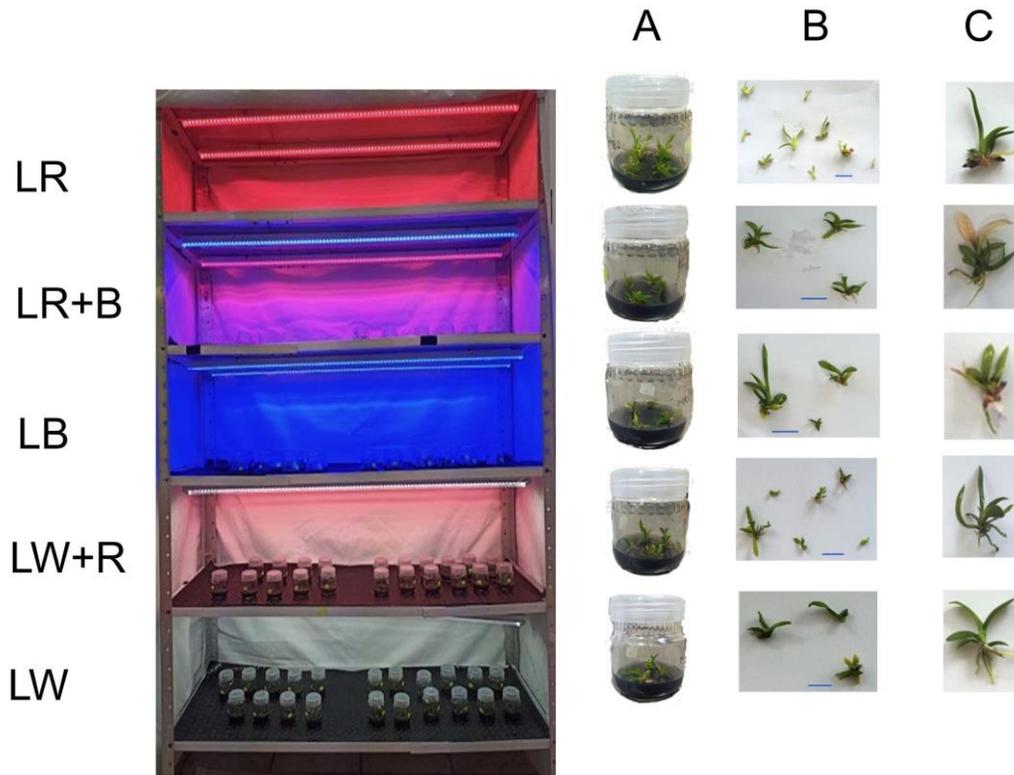
- 1 Petal Wilting on the *Catasetum integerrimum* Orchid. *Oxford University Press on*
2 *behalf of Entomological Society of America, 109(1), 845-849.*
- 3 Murillo, M., Pedraza, M. E., Gutiérrez, N., Rodríguez, M., Lobit, P., & Martínez, A. (2016).
4 Calidad de la luz LED y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*.
5 *Agrociencia, 50(8).*
- 6 Pérez, M., & Castañeda, G. (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una
7 contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal, 16(3), 143-151.*
- 8 Pimentel, V., Machado, K., & Salgueiro, L. (2007). Qualidade de Luz e producao de
9 pigmentos Fotosinteticos em plantas *In vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Revista*
10 *Brasileira de Biociencia, 5, 213-215.*
- 11 Santos, L., Ventorim, F., Torres, S., Duarte, A., Ribeiro, A., Vilela, S., Rodrigues, J. (2017).
12 Uso de Diodos Emissores de Luz (LED) na Fisiologia de plantas cultivadas. *Scientia*
13 *Agraria Paranaensis, 137-144.*
- 14 Schneiders, D., Pescador, R., Raitz, B., & Manoru, S. (2012). Germination, growth and
15 development *in vitro* of orchids of the genus *Cattleya*. *Revista Ceres, 59(2), 185-191.*
- 16 Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación *in vitro* de
17 orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de ciencias Agrícolas, 1, 451-456.*
- 18 Squeo, F., & Cardemil, L. (2007). *Fisiología Vegetal*. La Serena, Chile: Squeo y Cardemil.
19 Universidad de La Serena.
- 20 Tamay, L. D. (2016). Diversidad y uso de las Orquídeas. *Bioagrociencias.*

- 1 Walters, R. (2004). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of*
2 *Experimental Botany*, 56(411), 435-447.
- 3 Wang, J., Lu, W., Tong, Y., & Yang, Q. (2016). Morfología de la hoja, rendimiento
4 fotosintético, fluorescencia de clorofila, desarrollo de estomas de lechuga (*Lactuca*
5 *savita* L.) expuesta a diferentes proporciones de luz roja a luz azul. *Frontiers in Plant*
6 *Science*, 7(250).
- 7 Wu, H.-C., & Lin, C.-C. (2012). Red Light-emitting Diode Light Irradiation Improves Root
8 and Leaf Formation in Difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. Plantlets *In vitro*.
9 *HortScience*, 1490-1494.
- 10 Zhang, T., & Folta, K. (2012). Green light signaling and adaptive response. *Plant signaling*
11 *y Behavior*, 7(1), 1-4.

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

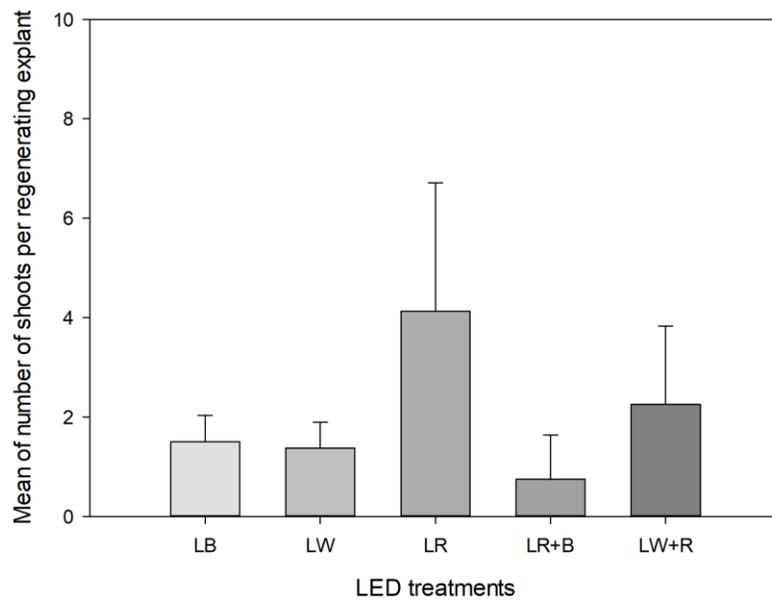
1

Figures



2

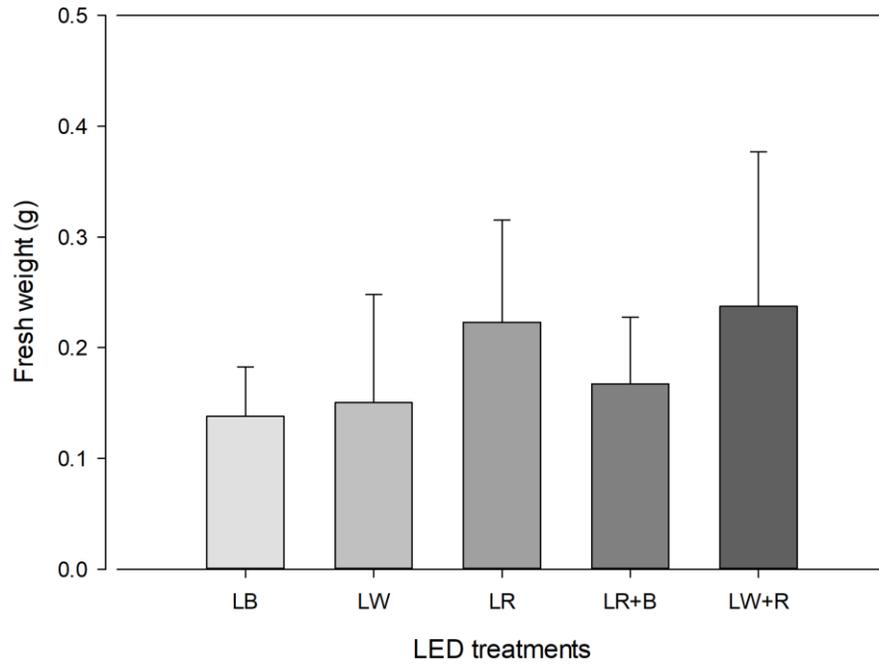
3 Figure 1



4

1 Figure 2

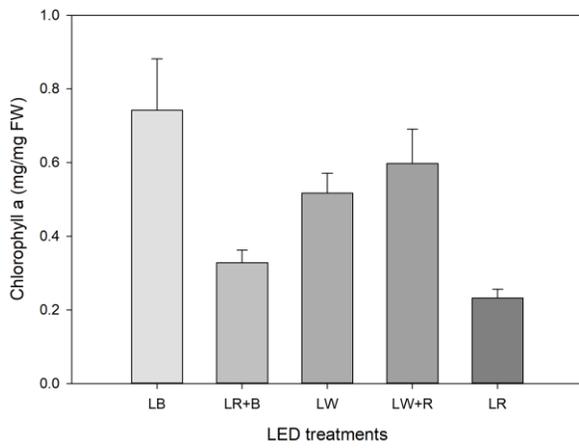
2



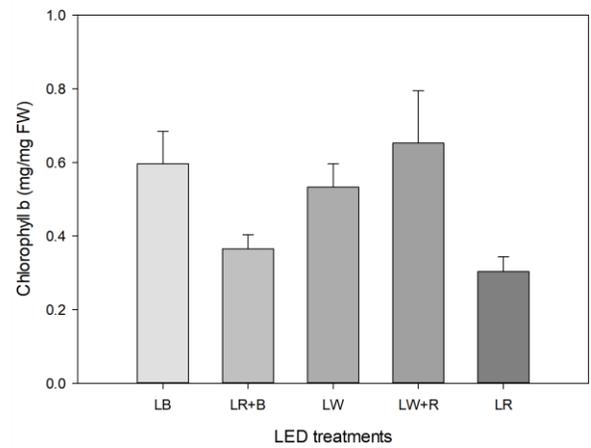
3

4 Figure 3

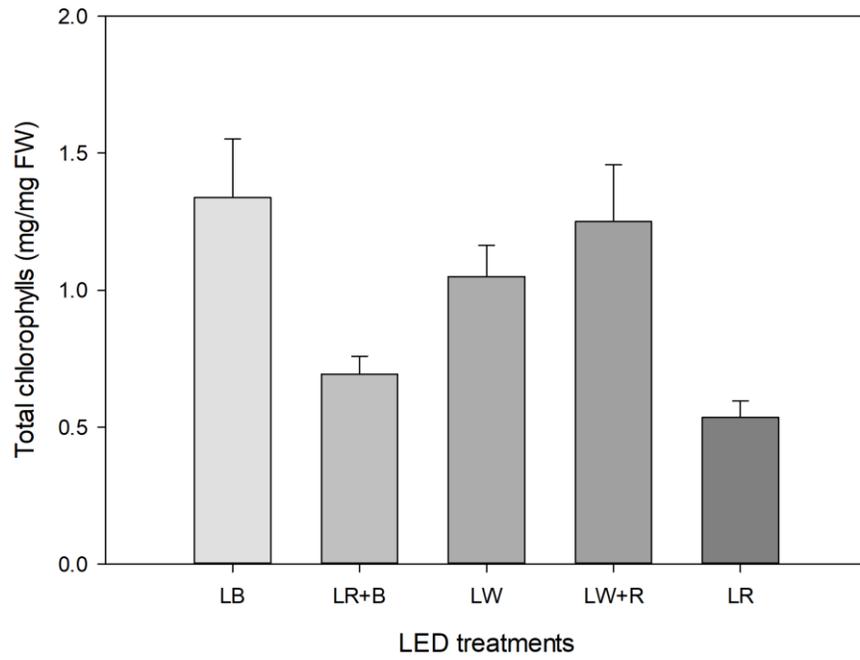
5



6



7 Figure 4



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Figure 5

Figure legends

1

2 **Figure 1.** Light treatments evaluated in this study and characteristics of the seedlings
3 obtained after 90 days of experimentation, in which they implemented red LED light lamps
4 (LR); red and white (LR+B); blue (LB), white and red (LW + R), and white light only (LW)
5 (left panel). (A) Representative flasks of an experimental unit subjected to each light
6 treatment; (B) Shoots obtained present in the representative flasks shown in (A); (C) Close-
7 up of the shoots obtained showing the variation in their roots.

8 **Figure 2.** Number of shoots obtained in the regenerated explants subjected to the different
9 LED lighting treatments.

10 **Figure 3.** Fresh weight of *Catasetum integerrimum* seedlings subjected to different light
11 treatments.

12 **Figure 4.** Determination of chlorophylls *a* and *b* of *C. integerrimum* orchid seedlings
13 subjected to 90 days of treatment with different LED light arrangements. (A) Detected
14 concentrations of chlorophyll *a*; (B) Detected concentrations of chlorophyll *b*. Abbreviations:
15 LB (blue light), LR+B (red and blue light), LW (white light), LW+R (white and red light);
16 LR (red light). FW: Fresh Weight.

17 **Figure 5.** Concentration of total chlorophylls in *Catasetum integerrimum* seedlings subjected
18 to different light treatments with LEDs. Abbreviations: LB (blue light), LR+B (red and blue
19 light), LW (white light), LW+R (white and red light); LR (red light). FW: fresh weight

8. Conclusión

Las comparaciones del desarrollo y micropropagación de plántulas *in vitro* de *C. integerrimum* expuestos a diferentes longitudes de onda lumínica demostraron que la luz monocromática roja promueve mayor número de brotes, con este resultado se propone el uso de iluminación LED monocromática roja para el proceso de micropropagación de orquídeas *Catasetum integerrimum*.

Otro punto analizar fue la concentración de pigmentos fotosintéticos, los cuales se vieron aumentados en los tratamientos con luz blanca y roja esto se pudiera traducirse en una mejor respuesta fisiológica de las plantas al verse incrementada la tasa de fotosíntesis, por lo que este tratamiento resulta ser idóneo para la micropropagación de esta especie de orquídea.

Los tratamientos con LED azul y blanco no mostraron resultados significativos por lo cual no se propone emplear en la micropropagación de tejidos de esta orquídea *C. integerrimum* como fuente lumínica.

Es importante recalcar la importancia de evaluar el efecto de los distintos tratamientos de luz en cada especie que se desee micropropagar con mayor eficiencia, ya que cada especie reacciona de forma muy distinta dependiendo de sus particularidades fisiológicas, características de su grupo taxonómico.

9. Anexos



PROPAGATION OF ORNAMENTAL PLANTS

Editorial Office, University of Forestry, 10 Kliment Ohridski blvd.,
Sofia 1756, Bulgaria, Fax: (++ 359 2) 862 28 30, e-mail: ivilievlu@yahoo.com
www.journal-pop.org

CONSENT TO PUBLISH AND TRANSFER OF COPYRIGHT

For the mutual benefit and protection of authors and publishers it is necessary that authors provide formal written CONSENT TO PUBLISH AND TRANSFER OF COPYRIGHT before publication of the work. The signed CONSENT ensures that the publisher has the author's permission to publish the relevant work. The signed TRANSFER entitles the publisher on behalf of the author to protect the work against unauthorised use and to authorise dissemination of the work by means of offprints, legitimate photocopies, microsoft editions, reprints, translations, and secondary information sources such as abstracting and indexing services including data bases. The publisher hereby requests the author to complete and return this form promptly to the Editor-in-chief of the journal so as to ensure the proper conduct of business.

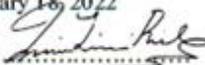
Title of contribution: EVALUATION OF THE IN VITRO RESPONSE OF *Catsetum integerrimum* UNDER DIFFERENT LED LIGHT TEATMENTS.....

Author (s): Márquez-Álvarez Pilar, Caamal-Velázquez José Humberto, Ramírez-Benitez José Efraín & Rodríguez-Ávila Norma Laura

1. The author hereby assigns to the publisher the copyright to the contribution named above whereby the publisher shall have the exclusive right to publish the above contribution and translations of it wholly or in part throughout the world during the full term of copyright including renewals and extensions thereafter. These rights include without limitation mechanical, electronic and visual reproduction; electronic storage and retrieval; and all other forms of electronic publication or any other types of publication including all subsidiary rights.
2. The author retains the right to republish the contribution in any printed collection consisting solely of the author's own works without charge and subject only to notifying the publisher of the intent to do so and to ensuring that the publication by the publisher is properly credited and that the relevant copyright notice is repeated verbatim.
3. In the event of receiving any other request to reprint or translate all or part of the contribution the publisher shall endeavour to obtain the approval of the author prior to giving any such permission.
4. The author guarantees that the contribution is original, it has not been published previously (nor have the tables, photographs, figures or other parts of the manuscript), it is not under consideration for publication elsewhere, and that any necessary permission to quote from another source has been obtained (A copy of such permission should be sent with this form).
5. The author declares that any person named as co-author of the contribution is aware of the fact and has agreed to being so named.
6. The author declares that he (or she) is familiar that the publishing in the journal is not free of charge and cost of one printed page is 30 USD.

Date: February 18, 2022

Name: Norma Laura Rodríguez Ávila

Signature*: 

*To be signed by the author, also on behalf of any co-authors, or by the employer, where appropriate

For Publisher's use only
Journal Issue

MS Ref. No:
Pages:

Year:.....