

Efecto de la iluminación LED sobre la multiplicación *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl.

Effect of LED lighting on *in vitro* multiplication of *Laelia anceps* Lindl.

Víctor Hugo Romano-Ávila¹ , Nydia del Rivero-Bautista^{1*} , José Humberto Caamal-Velázquez² , Ángel Sol-Sánchez¹ , Alberto Mayo-Mosqueda³ , Rocío Guadalupe Acosta- Pech¹ 

¹Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n, carr. Cárdenas-Huimanguillo Km 3.5 H. CP. 86500. Cárdenas, Tabasco, México.

²Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Km 17.5 Carr. Federal a Haltunchen-Edzna Km. 17.5, Sihochac. CP. 22450. Champotón, Campeche, México.

³División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, UJAT. Carr. Estatal Libre Villahermosa-Comalcalco Km. 27+000 s/n Ranch. Ribera Alta. CP. 86205. Jalpa de Méndez, Tabasco, México.

*Autor de correspondencia: rnidya@colpos.mx

Artículo científico

Recibido: 04 de julio 2024

Aceptado: 16 de mayo 2025

RESUMEN. Se ha demostrado que factores ambientales como la calidad e intensidad lumínica, así como el régimen de iluminación (fotoperiodo o luz continua) afectan el desarrollo de los explantes en los sistemas de micropropagación, debido a la inducción de respuestas fisiológicas de diferente naturaleza. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de fuentes lumínicas LED de diferente composición espectral y reguladores de crecimiento 6-BAP y 2,4-D en diferentes concentraciones sobre el desarrollo *in vitro* de plantines de *Laelia anceps* Lindl. Además, los plantines obtenidos *in vitro* se evaluaron en dos medios de cultivo (semisólido y líquido). Las variables evaluadas fueron número de brotes, número de raíces, número de hojas, materia seca, contenido de clorofila a, b, total y carotenoides. Con los datos se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con la prueba de LSD ($p \leq 0.05$). El mayor número promedio de brotes (4.44 ± 0.44) y número de raíces (3.11 ± 1.54) se obtuvieron en el tratamiento que contenían 10 mg L⁻¹ de 6-BAP y expuestas a luz LED roja + azul, mientras que la concentración de pigmentos fotosintéticos fue mayor en el tratamiento con luz blanca y roja. El uso de medio de cultivo líquido (Sistemas de inmersión temporal) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos probados cuando se compararon con el medio de cultivo semisólido.

Palabras clave: Biorreactores de inmersión temporal, calidad de luz, morfogénesis, orquídea, organogénesis directa.

ABSTRACT. It has been shown that environmental factors such as light quality and intensity, as well as the lighting regime (photoperiod or continuous light) affect the development of explants in micropropagation systems, due to the induction of physiological responses of different nature. The objective of this research was to evaluate the effect of LED light sources of different spectral composition and growth regulators 6-BAP and 2,4-D at different concentrations on the *in vitro* development of *Laelia anceps* Lindl. seedlings. In addition, seedlings obtained *in vitro* were evaluated in two culture media (semisolid and liquid). The variables evaluated were number of shoots, number of roots, number of leaves, dry matter, chlorophyll a, b, total and carotenoid content. Analyses of variance (ANOVA) were performed with the data and means were compared with the LSD test ($p \leq 0.05$). The highest mean number of shoots (4.44 ± 0.44) and number of roots (3.11 ± 1.54) were obtained in the treatment containing 10 mg L⁻¹ of 6-BAP and exposed to red + blue LED light, while the concentration of photosynthetic pigments was higher in the treatment with white and red light. The use of liquid culture medium (temporary immersion systems) showed no significant differences between the tested treatments when compared to the semisolid culture medium.

Keywords: Direct organogenesis, light quality, morphogenesis, orchids, temporary immersion bioreactors.

Como citar: Romano-Ávila VH, del Rivero-Bautista N, Caamal-Velázquez JH, Sol-Sánchez A, Mayo-Mosqueda A, Acosta-Pech RG (2025) Efecto de la iluminación LED sobre la multiplicación *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 12(2): e4241. DOI: 10.19136/era.a12n2.4241.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existen entre 20 000 y 30 000 especies de orquídeas, cada día se descubren nuevas especies y en general, los países tropicales no han sido suficientemente estudiados como para estar seguros del tamaño de su flora de orquídeas (Chase 2001). Las orquídeas están entre las familias más amenazadas por la degradación de su hábitat, deforestación, comercio ilegal, extracción insostenible por su valor ornamental, medicinal y de alimento (Ticktin *et al.* 2020). México figura entre los países de América Latina más deforestados, tiene cerca de 1 300 especies de orquídeas silvestres, de las cuales, más de 300 especies son afectadas por el tráfico ilegal (Cardoso *et al.* 2020).

En México, *L. autumnalis* (Lex.) Lindl., *L. speciosa* (Kunt.) Schltr., y *L. anceps* Lindl. son extraídas extensivamente de los bosques por vendedores y recolectores. Debido a esto, *L. speciosa*, *L. autumnalis* y *L. anceps* se encuentran enlistadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010) que incluye organismos en las categorías de bajo riesgo y protección especial (Ticktin *et al.* 2018, Cortes-Palomec *et al.* 2019). El cultivo *in vitro* de orquídeas ha sido una vía práctica para propagar especies de orquídeas endémicas o en peligro de extinción con propósitos de conservación (Ávila-Díaz *et al.* 2009, Leyva-Ovalle *et al.* 2020). Durante los últimos años se han reportado protocolos *in vitro* para la multiplicación y conservación para 11 especies de *Laelia*; sin embargo, los esfuerzos se han concentrado en *L. anceps*, *L. autumnalis* y *L. speciosa* (Ávila-Díaz *et al.* 2009, Vergara-Galicia *et al.* 2010, Ortega-Loeza *et al.* 2011, Murillo-Talavera *et al.* 2016, Castillo-Pérez *et al.* 2019). Dentro de las acciones que se han llevado a cabo para tratar de conservar y atender un mercado demandante de este tipo de plantas, se encuentran la germinación a simbiótica de cápsulas de semillas, la conservación de germoplasma *in vitro*, entre otras acciones (Castañeda-Zárate y Mata-Rosas 2012, Ramírez-Mosqueda *et al.* 2019, Mayo-Mosqueda *et al.* 2022).

Las orquídeas tienen baja tasa de germinación, debido a que sus semillas carecen de endospermo, por lo cual requieren de nutrientes o de otro organismo que favorezca la germinación. Por ejemplo, la asociación de orquídeas y hongos, ya sea sólo durante la germinación de las semillas o durante toda su vida, es un mutualismo a través del cual la orquídea obtiene nutrientes y compuestos de carbono (Hágsater *et al.* 2005). Si hay algo que caracteriza a las orquídeas en su conjunto es la complejidad de sus interacciones con otros seres vivos, ya sean hongos micorrícicos, polinizadores, árboles hospedadores u hormigas mutualistas (Selosse y Roy 2009, Hogewoning *et al.* 2010, Batista *et al.* 2018). En la naturaleza, se calcula que, de un millón de semillas, solo 10 a 15 germinan y un máximo de dos plantines se convierten en plantas adultas (Zhang *et al.* 2019). La germinación a simbiótica en condiciones de cultivo *in vitro* se ha utilizado para ocho especies de *Laelia* hasta el momento, lo que demuestra que es una alternativa eficaz para aumentar las tasas de germinación y supervivencia manteniendo la diversidad genética. Además, la germinación a simbiótica es una técnica poderosa para establecer cultivos asépticos *in vitro* con medios de cultivo MS e hidroponía para otros fines comerciales (Morini *et al.* 2000).

En los últimos años, la micropropagación ha incorporado los desarrollos tecnológicos como es el uso de sistemas de inmersión temporal, nanomateriales, extractos vegetales, iluminación LED, entre otros avances (Sorcía-Morales *et al.* 2021, Salaya-Reyna *et al.* 2021). Hasta la fecha, se han utilizado varias fuentes de luz en laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, incluidas lámparas

de sodio de alta presión, de haluro metálico y fluorescentes, siendo estas últimas las más populares (Gupta y Jatothu 2013). La fuente de luz tradicional utilizada para la propagación *in vitro* son las lámparas fluorescentes (FL). Sin embargo, el consumo de energía en las FL es costoso y produce una amplia gama de longitudes de onda (350-750 nm) innecesarias para el desarrollo de la planta, sus desventajas incluyen un alto consumo de electricidad, parámetros de radiación inestables y una emisión de calor considerable. Por otro lado, los diodos emisores de luz (LED) tienen la flexibilidad de ofrecer longitudes de onda específicas que pueden producir resultados más rápidos o favorables para los investigadores y cultivadores de plantas (Bello-Bello *et al.* 2017).

Los sistemas LED tienen bajo consumo, larga vida útil y mínima emisión de calor, lo que permite que se ubiquen cerca de las plantas, lo que aumenta la concentración de fotones y mejoran la fotosíntesis. Otro beneficio es que los LED emiten una luz constante independientemente de las condiciones de temperatura, a diferencia de las FL que son sensibles a la temperatura ambiente y al flujo de aire (Gupta y Jatothu 2013). Además, su construcción permite un control preciso del espectro y el uso de luz monocromática, valiosa para fines industriales y de investigación, pero imposible de obtener con las FL. Pero en las plantas existen carotenoides, xantofilas y fenoles, los llamados pigmentos accesorios que también absorben radiación (Esteban *et al.*, 2015). En términos de producción de plantas, hay pocas aplicaciones en las que un espectro de luz monocromática pura produzca buenos resultados de crecimiento, como mantener las plantas compactas o retrasar el crecimiento. Además, todas las longitudes de onda entre 400 y 700 nm y por encima de 700 nm, contribuyen a la fotosíntesis y transmiten información sobre el entorno de la planta (Zhen y van-Iersel 2017). Estudios previos llevaron a la conclusión de que cada especie de planta requiere un rango de longitud de onda específico para un crecimiento óptimo (Gupta y Jatothu 2013, Baghel y Bansal 2015).

Otra alternativa es el uso de sistemas de inmersión temporal (SIT), los cuales son sistemas automatizados y de diseño sencillo, pensados para el cultivo intensivo en un entorno de condiciones óptimas. Estos sistemas mejoran la transferencia de nutrientes y gases, y favorecen la formación de brotes. Además, permiten un monitoreo y control preciso de las condiciones ambientales, lo que resulta beneficioso en la producción comercial de plantas micropropagadas (Georgiev *et al.* 2014). El uso de medio líquido durante la micropropagación, se considera la solución ideal para reducir los costos de producción e introducir la automatización (San-José *et al.*, 2020). La frecuencia y duración de la inmersión, el volumen del medio líquido, el número de explantes, la aireación y la ventilación forzada son factores críticos para optimizar la técnica de micropropagación (Bello-Bello *et al.* 2019, Lu y Merkle 2021) ya que promueve procesos fisiológicos tales como la fotosíntesis, la respiración, el desarrollo de la clorofila y el funcionamiento de las estomas, lo que favorece el desarrollo durante el proceso de aclimatización. Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue comparar las respuestas morfológicas de explantes a luces LED, y determinar el sistema de cultivo más rentable para la producción *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. Asimismo, la aplicación de LEDs podría aumentar la tasa de multiplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados Campus Campeche. En el experimento se utilizaron plantines de 90 días de post-germinación, provenientes de semillas de una misma cápsula de *Laelia anceps* cultivadas *in vitro* en el medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 5 g L⁻¹ de carbón activado y 3.2 g L⁻¹ de goma Gellan como gelificante. Los plantines fueron cultivados en condiciones asépticas en cuarto de fotoperiodo, con un régimen de iluminación de 12 h luz/12 h oscuridad, iluminadas con lámparas de tubo fluorescente blanca de 2 700 lumens, a una temperatura de 25 °C. La combinación de tipo de luz LED y reguladores de crecimiento y los dos sistemas de cultivo semisólido y líquido, es un efecto que se evaluó en este estudio.

Efecto de luces LED y reguladores de crecimiento en plantines

Los plantines fueron cultivados en medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog 1962), complementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (6-BAP, Phytotechnology Labs. Cat. B800) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (ácido 2,4-D, Phytotechnology Labs Cat. D295), en diferentes concentraciones y un control. Se empleó medio de cultivo semisólido que contuvo 3.2 g L⁻¹ de goma Gellan. Cada frasco de vidrio de 250 mL de capacidad contuvo tres plantines de 1.0 cm de longitud en promedio. Los plantines fueron evaluados a los 45 días de cultivo. Los frascos con los plantines fueron mantenidos con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a temperatura de 25 °C. El fotoperiodo empleado se utiliza para plantas tropicales. El estante del cuarto de cultivo consistió en un anaquel (121 cm x 193 cm x 45 cm) cromado con certificación (NSF), de seis niveles con una separación de 35 cm por nivel. El sistema de iluminación consistió en 2 lámparas LED (Tianlai®, T8X2C06A, 18W, 6 500K, 840 lm) de colores blanco frío (LW, 14.84 μmol m⁻² s⁻¹), rojo (LR, 4.2 μmol m⁻² s⁻¹), azul (LB, 19.6 μmol m⁻² s⁻¹) o en combinación, según sea el tratamiento. Los tratamientos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos evaluados

Tratamiento	6-BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	Luz LED	Tratamiento	6-BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	Luz LED
1	0	0	Blanca	9	10	0	Roja +Azul
2	0	0	Roja	10	10	0	Roja + Blanca
3	0	0	Azul	11	1	0.5	Blanca
4	0	0	Roja + Azul	12	1	0.5	Roja
5	0	0	Roja + Blanca	13	1	0.5	Azul
6	10	0	Blanca	14	1	0.5	Roja + Azul
7	10	0	Roja	15	1	0.5	Roja + Blanca
8	10	0	Azul				

Influencia de dos sistemas de cultivo en la propagación de plantines

Se evaluaron dos sistemas de cultivo: Sistema de cultivo semisólido, en donde los medios fueron adicionados con 3.2 g L⁻¹ de goma Gellan y dosificados en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad y medio de cultivo líquido (Sistemas de Inmersión Temporal, SIT), en donde el medio de cultivo se dosificó en los frascos gemelos de un litro de capacidad. Se realizaron tres inmersiones durante 1 minuto cada 8 h. En este caso los SIT de un litro de capacidad, contuvo inicialmente 10 plantines. Los plantines fueron evaluados a los 25 días de cultivo. Los plantines fueron cultivados en condiciones asépticas en cuarto de fotoperiodo, con un régimen de iluminación de 12 h luz/12 h oscuridad, iluminados con lámparas de tubo fluorescente blanca de 2 700 lumens, a una temperatura de 25 °C. Para llevar a cabo los experimentos el pH se ajustó a 5.7, previo a su esterilización en autoclave a 121 °C y 1.2 kg cm⁻² de presión por 20 minutos.

VARIABLES DE RESPUESTA EVALUADAS

En los experimentos realizados, las variables evaluadas fueron el número de brotes, número de hojas y número de raíces de cada plantin. Asimismo, se determinó la materia seca expresada en porcentaje obtenida mediante la fórmula (Peso fresco (g))/(Peso seco (g)*100=MS) (las muestras fueron colocadas en estufa a 70 °C durante 8 h para obtener el peso seco). Además, se estimó el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b, total y carotenoides) mediante el método desarrollado por Wellburn (1994) modificado. Se tomaron 50 mg de hoja y se maceraron en frío con 2.0 mL de acetona al 80 %. El extracto fue colocado en microtubos y centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se midió la absorbancia del sobrenadante a la longitud de onda de 470 645 y 663 nm en un espectrofotómetro Jenway (modelo 7 315). Los datos de absorbancia se usaron para calcular la concentración de los pigmentos, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Ecuaciones para calcular la concentración de los pigmentos

$$\text{Clorofila } a = 12.21 (A_{663}) - 2.81 (A_{645})$$

$$\text{Clorofila } b = 20.13 (A_{645}) - 5.03 (A_{663})$$

$$\text{Clorofila total} = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/g}) = \frac{A_{470} \times V(\text{mL}) \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times P(\text{g})}$$

donde: A = absorbancia medida a 470 nm, V = volumen total del extracto (mL), P = peso de la muestra (g), A_{1cm}^{1%} = 2592 (Coeficiente de absortividad molar del β-caroteno en éter de petróleo), y 10⁴=Factor de conversión para expresar el resultado en μg/g.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, se empleó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial. Para el cultivo en medio semisólido, las unidades experimentales consistieron en un frasco con tres plantines cada uno con cinco repeticiones. Para los biorreactores se emplearon tres frascos con 10 plantines. La cantidad de plantines en los sistemas de cultivo varió debido a la capacidad de cada uno de los sistemas utilizados. Los experimentos en medios de cultivo semisólido y líquido fueron replicados tres veces. A los datos obtenidos se les realizaron las pruebas de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (Lindman 1974). Para el

procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó análisis de varianza (ANOVA), las medias se compararon con una prueba de Diferencia Significativa Mínima ($p \leq 0.05$), para encontrar diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis se realizaron con el software R Core Team versión 4.2.2. para Windows de Microsoft®.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre los tratamientos evaluados de manera individual (Figuras 1A, B, C y D).

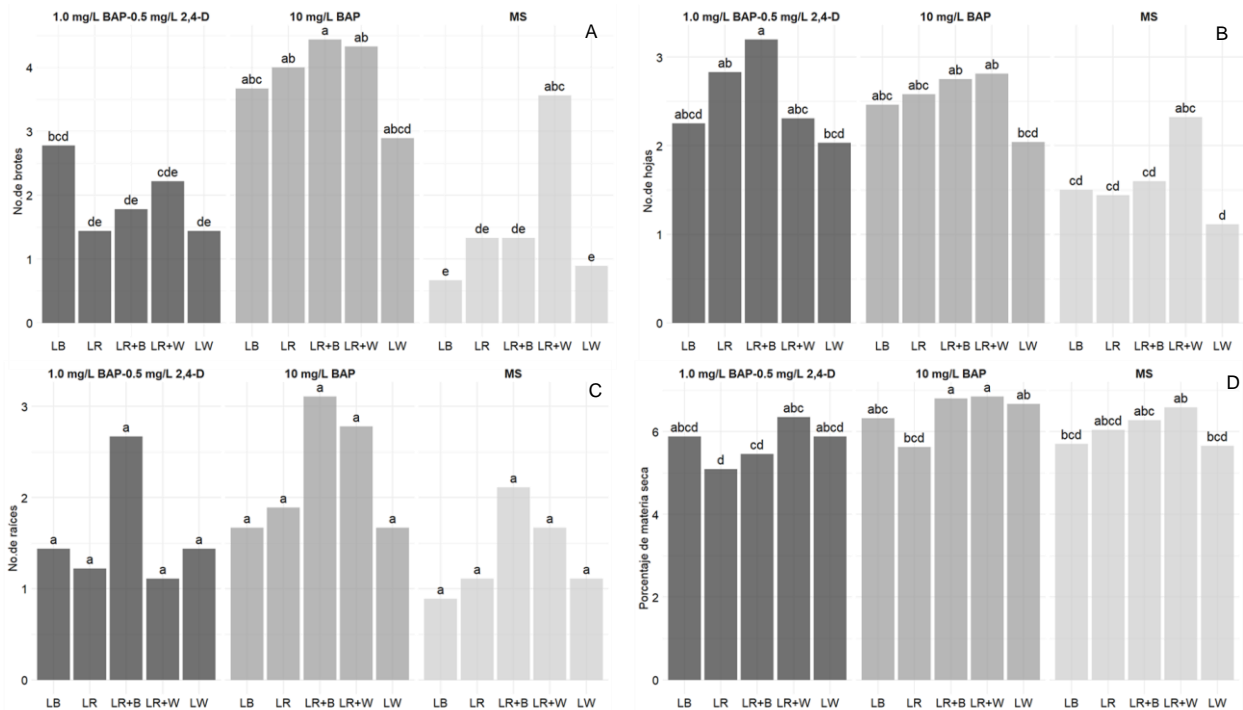


Figura 1. Efecto de la Luz LED y reguladores de crecimiento en la orquídea *Laelia anceps*. A) número de brotes, B) número de hojas, C) número de raíces y D) porcentaje de materia seca a los 45 días de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de LSD ($p < 0.05$).

El mayor número promedio de brotes (4.44 ± 0.44) (Figura 1A) se obtuvo en el tratamiento que contenía 1.0 mg L^{-1} de 6-BAP y expuesto a luz LED (LR+B) ($18.87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). En el tratamiento control se observó la misma respuesta, un incremento en el número de brotes en la combinación de LED (LR+B); mientras que cuando se adicionó una auxina al medio de cultivo el mayor número de brotes se obtuvieron en el tratamiento con LED (LB). En tanto que el mayor número de hojas (3.20 ± 0.46 , Figura 1B) se logró en el tratamiento que contenía 1.0 mg L^{-1} de 6-BAP adicionado con 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D en luz LED (LR+B). Cuando el medio de cultivo solo contenía la citoquinina se observó la misma respuesta a la luz LED (LR+B) y en el tratamiento control el mayor número de hojas se alcanzó en la combinación de luz LED (LR+W).

El número de raíces (3.11 ± 1.54) (Figura 1C) fue mayor en el tratamiento que contenía 10 mg L⁻¹ de 6-BAP en luz roja más azul y de (2.78 ± 1.83) en luz roja más blanca. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Con respecto al porcentaje de materia seca el mayor porcentaje (6.80 ± 0.49) se alcanzó con 10 mg L⁻¹ de 6-BAP en la combinación de luz LED (LR+B) (Figura 1D). La composición del medio de cultivo y el tipo de luz afectaron los contenidos de los pigmentos fotosintéticos (Figuras 2A, B, C y D).

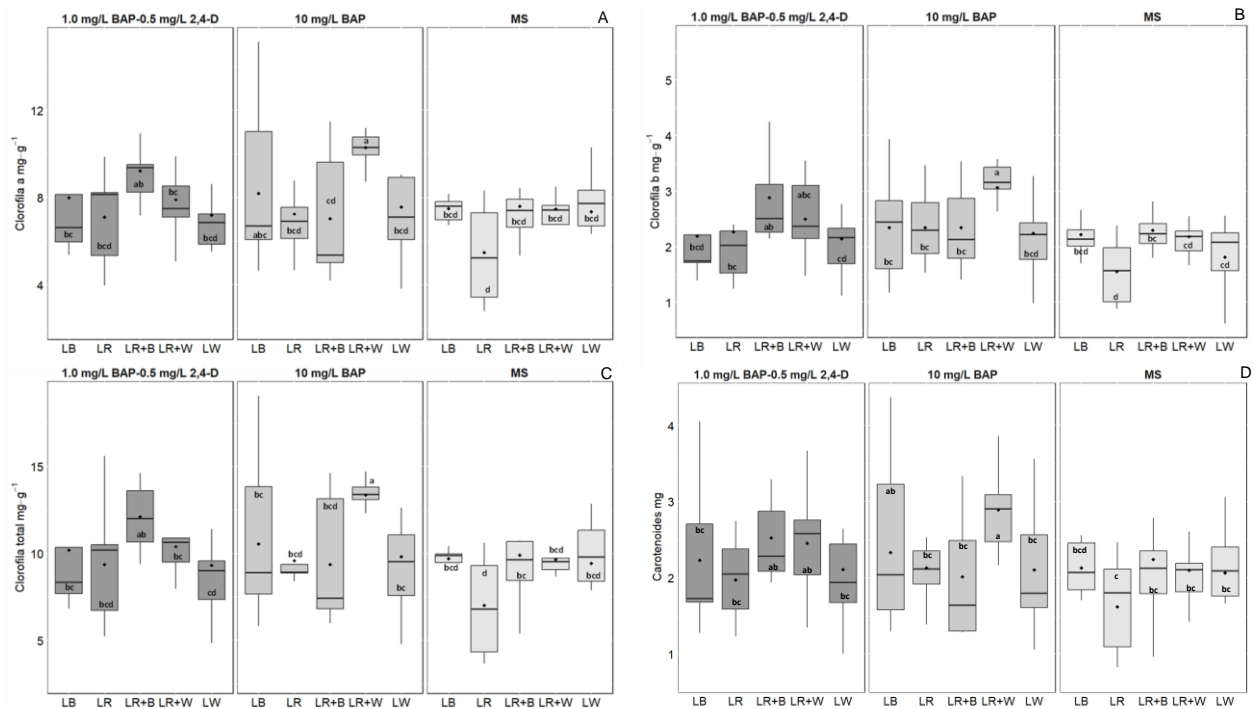


Figura 2. Efecto de la Luz LED y reguladores de crecimiento en la orquídea *Laelia anceps*. A) clorofila a, B) clorofila b, C) clorofila total y D) carotenoides, a los 45 días de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de LSD ($p < 0.05$)

La luz LED (LR+W) incrementó la acumulación de clorofila a (10.30 mg g^{-1}) (Figura 2A), clorofila b (3.07 mg g^{-1}) (Figura 2B), clorofila total (13.37 mg g^{-1}) (Figura 2C) y carotenoides (2.90 mg g^{-1}) (Figura 2D) con respecto a los demás tratamientos, con hasta 7.9 mg g^{-1} más clorofila total que en el tratamiento control más luz roja.

Se realizaron observaciones visuales de los plantines obtenidos como tamaño, cantidad, raíces, coloración y textura de las hojas. En las plántulas micropropagadas de *Laelia anceps*, en todos los tratamientos evaluados no se observaron visualmente cambios degenerativos en el tamaño, número de raíces y número de hojas (Figura 3).

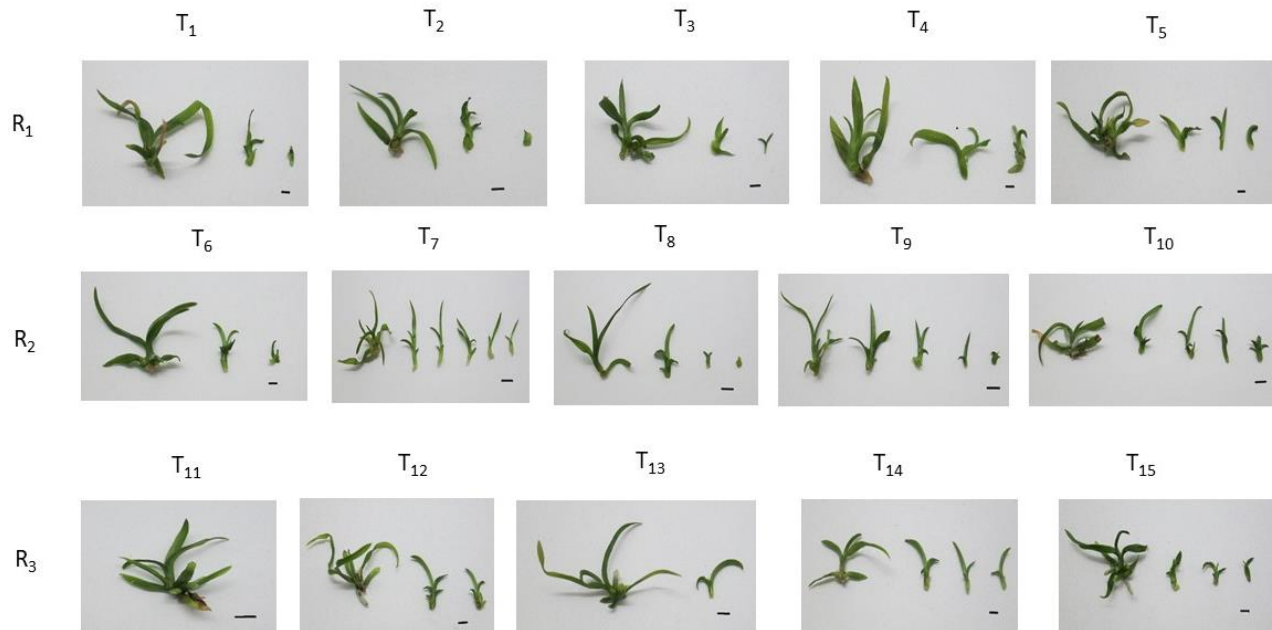


Figura 3. Plantines *in vitro* de *Laelia anceps*, obtenidas con diferentes combinaciones de luz y reguladores de crecimiento durante 45 días de cultivo. Las barras representan 1 cm.

Cuando las plántulas obtenidas estuvieron bajo la iluminación con luz blanca (T1, T6 y T11) se observaron plántulas pequeñas, con pocas hojas, algunas alargadas, raíces con presencia de velamen (la cual aparece como protección mecánica para evitar pérdida de agua) y variaron de verde claro a verde oscuro. También se observó que las plántulas sometidas al efecto de luz roja (T2, T7 y T12) eran pequeñas, hojas pequeñas y pocas, raíces con presencia de velamen y sin raíces; así como color verde claro. Las características de las plántulas bajo el efecto de la luz azul (T3, T8 y T13) fueron pequeñas y delgadas, pocas hojas, pocas raíces pequeñas y coloración verde claro. Para los tratamientos (T4, T9 y T14) se observaron plántulas grandes con varias hojas pequeñas y algunas alargadas, raíces largas y algunas sin presencia de raíces, la coloración varió de verde claro a verde oscuro. Las plántulas de los tratamientos (T5, T10 y T15) fueron pequeñas y delgadas, con hojas pequeñas, raíces pequeñas y la coloración fue de verde claro a verde oscuro.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos probados. Las variables evaluadas número de brotes, número de raíces, número de hojas, porcentaje de materia seca, clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides en los dos medios de cultivo no mostraron diferencias significativas estadísticamente (Tablas 2 y 3). Sin embargo, en el caso de las variables porcentaje de materia seca y carotenoides sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Aunque se esperaba que la exposición a los diferentes medios de cultivo incrementara en las variables en estudio.

Tabla 2. Influencia de los sistemas de cultivo en *Laelia anceps* a los 25 días de cultivo

Sistema de cultivo	No. de brotes Media ± ee	No. de hojas Media ± ee	No. de raíces Media ± ee	% de materia seca Media ± ee
Líquido	3.20 ± 0.368 a	5.40 ± 0.702 a	0.33 ± 0.12 a	5.61 ± 0.335 a
Semisólido	2.89 ± 0.655 a	7.11 ± 0.02 a	1.67 ± 1.03 a	6.67 ± 0.474 a

Tabla 3. Influencia de los sistemas de cultivo en *Laelia anceps* a los 25 días de cultivo

Sistema de cultivo	Clorofila a Media ± ee	Clorofila b Media ± ee	Clorofila total Media ± ee	Carotenoides Media ± ee
Líquido	8.84 ± 0.558 a	2.59 ± 0.217 a	11.4 ± 0.758 a	2.71 ± 0.61 a
Semisólido	7.57 ± 0.959 a	2.21 ± 0.304 a	9.80 ± 1.190 a	2.10 ± 0.78 b

Con respecto al sistema de inmersión temporal, los resultados obtenidos indican diferencias en los valores para las variables número de brotes, clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio en el número de brotes difieren de los alcanzados en vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) con 5.11 brotes cuando fueron expuestos a luz azul más roja ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Ramírez-Mosqueda *et al.* 2017) y en *Dendrobium officinale* Kimura & Migo con 11.5 brotes con luz azul al 100% ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Lin *et al.* 2011) es difícil indicar un único espectro de luz adecuado para la propagación de cada especie vegetal. Por ejemplo, Bello-Bello *et al.* (2016) obtuvieron en *Vanilla planifolia*, la tasa de propagación más alta (10.8 brotes) en la mezcla de LED azul y rojo, blanco y FL; mientras que, disminuyó la proliferación de brotes en luz roja y azul cuando se encontraban de forma individual o monocromática. Esto se debe a que las plantas responden a un estímulo de diferente manera, en virtud de su ambiente, necesidades y mecanismos que tienen la capacidad de detectar, medir e interpretar la información de luz entrante (Franklin *et al.* 2007, Shaarma *et al.* 2021).

Los resultados en el número de hojas promedio fueron superiores a los obtenidos por Mayo-Mosqueda *et al.* (2020) quienes alcanzaron en *Laelia rubescens* Lindl., 1.46 ± 0.51 hojas promedio en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (Figura 1B). Mientras que, los resultados del estudio fueron inferiores a los alcanzados en *Vanilla planifolia* 3.6 hojas promedio (Bello-Bello *et al.* 2016), 4.6 en *Myrtus communis* L. (Cioć *et al.* 2018) bajo condiciones de luz fluorescente (FL) y en *Vanilla planifolia* con 4.6 hojas en promedio con luz azul al 100% (Ramírez-Mosqueda *et al.* 2017). Esto puede ser debido a que la luz LED azul o la combinación LED azul rojo estimula la elongación de la hoja y por lo tanto el área foliar en varias especies de plantas cultivadas *in vitro* (Shin *et al.* 2008, Liu *et al.* 2014). Además, la luz fluorescente incrementa la densidad estomatal de las plántulas *in vitro* de *V. planifolia* mientras las diferentes luces LED promueven el efecto opuesto.

En el número de raíces en este estudio fueron superiores a los encontrados en *Laelia rubescens* (1.0 ± 0.1) (Mayo-Mosqueda *et al.* 2020), *Laelia autumnalis* (0.90) (Murillo-Talavera *et al.* (2016) y *Vanilla planifolia* (2.6) (Bello-Bello *et al.* 2016). Esto puede ser debido, a que las citoquininas promueven la formación de brotes y de raíces dependiendo de sus concentraciones en interacción a otros factores (Skoog y Miller 1957) a menudo, la presencia y acción conjunta de dos, como auxinas y citocininas, puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica en un tejido, de acuerdo con los niveles relativos entre sí, y discrepar entre un promotor o retardador del crecimiento (Garay-Arroyo *et al.* 2014). Por lo que la homeostasis de auxinas mediada por la regulación espacial y temporal de la biosíntesis de auxinas juega un papel central en la determinación de la arquitectura

de la raíz (Olatunji *et al.* 2017). En *L. anceps* y *L. rubescens* se obtuvieron 6.52 y 2.33 raíces por explante en un medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento y en un medio de cultivo Phytamax adicionado con jugo de piña, respectivamente con lámparas fluorescentes (Mayo-Mosqueda *et al.* 2020). Por otro lado, las luces LED permiten una especificidad de longitudes de onda lo que a su vez brinda a los diferentes cultivos, las condiciones necesarias (Gómez-Coto 2014) para que el cultivo *in vitro* sea más accesible y eficiente, permitiendo su amplio uso.

Con respecto a materia seca los resultados difieren con los obtenidos por otros autores, lo que sugiere buscar el mejor balance entre las proporciones que se utilicen de la combinación empleada. Lin *et al.* (2011), quienes indican que la acumulación de materia seca en plantines de *Dendrobium officinale* se favorece con 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz roja y azul (1:2) y Murillo-Talavera *et al.* (2016) obtuvieron 12.2% de materia seca con luz roja más azul en proporción (3:1) en *Oncidium tigrinum* Lex. y 10.83% con luz blanca en *Laelia autumnalis*. Así, en *Lilium oriental* híbrido 'Pesaro', la iluminación con luz LED (azul+roja) (1:1) y luz fluorescente, incrementaron la materia seca en bulbillos (Lian *et al.* 2002) y en *Dendrobium officinale*, la luz LED (roja+azul) (1:1) mejoró la concentración de biomasa en protocormos (Lin *et al.* 2011). Todos los estudios disponibles parecen confirmar que la luz roja promueve el aumento del peso fresco, y que la luz roja más azul aumenta la acumulación de materia seca (Lin *et al.* 2011).

En la micropropagación, la luz LED roja y azul, solas o combinadas, tienen una influencia significativa sobre el desarrollo de las plantas (Dutta y Jatothu 2013). La luz LED roja se asocia con el crecimiento de las plantas (alargamiento de entrenudos), como se observó en *Oncidium* (Mengxi *et al.* 2011) y con la baja concentración de pigmentos fotosintéticos probada en *Dendrobium officinale* (Lin *et al.* 2011). Las plantas tienen la capacidad de captar la cantidad (intensidad de la radiación), calidad (longitud de onda) y duración (fotoperiodo) de la luz. La luz es uno de los principales recursos que determinan las características económicas de las plantas (Li *et al.* 2018, Zhao *et al.* 2019, Centofante 2020). La iluminación artificial puede acelerar la acumulación de masa seca en las plantas mediante un fotoperiodo diario prolongado (Li *et al.* 2017, Wang *et al.* 2017, An *et al.* 2018).

El incremento obtenido en las clorofilas a, b, total y carotenoides puede deberse a la composición espectral de la luz blanca (400-700 nm), que incluye las longitudes de onda azul (430-480 nm), verde (495-570 nm) y roja (590-670 nm) que absorben los fotosistemas II (≤ 680 nm) y I (≤ 700 nm), dado que, para una máxima eficiencia deben participar ambos fotosistemas (Solarte *et al.*, 2010). Hay que considerar que las hojas absorben fotones principalmente de los espectros azul y rojo y de manera más débil lo hacen en el verde, aunque la mayoría de esos fotones son reflejados por las plantas en forma de radiación difusa (Lazo y Ascencio 2010). Sin embargo, los resultados varían con los alcanzados por Murillo-Talavera *et al.* (2016) en *Laelia autumnalis* con luz LED blanca. Se sabe que las regiones de luz azul y roja son absorbidas de manera más eficiente por las clorofilas, los pigmentos fotosintéticos primarios, lo cual ocurre durante los procesos fotosintéticos (Chen y Blankenship 2011). La luz roja promueve la fotosíntesis y el crecimiento vegetativo al aumentar el contenido de clorofila, estableciendo la formación del aparato fotosintético y probablemente induciendo la apertura estomática (Wang *et al.* 2016, Zhu *et al.* 2020).

La concentración de clorofilas totales es controlada por la luz y a intensidades elevadas de irradiación, las moléculas de clorofilas entran en procesos fotooxidativos (Kozłowski y Kramer

1991), lo que podría explicar la menor ganancia de peso observada en los plantines sujetas a luz azul. De hecho, en plantas de tomate y chile habanero expuestas a luz azul monocromática se observa una menor concentración de clorofilas totales (Liu *et al.* 2018, Mendoza *et al.* 2021), posiblemente debido también a la fotooxidación de dichos pigmentos. La baja concentración de clorofilas totales detectada en las plantas sometidas a la luz roja (LR) fueron similares a los resultados observados en lechuga (Wang *et al.* 2016). Sin embargo, hay especies en las que existe una correlación directa entre la cantidad de radicación recibida y la concentración de pigmentos fotosintéticos cuantificada, cada especie de planta requiere un rango de longitud de onda específico para un crecimiento óptimo (Gupta y Jatothu 2013, Baghel y Bansal 2015). El contenido de clorofila de plántulas *in vitro* cultivadas bajo diferentes calidades de luz puede estar correlacionado con la especie o el cultivar de la planta (Li *et al.* 2013). La calidad de la luz también juega un papel importante en la fotosíntesis, ya que influye en la forma en que la clorofila absorbe la luz (Tripathy y Brown 1995, Topchiy *et al.* 2005). El factor más importante es que la longitud de onda del LED es mucho más estrecha que las fuentes de luz tradicionales. Por lo tanto, se puede seleccionar una calidad espectral específica y más precisa y ajustarla a los requisitos de una planta en particular (Massa *et al.* 2008, Silva *et al.* 2017). La proporción apropiada de luz azul y roja parece ser lo más esencial para el crecimiento de las plantas. Muchos investigadores han informado sobre los efectos de la luz roja o azul en la morfogénesis y los procesos metabólicos de las plantas (Li *et al.* 2013, Alvarenga *et al.* 2015), incluidas las especies ornamentales, como *Lilium* (Lian *et al.*, 2002), crisantemo (Kurilčik *et al.* 2008), *Tripterospermum japonicum* (Moon *et al.* 2006) y *Dendrobium officinale* (Lin *et al.* 2011).

En cuanto a las características de los plantines estas variaron y se han comprobado efectos de la iluminación LED en orquídeas como *Cymbidium Waltz 'Idol'*, *Oncidium tigrinum* y *L. autumnalis* (Kamal *et al.* 2014, Murillo-Talavera *et al.* 2016). En la micropropagación, la luz LED roja y azul, solas o combinadas, tienen una influencia significativa sobre el desarrollo de las plantas (Dutta y Jatothu 2013). Esto es debido a que la composición espectral de las longitudes de onda color verde, rojo y azul tienen un papel importante en la mejora de la calidad de la planta, las cuales son más eficientes en incrementar el número de brotes, protocormos, la biomasa y elongación de la planta (Rehman *et al.* 2020). En los plantines con LED azul, estos mostraron un efecto similar al referido por Meng *et al.* (2020) quienes indicaron que generalmente las plantas que crecen bajo condiciones de luz azul suelen ser más cortas y tienen hojas más pequeñas, más gruesas y de color verde oscuro en comparación con las plantas que crecen sin luz azul.

Con respecto a los sistemas de cultivo, en gladiolo se obtuvo el mayor número de brotes y raíces cuando utilizaron un sistema de inmersión temporal (Chávez-García *et al.* 2018). La omisión del gelificante en el medio de cultivo definitivamente reduciría insumos de laboratorio los costos de producción de las plantas y facilitaría el proceso de automatización de la micropropagación. Los sistemas de inmersión temporal emplean medios líquidos lo cual facilita la asimilación de nutrientes por los explantes. La planta entra en contacto con este medio con cierta frecuencia durante un corto periodo de tiempo lo que evita los problemas de hiperhidricidad (desorden morfológico y fisiológico que provoca una estructura cristalina y acuosa del tejido, además de un crecimiento distorsionado) provocados por los medios líquidos en contacto permanentes. Además, estos sistemas permiten la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la

acumulación de gases nocivos como el etileno (que promueve la senescencia de los tejidos). Los sistemas de inmersión temporal facilitan la regulación de la concentración de CO₂ y mejoran la oxigenación de los tejidos (Castillo-Ontanera *et al.* 2020), dependiendo del sistema utilizado.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) son una alternativa que combina los efectos positivos del medio de cultivo líquido. La micropropagación de orquídeas ha sido llevada a cabo a través de sistemas de cultivo tradicionales utilizando medio de cultivo semisólidos (Bhattacharyya *et al.* 2017). Sin embargo, los SIT se han implementado como una alternativa que implica menores costos, mayores tasas de multiplicación y buscando lograr un proceso de micropropagación semiautomático (Murthy *et al.* 2018, Shen y Hsu 2018, Zhang *et al.* 2018).

CONCLUSIONES

Las diferentes combinaciones de luces LED producen un efecto diferencial (positivo o negativo) en el crecimiento y desarrollo durante la multiplicación *in vitro* de *Laelia anceps*. La combinación de LEDs rojo más blanco (R:W) estimuló todas las variables evaluadas con la adición de una citoquinina en el medio de cultivo. El uso de luces LED y reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones fueron utilizados para resolver los problemas que se presentan en la propagación *in vitro* en el cultivo de orquídeas expuestas a condiciones de luz fluorescente. El medio de cultivo líquido para esta especie numéricamente fue más eficiente que el medio de cultivo semisólido en las variables evaluadas.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

LITERATURA CITADA

- Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci VSK, Pinto PJEB (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L. quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 122: 299-308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>
- An B, Wei H, Li L, Guo P (2018) Nutrient uptake and utilization and antioxidants of fruits in Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivar 'Autumn Bliss' in response to fertilization under extended photoperiod. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46(2): 440-448. <https://doi.org/10.15835/nbha46211065>
- Ávila-Díaz I, Oyama K, Gómez-Alonso C, Salgado-Garciglia R (2009) *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99(3): 335-343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- Baghel S, Bansal YK (2015) *In vitro* regeneration of oil yielding plants - a review. *Journal Essent Oil Bear Plants* 18: 1022-1050. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971068>

- Bhattacharyya P, Kumar V, Van-Staden J (2017) Assessment of genetic stability amongst micropropagated *Ansellia africana*, a vulnerable medicinal orchid species of Africa using SCoT markers. *South African Journal of Botany* 108: 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.007>
- Batista DS, Heitor D, Sousa F, Silva DT, Motta de Castro K, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda AN, Ríos-Ríos MA, Vidal FD, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Campos OW (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In vitro Cellular and Developmental Biology* 3(54): 195-215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>
- Bello-Bello JJ, Martínez E, Caamal J, Morales V (2016) Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *African Journal of Biotechnology* 15(8): 272-277. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14662>
- Bello-Bello JJ, Pérez-Sato JA, Cruz-Cruz CA, Martínez-Estrada E (2017) Light-emitting diodes: Progress in plant micropropagation. In: Jacob-Lopes E, Queiroz-Zepka L, Queiroz MI (eds) *Chlorophyll*. Intech. London, UK. pp. 93-104. <http://dx.doi.org/10.5772/67913>
- Bello-Bello JJ, Cruz-Cruz CA, Pérez-Guerra JC (2019) A new temporary immersion system for commercial micropropagation in banana (*Musa AAA cv Grand Naine*). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 55(3): 313-320. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09973-7>
- Cardoso JC, Zanello CA, Chen JT (2020) An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal Molecular Science* 21(3): 985-1016. <https://doi.org/10.3390/ijms21030985>
- Castañeda-Zárate M, Mata-Rosas M (2012) Conservación de germoplasma *in vitro* de "Lirio de todos Santos" *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* f. *semialba* (Orchidaceae). En: Téllez-Velasco MAA (ed) *Conservación de orquídeas en México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 99-103.
- Castillo-Pérez L, Maldonado-Miranda, JJ, Alonso-Castro AJ, Carranza-Álvarez C (2019) Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). *Biotecnica* 22(1): 32-38. <http://doi.org/10.18633/biotecnica.v22i1.1122>
- Castillo-Ontaneda AL, Moreno-Herrera A, García-Batista RM (2020) Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas* 3(2): 173-182. <https://doi.org/10.62452/9dq60d52>
- Centofante A (2020) Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. *Scientia Horticulturae* 259: 108765. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108765>
- Cioć M, Szewczyk A, Żupnik M, Kalisz A, Pawłowska B (2018) LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 132: 433-447. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1340-2>
- Chase MW (2001) The origin and biogeography of Orchidaceae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum, Vol. 2: Orchidoideae (part one)*, Oxford University Press, Oxford, USA. pp. 1-9.
- Chávez-García JA, Andrade-Rodríguez M, Juárez-López P, Villegas-Torres OG, Sotelo-Nava H, Perdomo-Roldan F (2018) Evaluación de tres sistemas de cultivo *in vitro* para la multiplicación de microcormos de gladiolo. *Revista Fitotecnica Mexicana* 41(4-A): 551-554. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.4-A.551-554>
- Chen M, Blankenship RE (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends in Plant Science* 16(8): 427-431. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.011>
- Cortes-Palomec AC, McCauley RA, Oyama K (2019) Maintenance of high levels of genetic diversity and significant fine-scale genetic structure among age classes in single-tree populations of the endangered epiphytic orchid *Laelia speciosa* (Orchidaceae) in central Mexico. *Botanical Sciences* 97(3): 366-380. <https://doi.org/10.17129/botsci.2169>

- Dutta GS, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports* 7(3): 211-220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>
- Esteban R, Barrutia O, Artetxe U, Fernández-Marín B, Hernández A, García-Plazaola JI (2015) Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: a meta-analytical approach. *New Phytology* 206: 268-280. <https://doi.org/10.1111/nph.13186>
- Franklin K, Allen T, Whitelam G (2007) Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *The Plant Journal* 50(1): 108-117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03036.x>
- Garay-Arroyo A, Sánchez MP, García-Ponce B, Álvarez-Buylla ER, Gutiérrez C (2014) La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica* 33(1): 13-22.
- Georgiev V, Ivanov I, Berkov S, Pavlov A (2014) Temporary immersion systems for Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis by *Pancreatum maritimum* L. shoot culture. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23(4): 389-398. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0222-x>
- Gómez-Coto FJ (2014) Efecto de la calidad espectral sobre el desarrollo vegetal de *Salvia splendens* variedad Vista Red and White. *Revista Tecnología en Marcha* 27(8): 49-54. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i8.2230>
- Gupta D, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports* 7(3): 211-220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>
- Hágsater E, Soto MA, Salazar GA, Jiménez R, López MA, Dressler RL (2005) Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, A.C., México. 304p.
- Hogewoning S, Trouwborst G, Maljaars H, Poorter H, Van Ieperen W, Harbinson J (2010) Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *Journal of Experimental Botany* 61(11): 3107-3117. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq132>
- Kamal, M.M, Shimasaki, K, Akter, N (2014) Effect of light emitting diode (LED) lamps and N-Acetylglucosamine (NAG) on organogenesis in protocorm-like bodies (PLBs) of a *Cymbidium* hybrid cultured *in vitro*. *Plant Tissue Culture Biotechnology* 24: 273-277.
- Kozłowski T, Kramer P (1991) *Physiology of woody plants*. Academic Press Inc. San Diego California, USA. 641p.
- Kurilčik A, Miklušytė-Čanova R, Dapkūnienė S, Zilinskaitė S, Kurilčik G, Tamulaitis G, Duchovskis P, Arturas Z (2008) *In vitro* culture of Chrysanthemum plantlets using light-emitting diodes. *Central European Journal of Biology* 3(2): 161-167. <https://doi.org/10.2478/s11535-008-0006-9>
- Lazo JV, Ascencio J (2010) Efecto de diferentes calidades de luz sobre el crecimiento de *Cyperus rotundus*. *Bioagro* 22(2): 153-158.
- Leyva-Ovalle OR, Bello-Bello JJ, Murguía-Gonzalez J, Nuñez-Pastrana R, Ramírez-Mosqueda MA (2020) Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et WE Higging in temporary immersion systems. *3 Biotech* 1(10): 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3>
- Li H, Tang C, Xu Z (2013) The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. *Science Horticulturae* 150: 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.009>
- Li X, Gao Y, Wei H, Xia H, Chen Q (2017) Growth, biomass accumulation and foliar nutrient status in fragrant rosewood (*Dalbergia odorifera* T.C. Chen) seedlings cultured with conventional and exponential fertilizations under different photoperiod regimes. *Soil Science and Plant Nutrition* 63(2): 153-162. <https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1312518>

- Li Y, Dvořák M, Nesterenko P, Nuchtavorn N, Macka M (2018) High power deep UV-LEDs for analytical optical instrumentation. *Sensors and Actuators B: Chemical* 255: 1238-1243. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.085>
- Lian ML, Murthy HN, Paek KY (2002) Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Science Horticulturae* 94: 65-370. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00385-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00385-5)
- Lin Y, J Li, B Li, T He, Z Chun (2011) Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105(3): 329-335. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9871-9>
- Lindman RH (1974) Analysis of variance in complex experimental designs. Editorial W.H. Freeman and Company. EUA. 352p.
- Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. *Scientia Horticulturae* 174(1): 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.006>
- Liu X, Jiao X, Chang T, Guo S, Xu Z (2018) Photosynthesis and leaf development of cherry tomato seedlings under different LED-based blue and red photon flux ratios. *Photosynthetica* 56(4): 1212-1217. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0814-8>
- Lu S, Merkle SA (2021) Enhancing hybrid Liquidambar somatic seedling production using a temporary immersion bioreactor. *Trees* 35: 503-512. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02052-0>
- Mayo-Mosqueda A, Maceda-López LF, Andrade-Canto SB, Noguera-Savelli E, Caamal-Velázquez H, Cano-Sosa J del S, Alatorre-Cobo F (2020) Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany* 133: 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.030>
- Mayo-Mosqueda A, García-Hernández E, Noguera-Savelli E, Cetzal-Ix W, Alatorre-Cobos F (2022) Advances in breeding, bioprospecting, and *in vitro* culture of *Laelia* orchid species. *Horticulturae* 8(2): 103-121. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020103>
- Massa GD, Kim H, Wheeler RM, Mitchell CA (2008) Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience* 43(7): 1951-1956. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.7.1951>
- Mendoza J, Castillo A, Avitia E, Valdez L, García M (2021) Efecto de diferentes proporciones de luz LED azul:roja en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Biotecnia* 23(1): 110-119. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1288>
- Meng Q, Boldt J, Runkle ES (2020) Blue radiation interacts with green radiation to influence growth and predominantly controls quality attributes of lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 145(2): 75-87. <https://doi.org/10.21273/JASHS04759-19>
- Mengxi L, Zhigang X, Yang Y, Yijie F (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106(1): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9887-1>
- Moon HK, Park SY, Kim YW, Kim CS (2006) Growth of Tsuru-rindo (*Tripterosperrum japonicum*) cultured *in vitro* under various sources of light-emitting diode (LED) irradiation. *Journal of Plant Biology* 49(2): 174-179. <https://doi.org/10.1007/BF03031014>
- Morini S, D'Onofrio C, Bellocchi G, Fisichella M (2000) Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63(1): 47-55. <https://doi.org/10.1023/A:1006456919590>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Murillo-Talavera MM, Pedraza-Santos ME, Gutiérrez-Rangel N, Rodríguez-Mendoza M de las N, Lobit P, Martínez-Palacios A (2016) Led light quality and *in vitro* development of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Agrociencia* 50(8): 1065-1080.
- Murthy HN, Paek KY, Park SY (2018) Micropropagation of orchids by using bioreactor technology. In: Lee YI, Yeung ET (eds) *Orchid propagation: From laboratories to greenhouses methods and protocols*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY. pp. 195-208. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_9
- Olatunji D, Geelen D, Verstraeten I (2017) Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2587. <https://doi.org/10.3390/ijms18122587>
- Ortega-Loeza MM, Salgado-Garciglia R, Gomez-Alonso C, Avila-Díaz I (2011) Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. *Eu. Journal Environmental Science* 1(2): 48-54. <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.46>
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Luna-Sánchez IJ (2017) Light quality affects growth and development of *in vitro* plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks. *South African Journal of Botany* 109(1): 288-293. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.01.205>
- Ramírez-Mosqueda MA, Cruz-Cruz CA, Atlahua-Temoxtle J, Bello-Bello JJ (2019) *In vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. *South African Journal of Botany* 121: 219-223. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.010>
- Rehman M, Fahad S, Saleem MH, Hafeez M, Rahman MH, Liu F, Deng G (2020) Red light optimized physiological traits and enhanced the growth of ramie (*Boehmeria nivea* L.). *Photosynthetica* 58(4): 922-931. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.040>
- Salaya-Reyna SK, Villanueva-Couoh E, Garruña-Hernández R, Caamal-Velázquez JH (2021) Mixture of vegetable extracts and silver nanoparticles as disinfectant agents in the *in vitro* propagation of *Dendrobium nobile* Lindl. *Propagation of Ornamental Plants* 22(2): 58-64.
- San-José MC, Blazquez N, Cernadas MJ, Janeiro LV, Cuenca B, Sánchez C, Vidal N (2020) Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 143(2): 265-275.
- Selosse MA, Roy M (2009) Green plants that feed on fungi: Facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* 14(2): 6 4-70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.004>
- SEMARNAT (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre, 2010. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>. Fecha de consulta: 14 de febrero 2025.
- Sharma J, Koul A, Sharma S, Shankarayan R, Mallubhotla S (2021). *In vitro* propagation of *Nanorrhinum ramosissimum* (Wall.) Betsche: A traditionally important medicinal plant. *Kuwait Journal of Science* 48(3): 1-10. <https://doi.org/10.48129/kjs.v48i3.9100>
- Shen RS, Hsu ST (2018) Virus elimination through meristem culture and rapid clonal propagation using a Temporary Immersion System. In: Lee YI, Yeung ET (eds) *Orchid propagation: From laboratories to greenhouses methods and protocols*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY. pp. 267-282. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_14
- Shin KS, Murthy HN, Heo JW, Hahn EJ, Paek KY (2008) The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* plants act breaks and rearrangements *Doritaenopsis*. *Plant Physiology* 30(3): 339-343. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0128-0>
- Silva ST, Bertolucci SKV, Da Cunha SHB, Lazzarini LES, Tavares MC, Pinto JEBP (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures

- of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129(3): 501-510. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biolog* 11: 118-131.
- Solarte M, EL Moreno, LM Melgarejo (2010) Fotosíntesis y pigmentos vegetales. En: Melgarejo-Muñoz LM (ed) *Experimentos en Fisiología Vegetal*. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp. 77-87.
- Sorcía-Morales M, Gómez-Merino FC, Sánchez-Segura L, Spinoso-Castillo JL, Bello-Bello JJ (2021) Multi-Walled Carbon Nanotubes Improved Development during *In Vitro* Multiplication of Sugarcane (*Saccharum* spp.) in a Semi-Automated Bioreactor. *Plants* 10(10): 2015-2025. <https://doi.org/10.3390/plants10102015>
- Ticktin T, Quazi S, Dacks R, Tora M, McGuigan A, Hastings Z, Naikatini A (2018) Linkages between measures of biodiversity and community resilience in Pacific Island agro-forests. *Conservation Biology* 32: 1085-1095. <https://doi.org/10.1111/cobi.13152>
- Ticktin T, Mondragón D, Lopez-Toledo L, Dutra-Elliott D, Aguirre-León E, Hernández-Apolinar M (2020) Synthesis of wild orchid trade and demography provides new insight on conservation strategies. *Conservation Letters* 13: 1-10. <https://doi.org/10.1111/conl.12697>
- Topchiy NM, Sytnik SK, Syvash OO, Zolotareva OK (2005) The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. *Photosynthetica* 43(3): 451-456. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0072-4>
- Tripathy BC, Brown CS (1995) Root-Shoot interaction in the greening of wheat seedlings grown under Red Light. *Plant Physiology* 107(2): 407-411. <https://doi.org/10.1104/pp.107.2.407>
- Vergara-Galicia J, Aguirre-Crespo F, Castillo-España P, Arroyo-Mora A, López-Escamilla AL, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S (2010) Micropropagation and vasorelaxant activity of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Natural Product Research* 24(2): 106-114. <https://doi.org/10.1080/14786410802340820>
- Wang J, Lu W, Tong Y, Yang Q (2016) Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Frontiers in Plant Science* 250(7): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00250>
- Wang Z, Zhao Y, Wei H (2017) Chitosan oligosaccharide addition affects current-year shoot of post-transplant Buddhist pine (*Podocarpus macrophyllus*) seedlings under contrasting photoperiods. *IForest - Biogeosciences and Forestry* 10(4): 715-721. <https://doi.org/10.3832/ifor2302-010>
- Wellburn RA (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant Physiology* 144: 307-313. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Zhao M, Liao H, Molochev MS, Zhou Y, Zhang Q, Liu Q, Xia Z (2019) Emerging ultra-narrow-band cyan-emitting phosphor for white LEDs with enhanced color rendition. *Light: Science & Applications* 8(1): 38. <https://doi.org/10.1038/s41377-019-0148-8>
- Zhang B, Sarsaiyab S, Pana X, Jina L, Xub D, Zhange B, Dunsaj GJ, Shib J, Chena J (2018) Optimization of nutritional conditions using a Temporary Immersion Bioreactor system for the growth of *Bletilla striata* pseudobulbs and accumulation of polysaccharides. *Scientia Horticulturae* 240: 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.010>
- Zhang Y, Kaiser E, Zhang Y, Yang Q, Li T (2019) Red/blue light ratio strongly affects steady-state photosynthesis, but hardly affects photosynthetic induction in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Physiologia Plantarum* 167: 144-158. <https://doi.org/10.1111/ppl.12876>
- Zhen S, van-Iersel MW (2017) Far-red light is needed for efficient photochemistry and photosynthesis. *Journal Plant Physiology* 209: 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.12.004>

Zhu X, Yang R, Han Y, Hao J, Liu Ch, Fan S (2020) Effects of different NO₃⁻:NH₄⁺ ratios on the photosynthesis and ultrastructure of lettuce seedlings. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 61(3): 459-472. <https://doi.org/10.1007/s13580-020-00242-w>