

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA *IN VITRO* DE *Catasetum integerrimum* BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE LUZ LED

[EVALUATION OF THE *IN VITRO* RESPONSE OF *Catasetum integerrimum* UNDER DIFFERENT LED LIGHT TREATMENTS]

Pilar Márquez-Álvarez¹, Norma Laura Rodríguez-Ávila^{1§}, Humberto Caamal-Velázquez², José Efraín Ramírez-Benítez³

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Chiná. Posgrado en Agroecosistemas Sostenibles. Calle 11 entre 22 y 28, Centro. C.P. 24050, Chiná, Campeche, México. ²Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná Km 17.5. C.P. 24450 Sihochac, Champotón, Campeche, México. ³Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar S/N, entre Calle Juan de la Barrera y C.20, Col. Buenavista, C.P. 24039. Campeche, Campeche, México.

§Autor para correspondencia (norma.ra@china.tecnm.mx).

RESUMEN

La especie de orquídea *Catasetum integerrimum* se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica y es usada como agente medicinal para tratar heridas y tumores. Dado su bajo porcentaje de germinación (entre el 2 y 3%) y multiplicación en su entorno natural, es necesario desarrollar estrategias que posibiliten su propagación para su conservación. La luz representa un factor crucial en el proceso de fotosíntesis, interviniendo directamente en la multiplicación de brotes, en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* asociados con el uso de sistemas de iluminación LED representan una buena opción para potencializar la propagación de plantas. Por tanto, en este estudio se evaluó el efecto de distintos colores de luz LED sobre la micropropagación de *C. integerrimum*. Se eligieron plántulas de entre 1-1.5 cm de largo, cultivadas en medio MS suplementado con BAP y carbón activado; incubándose bajo cinco tratamientos (roja + roja:100%) (roja + azul:50+50%) (azul + azul:100%) (roja + blanco:50+50%) y (blanco + blanco:100%). Para su análisis, las plantas fueron extraídas del medio, cuantificándose el número de brotes y las dimensiones de éstos. Los resultados demostraron mayor número de brotes en el tratamiento con luces LED roja + blanca y solo luz roja, postulándose a ambos tratamientos como los más viables para favorecer la multiplicación de esta especie de orquídea y obtener plantas libres de enfermedades y vigorosas en un menor tiempo que bajo las condiciones de cultivo *in vitro* convencionales.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, luz LED, micropropagación, orquídeas.

ABSTRACT

The orchid species *Catasetum integerrimum* is widely distributed in Central America and is used as a medicinal agent to treat wounds and tumors. Given its low germination percentage (between 2 and 3%) and multiplication in its natural environment, it is necessary to develop strategies that allow its propagation for its conservation. Light represents a crucial factor in the photosynthesis process, directly intervening in the multiplication of shoots, in the growth and development of plants. *In vitro* tissue culture techniques associated with the use of LED lighting systems represent a good option to enhance the propagation of plants. Therefore, 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 long were chosen, grown in MS medium supplemented with BAP and activated charcoal; incubating under five treatments

(red + red: 100%) (red + blue: 50 + 50%) (blue + blue: 100%) (red + white: 50 + 50%) and (white + white: 100%). For their analysis, the plants were extracted from the medium, quantifying the number of shoots and the dimensions of the battery. The results showed a greater number of shoots in the treatment with red + white LED lights and only red light, postulating both treatments as the most viable ones to favor the multiplication of this species of orchid and obtain disease-free and vigorous plants in a shorter time. than under conventional in vitro culture conditions.

Index words: *In vitro* culture, LED light, micropropagation, orchids.

INTRODUCCIÓN

El termino orquídea deriva del griego “orchis”, que significa testículo debido a la forma de los pseudobulbos (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 (Cox *et al.*, 2016). Por su parte, la especie de orquídea *Catasetum integerrimum* se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica, en lugares como Guatemala, Belice, Honduras, el Salvador, Nicaragua, y en varias regiones de México, como Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Morales *et al.*, 2016). En la península de Yucatán, el género *C. integerrimum* es utilizado para tratar heridas y tumores (Cox, 2013).

El género *Catasetum* incluye plantas epífitas o semiepífitas, las cuales poseen pseudobulbos gruesos, carnosos y cubiertos de escamas tunicadas. Sus hojas son anchas y dobladas, con nervios claramente marcados con brotes en racimos (Morales *et al.*, 2016). Por sus características visuales las orquídeas sobresalen como plantas de ornato. Entre las principales amenazas de esas especies se encuentra extracción ilegal, la destrucción de sus hábitats y los problemas reproductivos; en su estado natural, la tasa de germinación es del 2-3% (Pérez y Castañeda, 2016); además de que muy pocas plántulas llegan a la etapa adulta. En este contexto, el cultivo *in vitro* se ha utilizado para propagar diferentes especies de orquídeas en diferentes partes del mundo.

En la actualidad, al proceso de cultivo de tejidos se le adiciona diferentes tipos y fuentes de iluminación, debido a que la luz es considerada un factor crucial en el proceso de la fotosíntesis de las plantas, contribuyendo a su buen crecimiento y desarrollo. Las diferentes especies de plantas tienen fotorreceptores (fitocromos, criptocromos y fototropinas) que responden de forma distinta al color e intensidades de luz a las que son expuestas (Zhang y Folta, 2012; Kozal, 2007). Por consiguiente, los sistemas de luz LED (Diodos Emisores de Luz) resultan ser una muy buena opción de iluminación, ya que producen altos niveles de luz con un índice de radiación calorífica bajo, con buen control de la composición espectral, además de su larga vida útil (Bourget, 2008; Gupta y Jatothu, 2013); además, producen una menor emisión de CO₂, eficientizando la fotosíntesis de las plantas (Murillo *et al.*, 2016).

Por lo anterior, en el presente estudio se plantea usar las técnicas de cultivo *in vitro* convencionales acoplados con un sistema de luces LED de distintos espectros de iluminación, con la finalidad de establecer una metodología óptima para la micropropagación y el desarrollo de la especie *C. integerrimum*, para determinar las condiciones óptimas requeridas por estas orquídeas para lograr su multiplicación y crecimiento en un menor tiempo que bajo las condiciones de cultivo *in vitro* convencionales con luz blanca fluorescente. Al término de este proyecto se contará con un banco de germoplasma de esta especie de orquídea y se habrá desarrollado una nueva estrategia experimental que pudiera ser aplicable para la conservación de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal fue tomado del banco de germoplasma originado en trabajos previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Chiná.

Subcultivos realizados

Para los subcultivos se tomaron plántulas de entre 1-1.5 cm de largo, las cuales fueron cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) (0.02 g l^{-1}), sacarosa (30 g l^{-1}), Phytigel (5 g l^{-1}) y Carbón activado (5 g l^{-1}). El medio fue esterilizado en autoclave por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 15 libras de presión. Se ajustó el pH del medio a 5.6 con NaOH 1N y/o HCl 1N. Las plántulas se sembraron en este medio de cultivo durante 90 días, incubándose a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a un fotoperiodo de 16/8 h luz con lámparas LED de colores blanco, rojo o azul, y combinaciones de éstas (Tianla, 18W).

Diseño experimental y análisis estadístico

Para el diseño experimental y análisis se establecieron cinco tratamientos (roja + roja:100%) (roja + azul [R+A]:50+50%) (azul + azul [A+A]:100%) (rojo + blanco [R+B]:50+50%) y (blanco+blanco [B+B]:100%), con 10 repeticiones cada uno. En cada frasco (repetición) se sembraron cuatro plántulas, obteniéndose un total de 40 unidades experimentales por tratamiento (Figura 1).

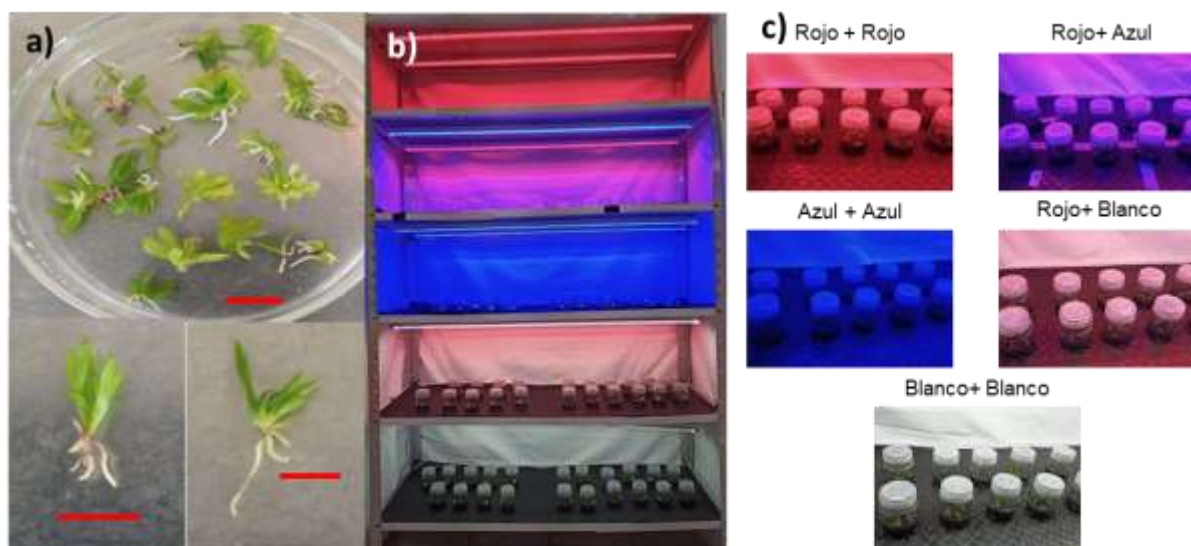


Figura 4. Elementos del experimento realizado en este estudio. a). Tamaño de las plántulas al inicio del experimento. b) Estante con la distribución de las luces LED. c) Distribución de los frascos con las plántulas de *C. integerrimum*.

Para evaluar el desarrollo de los brotes en cada tratamiento se evaluaron en promedio 16 plántulas por cada uno. Las variables medidas fueron las siguientes: longitud de los brotes, número de brotes, número de hojas y peso fresco, tras 90 días de experimentación. Para el análisis de los datos recopilados para cada variable se le realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con el programa STATISTICA V. Para comparar las medias entre los diferentes tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la calidad de la luz sobre la proliferación de brotes

La proliferación de brotes de las plántulas de *C. integerrimum* expuestas a los diferentes regímenes luminosos no presentó diferencia estadística significativa; sin embargo, el mayor número de brotes por explante se presentó en los tratamientos de luz R + R y R + B. Estos tratamientos produjeron más de seis brotes. Sucedió lo contrario en los tratamientos con luz A + A, R + A y Blanco, en los que se produjeron menos de dos brotes por explante (Figura 2).

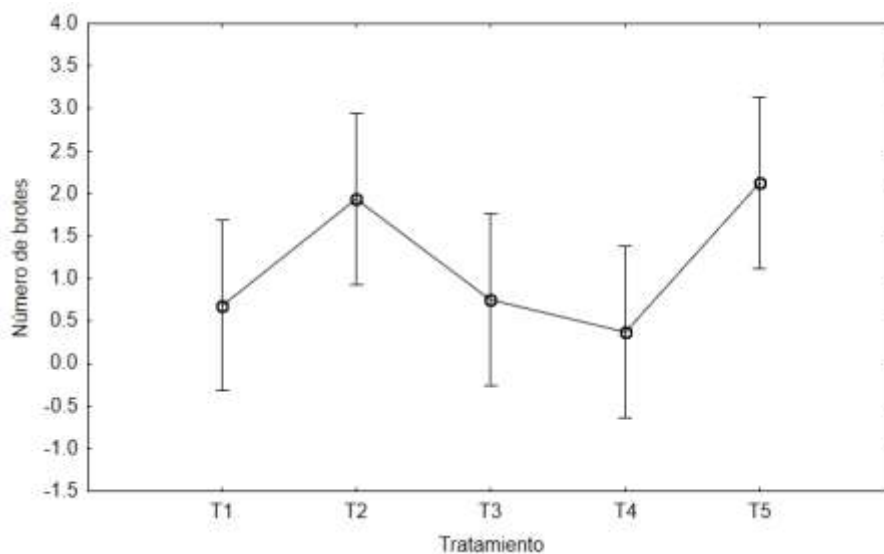


Figura 5. Brotes obtenidos en promedio en los explantes sometidos a los diferentes tratamientos. T1 = Luz Blanca, T2 = Roja + Blanca, T3 = Azul + Azul, T4 = Rojo + Azul, T5 = Rojo + Rojo.

Efecto de la calidad de la luz sobre el crecimiento de las plántulas

Los diferentes tratamientos de luz LED tuvieron efectos variables sobre el crecimiento de *C. integerrimum*. Plantas de mayor peso se obtuvieron con la combinación de luz B + R (1:1); sin embargo, fue estadísticamente similar a otros tratamientos, excepto con la combinación de luces A + A, donde las plantas presentaron el menor peso encontrado en el experimento (Figura 3). De igual manera, se obtuvieron plantas más vigorosas en los tratamientos de R + B y R + R, y las plantas con menor tamaño se obtuvieron del tratamiento con luces A + A (Figura 4). Respecto al número de raíces, no se observó diferencias significativas entre los tratamientos, presentándose en todo un número parecido de raíces por explante.

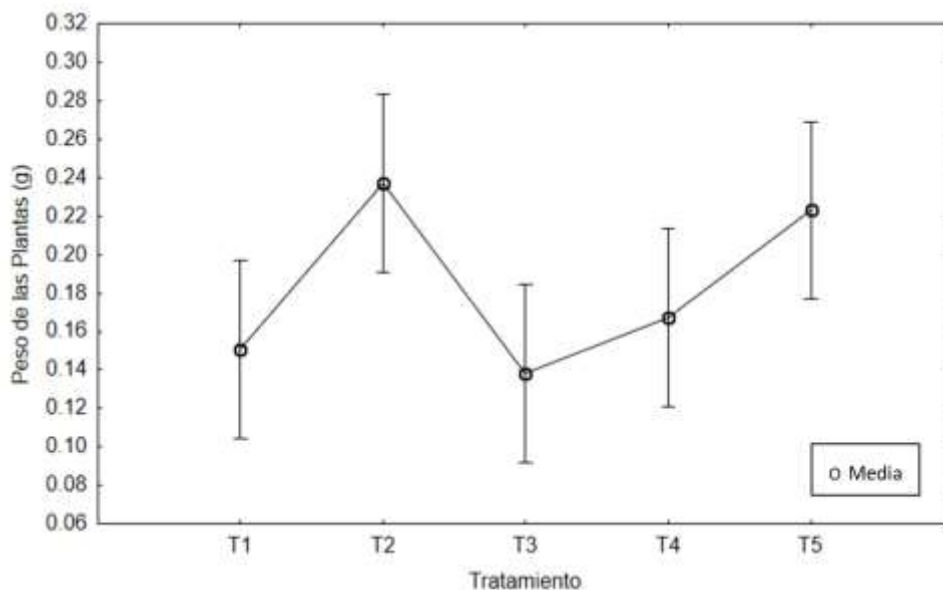


Figura 6. Pesos de la materia fresca de las plántulas de *C. integerrimum* sometidas a los diferentes tratamientos de luz. T1 = Luz Blanca, T2 = Roja + Blanca, T3 = Azul + Azul, T4 = Rojo + Azul, T5 = Rojo + Rojo.

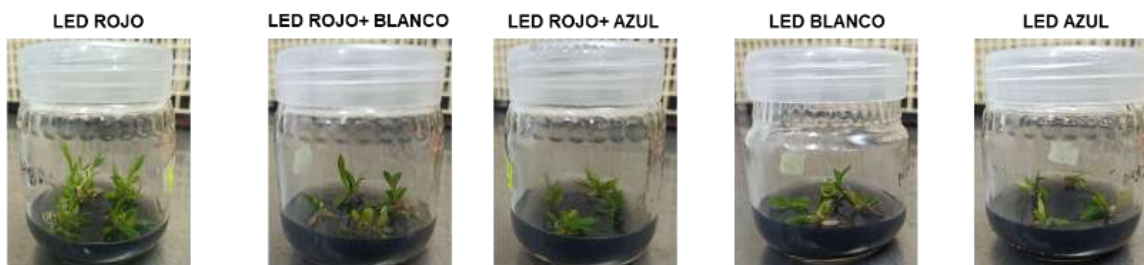


Figura 4. Calidad de las plantas de *C. integerrimum* de acuerdo a los tratamientos que fueron expuestas las plántulas.

Con los resultados anteriores, se puede definir que el color LED azul inhibió el incremento de biomasa, ya que en este tratamiento se observó el menor peso de las plantas; en el caso particular del tratamiento con luz R+A, se esperaban mejores resultados, ya que se ha reportado que esta combinación de luces favorece la apertura de los estomas (Squeo y Cardemil, 2007), con el consecuente incremento en la tasa de intercambio gaseoso que pudiera favorecer la fijación de CO₂, como sucedió con los trabajos realizados con la plántulas de *Protea cynaroides* (Wu y Lin, 2012) y *Laelia autumnalis* (Murillo *et al.*, 2016), donde las plantas de mayor peso se obtuvieron en las expuesta a dicha combinación de luz R + A. En general el uso de luz R + A resulta muy eficiente en el desarrollo de las plantas, sin embargo, siempre dependerá de la especie a estudiar.

Sin embargo, en este trabajo en los tratamientos con luz roja (B + R y R + R) las plantas incrementaron su peso; este comportamiento puede deberse a que la luz LED roja emite en un espectro luminoso de 660 nm, el cual se encuentra cerca del rango de absorbancia de las clorofilas y los fitocromos. Adicionalmente, la luz roja es la que mayor influencia ejerce sobre la fotomorfogénesis de las plantas (Lazzarini *et al.*, 2017). Nuestros resultados fueron muy distintos a los obtenidos con *Vanilla planifolia* Andrews (Bello *et al.*, 2016), en donde el tratamiento con luz LED roja más azul solo produjo proliferación de brotes y fue la luz blanca

donde se obtuvo mayor crecimiento de los brotes. De acuerdo con lo anterior, con este trabajo se comprueba la importancia de evaluar el efecto de los distintos tratamientos de luz, ya que cada especie reacciona de forma muy distinta, aunque pertenezcan a la misma familia taxonómica.

CONCLUSIONES

El proceso de multiplicación y desarrollo de los brotes de *C. integerrimum* se vio afectado, por las diferentes intensidades de luz evaluados. Los fotorreceptores de las plantas, que son los encargados de recibir y almacenar la luz del exterior, responden de forma diferente entre las especies vegetales a diferentes intensidades luminosas.

Con los resultados obtenidos se comprobó que las variables de crecimiento se vieron afectadas por los tratamientos de diferentes colores de LEDs. En general, se afirma que para la especie de orquídea *C. integerrimum*, la luz LED de color rojo combinada con blanca promueve la obtención de brotes y el incremento de biomasa, como sucede con muchas otras especies. Además, con dicho arreglo luminoso se obtuvieron brotes con mejor apariencia en color, con hojas de mayor tamaño.

AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento otorgado para la ejecución del presente proyecto de investigación (Convocatoria 2021: Proyectos de investigación científica, Clave: 9985.21-P).

LITERATURA CITADA

- Bello, J.J., E. Martínez, J.H. Caamal and V. Morales. 2016. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Revista Africana de Biotecnología*. pp. 272-277.
- Bourget, M. 2008. An introduction to Light-emitting Diodes. *Hort Science*, 43(7). pp. 1944-1946.
- Cox, T.L.D., J.Y.S. Ruiz-Cruz y E.A. Pérez-García. 2016. Diversidad y uso de las orquídeas. *Bioagrocencias* 9: 1-6.
- Cox, T.L.D. 2013. Orquídeas: Importancia y uso en México. *Bioagrocencias* 6(2), 4-7.
- Fischer, A.L. 2007. Cultivo de orquídeas. *Cultivation of orchids*. Grupo Imaginador de Ediciones. Buenos Aires, Argentina. 96 p.
- Gupta, D. and B. Jatothu. 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports* 7(3). pp. 211-220.
- 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.
- Lazzarini, L.E.S., F.V. Pacheco, S.T. Silva and A.D. Coelho. 2017. Uso de diodos emisores de luz (LED) na fisiología de plantas cultivadas: revisão. *Scientia Agraria Paranaensis* 16(2), 137-144.
- Morales-Báez, M., A. Salinas-Castro, D.E. Bello, M.G.L. Cadena, A.R. Fernández y A. Trigos. 2016. *Stethobaroides nudiventris* (Coleoptera: Curculionidae), the curculionid cause of petal wilting on the *Catasetum integerrimum* orchid. *Annals of the Entomological Society of America*. 109(6), 845-849.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3), 473-497.
- Murillo-Talavera, M.M., M.E. Pedraza-Santos, N. Gutiérrez-Rangel, M.N. Rodríguez-Mendoza, P. Lobit y A. Martínez-Palacios. 2016. Calidad de la luz led y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Agrociencia* 50(8), 1065-1080.
- Pérez, B. y S.L. Castañeda. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*. pp. 143-151.
- Squeo, F. y L. Cardemil. 2007. Fisiología vegetal. La Serena, Chile: Squeo y Cardemil. Universidad de La Serena.

- Wu, H.C. and C.C. Lin. 2012. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. Hort Science. pp. 1490-1494.
- Zhang, T. and K. Folta. 2012. Green light signaling and adaptive response. Plant signaling y Behavior 7(1). pp. 1-4.