



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE  
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA NATURALEZA  
(ILACVN)  
CIENCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGÍA Y  
BIODIVERSIDAD**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DE  
LUZ LED EN LA GERMINACIÓN DE UNA ORQUÍDEA *Encyclia* sp.**

**LUCÍA MARÍN PÉREZ**

Foz do Iguaçu  
2016



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE  
LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

**CIENCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGÍA Y  
BIODIVERSIDAD**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DE LUZ LED  
EN LA GERMINACIÓN DE UNA ORQUÍDEA *Encyclia* sp.**

**LUCÍA MARÍN PÉREZ**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza, como requisito parcial a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

Foz do Iguaçu  
2016

LUCÍA MARÍN PÉREZ

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DE LUZ LED  
EN LA GERMINACIÓN DE UNA ORQUÍDEA *ENCYCLIA* SP.**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza, como requisito parcial a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas  
UNILA

---

Prof. Dr. Jorge Ruiz  
UNILA

---

Prof. Dr. Laura Lima  
UNILA

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi familia por el apoyo incondicional desde el inicio de la carrera y por miles de consejos y conocimiento en todas las áreas de la vida. A la UNILA por darme la oportunidad de creer en una Latinoamérica unida y por los muchos amigos y colegas que me regalo e hicieron todos los días mas lindos. Al orquidário Tania Mara por el interés con el proyecto y por cedernos las cápsulas sin las cuales no habría sido posible el estudio. A los técnicos del Delaben por cuidar de las orquídeas y ayudar a resolver diversos problemas metodológicos. A toda la gente que de alguna forma ayudo desde Uruguay, principalmente a Sebastián Fernández y Gastón Quero por presentarme su laboratorio de el cultivo con LEDs y Julio Gómez por la ayuda en estadística. Y para terminar, al orientador por la paciencia, a la fundación Rojas por aportar los materiales y a los integrantes de la banca por aceptar la invitación.



NÃO ESTOU SOZINHO,  
SÓ ESTAMOS  
ESPALHADOS...

The character is shown from a slightly different angle, still holding the plant and looking towards the larger person.

BECK, 2013 - Armandinho

**MARÍN PÉREZ, Lucía. Estudio de la influencia de diferentes longitudes de onda de luz led en la germinación de una orquídea *Encyclia* sp.** 2016. 49 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso de Graduación en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2016.

## RESUMEN

Las orquídeas son un numeroso grupo de angiospermas con distribución en casi todo el mundo, representando la excepción, Antártida, Ártico y zonas desérticas. En la actualidad son de gran importancia económica, creando la necesidad de protección y conservación de muchas especies. Por esto, se han desarrollado metodologías para el cultivo y germinación *in vitro* de orquídeas que permitan el fácil crecimiento y reproducción del grupo. En este sentido, las luces LEDs traen un avance eficaz y económico en la forma de hacer luces para este tipo de producción. Pese a su gran importancia, se encuentran pocos estudios de germinación y crecimiento de plantas con influencia de luces LEDs. De esta forma, el objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de las luces LEDs de longitud de onda rojo (625 nm), azul (470 nm) y blanco ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en la germinación de una orquídea del género *Encyclia*. Para esto, se colocaron a germinar 6 placas con medio Phytamax y semillas de la orquídea durante 50 días bajo los tres tratamientos de luces. Como resultado se obtuvieron 4556 semillas germinadas bajo el tratamiento con luz blanca representando 90,61 % de media de germinación. 4670 semillas germinadas con luz azul, siendo 88,48 % la media de germinación y 4304 con luz roja completando 88,96 % de media de germinación. Estos valores no representaron una diferencia significativa estadísticamente entre los tratamientos por lo que la luz no actuó como limitante en esta fase del proceso. Se concluye que en la germinación de la orquídea *Encyclia* sp., el tratamiento con luz LED blanca, azul y roja, no genera influencia en el porcentaje de germinación.

**Palabras llave:** fisiología de semillas, fotometría, orchidaceae.

**MARÍN PÉREZ, Lucía. Estudio de la influencia de diferentes longitudes de onda de luz led en la germinación de orquídeas del género *Encyclia sp.*** 2016. 49 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso de Graduación en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2016.

## RESUMO

As orquídeas são um numeroso grupo de angiospermas com distribuição em quase todo o mundo, representando a exceção, Antártida, Ártico e zonas desérticas. Na atualidade são de grande importância econômica, criando a necessidade de proteção e conservação de muitas espécies. Por isso, foram desenvolvidas metodologias para o cultivo e germinação *in vitro* de orquídeas que permitam o fácil crescimento e reprodução do grupo. Neste sentido, as luzes LEDs trazem um avanço eficaz e econômico na forma de fornecer luz para este tipo de produção. Apesar de sua grande importância, se encontram poucos estudos de germinação e crescimento de plantas com influência de luzes LEDs vermelha (comprimento de onda 625 nm), azul (comprimento de onda 470 nm) e branco (mistura de todos os comprimentos de onda,  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), na germinação de uma espécie de orquídea do gênero *Encyclia*. Para isso, foram colocadas a germinar 6 placas com meio de cultivo Phytamax e sementes da orquídea durante 50 dias baixo os três tratamentos de luzes. Como resultado se obtiveram 4556 sementes germinadas sob o tratamento com luz branca representando 90,61% de média de germinação, 4670 sementes germinadas com luz azul, sendo 88,48% a média de germinação e 4304 com luz vermelha completando 88,96% de média de germinação. Esses valores não representaram uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo que a luz não influenciou positiva ou negativamente neste processo fisiológico como limitante nesta fase do processo. Se conclui que na germinação da orquídea *Encyclia sp.*, o tratamento com luz LED branca, azul e vermelha, não gera influência na porcentagem de germinação.

**Palavras-chave:** fisiologia de sementes, fotometria, orchidaceae

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1</b> – Diseño botánico de una orquídea.....	15
<b>Fotografía 2</b> – Cápsulas <i>Encyclia sp.</i> .....	25
<b>Fotografía 3</b> – Preparación de medio y sembrado de placas.....	25
<b>Fotografía 4</b> – Test de viabilidad.....	27
<b>Fotografía 5</b> – Sistema de cultivo <i>in vitro</i> .....	28
<b>Fotografía 6</b> – Tratamiento de placas.....	28
<b>Fotografía 7</b> – Estados de germinación de semillas.....	30
<b>Fotografía 8</b> – Estados de germinación de semillas 3D.....	31
<b>Fotografía 9</b> – Semillas en diferentes estados de germinación – Rojo.....	31
<b>Fotografía 10</b> – Semillas en diferentes estados de germinación 3D – Rojo.....	32
<b>Fotografía 11</b> – Semillas en diferentes estados de germinación 3D – Azul.....	32



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> – Resultados del test de Viabilidad.....	28
<b>Tabla 2</b> – Porcentaje de germinación por repetición.....	28
<b>Tabla 3</b> – Porcentaje de germinación total y en segundo estado.....	28
<b>Tabla 4</b> – Total de semillas germinadas en primera fase por tratamiento.....	28
<b>Tabla 5</b> - Total de semillas germinadas en segunda fase por tratamiento.....	29
<b>Tabla 6</b> - Total de semillas sin germinar por tratamiento.....	29
<b>Tabla 7</b> – Media y desviación estándar de las muestras.....	41
<b>Tabla 8</b> – Test de normalidad.....	42
<b>Tabla 9</b> – Test ANOVA.....	43
<b>Tabla 10</b> – Test t.....	44

## LISTA DE IMÁGENES

<b>Imagen 1</b> – Fases de germinación de semillas de orquídeas.....	17
<b>Imagen 2</b> –Germinación de Orquídeas.....	17
<b>Imagen 3</b> –Acciones y efectos de la luz en diferentes longitudes de onda.....	18
<b>Imagen 4</b> – Formas del fitocromo.....	19
<b>Imagen 5</b> –Espectro de luz.....	20
<b>Imagen 6</b> –Longitudes de onda y espectro irradiante de LEDs.....	21

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Porcentaje de germinación.....	29
<b>Gráfico 2</b> – Diagrama de cajas.....	41

## SUMARIO

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
1.1 OBJETIVO.....	13
1.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.2.1 Familia <i>Orchidaceae</i> .....	13
1.2.2 Género <i>Encyclia sp.</i> .....	14
1.2.3 Semillas de Orquídeas.....	15
1.2.4 Germinación.....	15
1.2.5 Fotorreceptores.....	17
1.2.6 Fotometría.....	19
1.2.7 Luz LEDs.....	20
<b>2 METODOLOGÍA</b> .....	<b>22</b>
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	22
2.2 TEST DE VIABILIDAD.....	22
2.2.1 Esterilización de cápsulas.....	23
2.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO.....	23
2.4 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS LONGITUDES DE ONDA EN LA GERMINACIÓN DE <i>Encyclia sp.</i> .....	24
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 TEST DE VIABILIDAD.....	25
3.2 INFLUENCIA DE LAS LONGITUDES DE ONDA.....	26
3.2.1 Análisis estadístico de la germinación en respuesta a la longitud de onda.....	32
<b>4 DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>5 CONCLUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>
<b>APÉNDICES</b> .....	<b>44</b>
APÉNDICE A – CÁLCULOS ESTADÍSTICOS.....	41
<b>ANEXOS</b> .....	<b>47</b>
ANEXO A – COMPOSICIÓN DEL MEDIO PHYTAMAX.....	48

## 1 INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son un grupo muy numeroso de plantas, apreciadas desde la antigüedad por civilizaciones como la Maya y Azteca, que las utilizaban en su vida cotidiana como medicina, ornamentales e incluso como pegamento (Ruíz, 2008). El género *Encyclia* utilizado en este trabajo, tiene amplia distribución en América con especies de vistosos colores y agradables perfumes (Baigts, 2010; Padilla et al., 2011). En la actualidad las orquídeas son uno de los grupos mas importantes económicamente en plantas ornamentales pero también, un grupo con alto grado de peligro de extinción (Chugh et al., 2009; Hagsater et al.; Junior, 2012; 2002; Silva, 2014).

La propagación natural del grupo, es uno de los factores que lo torna vulnerable a extinción, resulta difícil debido al tamaño reducido de las semillas y falta de endosperma. Por esto, el grupo requiere de simbiosis obligatoria con hongos micorrízicos que permita la germinación (Arditti, 2009; Baigts, 2010; Damon et al., 2004). Debido a esta condición se han desarrollado metodologías para el cultivo y germinación *in vitro* de orquídeas que permitan el fácil crecimiento y reproducción del grupo. Diversos estudios a lo largo del tiempo han refinado las condiciones de cultivo como humedad, temperatura y nutrientes alcanzando, en la actualidad, una amplia eficiencia (Manrique, 2006; Miyata, 2014). Aún así, estudios como el de Damon et al. (2004) y Ruíz (2008) resaltan la importancia de los trabajos de germinación *in vitro* debido a la gran variedad de necesidades y factores específicos en las especies de orquídeas.

Como ya fue mencionado, las orquídeas necesitan de condiciones de cultivo específicas, entre ellas, el pH con valores entre 5,2 y 5,5, importante debido al efecto que posee en la disponibilidad de nutrientes para la planta y semillas. Diversos macro y micronutrientes, incluyendo calcio, nitrógeno, magnesio, fósforo, potasio y azufre como macronutrientes y hierro, magnesio y cobre, entre otros, como micronutrientes. Además de control de temperatura, humedad y luz para su crecimiento y germinación de semillas (Cabrera, 2012).

En este sentido, la nueva tecnología de luces de diodo (LEDs) colabora al tornar los sistemas de cultivo mas eficientes. Las luces LEDs presentan elevada eficiencia en la transformación de energía eléctrica en lumínica, con un alto ahorro energético y siendo casi nula la disipación de calor, volviendo a estos sistemas mucho mas económicos (Bourguet, 2005; Jao, 2004; Navarro, 2013). Por otro lado, permiten una especificidad de longitudes de onda lo que permite brindar a los diferentes cultivos, las condiciones

necesarias (Gomez-Coto, 2014; Navarro, 2013). Esto permite que el cultivo *in vitro* sea mas accesible y eficiente, permitiendo su amplio uso. Pese a su gran importancia, en la actualidad, se encuentran pocos estudios de germinación y crecimiento de plantas con influencia de LEDs en plantas que no son de importancia agrícola-comercial.

## 1.1 OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la influencia de diferentes longitudes de onda de luz LED en la germinación de *Encyclia sp.*

Específicamente, se buscó estudiar el efecto de la longitud de onda de luz LED blanca ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), roja (625nm) y azul (470nm) en la germinación y primeras fases del crecimiento de las semillas. También fue propuesto, determinar si existen diferencias significativas entre las diferentes longitudes de onda para los parámetros estudiados.

## 1.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Familia Orchidaceae

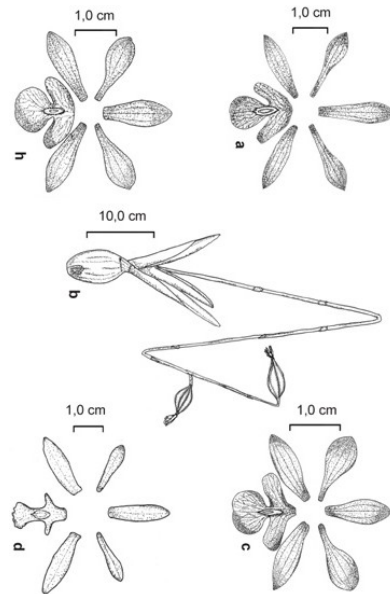
Esta familia es considerada la más numerosa del reino vegetal, se encuentra en casi todas las regiones del planeta con excepción de la Antártica, Ártico y zonas desérticas. Ocurre de forma mas significativa en los trópicos, siendo Brasil el segundo país del mundo con mayor concentración de especies (Silva 2003). Se conocen aproximadamente 780 géneros con 25.000 a 30.000 especies (Dezan et al., 2012) de las cuales, muchas pasan desapercibidas por ser muy pequeñas, tenes flores poco llamativas o por su ubicación en el dosel de grandes árboles o peñascos inaccesibles (Damon, 2004). Otras, son ampliamente populares y producidas comercialmente, el género *Phalaenopsis* y *Cattleya* son en la actualidad dos de las mas reconocidos por la belleza y exuberancia de sus flores. (Hetherington, 2002; Lee, 2011; Rodríguez & González, 2010; Zanega- Godoy, 2003).

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas, herbáceas y perennes, pudiendo ser epífitas, terrestres o rupícolas (Black, 1984), diversos géneros se encuentran en los árboles de las selvas tropicales y subtropicales ya que necesitan de la humedad para sobrevivir y retirar sus nutrientes de los materiales orgánicos depositados sobre el tronco (Dêmatte e Dêmatte, 1996 apud Assis et al., 2011). Una elevada cantidad de especies e

híbridos posibilitan una gran diversidad de colores y formas, lo que las torna de gran importancia comercial (Campos, 2008 apud Miyata, 2014). Se consideran una de las plantas ornamentales más apreciadas económicamente (Colombo et al., 2004) principalmente por sus flores perfectas con delicada y exuberante coloración (Vieira, 2009). La mayor característica visible de las orquídeas es la presencia de una estructura floral denominada labelo o labio, que se trata de un pétalo modificado que en general es de mayor tamaño y más vistoso que los otros dos.

### 1.2.2 Género *Encyclia*

Este género posee 144 especies americanas descritas, que habitan desde Estados Unidos, México y Las Antillas hasta Sudamérica. De hábitat epífita, se distribuyen desde lugares cercanos al nivel del mar como florestas secas en Florida, hasta elevadas altitudes (Baigts, 2010; Meisel, et al. 2014; Padilla et al., 2011). Presentan pseudobulbos con una o varias hojas que las diferencia de otros géneros similares, inflorescencia de forma variada puede encontrarse larga o corta, sencilla o ramificada y conteniendo pocas o numerosas flores. Los pétalos y sépalos son similares a diferencia del labelo que varía de corto a amplio, generalmente es trilobulado y recubre la base de la columna con lóbulos laterales bastante conspicuos (Baigts & Molina, 2010). La orquídea *Encyclia cordigera* (ver foto 1), presenta inflorescencia terminal, con flores de 2 cm de diámetro y con sépalos y pétalos carnosos de color marrón hasta púrpura (Leopardi, 2010), en cambio, *Encyclia baculus* puede llegar a 40 cm de alto con flores grandes de color crema con rayos morados en el labelo (Ibarra-Manríquez & Colen, 1996). Especies como *Encyclia adenocaula* o *Encyclia phoenicia*, son ampliamente reconocidas por su aroma y colores exuberantes. Esta última conocida como orquídea de chocolate presenta un fuerte perfume a vainilla o chocolate (Rodríguez L., 2010) y la primera, llamada comúnmente trompillo morado se encuentra en peligro de extinción en México debido a la belleza de sus flores (Ruíz B., 2008).

**Fotografía 1:** Diseño botánico de una orquídea

*Fuente: MENEGUZZO.*

### 1.2.3 Semillas de Orquídeas

Las semillas de orquídea son de tamaño muy pequeño, entre 1 y 2 mm de largo y cerca de 1 mm de ancho pero se producen en gran cantidad, de 1300 a 4.000.000 de semillas dentro de una cápsula. Son de tipo ortodoxa, por lo que son capaces de tolerar la desecación y mantener su viabilidad a baja temperatura para ser almacenadas (Iriundo, 2001). Presentan una cubierta seminal (testa) en forma de red característica, diferente en cada especie, que encierra un embrión de al rededor de 100 células. Estas cubiertas son formadas de tejido muerto y aire que representa cerca del 96% de la composición. El embrión no presenta endosperma, es de forma redondeada y escasamente diferenciado en la mayoría de orquídeas, esto implica que sea muy difícil distinguir cotiledones y raíces. En el extremo distal del embrión, también presenta un punto de crecimiento potencial no identificable en estado de semilla (Pierik, 1997).

### 1.2.4 Germinación de Orquídeas

La germinación es uno de los procesos mas críticos en el desarrollo de cualquier especie (Baskin y Baskin, 2001), para que esta ocurra, en la mayoría de las orquídeas, las semillas necesitan la asociación simbiótica con un hongo específico. Esta relación permite

a los dos organismos convivir y beneficiarse uno al otro sin afectarse. En el medio natural, el proceso es difícil de concretarse debido a la necesidad de que muchos factores coincidan simultáneamente, por lo que el porcentaje de germinación es muy bajo, llegando, en algunos casos, a germinar cerca de 15 o 20 semillas de un total de un millón (McKendrick, 2000).

Arditti (2009), describe el proceso de germinación de semillas de orquídeas ocurriendo en diversas fases. En principio, el embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando su volumen; seguido de la división celular y rompimiento de la cubierta seminal. A continuación, se forma una estructura (protocormo) a partir del agregado de células, sobre el que se puede distinguir el meristema del vástago. Seguidamente, ocurre la diferenciación de órganos (meristema del vástago hacia un lado y rizoides hacia el opuesto) y un periodo de crecimiento intenso. Si el protocormo se encuentra a la luz, se desarrollan las hojas y adquiere color verde. Posteriormente, se forma clorofila y se desarrollan raíces verdaderas, lo que provoca la pérdida del protocormo y rizoides, continuando a la fase autótrofa (ver imagen 1 y 2).

En este sentido, de acuerdo con Godo, (2011), se considera que ha ocurrido el proceso de germinación cuando el tamaño del embrión se duplica en comparación con el que poseía inmediatamente después de la siembra. En otros trabajos como el de Schneiders et al., (2012), son consideradas semillas germinadas a las que poseen protocormos con coloración verde.

En la actualidad, el cultivo *in vitro* se ha tornado una técnica ampliamente utilizada en la germinación de orquídeas, ya que colabora en la obtención de gran número de plantas, siendo una valiosa herramienta en la propagación de especies en peligro de extinción e híbridos del punto de vista comercial (Flachsland et al., 1996). Esta técnica, además, se emplea para el estudio de aspectos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de orquídeas y como método de conservación *ex-situ* (Ferreira y Suzuki, 2008).

En el género *Encyclia* existen muy pocos estudios de germinación *in vitro* en los que se prueban las mejores condiciones, tanto en especies comerciales como amenazadas de extinción. Según el estudio de Ruiz *et. al.* (2008) la especie *Encyclia adenocaula* obtuvo una germinación en mayor proporción y menor tiempo al utilizarse el medio de cultivo Phytamax, específico para germinación de orquídeas, y las cápsulas de semillas de color verde o verde amarillo. En otros estudios se determinó una mayor germinación en el medio Murashige y Skoog (MS) con la mitad de los nutrientes y adición de agua de coco y jugo de piña y se resaltó la importancia de considerar la madures de



las capsulas al momento de la cosecha para permitir al embrión tener un grado de diferenciación que le permita germinar. Además, el color de la cápsula en relación a la madures presenta una gran diversidad en relación a las especies de este género (Rodríguez et al., 2010).

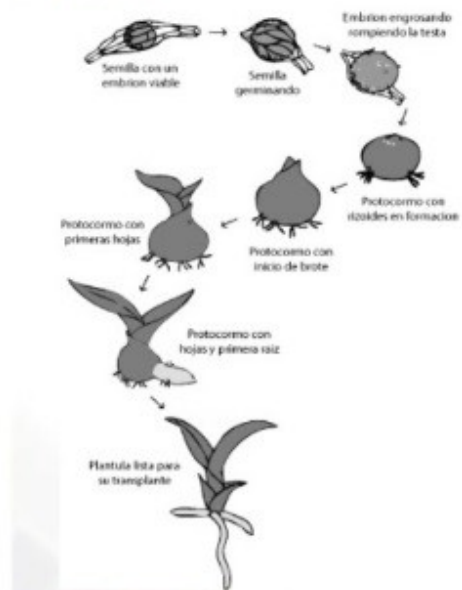
En otro sentido, al evaluar las condiciones de germinación de una semilla de orquídea, es importante considerar su viabilidad ya que esto permite conocer la proporción de semillas que no germinarán (Muñoz y Gimenez, 2008). En orquídeas, la técnica más utilizada es la de coloración del embrión mediante el test de tetrazolio, debido a la fácil identificación de semillas viables por coloración roja (Johnson *et al.*, 2007). El proceso de tinción rojo ocurre debido a la reducción del tetrazolio por la actividad de respiración de las células (Salazar, 2012).

**Imagen 1 – Fases de germinación de semillas de orquídea**

Fase	Descripción
0	Semillas con embrión no germinaron.
1	El embrión aumenta de tamaño.
2	Ruptura de la testa.
3	Formación de protocormos y rizoides.
4	Aparición de la primera hoja.
5	Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior.

Fuente: SALAZAR, 2012

**Imagen 2 – Estadios de germinación de orquídeas**



Fuente: SEATON Y RAMSAY, 2009

### 1.2.5 Fotorreceptores

La germinación de semillas, es una fase importantes en el desarrollo de una planta, cada especie necesita un rango específico de factores ambientales tales como, luz, temperatura, humedad y pH, para que esta ocurra (Baskin y Baskin, 2001). La cantidad de luz (tiempo de exposición a la Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos), así como la calidad (en especial la relación de longitud de onda del rojo-rojo lejano), son factores que

intervienen en diversos procesos fisiológicos y se consideran esenciales para el establecimiento y desarrollo de la semilla (Pons, 2000).

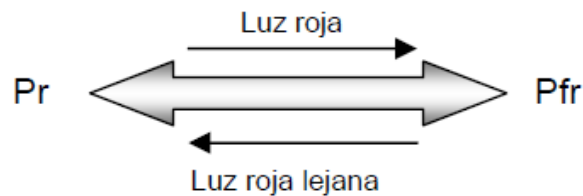
La calidad de luz y diferentes reguladores de crecimiento intervienen en el proceso de germinación debido a la gran cantidad de fotorreceptores que poseen (Manrique, 2006). Según Bergareche y Moyseet (1993), tanto en monocotiledoneas como en dicotiledoneas, los fitocromos son mas abundantes en tejidos jóvenes. Los reguladores de crecimiento son hormonas que intervienen en pequeñas cantidades (Koolman, 2004) y los fotorreceptores moléculas o complejos de molécula, que al activarse por fotones de determinadas longitudes de onda, traducen señales provocando la capacidad del organismo a responder a estímulos lumínicos (Meisel & Pinto, 2011).

La germinación, así como el desarrollo y la floración de la planta, están regulados por tres fotorreceptores que perciben longitudes de onda diferentes, fitocromo, criptocromo y fotorreceptores en ultravioleta-B (ver imagen 3). El primero, es un fotorreceptor que media los efectos de la luz roja e infrarroja, para esto, absorbe primariamente en el espectro lumínico rojo de 600 a 800 nm (forma Pr), siendo convertido para absorber en la longitud del rojo lejano entre 700-1000 nm (forma Pfr), esta interconversión depende de la proporción de luz roja respecto a la roja lejana (ver imagen 4). Diversos estudios mostraron que la radiación roja promueve la germinación, además de la fotomorfogénesis (replicación de plastidios y síntesis de clorofila y antocianos), formación de primordios foliares y florales y el crecimiento. Existen dos tipos de fitocromos, tipo I: predominante en plantas etioladas y tipo II: mas estable a la luz y abundante en todas las plantas verdes (Jorge, 2006; Meisel & Pinto, 2011), esta presencia indica que las longitudes de onda entregan información importante que ayuda a la planta en su adaptación al entorno (Jorge, 2006). El criptocromo absorbe principalmente en la longitud de onda del azul y ultravioleta- A, donde se han identificado dos tipos (CRYI y CRYII). La luz azul se relaciona con la morfogénesis de la planta y diferenciación de órganos, en su presencia se inhibe la elongación del tallo, participa de la síntesis y acumulación de clorofila y regula la apertura de estomato y el crecimiento celular, lo cual permite crecer en función o dirección de la fuente luz (fototropismo) (Meisel & Pinto, 2011). Los fotorreceptores en ultravioleta-B, se relacionan a respuestas fotométricas que modifican la composición química, la competencia fotosintética, morfogénesis y defensa (Jenkins, 2014).

**Imagen 3-** Acciones y efecto de la luz en diferentes longitudes de onda

	$\lambda$ (nm)	Acciones y efectos	Tipo de fotorreceptor y otras moléculas que absorben la energía lumínica
UV-C	< 280	Mutaciones, Daño y muerte celular	DNA- RNA
UV-B/UV-A	315 - 400	Acción fotomorfológica; síntesis de pigmentos; daño y muerte celular	Criptocromos (?), Fotorreceptores UV
Violeta - Azul	400 - 510	Acción fotosintética, fotomorfogénesis, ritmo circadiano, tiempo de floración, fototropismo, movimiento de cloroplastos, apertura de estomas, estimulación del síntesis de clorofila y carotenos	Fotosistemas (clorofilas a y b), Criptocromos, Fototropinas
Verde - Amarillo	510 - 610	Acción reducida sobre la fotosíntesis.	Carotenos
Anaranjado - Rojo / Rojo lejano	610 - 1000	Acción fotosintética, germinación de semillas, tiempo de floración, ritmo circadiano, fotomorfogénesis, elongación celular	Fotosistemas, (clorofilas a y b), Fotocromos
Infrarrojo	> 1000	Efectos mínimos, poco estudiados	¿?

Fuente: MEISEL, 2011



Fuente: MEISEL, 2011

### 1.2.6 Fotometría

Para el estudio del efecto de la luz en la germinación y crecimiento de las plantas es necesario conocer algunos conceptos que explican como es esta interacción por lo que a continuación se describen algunos de ellos (Ruíz, 2008).

La energía proveniente del sol se propaga en el espacio en forma de onda electromagnética o radiación electromagnética (unidad Joule), la distancia entre dos crestas sucesivas es llamada de longitud de onda ( $\lambda$ ) y el número de veces que crestas contiguas pasan por un dado punto es la frecuencia ( $\nu$ ). La distribución de la radiación electromagnética en función de las respectivas longitudes de onda (nanómetros) o frecuencias, se denomina espectro electromagnético, el cual se divide en regiones que van desde radiaciones gama ( $\lambda \sim 10^{-3}\text{nm}$ ), hasta ondas de radio ( $\lambda > 10^9\text{nm}$ ) pasando por el espectro visible. Este último comprende la parte de radiación que el ser humano consigue ver, situado aproximadamente entre las longitudes de onda 380 nm

correspondiente al violeta y 770 nm al rojo lejano (Cardoso, 2009). La mayor parte de la radiación ultravioleta (UV) e infrarroja (IR) es absorbida en la atmósfera por sus gases, el UV por el ozono ( $O_3$ ) en la estratosfera y el IR por el vapor de agua y  $CO_2$ . De esta forma, la radiación solar que alcanza la biosfera presenta una mayor proporción de radiación visible que en la región superior de la atmósfera (Meisel, 2011).

De todo el espectro visible, las plantas utilizan para la fotosíntesis solo una región comprendida entre 400 hasta 700 nm, la cual es denominada radiación fotosintéticamente activa o de crecimiento (RFA) (Ramos et al., 2010) (ver imagen 5). Esto ocurre debido a que los seres vivos evolucionaron en relación a sistemas fotoquímicos capaces de utilizar estas longitudes de onda (Meisel et al., 2011). El efecto que estas ejercen sobre la planta varía dependiendo de la hora del día y fase de crecimiento, afectando propiedades como el aspecto, momento de floración o valores farmacéuticos y nutricionales (Ramos et al., 2010).

La radiación electromagnética también puede ser descrita en términos de intensidad así como de calidad, lo cual es útil para diversos estudios científicos principalmente con plantas. La cantidad de radiación electromagnética indica el tiempo de exposición a la densidad de flujo de fotones. Esta densidad medida en unidades fotométricas, describe la radiación tal como es percibida por el ojo humano y se refiere al espectro de luz visible o simplemente luz. La unidad no estándar es conocida como talbot y equivale en el sistema internacional (SI) a la energía de un flujo luminoso de un 1 *lumem* en un segundo o lumen-segundo. Para realizar esta medida se utiliza un equipo llamado luxímetro que mide la iluminancia, flujo luminoso por unidad de área y su unidad es el lux (lx) (Cardoso, 2009).

**Imagen 5** - Espectro de luz mostrando la franja de radiación fotosintéticamente activa (PAR), la longitud de onda correspondiente y energía que interviene.

$\lambda$ (nm)	0,01	200-280	280-400	400- 510	510 - 610	610 - 700	700 -1000	1000	$10^9$ - $10^{12}$
Radiación	Rayos X	UV-C	UV-B a UV-A	Violeta y Azul visible	Verde a Amarillo	Naranja a Rojo visible	Rojo Lejano	Infrarrojo	Ondas de radio
Energía promedio 1mol de fotón (J)	$120 \times 10^8$	$120 \times 10^5$	$59,5 \times 10^4$	$29,6 \times 10^4$	$23,9 \times 10^4$	$17,5 \times 10^4$	$15,2 \times 10^4$	$14 \times 10^4$	$12 \times 10^{-27}$



Fuente: RODRÍGUEZ (2010)

### 1.2.7 Luz LED

Las lámparas de diodo (LEDs) son la más reciente tecnología en ingresar al campo de la investigación y agricultura en ambientes controlados con bastante aceptación por parte de los investigadores. Este éxito se debe a la elevada eficiencia en comparación con las lámparas incandescentes, consumen mucha menos energía eléctrica y poseen una vida media de uso mas larga, disminuyendo costos de producción. Por otro lado, no generan exceso de calor y por lo tanto es posible utilizarlos con plantas térmicamente sensibles sin daños, e incluso, en el caso de las LEDs rojas debido a su propiedad repelente de insectos ayuda a disminuir el uso de agrotóxicos (Bourguet, 2005; Navarro *et. al.*, 2013; Ramos *et. al.*, 2010).

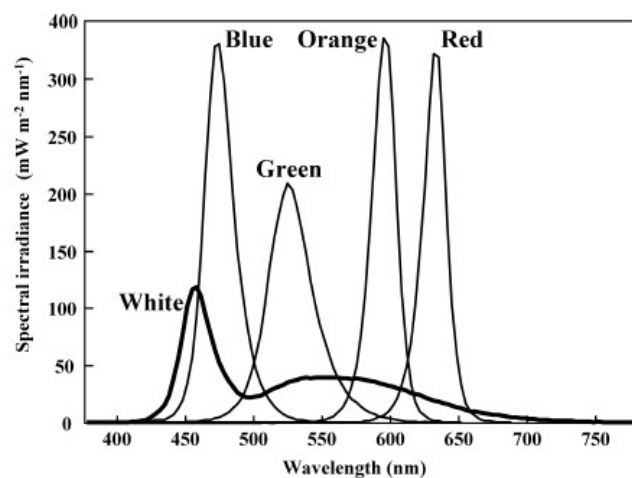
Otras ventajas de estos dispositivos son en relación a la posibilidad de emisión de longitudes de onda mono cromáticas, cada color de luz LED se limita a una longitud de onda de alcance muy estrecho (dominante) dado por el material semiconductor que lo compone y la luz blanca por la mezcla aditiva de todos los colores. En luces comerciales, diversos colores se obtienen por una mezcla de los colores rojo (630-890 nm), verde (525-555 nm) y azul (450- 480 nm) que emiten en una longitud de onda específica (OSRAM, 2016) (ver imagen 6). Esto permite brindar a diversas plantas una fuente de luz ajustada a las necesidades de las mismas, aumentando aun más la eficiencia de todo el proceso productivo (Jao & fong, 2005). Además, debido a su pequeño tamaño y reducido peso, brindan una enorme flexibilidad al momento de diseñar sistemas lumínicos, generando un aumento de la eficiencia en la utilización del espacio en comparación con otras fuentes de

luz como los tubos fluorescentes y las lámparas incandescentes (Bourget, 2005).

En este sentido, las LEDs proporcionan un mejor rendimiento en invernaderos tanto industriales como de pequeño tamaño. Según investigaciones de diversos grupos como el de Ostergard et al. (2008), en invernaderos industriales, el uso de LEDs rojas y azules ahorran un total de 80% de consumo eléctrico en relación a la luz incandescente, compensando rápidamente el costo de la instalación que es tres veces mayor. En 2007, la empresa fabricante de LEDs, Nippon Keiki Kagoshima Works Ltd., publicó un informe en que se demostraba en pequeños invernaderos, la disminución del costo de consumo eléctrico en 25 veces por el uso de LEDs rojos en vez de lámparas incandescentes (Ramos, et al. 2010).

En cultivo *in vitro* de orquídeas, los estudios con luces LEDs son muy escasos, en el trabajo de Godo *et al.* (2011), se analiza la influencia de diferentes longitudes de onda: blanca ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), azul (470 nm), verde (525 nm), naranja (590 nm) y rojo (625 nm) en la germinación y crecimiento de la orquídea *Bletilla ochracea*. Los resultados apuntaron una gran diferencia en la germinación y crecimiento, principalmente por influencia de la luz naranja. Los autores resaltaron la importancia en la investigación en esta área debido a la relevancia que puede alcanzar en conservación *ex situ* y desarrollo comercial. También, menciona la dificultad en la generalización de la influencia de la luz en la germinación y crecimiento del grupo de orquídeas debido a la gran diversidad que posee.

**Imagen 6** – Longitudes de onda y el espectro irradiante de LEDs de luz blanca, roja, verde y azul de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



Fuente: GODO, 2011

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Las cápsulas de la orquídea *Encyclia* sp. Fueron obtenidas em abril de 2016 provenientes de un orquidario comercial. Los frutos median en media, 1,5 cm de ancho y 3,0 cm de largo (fotografía 2).

### 2.2 TEST DE VIABILIDAD

Para evaluar el estado del material vegetal antes de proceder a la siembra de las semillas fue necesario analizar su viabilidad mediante el test de tetrazolio (2,3,5- cloruro de trifenil tetrazolium). Para ello, se utilizaron las semillas de una capsula verde cerrada de la orquídea *Encyclia* sp. Todas las semillas de la cápsula son inmersas en un vaso de bohemia de 50 mL, conteniendo 10 mL de solución de tetrazolio 1% y mantenido por 24 hs en oscuridad (Lallana, 2013). Posteriormente, son retiradas del vaso tres gotas de la solución con semillas y colocadas en una placa de Petri superpuesta a una gradilla de 0,5 cm. A continuación, son examinadas en microscopio estereoscópico Leica EZ4HD y contadas todas las semillas dentro de un cuadrado de la gradilla con 10 repeticiones. Se consideraron semillas viables a las que presentaron coloración entre rosado y rojo y no viables a las semillas sin tinción. El mismo procedimiento se repite con cápsulas cerradas con coloración marrón.

#### 2.2.1 Esterilización de las cápsulas

4 cápsulas de las semillas de orquídeas fueron esterilizadas externamente para evitar contaminación, siendo sumergidas en solución de alcohol 70% durante 2 minutos, seguido de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio 1 % con dos gotas de detergente. Seguidamente fueron enjuagadas cinco veces con agua destilada autoclavada. Posteriormente se dejaron secar en flujo laminar previamente esterilizado. A partir de este momento toda la manipulación fue realizada con material estéril. Las cápsulas son cortadas longitudinalmente con bisturí y las semillas colocadas en un vaso de bohemia (fotografía 2).

## 2.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO

Se lavan las placas de Petri con solución de detergente, posteriormente son autoclavadas por 30 minutos a una atmósfera de presión y 120°C.

La preparación del medio y la siembra se realiza en el laboratorio de biología de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Campus Jardín Universitario.

Se preparan 500 mL de medio Sigma Phytamax (ver los componentes en Anexo A) con la mitad de los micronutrientes. Son pesados en balanza analítica, 6,325 g de medio y disuelto en 500 mL de agua destilada. Para ajustar el pH a 5,5, se coloca el medio en una plancha de agitación magnética conectada a un phmetro Ms. Tecnpon PA2010 y se adiciona hidróxido de potasio 1 N hasta alcanzar el valor. Finalmente se adiciono 3,0 g de agar para una concentración final de 1,5 g/L.

El medio es autoclavado por 15 minutos a una atmósfera de presión y distribuidos en 40 placas de Petri de 10 mL, con la ayuda de una jeringa plástica de 10 mL dentro del flujo laminar. Las placas se dejan enfriar para evitar condensación en la tapa y luego son sembradas. Las semillas de las 4 cápsulas son mezcladas en un vaso de bohemia de 50 mL y colocada una punta de espátula de semillas en cada placa.

Posteriormente al sembrado de todas las placas, estas son cerradas, selladas con cinta de papel y colocadas en cada tratamiento (fotografía 3).

## 2.4 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA LONGITUD DE ONDA EN LA GERMINACIÓN DE *Encyclia sp.*

Las 40 placas son divididas de forma aleatoria en tres grupos de 13, 13 y 14 placas y colocados bajo luces LED azul (470 nm), rojo (625 nm) y blanca ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), con fotoperiodo de 12 horas. Para obtener un fotoperiodo exitoso, las placas son mantenidas bajo luz continua y tapadas cada 12 horas con una bandeja forrada en papel aluminio por 12 horas. Los tratamientos son realizados en la sala de germinación de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, *Campus* PTI, entre los meses de abril (día 13) y junio (día 01) completando un total de 50 días de tratamiento. La temperatura y luminosidad de la sala son controladas y la humedad es mantenida en cada placa por éstas estar selladas.

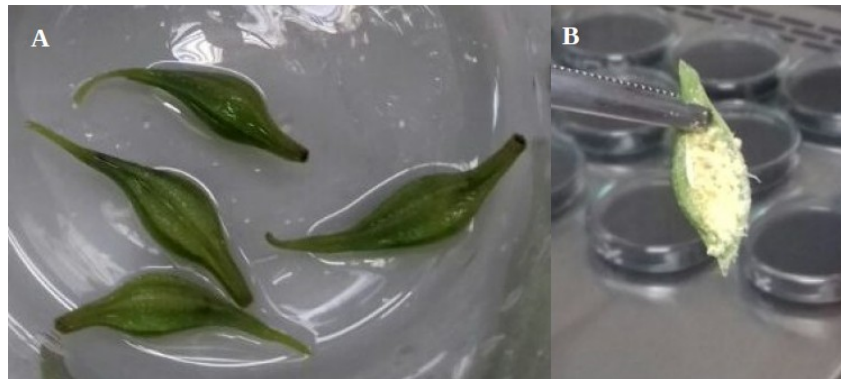
El montaje del sistema se realiza en una estantería de 3 estantes de hierro de 2,0 m de alto, 1,0 m de ancho y 40 cm de profundidad, con 4 focos de luces LEDs



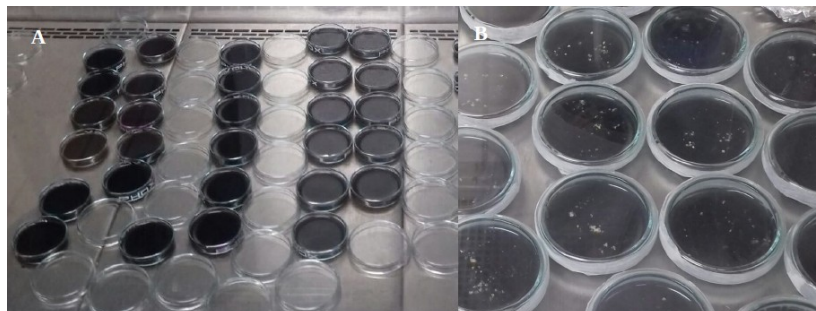
comerciales en cada estante. El estante superior se mantiene con 2 focos de luces LEDs rojas prendidas constantemente, el siguiente estante hacia abajo con dos focos de luces azules y el inferior con dos focos de luces blancas. Las placas fueron revisadas visualmente tres veces por semana para retirar eventuales contaminaciones de la sala y chequeo de las condiciones de temperatura y luminosidad.

Luego de transcurridos 50 días de tratamiento, 6 placas de cada tratamiento son retiradas, contadas en esteromicroscopio Leica EZ4HD todas las semillas, clasificadas en las categorías: primer estadio de germinación, segundo estadio y no germinadas. Se clasificó como primer estadio de germinación a las semillas que presentaban, como mínimo, el doble del tamaño del embrión que el de las semillas recién sembradas y el protocormo poco diferenciado. Las semillas en segundo estadio son aquellas en que se puede observar diferenciación de órganos (meristema del vástago hacia un lado y rizoides hacia el opuesto) y las no germinadas aquellas que no presentan diferencia con las semillas sembradas.

**Fotografía 2-** En A se pueden observar las 4 cápsulas de *Encyclia* sp.; En B una cápsula abierta con sus semillas antes de ser retiradas.



**Fotografía 3-** En A placas de Petri siendo llenadas con medio Pytamax; B placas selladas con cinta de papel



### 3 RESULTADOS

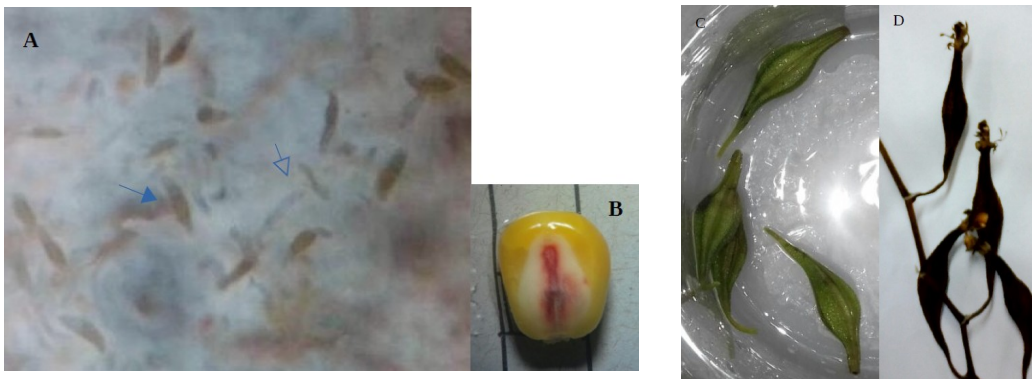
#### 3.1 TEST DE VIABILIDAD

El porcentaje de viabilidad en semillas de cápsulas verdes resulto en un total de 91% a diferencia de las cápsulas marrones que presentaron un porcentaje de germinación de 35% (tabla 1). En la fotografía 4, se pueden observar semillas con embrión coloreado y sin tinción de una cápsula de coloración marrón.

Tabla 1 - Resultados del test de tetrazolio

Cápsula	Test de Tetrazolio					
	Verde			Madura (marrón)		
Cantidad de Semillas	Positivo	Negativo	Total de semillas	Positivo	Negativo	Total de semillas
	97	179	279	307	23	338
Porcentaje de Viabilidad	35,14			90,82		

**Fotografía 4-** A Semillas teñidas con el test de tetrazolio (100x); la flecha oscura muestra un resultado positivo mientras que la flecha blanca uno negativo; B semilla de maíz control con el embrión coloreado por el test. En la imagen C se muestran cápsulas de la orquídea verdes y en D las cápsulas ya marrones.



#### 3.2 INFLUENCIA DE LAS LONGITUDES DE ONDA EN LA GERMINACIÓN DE *Encyclia* sp.

Se analizaron 6 placas por tratamiento luego de transcurridos 50 días, completando un total de 4965 semillas con tratamiento con luz blanca, siendo 4556 germinadas, un total de 5275 con luz azul, siendo 4670 germinadas y de un total de 4848 con luz roja, 4304 son germinadas. La tabla 2 presenta los porcentajes de germinación de cada placa analizada (repetición) en cada tratamiento. La tabla 3 y el gráfico 1, muestran los resultados de porcentaje de germinación total de cada tratamiento y la tabla indica también, el porcentaje de semillas que luego de 50 días mostraba evidencia de haber pasado al segundo estadio de germinación (desarrollo de rizoides). Los datos fueron

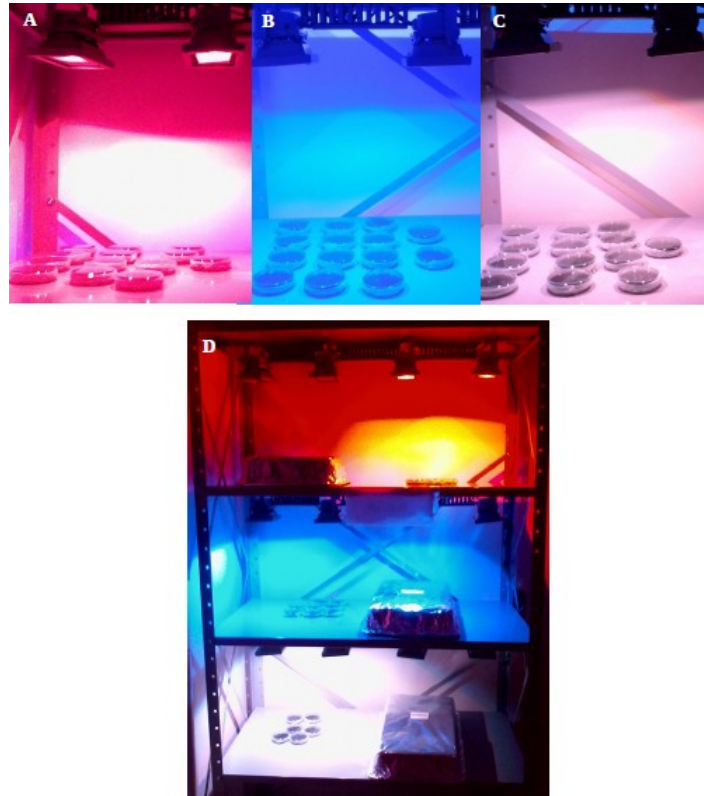
analizados con el test estadístico ANOVA sin mostrar diferencia significativa entre los tratamientos. Las siguientes tablas muestran los valores totales de semillas contabilizados por placa (repeticiones) en relación al estado de germinación. La tabla 4 presenta la cantidad de semillas de cada placa analizada por tratamiento, que luego de transcurridos 50 días de tratamiento, se encontraban en el primer estadio de germinación. La tabla 5 la cantidad de semillas que se encuentran en fase avanzada y la tabla 6, la cantidad de semillas que no germinaron.

En la fotografía 5 se muestra el sistema de cultivo *in vitro* con las placas de Petri en cada estante, recibiendo las correspondientes luces LEDs y en la foto 6, las placas recibiendo cada luz de tratamiento.

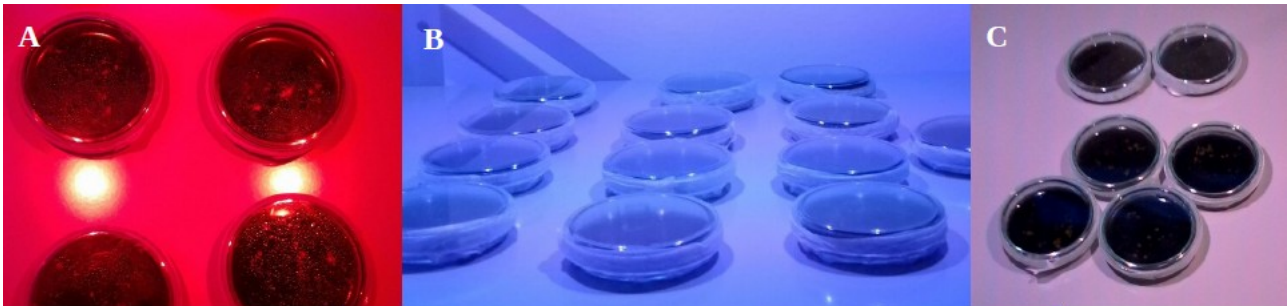
Las fotografías 7 y 8, muestran los tres estadios de germinación analizados, en A se observan dos semillas sin germinar (flechas), en B semillas en el primer estadio de germinación y en C se puede diferenciar el desarrollo del protocormo (hoja y rizoides) del segundo estadio de germinación, en base a la clasificación de Salazar (2012).

Las fotografías 9, 10 y 11 presentan imágenes de las semillas en diferentes estados de la germinación luego de los 50 días de tratamiento con luz roja (fotografía 9 y 10) y luz azul (fotografía 11). Las fotografías 10 y 11 son realizadas con la técnica de 3D en estereomicroscopio conectado al sistema Axiovision SE64, obteniendo mejor resolución y determinación de estructuras como la cubierta seminal en forma de red y en la fotografía 9 se muestran las semillas con imagen de estereomicroscopio.

**Foto 5** - Sistema de cultivo *in vitro*: A tratamiento en estante con luz roja; B tratamiento con luz azul; C tratamiento con luz blanca; D estantes con los tratamientos



**Foto 6**- Placas con tratamiento de luz roja (A), azul (B) y blanca (C)



**Tabla 2** – Porcentaje de germinación total luego de 50 días de tratamiento en las 6 repeticiones

Placas	Blanco	Azul	Rojo
1	97,3	90,93	89,24
2	87,66	87,94	85,54
3	85,71	89,37	92,99
4	84,74	92,06	90,57
5	94,39	83,48	86,85
6	93,87	87,12	88,55

**Tabla 3** - Resultados de porcentaje de germinación total y Porcentaje de semillas en la segunda fase de germinación.

Tratamiento	blanco	Azul	Rojo
% germinación total	90,61	88,48	88,96
% semillas en segunda fase de germinación	8,68	8,61	9,35
desvío padrón	5,23	3,06	2,65

**Tabla 4** – Semillas germinadas en primera fase luego de 50 días de tratamiento bajo las luces blanca, azul y roja en las 6 repeticiones.

Placas	Total de semillas en primera fase por tratamiento		
	Blanco	Azul	Rojo
<b>1</b>	553	982	740
<b>2</b>	552	283	316
<b>3</b>	226	691	491
<b>4</b>	482	747	598
<b>5</b>	617	741	1065
<b>6</b>	1708	751	627
total	4138	4195	3837

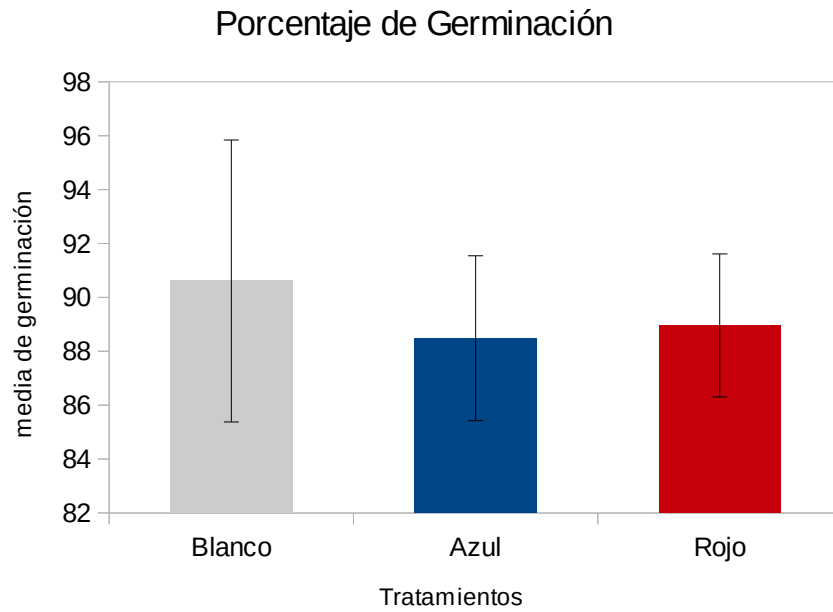
**Tabla 5** – Semillas germinadas en segunda fase luego de 50 días de tratamiento con luces blanca, azul y roja.

Placas	Total de semillas en segunda fase por tratamiento		
	Blanco	Azul	Rojo
<b>1</b>	24	81	98
<b>2</b>	59	16	33
<b>3</b>	26	91	40
<b>4</b>	90	88	65
<b>5</b>	73	118	131
<b>6</b>	146	81	100
total	418	475	467

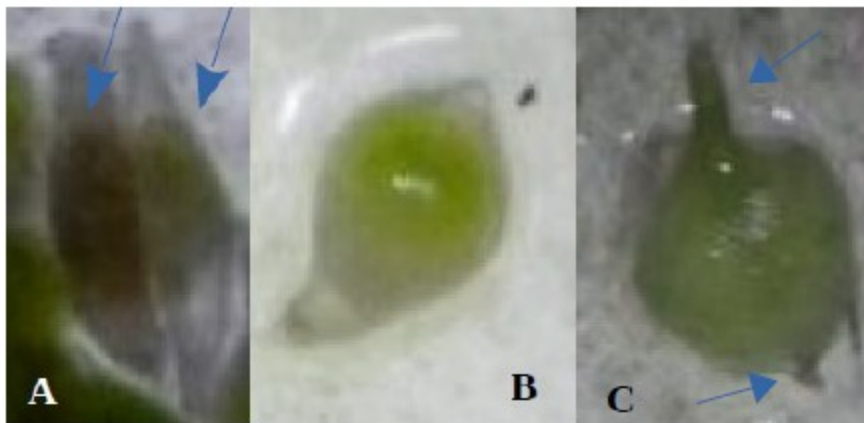
**Tabla 6** – Semillas no germinadas luego de 50 días de tratamiento con luces blanca, azul y roja.

Placas	Total de semillas sin germinar por tratamiento		
	Blanco	Azul	Rojo
<b>1</b>	16	106	101
<b>2</b>	86	41	59
<b>3</b>	42	93	40
<b>4</b>	103	72	69
<b>5</b>	41	170	181
<b>6</b>	121	123	94
total	409	605	544

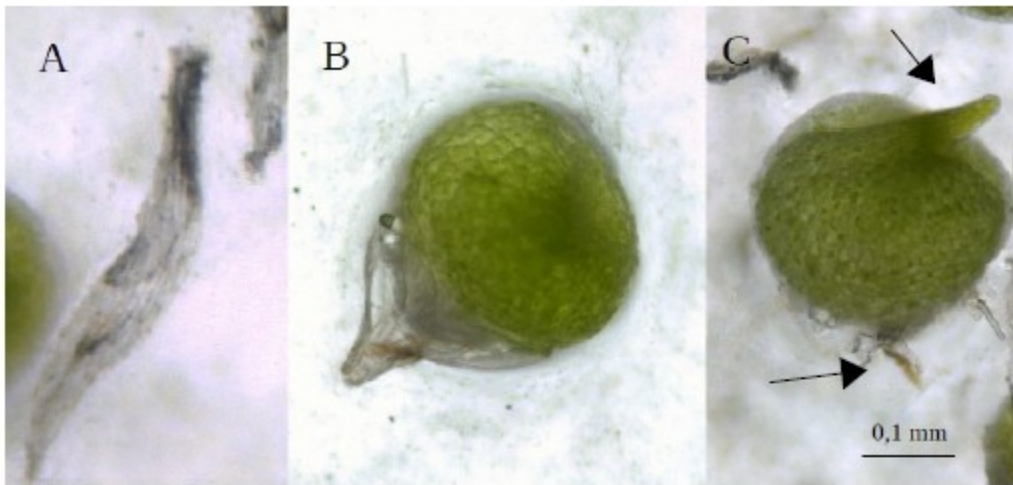
**Gráfico 1-** Porcentaje de germinación en los tres tratamientos, luz blanca, luz azul y luz roja, con el correspondiente desvío estándar, luego de 50 días de tratamiento.



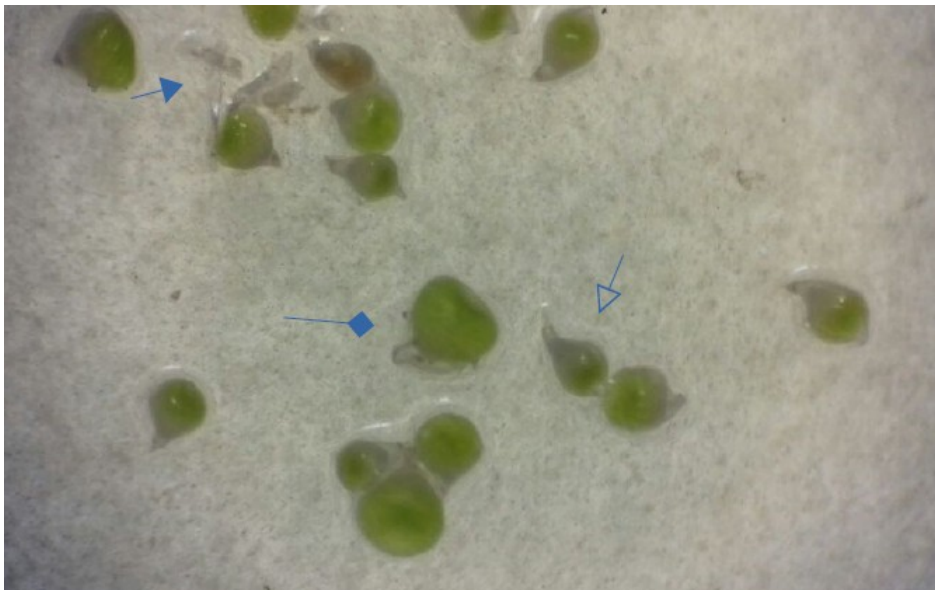
**Foto 7** - Estados de germinación de semillas de *Encyclia* sp (100x), A semillas sin germinar (flechas); B semillas en imbibición (primera fase de germinación); C segundo estado de germinación con desarrollo de rizoides y hoja (flechas)



**Foto 8** – Fotografía 3D con estereomicroscópio, mostrando los estados de germinación de semillas con 50 días de tratamiento, A semillas sin germinar (flechas); B semillas en imbibición (primera fase de germinación); C segundo estado de germinación con desarrollo de rizoides y hoja (flechas)



**Foto 9** - Estado general de una placa bajo el tratamiento de luz roja, mostrando los tres estados de germinación indicado por las flechas (50x). Semillas sin germinar (flecha rellena), primer estado de germinación (flecha sin relleno), semillas con protocormo diferenciado (flecha cuadrada)



**Foto 10** – Fotografía 3D con estereomicroscópio mostrando el estado general de una placa luego de 50 días de tratamiento de luz roja, mostrando los tres estados de germinación indicado por las flechas



**Foto 11** – Fotografía 3D con estereomicroscópio mostrando semillas germinadas y sin germinar (flechas negras)





### 3.2.1 Análisis estadístico de la germinación en respuesta a la longitud de onda

La varianza es la medida que muestra la variabilidad de los valores o grado de dispersión en relación al conjunto de observaciones en torno de la media. Se calcula al tomar la media de los cuadrados de los desvíos en relación a la media, o el cuadrado de la desviación estándar. La desviación estándar indica la dispersión de los datos de muestreo en relación a la media y se calcula como la raíz cuadrada de la varianza (Blair & Taylor, 2013). La tabla 13 muestra los resultados para las tratamientos, siendo el tratamiento con luz blanca el mayor.

**Tabla 13** – Valores de media, cantidad de muestras y desviación estándar del porcentaje de germinación de cada tratamiento y el total.

**Informe**

VAR00002

VAR00001	Media	N	Desviación estándar
azul	88,4833	6	3,05785
blanco	90,6117	6	5,23147
rojo	88,9567	6	2,65435
Total	89,3506	18	3,70855

Este método estadístico, desarrollado por R.A. Fisher en los años entre 1920 y 1930 es fundamental en una gran cantidad de aplicaciones de estadística para biología, tanto para interpretar los resultados como para la planificación de experimentos ya que permite discernir la naturaleza de la variación de los acontecimientos naturales (Bakieva *et al.*, 2012; Sokal & Rohlf, 1986 p.195).

Este análisis permite determinar si diferentes tratamientos presentan diferencias significativas o sus medias de población no difieren y se basa en los supuesto de normalidad y homocedasticidad (ver apéndice A). La hipótesis nula del test (Ecuación 1), declara que todas las medias de la población son iguales, por lo que las medias de los grupo también lo son. Por otro lado, la hipótesis alternativa es cualquier condición que torne falsa a la hipótesis nula (Ecuación 2), considerando que en análisis con grupos de mas de tres tratamiento, no es posible saber cual de las condiciones causa este rechazo. Si el nivel de significación es menor o igual que 0,05 rechazamos la hipótesis de igualdad

de medias, si por el contrario, es mayor, aceptamos la igualdad de medias o que no existen diferencias significativas entre los grupos (Bakieva *et al.*, 2012; Blair & Taylor, 2013 p. 238). En la tabla 12 se muestran los resultados del análisis, indicando que no existe diferencia entre los tratamientos.

**Ecuación 1** – Hipótesis nula del test ANOVA

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

**Ecuación 2** – Hipótesis alternativa del test ANOVA

$$H_1: \mu_1 = \mu_2 \neq \mu_3$$

$$\mu_1 \neq \mu_2 = \mu_3$$

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

**Tabla 12** – Resultado del test de ANOVA mostrando el valor de p (Sig.) = 0,608 siendo mayor que 0,05, indicando que no existen diferencia entre las medias y por lo tanto entre los tratamientos

**ANOVA**

VAR00002

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14,986	2	7,493	,514	,608
Dentro de grupos	218,822	15	14,588		
Total	233,807	17			

Test T

Si la conclusión de contraste es rechazada, como en este caso, la igualdad de medias se puede analizar que grupos de dos a dos, tienen medias significativamente distintas. En este estudio, análisis con un p valor (sig) mayor que 0,05 son significativamente diferentes (Bakieva *et al.*, 2012). En la tabla 13 se muestran los resultados del análisis, indicando el rechazo de la hipótesis estadística en los tres casos.

**Tabla 13** – Se muestran los resultados del test entre los grupos Blanco – Azul, Blanco – Rojo y Azul – Rojo, siendo en los tres casos rechazada la hipótesis de diferencia entre las medias.

**Estadísticas de grupo**

VAR00001	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
VAR00002 blanco	6	90,6117	5,23147	2,13574
VAR00002 azul	6	88,4833	3,05785	1,24836

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
VAR00002	Se asumen varianzas iguales	5,914	,035	,860	10	,410	2,12833	2,47382	-3,38368	7,64035
	No se asumen varianzas iguales			,860	8,059	,414	2,12833	2,47382	-3,56900	7,82566

**Estadísticas de grupo**

VAR00001	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
VAR00002 blanco	6	90,6117	5,23147	2,13574
VAR00002 rojo	6	88,9567	2,65435	1,08363

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
VAR00002	Se asumen varianzas iguales	8,790	,014	,691	10	,505	1,65500	2,39492	-3,68122	6,99122
	No se asumen varianzas iguales			,691	7,414	,511	1,65500	2,39492	-3,94456	7,25456

**Estadísticas de grupo**

VAR00001	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
VAR00002 azul	6	88,4833	3,05785	1,24836
VAR00002 rojo	6	88,9567	2,65435	1,08363

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
VAR00002	Se asumen varianzas iguales	,120	,736	-,286	10	,780	-,47333	1,65308	-4,15662	3,20996
	No se asumen varianzas iguales			-,286	9,806	,781	-,47333	1,65308	-4,16651	3,21985

## 4 DISCUSIÓN

Mediante la fotosíntesis, la luz, influye en el crecimiento de las plantas así como en otros procesos de desarrollo, tales como la germinación y la floración (Runkle & Heins, 2005). Al evaluar el porcentaje de semillas germinadas se constato que no existe diferencia significativa entre los tratamientos lo cual indica que en este estadio de germinación la luz no representa un factor determinante y en presencia tanto de luz blanca como de azul y roja, la germinación ocurre en un alto porcentaje de semillas. En relación a diferencias entre la primer y segunda fase de germinación, se observan semillas en ambas fases en todos los tratamientos, indicando que la luz tampoco se comporta como un factor limitante en este estadio. Estos efectos, de las diferentes longitudes de onda en las plantas se estudian desde hace mucho tiempo en diversos grupos, pero utilizando otras técnicas, como luces fluorescentes y filtros y se han obtenido resultados interesantes en concordancia y que difieren con este estudio. En alpiste, se observó un aumento significativo de germinación en tratamientos con filtros de luz rojo y rojo lejano y una disminución si se utilizaba solo el filtro rojo (Ferrarotto y Silva, 2013). En semillas de brocoli, la germinación fue favorecida por el uso de filtros rojos al igual que el crecimiento de la plántula, sin embargo, con filtros azules la germinación fue menor (Casierra y Rojas, 2009). Por otro lado, en muchos estudios con orquídeas los filtro no proporcionan diferencias o interfieren negativamente. En el trabajo de Júnior et al. (2012), se estudió el efecto de dos espectros de luz, blanca por medio de una luz fluorescente y roja obtenida por un filtro de papel celofán superpuesto a una lampara fluorescente, en el crecimiento de *Cattleya loddigesii*. Como resultado se obtuvieron plantas de menor tamaño y cantidad de raíces en las tratadas con luz blanca con filtro rojo. Otro estudio, analizó la influencia de luz natural con filtros, rojo, azul y verde en el crecimiento y enraizamiento de la especie *Ocidium baueri*. Los autores concluyeron que el crecimiento y enraizamiento de esta orquídea no era favorecido por la aplicación de ningún filtro (Camargo et al., 2015).

Por otro lado, como muestran muchos estudios, la incidencia de luz de diferentes longitudes de onda en este momento de la semilla, puede afectar fases siguientes del crecimiento o morfogénesis de la planta. En el estudio de Cybulars-Urban et al. (2007), se analizó el efecto de la luz LED roja, azul, blanca, rojo lejano y en oscuridad, en el crecimiento y morfología de una orquídea del género *Cattleya in vitro*. Se constató que la luz azul afecto positivamente la anatomía y morfología de la orquídea mientras que bajo el

tratamiento con luz roja se obtuvieron plantas con reducción de clorofila y carotenoides en las hojas y degeneración en los tejidos. Este estudio concluyó que es posible utilizar los espectros de luz en *Cattleya* para controlar la morfogénesis y el crecimiento de tejidos *in vitro*. Este efecto no fue evaluado en este estudio abriendo la posibilidad de experiencias futuras. En el estudio de Godo et. al., (2011), se analizó el efecto de la luz LED blanca ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), roja (625 nm), verde (525 nm), azul (470 nm) y naranja (590 nm) en la orquídea *Bletilla ochracea*. En todos los tratamientos se obtuvo más de 60% de porcentaje de germinación en las primeras tres semanas y al final del tratamiento, las frecuencias más altas de germinación fueron con las luces verde y naranja. En relación a la formación de rizoides, las longitudes de onda más efectivas fueron las del rojo y naranja y luego de tres meses de tratamiento se constató que las plántulas con luz LED blanca y azul presentaron pseudobulbos más grandes.

Otros grupos de plantas también son utilizados para analizar el efecto de las luces LEDs en el crecimiento y germinación *in vitro*. En cultivos de papas, Navarro (2013), realizó un estudio con sistemas de LEDs combinando luces azul, roja y blanca, y blanca y roja. Todos los parámetros estudiados mostraron un mejor crecimiento en relación al método tradicional, tornando el cultivo más eficiente. El autor destaca, además, la necesidad de más estudios en el área que al igual que con las orquídeas, aún son muy escasos. En otra planta de interés comercial, *Salvia splendens*, se analizó el efecto de la luz LED azul, y púrpura en el crecimiento de la planta, verificando el efecto en la reducción del tiempo de floración. El resto de los parámetros analizados, altura, diámetro y número de brotes no mostraron diferencia significativa con los métodos convencionales (Gómez-Coto, 2014).

Este estudio no demostró que la luz sea un factor determinante en esta fase, sin embargo, otros factores como la humedad y los nutrientes pueden cumplir este papel. En el caso de la humedad al mantener las placas cerradas se mantuvo constante y los nutrientes, debido al medio específico de orquídeas son ampliamente suministrados. La condición óptima de otros factores de germinación, puede enmascarar el efecto de la luz, dificultando la constatación de su influencia. Diversos estudios verifican que la adición de nutrientes es un factor de gran influencia en la germinación de orquídeas, Salazar et al. (2012), muestra que el medio MS suplementado con jugo de piña aumenta estadísticamente la respuesta a la germinación y formación de plántulas de *Prosechea vespa* y *Sobralia klotzscheana*. En otros estudios se verificó la influencia positiva de fertilizantes en la germinación y desarrollo de semillas de *Cattleya tigrina* siendo el

Kristalon Laranja el mas eficiente (Moraes et al., 2010). Para realizar un mejor análisis en experiencias futuras se pueden modificar estos factores para tornarlos más limitantes.

En otro sentido, aún sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos, el resultado indica un porcentaje de germinación cercano al 100%, lo cual, representa un ahorro económico al intercambiar métodos de iluminación mas convencionales de luz incandescente o fluorescente por la nueva tecnología de LEDs. Esto se torna una ventaja en proyectos donde el factor económico es un limitante, como en conservación de especies o sociales de cultivo *in vitro* en pequeña escala. Estudios como el de Navarro (2013) muestran ahorro energético en los sistemas de luces LEDs, en cultivo de papas, en los que se alcanza un consumo eléctrico 38% menor que con tubos fluorescentes obteniendo cultivos mas eficientes y económicos.

En relación a la viabilidad de las semillas, el análisis de cápsulas verdes y marrones, muestra una gran diferencia en el porcentaje de germinación. Este resultado es concordante con diversos estudios, entre los que se destaca el de Rodríguez & Gonzalez (2010); Salazar & Cancino (2012) que verifican la ventaja en el uso de cápsulas maduras verdes o amarillas en orquídeas del género *Encyclia* permitiendo que el embrión alcance la madurez para germinar. En otro estudio con orquídeas del genero *Orque* también se obtuvo una amplia diferencia que alcanzo 60% en el porcentaje de germinación entre cápsulas maduras e inmaduras (Jara et al., 2007). Sin embargo, en el estudio de Rodríguez, (2010) se resalta la importancia de ampliar los estudios en este sentido debido a la gran diversidad en las especies del género.

## 5 CONCLUSIÓN

Se concluye que para la primer y segunda fase de germinación de orquídeas del género *Encyclia sp.*, el tratamiento con luces LEDs rojas, azules y blancas no genero una diferencia significativa en la germinación. Debido a que esta adición lumínica puede generar cambios en fases futuras del desarrollo de la plántula, se determina la necesidad de continuar el estudio hasta estados mas avanzados de crecimiento y considerando nuevas condiciones tanto de nutrientes y humedad, como de otras longitudes de onda de luz. Considerando la importancia de esta nueva tecnología en la optimización y ahorro económico en cultivos con condiciones controladas se hace énfasis en la necesidad del desarrollo de estudios en esta área que puedan ser utilizados en el uso y conservación de este grupo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARDITTI, J. (2009). **Micropropagation of orchids**. John Wiley & Sons cap:1, p63-139.
- ASSIS, A. M., Unemoto, L. K., Yamamoto, L. Y., Lone, A. B., de Souza, G. R. B., de Faria, R. T., ... Takahashi, L. S. a. (2011). Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café. **Bragantia**, 70(3), 544–549.
- BAIGTS, C. R. B., & Molina, I. M. (2010). Primer registro de *Encyclia nematocaulon* (A. Rich.) Acuña (1939)(Orchidaceae, Laeliinae) para Chiapas, México. **Lacandonia**, 4(2).
- BAKIEVA, M., González Such J., Jornet. (2012). SPSS: Anova de un Factor. **Innova Mide**, Valencia, España.
- BASKIN, C. y Baskin, J. (2001). Environmental factors causing changes in dormancy states. Seeds. Ecology, Biogeography and evolution of dormancy and germination. **Academic Press**. California -USA. 666 p. pp. 73-76.
- BECK, A. (2013). **Armandinho dois**. da 4 Estações. Brasil. p.96
- BERGARECHE, C.; Moysset, L., El fotocromo, en Azcon Bieto, J. y Talon, M. **Fisiología y bioquímica vegetal**, Bogotá, McGraw-Hill, 1993, pp. 397-417
- BOURGET, C. M. (2005) An Introduction to Light-emitting Diodes, **HortScience**, 43 (7): 1944-1946.
- CAMARGO, S. S., Rodrigues, D. B., Rodrigues, C. M., de Assis, A. M., de Faria, R. T., & Schuch, M. W. (2015). Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, pp. 45.
- CARDOSO, V. J. M. (2009). Fotometria para biólogos. **Oecologia Brasiliensis**, 545-553.
- CASIERRA-POSADA, F., & Rojas, J. F. (2009). Efecto de la exposición del semillero a coberturas de colores sobre el desarrollo y productividad del brócoli (*Brassica oleracea* var. italica). **Agronomía Colombiana**, 27(1), 49-55.
- CHUGH, S. (2009) Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, v.122, n.4, p.507-520.
- COLOMBO L. A.; Faria, R. T.; De Carvalho J. F. R. P.; Fonseca, I. C. D. B.; Assis A. M.; (2004). Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento in vitro de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 26(2), 253–258.
- CYBULARZ-URBAN, T., Hanus-Fajerska, E., & Swiderski, A. (2007). Effect of light wavelength on in vitro organogenesis of a *Cattleya* hybrid. **Acta Biologica Cracoviensia**, 49(1), 113-118.



- DAMON, A., Aguilar, G. E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 195-203.
- DEZAN, L. F., Canassa, F., de Souza-Leal, T., Diogo, J. A., Massaro, R., Marcelino Cordeiro, G., & Pedroso-de-Moraes, C. (2012). Crescimento in vitro de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. *Idesia (Arica)*, 30(2), 53–58.
- FERRAROTTO, M. S., & Da Silva, H. (2013) germinación y morfología de alpiste (*phalaris canariensis* L.) poaceae, bajo distintas condiciones de calidad de luz.
- FLACHSLAND, E.; Terada, G.; Rey, H.; Mroginski, L. (1996). Medios de cultivo para la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. **FACENA**. Volumen 12: 93-100.
- GODO, T., Fujiwara, K., Guan, K., & Miyoshi, K. (2011). Effects of wavelength of LED-light on in vitro asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr. (Orchidaceae). **Plant Biotechnology**, 28(4), 397-400.
- GÓMEZ-COTO, F. J. (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.
- HÁGSATER E., R. Jiménez, Soto -Arenas M. A., -Nez Machorro, Salazar Chávez, r. Solano Gómez, Flores González, e i. Ruíz Contreras, 2007. **Catálogo Digital**, Las orquídeas de México, Cd.
- HETHERINGTON, E.(2002) Influência de *Cattleya labiata* na hibridação. In: MENEZES, L.C. *Cattleya labiata* autumnalis. **Brasília: IBAMA**, 2002. p.235-247.
- IBARRA-MANRÍQUEZ, Guillermo; COLÍN, Santiago Sinaca. Lista comentada de plantas de la Estación de Biología Tropical" Los Tuxtlas", Veracruz, México:(Violaceaeae-Zingiberaceae). **Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation**, 1996, vol. 44, no 2 A, p. 427-447.
- IRIONDO, J. 2001. **INIA**. España. Consultado 06 Junio 2016. Disponible en: [Http://www.inia.es/gcontcept/pub/germoplasm\\_116858274546.pdf](http://www.inia.es/gcontcept/pub/germoplasm_116858274546.pdf)
- JAO, R. C.; Fang, W. (2005). Effects on Frequency and Duty Ratio on the Growth of Potato Plantlets *In Vitro* Using Light-emitting Diodes, **HortScience**, 39 (2): 375-379.
- JARA, G., Seemann, P., Durán, C., & Soto, S. (2007). Multiplicación in vitro y caracterización citológica de dos especies de orquídeas nativas (*chloraea* y *gavilea*) de la provincia de valdivia, Chile. **Agro sur**, 35(2), 43-44.
- JENKINS, G. I. (2014,). The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. **The Plant Cell**, vol. 26, no 1, p. 21-37.
- JOHNSON, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 90(3),

313-323.

JORGE H. R. (2006). **Fisiología de la Producción de los Cultivos Tropicales**. 1ª Ed. Editorial Universidad de Costa Rica (San Jose). pp: 62 – 65.

JÚNIOR, R. F. G. (2012). Crescimento in vitro e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, vol. 42, no 5, p. 801-807.

KOOLMAN. R. (2004). **Bioquímica**. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana (Madrid). pp: 370.

LALLANA, V. H., & García, L. F. (2013). Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). **Investigación Agraria**, 15(2), 129-132.

LEOPARDI C. (2010). Orquideoflórula de un sector de Serranía de La Cuchilla, municipio Caripe, estado Monagas, Venezuela. **Lankesteriana**.

MANRIQUE, J. P. (2006). Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación in vitro de *Masdevallia auropurpurea* Reich. **Revista Científica**, (9), 117-141.

MCKENDRICK, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de orquídeas. *Ceiba Fundación para la Conservación Tropical*. **Universidad San Francisco de Quito**, p 38-39.

MEISEL, L., Urbina, D., & Pinto, M. (2011). Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. **Fisiología vegetal**. *FA Squeo Cardemil (eds), Ediciones Universidad de La Serena, Chile. Cap, 18, 1-10.*

MEISEL, J. E., Kaufmann, R. S., & Pupulin, F. (2014). *Orchids of tropical America: an introduction and guide*. **Cornell University Press**.

MENEGUZZO, T. E., Bianchetti, L. B., & Proença, C. E. (2012). The genus *Encyclia* (Orchidaceae) in the Distrito Federal, Goiás and Tocantins. **Rodriguésia**, 63(2), 277-292.

MIYATA, L. Y., Villa, F., & Pasqual, M. (2014). Meios de cultura utilizados na micropropagaçãode híbridos de orquídeas. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 1731.

MUÑOZ, M. y Jiménez, V. 2008. Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. **Lankesteriana** 8(2):23 - 31.

NAVARRO PAZ, V. (2013). Análisis de la utilización de luz emitida por lámparas de diodo LEDs en la producción in vitro para la obtención de semillas prebásicas de *Solanum tuberosum*. Trabajo final de ingeniería en Producción Agropecuaria. **Facultad de Ciencias Agrarias**. Universidad Católica Argentina.

OSRAM disponible en [http://www.osram.es/osram\\_es/noticias-y-conocimiento/led-](http://www.osram.es/osram_es/noticias-y-conocimiento/led-)

[home/conocimiento-profesional/basicos-led/colores-de-la-luz/index.jsp](http://home/conocimiento-profesional/basicos-led/colores-de-la-luz/index.jsp) ultimo acceso: 20/06/2016

PADILLA, M. A., Villanueva, O., Bonomo, C., Aviles, Z., & Vacca Molina, M. (2011). Germinación asimbiótica y obtención de vitroplantas de *Encyclia oncioides* (Lindl) Schltr.

PEDROSO M.; C. Santos N. S.; Massaro, R.; Cordeiro, G. M.; Souza L. T. (2010). Desenvolvimento in vitro de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência**, 13(2), 67-78.

PIERIK R.L.M. 1997. Cultivo in vitro de las plantas superiores. **Springer Science & Business Media**.

PONS, T. 2000. Seed responses to light. En: Fenner, M (Ed). *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. **CAB International**, New York, NY

RAMOS, P., Navas Gracia, L. M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Martin Gil, J., Martin Bravo, E., ... & Duran Altisent, J. M. (2010). Diodos emisores de luz para irradiación de plantas. **Scribd**.

RODRÍGUEZ, L., González, M. C., & González, R. (2010). Micropropagación de *encyclia phoenicea* (lindl.) neum, orquídea epífita endémica de Cuba. In Congreso Científico del INCA, XVII, San José de las Lajas. **Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas**. pp.22-26.

RUIZ, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L. G., Damon, A., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S., & Moreno, M. J. L. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). **Phyton (Buenos Aires)**, 77, 203-215.

RUNKLE, E. S., & Heins, R. D. (2005). Manipulating the light environment to control flowering and morphogenesis of herbaceous plants. In *V International Symposium on Artificial Lighting in Horticulture*. 711 pp. 51-60.

SADAVA. Heller. Orians. Purves. Hillis (2009). **Vida, la Ciencia de la Vida**. 8ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Capítulo 37. pp: 797, 798.

SALAZAR Mercado, S. A., & Cancino, G. O. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 14(1), 53-59.

SCHNEIDERS, D., Pescador, R., Booz, M. R., & Suzuki, R. M. (2015). Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Ceres**, 59(2).

SEATON P., Ramsay M. (2009). Cultivo de orquídeas por semilla. **New Publishing**. Richmond. P65

SILVA, E. (2003). Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea *Brassocattleya* "Pastoral" x *Laeliocattleya* "Amber Glow". **Doctoral dissertation**, Dissertação (Mestrado

em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG). p. 62.

SOKAL, Robert R.; ROHLF, F. James. **Introducción a la Bioestadística**. Reverté, 1986.

VIEIRA, J. Z. (2009). Propagação in vitro e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, 37(1), 48–52.

ZANENGA-GODOY R.; Costa C. G. (2003). Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. *Acta Bot. Bras.*, Porto Alegre, v. 17, n. 1.

## APÉNDICES

## APÉNDICE A – CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

### APÉNDICE A – Análisis Estadístico

Para el estudio de los resultados esperados en el experimento es necesario basarse en análisis estadísticos que permitan entender la situación generada, para ello algunos de los test a seguir son utilizados.

#### Normalidad

Si el p valor es mayor que 0,05 (95% nivel de confianza) se acepta la hipótesis nula (ecuación 3) que afirma que la variable presenta distribución normal (requisito para el de análisis de varianza) (Blair & Taylor, 2013).

H<sub>0</sub>: La variable tiene distribución normal en la población

H<sub>1</sub>: La variable no presenta distribución normal

**Tabla 10** – Valores del test de Shapiro-Wilk para muestras con cantidad menor a 50, mostrando los valor de p (Sig.) mayores a 0,05.

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
VAR00001		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
VAR00002	azul	,161	6	,200*	,964	6	,848
	blanco	,233	6	,200*	,894	6	,339
	rojo	,124	6	,200*	,987	6	,979

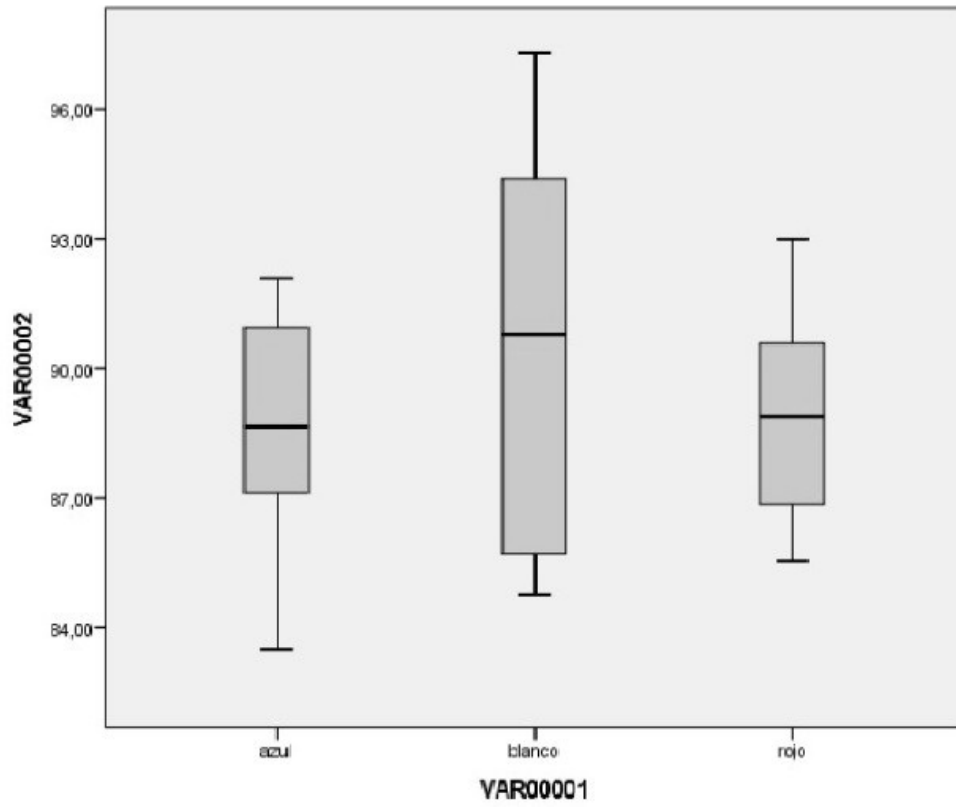
\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

#### Homocedasticidad

La hipótesis de homocedasticidad constata si la varianza de los residuos es constante o varían en los diferentes niveles del factor. Es decir, que la varianza del error de la variable se mantiene constante. En el caso que el nivel crítico (sig) sea menor o igual a 0,05 debemos rechazar la hipótesis de igualdad de varianzas. Si es mayor aceptamos la hipótesis de igualdad de varianzas (Bakieva *et al.*, 2012).

**Gráfico 3** – Diagrama de cajas mostrando las medias y el error de los tres tratamientos y su homogeneidad de varianza.



**ANEXOS**



## ANEXO A – COMPOSICIÓN DEL MEDIO PHYTAMAX

Componentes en mg/L del medio de cultura SIGMA Phytamax suministrado por la ficha de información del producto de la empresa, disponible en:

<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/4/p1056dat.pdf>

Se requieren 57,3 g de polvo para preparar 1 L de medio.

Components: mg/L	
Ammonium Nitrate .....	825.0
Banana Powder (50% Malto-dextrin) . . . . .	30000.0
Boric Acid.....	3.10
Calcium Chloride Anhydrous .....	166.0
Cobalt Chloride Hexahydrate.....	0.0125
Cupric Sulfate Pentahydrate .....	0.0125
Disodium EDTA Dihydrate .....	37.240
Ferrous Sulfate Heptahydrate.....	27.850
Magnesium Sulfate Anhydrous .....	90.350
Manganese Sulfate .....	8.450
Potassium Iodide .....	0.4150
Potassium Nitrate .....	950.0
Potassium Phosphate Monobasic .....	85.0
Sodium Molybdate Dihydrate .....	0.1250
Zinc Sulfate Heptahydrate .....	5.30
Charcoal .....	2000.0
MES (Free Acid) .....	1000.0
Myo-Inositol.....	100.0
Nicotinic Acid (Free Acid) .....	1.0
Peptone Type I.....	2000.0
Pyridoxine Hydrochloride .....	1.0
Sucrose . . . . .	20000.0
Thiamine Hydrochloride .....	10.0
57.3 g of powder are required to prepare 1 L of medium	