UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SÁN NICOLAS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

DISPONIBILIDAD Y FORMA DEL NITRÓGENO EN EL DESARROLLO DE PLANTULAS *in vitro* DE *Laelia speciosa* (KUNTH) SCHLTR Y *Laelia autumnalis* (LA LLAVE & LEX) LINDLEY.

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA: OPCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA:

BIOL. FIDEL VARGAS DE LA CRUZ

ASESOR:

D. C. RAÚL CÁRDENAS NAVARRO

CO-ASESOR

D. C. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS

Morelia, Michoacán, agosto del 2017

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mis padres, a mis esposa Idolina Flores y a mi hijo Adrián Vargas, que gracias a su apoyo, cariño y amor me han ayudado a concluir las metas que me he propuesto.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales por permitirme llevar a cabo mis estudios de Maestría.
- A CONACYT por otorgarme la beca no. **577515** para la realización de mis estudios.
- A mi asesor y coasesor de Tesis, el Dr. Raúl Cárdenas Navarro y el Dr. Alejandro Martínez Palacios respectivamente por permitirme trabajar con ellos, por el tiempo dedicado y por los consejos, apoyo y compañía que me otorgaron durante el desarrollo de este proyecto.
- Al Dr. Luis López Pérez, Dra. Ma. Luisa España Boquera y a la Dra. Martha Elena Pedraza Santos por el tiempo y apoyo dedicado para la conclusión de esta tesis.
- A mis compañeros de maestría por su apoyo y amistad.
- A mi esposa Idolina Flores por su tiempo y ayuda para la culminación de este trabajo.

Tabla de contenido

INDICE DE CUADROS ..... **I**

INDICE DE FIGURAS ..... **IV**

RESUMEN ..... **V**

ABSTRACT ..... **VI**

1. INTRODUCCIÓN **1**

1.1. Características generales de la Familia Orchidaceae **1**

1.2. Importancia comercial de las orquídeas **2**

1.2.1. En el mundo 2

1.2.2. En México 2

1.2.3. Distribución y abundancia 3

1.3. Características generales del género *Laelia* spp. Lindl. **4**

1.3.1. *Laelia autumnalis* (Llave & Lex.) Lindl. 1831 5

1.3.1.1. Descripción botánica (Halbinger y Soto, 1997). 5

1.3.1.2. Sinonimias y nombres comunes 7

1.3.1.3. Distribución y hábitat (Halbinger y Soto, 1997). 7

1.3.2. *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr. 1914 8

1.3.2.1. Descripción botánica (Halbinger y Soto, 1997). 8

1.3.2.2. Sinonimias y nombres comunes 10

1.3.2.3. Distribución y hábitat (Halbinger y Soto, 1997). 10

1.4. Problemática de las orquídeas **11**

1.5. Cultivo *in vitro* de plantas de orquídea **12**

1.6. Nutrición mineral de las orquídeas bajo condiciones *in vitro* **14**

1.7. Importancia del Nitrógeno en las orquídeas **16**

1.8. Fuentes de Nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-) **16**

2. HIPÓTESIS **20**

3. OBJETIVOS **20**

3.1 OBJETIVO GENERAL **20**

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES **20**

4. MATERIALES Y METODOS **21**

4.1. Material biológico **21**

4.2. Lavado general del material de cristalería **21**

4.2.1. Descripción del procedimiento de lavado propuesto por Obregón R., (2015). 21

4.2.2. Lavado de material con tratamiento especial 22

4.3. Preparación de medio ER para la germinación de semillas de orquídeas. **22**

4.4. Esterilización y siembra de las semillas colectadas. **22**

4.4.1. Esterilización de semillas por el método de "paquete". 22

4.5. Preparación de los medios de cultivo a utilizar para la evaluación del crecimiento y desarrollo de plántulas *in vitro* **23**

4.6. Crecimiento y desarrollo de plántulas *in vitro* **24**

4.7. Muestreos **24**

4.8. Análisis estadístico **24**

5. RESULTADOS **25**

5.1. Evaluación del efecto de tres concentraciones de N y seis proporciones de las formas NH_4^+ y NO_3^- y su interacción sobre variables de crecimiento en plántulas de *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. bajo condiciones *in vitro*. 26
5.1.1. Número de raíces 26
5.1.2. Número de hojas 27
5.1.3. Número de pseudobulbos 28
5.1.4. Número de brotes 29
5.1.5. Altura parte aérea 30
5.1.6. Longitud total de raíces 31
5.1.7. Materia fresca de la raíz 32
5.1.8. Materia seca de la raíz 33
5.1.9. Materia fresca de la parte aérea 34
5.1.10. Materia seca de la parte aérea 35
5.2. Evaluación del efecto de tres concentraciones de N y seis proporciones de las formas NH_4^+ y NO_3^- y su interacción sobre variables de crecimiento en plántulas de *L. speciosa* (Kunth) Schltr. bajo condiciones *in vitro*. 36
5.2.1. Número de raíces 36
5.2.2. Número de hojas 37
5.2.3. Número de pseudobulbos 38
5.2.4. Número de brotes 39
5.2.5. Número de PLB´s 40
5.2.6. Altura parte aérea 41
5.2.7. Longitud total de raíces 42
5.2.8. Materia fresca de la raíz 43
5.2.9. Materia seca de la raíz 44
5.2.10. Materia fresca de la parte aérea 45
5.2.11. Materia seca de la parte aérea 46
5.3. Determinación del porcentaje de N total en parte aérea y raíz de *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. y *L. speciosa* (Kunth) Schltr. bajo tres concentraciones de N y seis proporciones de las formas NH_4^+ y NO_3^- en condiciones *in vitro*. 47
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 51
7. CONCLUSIONES 53
8. BIBLIOGRAFIA 54
9. ANEXOS 64
Anexo 1: Tratamientos de los factores evaluados. 64
Anexo 2. Medio de cultivo ER para la germinación de semillas de orquídeas 65
Anexo 3. Soluciones nutritivas para la elaboración de medios de cultivo 66
Anexo 4: Elaboración de soluciones nutritivas 71
Anexo 5: Micronutrientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 1962. 72
Anexo 6: Imágenes *L. autumnalis* 73
Anexo 7: Imágenes *L. speciosa* 74

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE RAÍCES DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 26

CUADRO 2: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE HOJAS DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 27

CUADRO 3: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE BULBOS DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 28

CUADRO 4: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE PLANTAS DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 29

CUADRO 5: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA ALTURA DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 30

CUADRO 6: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA LONGITUD PROMEDIO DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 31

CUADRO 7: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL PESO FRESCO DE LAS RAÍCES DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS.....32

CUADRO 8: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL PESO SECO DE LAS RAÍCES DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 33

CUADRO 9: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL PESO FRESCO DE LA PARTE AÉREA DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS.....34

CUADRO 10: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL PESO SECO DE LA PARTE AÉREA DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS.....35

CUADRO 11: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE RAÍCES DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 36

CUADRO 12: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE HOJAS DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 37

CUADRO 13: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE BULBOS DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 38

CUADRO 14: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE PLANTAS DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 39

CUADRO 15: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE EL NÚMERO DE PLB´S DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 40

CUADRO 16: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA ALTURA DE LA PARTE AÉREA DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 41

CUADRO 17: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA LONGITUD DE RAÍCES DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 42

CUADRO 18: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA MATERIA FRESCA DE LAS RAICES DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 43

CUADRO 19: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA MATERIA SECA DE LAS RAÍCES DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 44

CUADRO 20: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA MATERIA FRESCA DE LA PARTE AÉREA DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 45

CUADRO 21: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y PROPORCIÓN DE LAS FORMAS NH_4^+:NO_3^- Y SU INTERACCIÓN SOBRE LA MATERIA SECA DE LA PARTE AÉREA DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 46

CUADRO 22: CONTENIDO DE NITRÓGENO EN PARTE AÉREA DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 47

CUADRO 23: CONTENIDO DE NITRÓGENO EN RAÍZ DE *L. autumnalis* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 48

CUADRO 24: CONTENIDO DE NITRÓGENO EN PARTE AÉREA DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 49

CUADRO 25: CONTENIDO DE NITRÓGENO EN RAÍZ DE *L. speciosa* A LOS 270 DÍAS DE ESTABLECIDAS. 50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- COLOR Y FORMA COMÚN DE ***Laelia autumnalis*** (LINDL)**.** 7

FIGURA 2.- ***Laelia autumnalis*** LINDL**.** HA1BINGER, E. PÉREZ 100. DRAWING BY R. JIMÉNEZ.....6

FIGURA 3.- COLOR Y FORMA COMÚN DE ***Laelia speciosa*** (LLAVE & LEX.).....10

FIGURA 4.- ***Laelia speciosa*** (LLAVE & LEX.) SCWTR. M. SOTO 5663. DRAWING BY R. JIMÉNEZ.....9

RESUMEN

Los estudios sobre la nutrición de orquídeas que involucran diferentes concentraciones de Nitrógeno (N) y proporciones de amonio-nitrato son incipientes en la literatura. En este sentido se evaluaron tres concentraciones de N y seis proporciones de amonio-nitrato además de la interacción entre ambos factores. El experimento constó de un diseño factorial compuesto por tres concentraciones de N: 9.2, 18.3 y 36.6 mmol L^{-1} y seis proporciones de amonio-nitrato: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100 para cada especie (*Laelia speciosa y L. autumnalis*), con cinco repeticiones. Cada unidad experimental se conformó por 50 protocormos, con una distribución completamente al azar. Para la elaboración de las soluciones nutritivas se tomó como base el medio ER eliminando Nitrato de Amonio y formuladas con un total de 41.10 Meq L^{-1} con micronutrientes del medio de cultivo MS al 10%. Las variables evaluadas fueron: peso fresco y seco de la parte aérea y la raíz, longitud de raíz, altura de parte aérea, número de hojas, raíces, brotes, PLB´s (Protocorm like bodies) y pseudobulbos y nitrógeno total en parte aérea y raíz. El análisis de varianza multifactorial nos indica que hay una alta diferencia significativa ($P < 0.001$) en todas las variables evaluadas. Los mejores resultados de las variables evaluadas para *L. autumnalis* se obtuvieron con la interacción del nivel de nitrógeno de 36.6 mM y la proporción 20:80 y 40:60 de NH_4^+ : NO_3^-, solamente la longitud de raíces y altura de los brotes tuvieron un mejor efecto con el nivel de nitrógeno (9.2 mM) y (18.3 mM) respectivamente. En el caso de *L. speciosa* se obtuvieron los mejores resultados con la interacción del nivel de nitrógeno 18.3 mM y 36.6 mM y con la proporción 20:80 de NH_4^+:NO_3^-; en esta especie se presentó la generación de PLB´s en el tratamiento con una proporción de NH_4^+ : NO_3^- (40:60) y una concentración de N de 36.6 mM. En el caso de *L. autumnalis* donde los protocormos murieron fueron los tratamientos con las proporciones 80:20 y 100:0 de NH_4^+ : NO_3^- en los tres niveles de N y para *L. speciosa* fueron las proporciones NH_4^+ : NO_3^- 60:40, 80:20 y 100:0 en los tres niveles de N. El desarrollo y crecimiento de *Laelia autumnalis y L. speciosa* se favorece en concentraciones de N 18.3 y 36.6 mM, suministrado en combinación de las formas NH_4^+ y NO_3^- (20:80, 40:60) en cultivo *in vitro.*

Palabras clave: *L. autumnalis, L. speciosa,* orquídeas, nitrógeno, fertilizantes.

ABSTRACT

Studies on orchid nutrition involving different concentrations of Nitrogen (N) and ammonium-nitrate ratios are incipient in the literature. In this sense, three concentrations of N and six proportions of ammonium-nitrate were evaluated in addition to the interaction between both factors. The experiment consisted of a factorial design composed of three concentrations of N: 9.2, 18.3 and 36.6 mmol L^{-1} and six proportions of ammonium-nitrate: 100: 0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 And 0:100 for each species (*Laelia speciosa* and *L. autumnalis*), with five replicates. Each experimental unit was conformed by 50 protocorms, with a completely random distribution. For the preparation of the nutrient solutions, the ER medium was taken as the basis for the elimination of Ammonium Nitrate and formulated with a total of 41.10 Meq L^{-1} with micronutrients of the 10% MS culture medium. The variables evaluated were: fresh and dry weight of shoot and root, root length, shoots height, number of leaves, roots, shoots, PLB's (Protocorm like bodies) and pseudobulbs and total nitrogen in aerial part and root. The analysis of multivariate variance indicates that there is a high significant difference ($P < 0.001$) in all variables evaluated. The best results of the variables evaluated for *L. autumnalis* were obtained with the interaction of the nitrogen level of 36.6 mM and the ratio 20:80 and 40:60 of NH_4^+ : NO_3^-, only the length of roots and height of the shoots had A better effect with nitrogen level (9.2 mM) and (18.3 mM) respectively. In the case of *L. speciosa* the best results were obtained with the interaction of the nitrogen level 18.3 mM and 36.6 mM and with the proportion 20:80 of NH_4^+ : NO_3^-; In this species the generation of PLB´s was presented in the treatment with a proportion of NH_4^+ : NO_3^- (40:60) and an N concentration of 36.6 mM. In the case of *L. autumnalis* where the protocorms died were the treatments with the proportions 80:20 and 100: 0 of NH_4^+ : NO_3^- in the three levels of N and for *L. speciosa* were the proportions NH_4^+ : NO_3^- 60:40 , 80:20 and 100:0 in the three levels of N. The development and growth of *L. autumnalis* and *L. speciosa* is favored in concentrations of N 18.3 and 36.6 mM, supplied in combination of NH_4^+ and NO_3^- (20: 80, 40:60) *in vitro* culture.

Key words: *L. autumnalis, L. speciosa*, orchids, nitrogen, fertilizers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de la Familia Orchidaceae

Son plantas herbáceas con una estructura básica similar a la de muchas otras monocotiledóneas; son perennes, epífitas o terrestres, a veces trepadoras, raramente subacuáticas, algunas veces saprófitas; tienen hábito de crecimiento monopodial (con inflorescencias laterales y crecimiento apical continuo) o simpodial (con crecimiento lateral sobre la superficie) (García-Cruz y Sosa, 1998), tallo con frecuencia modificado a modo de pseudobulbo (órgano caulinar engrosado) aéreo en las especies terrestres; hojas radicales o caulinas, ausentes o reducidas en las saprofitas y ausentes en muchas de las terrestres en la época de floración), por lo común envainantes en la base (Rzedowski, 1990).

Las flores de las orquídeas difieren de las otras angiospermas por sus flores muy atractivas con gran variación de tamaño, color y textura. Tres sépalos y tres pétalos, pero uno de ellos es diferente a los otros dos y se le llama labelo (Díaz-Toribio *et al*., 2013); son solitarias o dispuestas en racimos, espigas o panículas, laterales (originándose sobre un vástago independiente al lado de hojas o pseudobulbos) o terminales, zigomorfa, en ocasiones resupinada (labelo situado en la parte inferior de la flor, debido a un giro de 180°), por lo general hermafrodita (Rzedowski, 1990).

Tienen ovario ínfero, 1 ó 3 locular, los estambres y el estilo se presentan consolidados en una columna carnosa (ginostemo) con 1 ó 2 anteras en la parte terminal de la columna; los lóbulos estigmáticos son 3, 2 de ellos comúnmente confluentes y fértiles, el tercero modificado en una estructura llamada “rostelo”; antera situada bajo el rostelo, el polen generalmente aglutinado en 2, 4, 6 u 8 masas o “polinios”. El fruto por lo general es capsular, abriéndose por 1, 2, 3 ó 6 valvas longitudinales que se conservan unidas apicalmente (Rzedowski, 1990). La mayoría de las orquídeas son monandras, tienen una sola antera y suelen tener cerca de la punta del ginostermo lo que representa una fusión de la antera, el estigma y el estilo donde tiene un disco pegajoso o gancho para adherirse al organismo polinizador (Arditti, 2002).

Las semillas de las orquídeas son muy simples, constituidas por un embrión esférico suspendido dentro de una cubierta membranosa, casi siempre transparente, la testa o cubierta formada por una o dos capas de células, carecen de endospermo y cotiledones (Menchaca y Moreno, 2011), son muy pequeñas, extremadamente ligeras con una longitud de 0.05 – 6.0 mm. La testa es generalmente transparente; las células de la pared exterior pueden ser suaves o reticuladas. El número de semillas es hasta de 4.000.000 por fruto (Arditti, 2000).

1.2. Importancia comercial de las orquídeas

1.2.1. En el mundo

Las orquídeas se encuentran entre las plantas ornamentales más apreciadas y comercialmente valiosas (Colombo *et al*., 2004; Roberts *et al.*, 2008), es un negocio internacional que representa alrededor del 8% del mercado mundial de plantas ornamentales y tiene el potencial de alterar la economía de un país (Chugh *et al*., 2009). Son potencialmente comerciales como plantas y como flores de corte, a tal grado que su valor y mercadeo se ha incrementado notablemente (Ammirato *et al*., 1990); son una de las plantas decorativas más llamativas de todo el mundo. Son altamente valoradas en los mercados nacionales e internacionales debido a sus flores duraderas y hermosas.

La familia Orchidaceae representa el 7% del total de las especies de plantas con flores que figuran como uno de los productos ornamentales más caros conocidos hoy en día y dominan el comercio internacional de flores de corte (Rahman *et al.*, 2005). La orquidiocultura evolucionó hacia una actividad importante, pues representa una de las actividades económicamente más significativas (Teixeira de Silva, 2013).

1.2.2. En México

Las orquídeas son uno de los recursos florísticos con mayor riqueza de especies y elevado valor cultural y económico que han sido utilizadas desde tiempos precolombinos por varios grupos mesoamericanos para satisfacer necesidades sociales de importancia médica, ceremonial, alimenticia y como fuente de ingreso (Hernández, 1959; Sahagún, 1975; Flores-Palacios *et al.*, 2007). Características como la belleza de sus flores, lo enigmático de sus relaciones bióticas, la

adaptabilidad a los ambientes en donde crecen y los variados hábitos de crecimiento que presentan, hacen que éste sea uno de los grupos de plantas más apetecidos y fascinantes, situación que ha provocado su comercio intensivo y no controlado y su extracción inmisericorde e ilegal de sus ambientes naturales (Betacour *et al*., 2015).

Las orquídeas que son cultivadas por sus flores son: *Cypripedium* L., *Spiranthes* Rich., *Paphiopedilum* Pfitz., *Habenaria* Willd., *Liparis* Rich., *Epidendrum* Rich., *Govenia* Lindl., *Laelia* Lindl (Sánchez, 1978). Sin duda, las flores más admiradas son las del género *Laelia*, muy conocidas por su uso tradicional en las ofrendas de muertos y en otras fiestas como el día de las madres o el de la Virgen de Guadalupe (Ramírez, 2004). En general las flores del género *Laelia* también se utilizan como adorno en diversas festividades religiosas, es por ello que se les conoce como "flores sagradas".

La especie *L. autumnalis* en el Estado de México y Michoacán se les conoce como ahuaxuchitl, palabra de origen náhuatl que proviene de auatl que significa encino y xochitl que significa flor (Molina, 2004 y Simeón, 2004) traducido como flor de encino (Nava, 2008; Beltrán-Rodríguez *et al*., 2012). Actualmente, de forma general, a las orquídeas también se les conoce como tecolomeses, san miguelitos, flor de las animas, flor de todos los santos, flor de encino, flor de la calavera, lirio de San Francisco, gallitos y catarinas principalmente en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato, México, Morelos, Guerrero, Puebla, y la CDMX.

1.2.3. Distribución y abundancia

La familia Orchidaceae tiene una gran diversidad de especies en el planeta, se estima que existen entre 20,000 y 30,000 especies representadas por entre 600 y 800 géneros (Hágsater *et al*., 2005; Rzedowski y Calderón, 2005), son de las plantas más evolucionadas de las angiospermas, cosmopolitas con excepción de la Antártida, registrando una mayor diversidad en las regiones tropicales, son herbáceas perennes, hábitos de crecimiento variados y se separan en: epífitas, terrestres y litófitas (Cavero *et al*., 1991, Hágsater *et al*., 2005).

En México la familia incluye 168 géneros y 1 254 especies (Soto-Arenas *et al*., 2007), de las cuales 300 son de tipo endémico (Espejo-Serna *et al*., 1998b). La mayor parte de la diversidad de orquídeas se encuentra en los bosques húmedos y subhúmedos de las sierras y las tierras bajas del sur del país. Las regiones situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3,500 msnm, albergan la mayor riqueza de orquídeas. Aún las regiones más áridas, pueden albergar representantes de esta familia (Salazar, 2006; Uribe-Curiel, 2013).

Los géneros más importantes de orquídeas que se encuentran representados en México son: *Cattleya, Laelia, Epidendrum, Encyclia, Oncidium, Brassia, Sobralia, Stanhopea, Odontoglossum, Góngora, Lycaste*, entre otros (Navarro *et al*., 2001).

1.3. Características generales del género *Laelia* spp. Lindl.

El género *Laelia,* es un grupo característico de América, su distribución va desde México y las Antillas hasta Brasil (Rzedowski y Calderón, 2005). Son plantas herbáceas epifitas y a veces rupícolas; rizoma poco visible por el crecimiento de pseudobulbos, cilíndricos o ancipitados; hojas terminales en número variable; flores grandes, vistosas sobre un escapo largo, una, dos, o varias en racimo; sépalos libres, extendidos, subiguales; pétalos semejantes a los sépalos, labelo trilobado, ligeramente adnato a la columna, lóbulos laterales envolviendo a la columna, formando un disco liso o lamelado; columna corta o larga, con o sin alas; antera operculada, incumbente, con 2 lóculos, septados, y 8 polinios, 4 en cada lóculo, ovoides o comprimidos lateralmente y cerosos.

Este género incluye una de las orquídeas más bellas y es sobresaliente en la flora de nuestro país (Halbinger y Soto, 1997), en donde se reportan 12 especies: *Laelia albida, L. anceps* con dos subespecies, *anceps y dawsonii*, *L. aura*, *L. autumnalis, L. crawshayana, L. eyermaniana, L. furfuracea*, *L. gouldiana, L. halbingeriana, L. rubescens, L. speciosa* y *L. superbiens* (Salazar, 2006). Varias se cultivan y se han logrado cruzas artificiales con especies de géneros cercanos, aumentando su esplendor y belleza (Rzedowski, 1990).

Tradicionalmente las Laelias han sido cultivadas y apreciadas en el pueblo mexicano, especialmente por las distintas etnias indígenas, desde Chihuahua hasta Chiapas. Las plantas han sido utilizadas durante siglos en diferentes actividades, como ofrendas en las festividades del día de muertos, de ahí el origen de los nombres comunes de las especies: "calaverita", "lirio de todos los santos", "flor de muerto", "flor de las ánimas" entre otros nombres (Halbinger y Soto, 1997).

1.3.1. *Laelia autumnalis* (Llave & Lex.) Lindl. 1831

Clasificación taxonómica (Dressler, 1982)

Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Subtribu: Laeliinae
Alianza: Cattleya
Género: *Laelia* Lindl. 1831
Especie*:* *L. autumnalis* (Llave & Lex.) Lindl.

1.3.1.1. Descripción botánica (Halbinger y Soto, 1997).

Planta epífita de 20 a 40 cm de alto, con pseudobulbos cónico-ovoides de color verde oscuro de 4 a 11 cm de largo, hojas carnosas, largas y arqueadas, usualmente dos de color verde a menudo teñida de purpura, de 9-23 cm de largo y 1.6-3.8 cm de ancho, con una inflorescencia que surge del pseudobulbo maduro de 40-100 cm de largo de color verde con puntos morados de 4-13 flores (fig 2). Las flores son grandes y llamativas de 6.5-11 cm de diámetro, tépalos color lila oscuro, los ápices de los sépalos más oscuro, labios con los lóbulos laterales, blancas bañadas con lila magenta, lóbulo medio lila, un disco blanco a amarillo, con morado-violeta, rayas a lo largo de las venas (fig. 2). Ovario pediculado, subcilíndrico, concentrado hacia el ápice de color verde oliva y base más pálida de 35-46 x 3-4.5 mm. Su floración es de septiembre a noviembre, rara vez en diciembre.

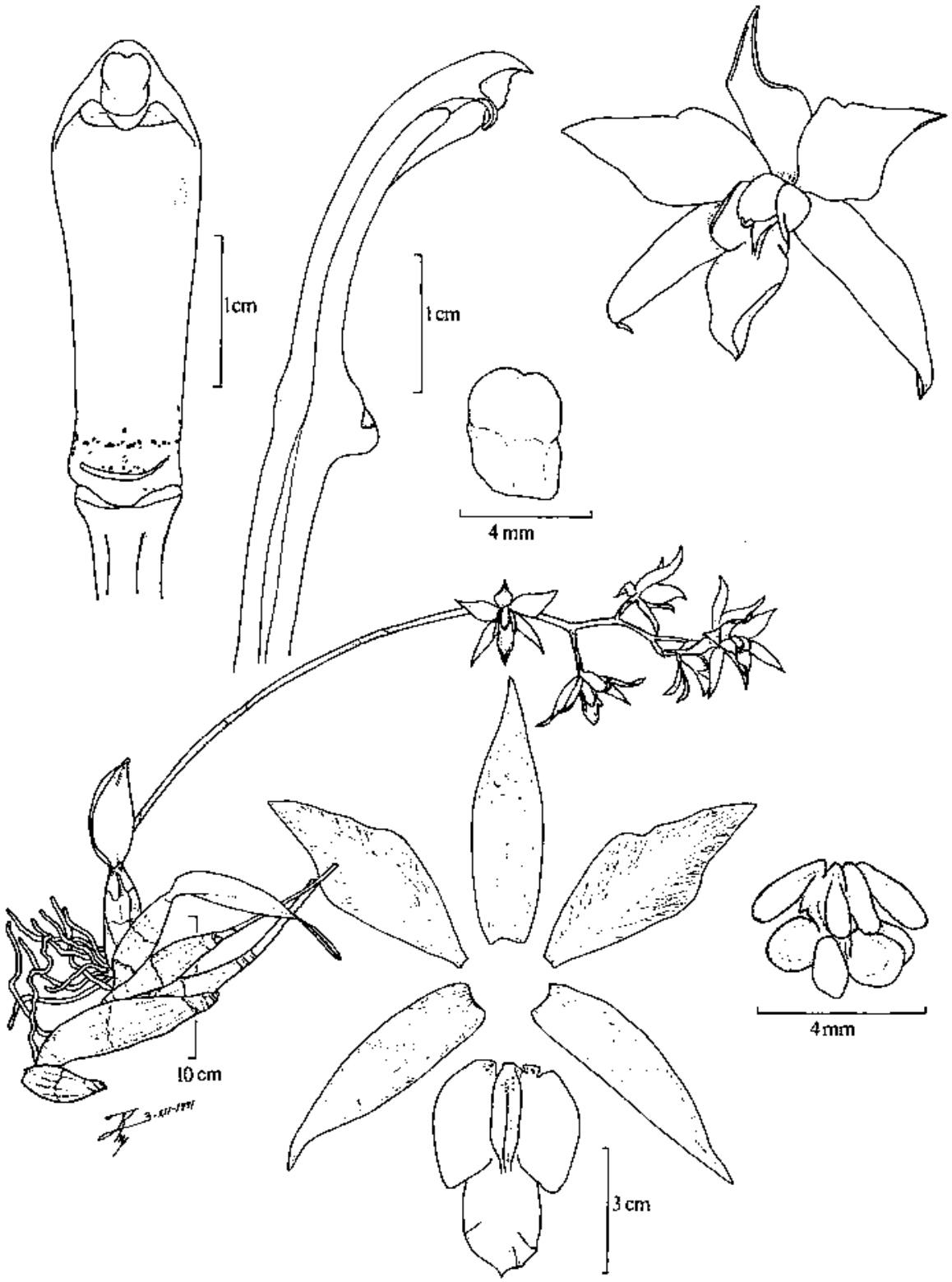

Figura 1.- ***Laelia autumnalis*** (Llave & Lex.) Lindl**.** Ha1binger, E. Pérez *100. Drawing by R. Jiménez.*

Figura 2.- Color y forma común de ***Laelia autumnalis*** (Llave & Lex.) (Lindl)**.**

1.3.1.2. Sinonimias y nombres comunes

Bletia autumnalis Llave & Lex., Nov. Vrg. Descr. Orch, Opusc. 19. 1825.
Cattleya autumnalis (Llave & Lex.) Beer, Prakt. Stud. Fam. Orch. 208. 1854.
En algunos estados como Michoacán, Puebla y el Estado de México se le conoce como "Flor de las ánimas", "Flor de todos los santos", "Flor de encino", "Flor de la calavera", "Lirio de San Francisco", "Gallitos" (Halbinger y Soto, 1997); tzacxóchitl y "Flor de Catarina (Martínez *et al.*, 2012).

1.3.1.3. Distribución y hábitat (Halbinger y Soto, 1997).

Es endémica del Eje Neovolcánico Transversal, orquídea típica de montaña del centro de México, ha sido recolectada en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Morelos, Guerrero, Puebla y el Distrito Federal.

Su hábitat son principalmente los encinos, rara vez en rocas, a una altitud de 1.400 a 2.700 msnm, ya sea en bosque de encino o bosque de pino-encino.

1.3.2. *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr. 1914

Clasificación taxonómica (Dressler, 1982)

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Género*:* *Laelia*

Especie*:* *L. speciosa* (H. B. K.) Schltr.

1.3.2.1. Descripción botánica (Halbinger y Soto, 1997).

Son plantas epífitas, perennes, de actividad xerófila; presentan un rizoma con crecimiento horizontal a ligeramente ascendente con relación al sustrato. Presentan pseudobulbos globosos a ovoides, verde claro, superficie rugosa cuanto están viejos, 3-6 cm de largo y 1.5-4 cm de grosor, estrechamente agrupados, con una hoja terminal, rígida, raramente dos por pseudobulbo, lanceoladas elípticas suculentas, verdes, en ocasiones teñido de purpura, ligeramente carnosas coriáceas. Amplexicaules en la base, de 7.5-16 cm de longitud y 23.5 cm de ancho (fig 3). La inflorescencia terminal producida en el brote en desarrollo, racimosa, 15-25 cm de largo, 1-2 raramente hasta 4 flores muy grandes y vistosas que miden de 10-16 cm de diámetro, muy abiertas con pétalos y sépalos del mismo tamaño, teñidos de color rosa o rosa púrpura, raramente son totalmente blancos (fig. 4), lanceolados, agudos, de 5.5-8.5 cm de largo por 1-2 cm de ancho; labelo blanco con los márgenes frecuentemente coloreados con manchas y rayas púrpura variables que van de lila claro hasta oscuro, trilobado de 4-7 cm de largo por 3.5-5 cm de ancho, lóbulos laterales oblongos, erectos, formando una garganta que rodea a la columna, con márgenes reflexos; pétalos elíptico-rómbicos, agudos o subagudos, con margen ligeramente irregular frecuentemente recurvados, de 6-9 mm de largo por 7-9 mm de ancho. Clinandrio con una protuberancia en el margen superior, antera ovoide subcuadrada, 8-1 locular, de 5-6 mm de largo. Polinario con 8 polinios lateralmente comprimidos, triangular, subcuadrado, unidos a caudículas granulosas. El rostelo está formado por una lámina transversal de 4 mm de ancho. Cavidad estigmática viscosa, brillante, de 5mm de largo. Capsula elipsoide, de 6 cm de largo y 2.5 cm de grosor. Las flores tienen una tenue fragancia, semejante a la de las violetas.

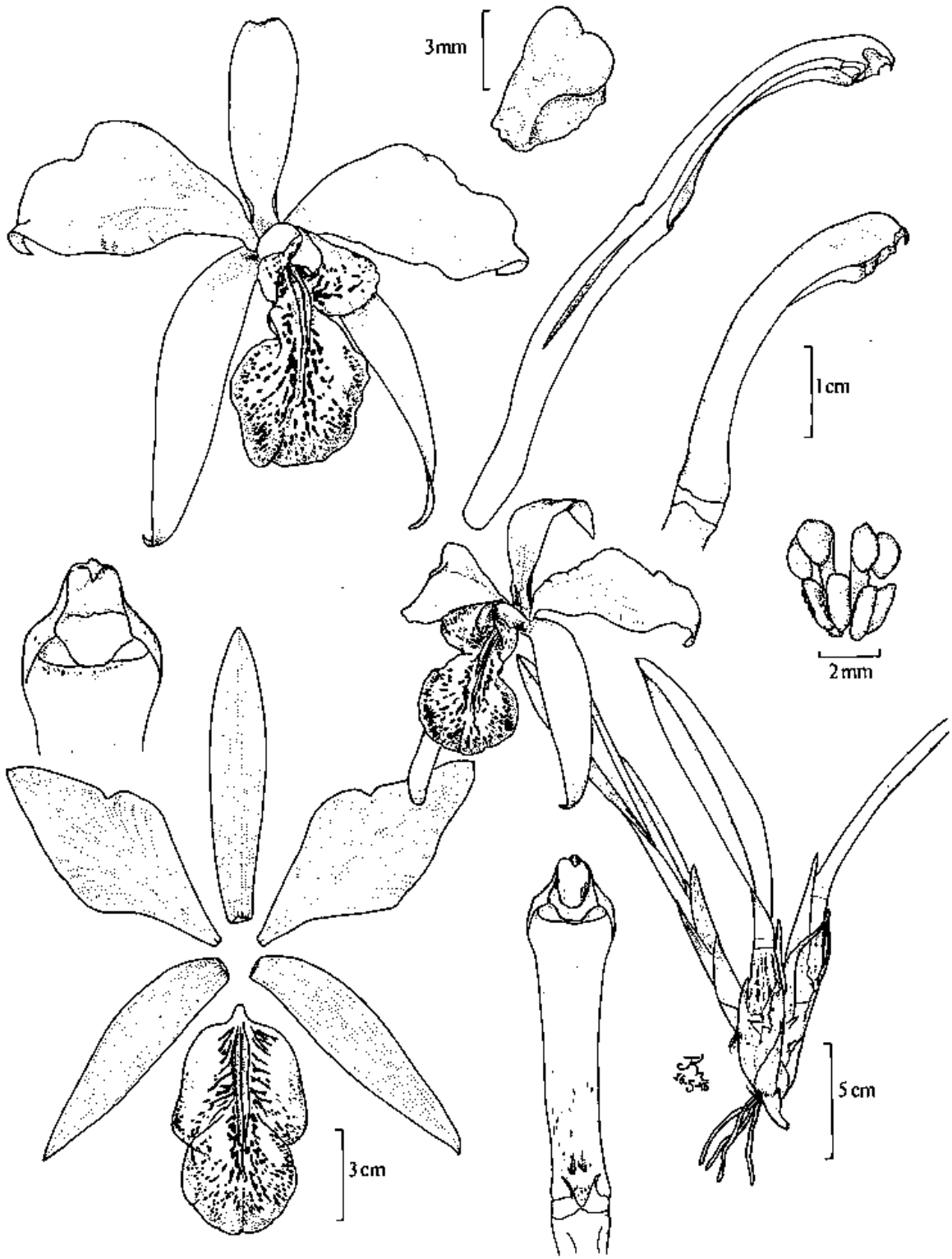

Figura 3.- ***Laelia speciosa*** (Kunth) Schltr. *M. Soto 5663. Drawing by R. Jiménez.*

Figura 4 - Color y forma común de ***Laelia speciosa*** (Kunth) Schltr.

1.3.2.2. Sinonimias y nombres comunes

Bletia speciosa H. B. K. 1816, *Bletia grandiflora* (Llave y Lex.) 1825, *Laelia grandiflora* (Llave y Lex.) Lindl. 1831, *Laelia grandiflora* var. *alba* Dimmock. 1901, *Cattleya grahamii* Lindl. 1831, *Laelia majalis* Lindl. 1840, *Cattleya majalis* (Lindl.) Beer. 1854, *Laelia majalis alba* Hort, 1906.

"Flor de mayo", "flor grande", "flor de corpus", "tlacuxóchitl", "deantza", "itzámahua" y "chichiltictepetzacuxóchitl".

1.3.2.3. Distribución y hábitat (Halbinger y Soto, 1997).

Su distribución geográfica se encuentra restringida a las serranías del Altiplano Central de México (Centro y Sur). No presenta una distribución continua, su distribución es la región lacustre de los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco; aunque se encuentra en un territorio muy extenso de México: Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas.

1.4. Problemática de las orquídeas

La degradación, transformación o destrucción de sus hábitats, hace que varias especies estén consideradas en peligro de extinción (Hágsater *et al*., 2005). Características como la belleza de sus flores, lo enigmático de sus relaciones bióticas, la adaptabilidad a los ambientes en donde crecen y los variados hábitos de crecimiento que presentan, hacen que éste sea uno de los grupos de plantas más apetecidos y fascinantes, situación que ha provocado su comercio intensivo y no controlado y su extracción inmisericorde e ilegal de sus ambientes naturales (Betacour *et al*., 2015).

Desafortunadamente derivado de los múltiples usos a que las orquídeas han sido sujetas en México, a partir de 1998 se han extinguido más de 20 especies de orquídeas (Hágsater *et al*., 2005), por ello están catalogadas como el segundo grupo de plantas con más especies protegidas (SEMARNAT, 2010)., éstas afrontan problemas de disminución de sus poblaciones naturales, por efectos del cambio climático, combinados con el mal manejo de los sistemas en hábitats únicos (Soto-Arenas *et al*., 2007), actividades agrícolas, sobrecolecta de sus poblaciones, deforestación, comercio ilegal, carencias en la legislación, política ambiental y la falta de esquemas para la participación de las comunidades en actividades de conservación (Menchaca y Moreno, 2011).

En algunas regiones de México se han desarrollado prácticas y técnicas de recolección para autoabasto y comercialización de orquídeas, especialmente aquellas con valor ornamental (Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007) o las utilizadas en ceremonias religiosas (Salazar-Rojas *et al*., 2007). Las orquídeas presentan factores intrínsecos que limitan su propagación sexual y la variación genética que en ellas se puede presentar. Estos factores están relacionados con el pequeño tamaño de las semillas y sus escasas reservas alimenticias, que las lleva a establecer asociaciones simbióticas principalmente con micorrizas para lograr su germinación, que, en condiciones naturales, puede llegar a ser sólo de un 2-3% (Luan *et al*., 2006).

Como consecuencia de su falta de endospermo (Rasmussen, 2002) y el almacenamiento de sólo cantidades marginales de carbono (C) como reservas dentro del embrión (Manning & van

Staden, 1987), las semillas de orquídeas son dependientes para su germinación y establecimiento del carbono y nutrientes suministrado por los hongos. Este tipo de suministro de carbono y la ganancia de nutrientes de los hongos en la fase temprana de la plántula (protocórmica) se llama miocereterotrofÍa inicial (Leake, 1994; Merckx, 2013).

Los protocormos de las orquídeas terrestres son a menudo extremadamente lentos para desarrollarse en la naturaleza; puede tardar años hasta que las plántulas produzcan por primera vez una hoja fotosintética sobre la superficie del suelo (Rasmussen y Whigham, 1993, 1998; Leake, 1994; Smith & Read, 2008).

Este es el caso de algunas especies del género *Laelia* en México, particularmente de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) y *L. speciosa* (H. B. K.). Estas especies son importantes tanto en el aspecto económico como culturalmente (Martínez-Rivera *et al.,* 2009; Martínez-Rivera *et al*., 2010). Estas especies presentan demandas nutricionales específicas, sin embargo, la mayoría de los productores utilizan los abonos convencionales disponibles en el mercado, desarrollados para atender a los cultivos de producción de alimentos (Takane *et al.,* 2010).

1.5. Cultivo *in vitro* de plantas de orquídea

Las técnicas *in vitro* son una herramienta útil en estudios de fisiología, ya que permite conocer la respuesta a modificaciones de sales minerales del medio en etapas de desarrollo temprano (Rehfeldt, 1984), además de ser usado como su medio básico *in vitro*, desarrollado exprofeso para la especie en estudio (Pedroza-Manrique *et al*., 2010).

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin agua y nutrientes minerales no habría desarrollo de plantas *in vitro*. Sin embargo, para el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos es necesario, además, adicionar una fuente de carbono. La sacarosa es la más comúnmente empleada, pues remplaza al carbono que normalmente las plantas fijan desde la atmósfera al realizar fotosíntesis (George y de Klerk, 2008), la cual en condiciones *in vitro* se suspende o se ve reducida, debido a que los tejidos tienen una nutrición heterótrofa (Smith *et al*, 1986)

Las técnicas *in vitro* se han desarrollado sólo para unas cuantas plantas, principalmente ornamentales, hortícolas, frutales, forestales y algunas en riesgo de extinción (Salgado-Garciglia *et al*. 1997); por lo que existe la necesidad de realizar estudios para su producción suministrando las condiciones óptimas y los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las orquídeas.

La fertilización nitrogenada es una práctica imprescindible para el cultivo de orquídeas, pero poco se sabe en cuanto a las proporciones ideales de nitrato y amonio que deben ser suministradas, aunque hay resultados preliminares reportados por Britto y Kronzucker (2002), así como, por Li *et al.,* (2013).

En investigaciones hechas en mini-*Cymbidium* el N promovió el crecimiento de brotes vegetativos, pero redujo el número de escapos por brote (Bik y Van den Berg, 1984); para *Phalaenopsis* la adición de 200 mg L^{-1} de N, 160 mg L^{-1} de K y 22 mg L^{-1} de P son adecuados para un excelente crecimiento vegetativo. La necesidad de aplicar fertilizantes con un alto contenido de N cuando se cultiva esta orquídea en corteza de abeto de Douglas puede deberse a la baja retención de nutrientes de este material (Wang y Konow, 2002).

En estudio con plantas de *Salvinia cucullata* bajo concentraciones de amonio, Jampeetong *et al.,* (2012) observaron que concentraciones superiores a 5 mmol L^{-1} de NH_4^+ indujeron la aparición de clorosis en las hojas más viejas, asociadas a menores contenidos de clorofila, carotenoides y de K, disminuyendo el crecimiento de la raíz y de la parte aérea.

En estudios con proporciones de N nítrico y amoniacal en la nutrición de plantas de girasol, se constató que las plantas cultivadas con la mayor proporción de NH_4^+ presentaron una reducción en el contenido de clorofila, en la longitud y el volumen de raíz y en la materia seca, en las plantas que fueron cultivadas con mayor proporción de nitrato (Silva *et al.* 2010).

El efecto del NH_4^+ y NO_3^- a pH constante fue evaluado en embriones de orquídeas. Ambos iones fueron usados por estos, el NO_3^- fue superior para *Cymbidium*, significativamente mejor para

Cattleya e inferior para *Vanda* (Curtis *et* a*l.*, 1949). El contenido de N en hojas maduras de *Cymbidium* fue mayor en plantas fertilizadas con $(NH_4)_2SO_4$ comparada con las que recibieron $Ca(NO_3)_2$, pero no hubo diferencia en el crecimiento (Lunt y Kolfranek, 1961).

Plantas de *Cattleya* que fueron fertilizadas semanalmente con NH_4^+, presentaron mayor peso fresco y área foliar de nuevos brotes, así como mayor peso de materia seca de raíz que las plantas fertilizadas con NO_3^-. Plantas fertilizadas de manera similar, a intervalos de dos o tres semanas no mostraron diferencias en el crecimiento entre las dos fuentes de N. Sin embargo, las plantas que recibieron NH_4^+ a intervalos de tres semanas mostraron mayor clorosis en hojas después de 10 meses de cultivo comparadas con las plantas que fueron fertilizadas con NO_3^-. Esta clorosis se debe, probablemente, a que el NH_4^+ provocó una deficiencia de K^+, como resultado de un antagonismo entre los dos iones y una fertilización menos frecuente (Poole, 1971).

1.6. Nutrición mineral de las orquídeas bajo condiciones *in vitro*

Las necesidades nutrimentales de los vegetales dependen de factores como: especie, variedad, etapa fenológica (Steiner, 1973, 1984, Carpena *et al*., 1987) y ambiente físico en que se desarrolla la planta, el cual afecta la tasa de absorción y la distribución de nutrimentos dentro de la misma, además de la tasa de crecimiento (Adams, 1999).

La composición de un medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* varía con la especie, e incluso es específica de acuerdo con la parte de la planta que se quiera cultivar o a la respuesta que se desee obtener (Ramage *et al.*, 2002). La formulación del medio de cultivo es esencial para el desarrollo del explante, por lo que la presencia de componentes necesarios (minerales, vitaminas y reguladores del crecimiento) estimula la proliferación, el enraizamiento y el crecimiento (Faria *et al*., 2002). La acumulación y la distribución de los nutrientes minerales en la planta dependen de su estadio de desarrollo (Marschner, 2012). Por otro lado, variaciones en los factores ambientales, como temperatura y humedad, y tipo de sustrato influyen tanto en la disponibilidad de los nutrientes como en la absorción de éstos por las raíces y, consecuentemente, en el crecimiento de la planta.

Como se conoce, los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Por ejemplo: el magnesio es parte de la molécula de clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el hierro, zinc y molibdeno son parte de ciertas enzimas. Además del carbono, oxígeno e hidrógeno se conocen otros 14 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, iones de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, azufre, hierro, níquel, cloro, manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno. Los seis primeros se requieren en mayores concentraciones y se les conoce como macroelementos, los ocho últimos son demandados en concentraciones más bajas y se les denomina microelementos (George *et al.*, 2008).

Sumado a lo anterior, el funcionamiento normal del organismo vegetal ocurre con una determinada relación de cationes y aniones en el medio nutritivo; el crecimiento de los órganos aéreos de las plantas y el desarrollo del sistema radical dependen del equilibrio fisiológico de la solución nutritiva (Yágodin, 1986). En este sentido, las características de la solución nutritiva que más influencia tienen en el crecimiento, rendimiento y en la calidad de los productos vegetales de interés antropogénico son: la relación mutua de cationes ($K^+ + Ca^{2+} + Mg^{2+}$) la relación mutua de aniones ($NO_3^- + H_2PO_4^- + SO^{2-}$), la concentración total de iones y el pH, por lo que cuando se aplica la solución nutritiva en forma continua, las plantas pueden absorber iones a muy bajas concentraciones. Sin embargo, es probable que, a una concentración demasiado baja, la demanda mínima de determinados nutrientes no sea cubierta. En el otro extremo de concentración, el consumo excesivo puede conducir a efectos tóxicos. (Steiner, 1961).

Es evidente la necesidad de investigaciones para atender las necesidades nutricionales de las orquídeas especialmente de nitrógeno, el cual es un nutriente esencial para las plantas y, al limitarlo, puede reducir el crecimiento y la productividad de los cultivos (Glass, 2005; Piwpuan *et al*., 2013), siendo variable con las especies (Horchani *et al.,* 2011) y con los genotipos (Cruz *et al*., 2011). El punto de discusión es la existencia de concentraciones óptimas de nitrógeno en medio de cultivo para las orquídeas, bajo particulares condiciones *in vitro*, o si sus proporciones relativas y no sus concentraciones absolutas son los factores determinantes.

1.7. Importancia del Nitrógeno en las orquídeas

El Nitrógeno (N) es el elemento mineral más abundante en el tejido de las plantas y necesario para su crecimiento y desarrollo (Salisbury *et al*., 1994). Bonomelli (2005) estimó que las plantas contienen un promedio de 1.8 – 2.8 % en N de su peso seco, lo cual refleja la importancia de los compuestos nitrogenados en la estructura y metabolismo de la planta, es considerado como un factor limitante para la producción de biomasa en ecosistemas naturales, es el principal elemento esencial asociado al crecimiento de la planta (Miller 2004). En el suelo se presenta como iones de NH_4^+ y NO_3^-, formas que son capaces de absorber la mayoría de las plantas (Schortemeyer, 1993; Srivastava, 1999; Tischner, 2000). Posteriormente es asimilado en compuestos como aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos necesarios para la producción de biomasa, por lo que debe mantenerse un abastecimiento adecuado de este nutriente para que una planta crezca y se desarrolle satisfactoriamente.

El nitrato y el amonio son las principales fuentes de nitrógeno para plantas. Mientras que la absorción y asimilación de nitrato está fuertemente controlado, el amonio cuando está presente en exceso, es perjudicial para muchas especies de plantas. Sin embargo, las plantas se benefician de una mezcla de NO_3^- y NH_4^+, aunque la relación óptima y la concentración de N varía dependiendo de la especie, edad de la planta y pH del medio de crecimiento (Miller y Cramer, 2004).

1.8. Fuentes de Nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-)

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sólo dos formas inorgánicas de nitrógeno - amonio y nitrato - son absorbidas por organismos para la generación de nueva biomasa (Bernhard, 2010). Las plantas asimilan amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) de la solución del suelo y estas dos formas inorgánicas son sus fuentes de nitrógeno más importantes (Miller y Cramer, 2005). Aproximadamente cuatro quintas partes del total de cationes y aniones absorbidos por las plantas son NH_4^+ o NO_3^-. La captación excesiva de cationes o aniones podría ocurrir debido a las diferencias en la disponibilidad de N y los requerimientos de las plantas (Kirkby y Knight, 1977; Jampeetong *et al*., 2013).

Por lo tanto, la nutrición N tiene un fuerte efecto sobre el balance de catión-anión en las plantas y sobre la regulación del pH en las células, así como el pH de la rizósfera (Marschner, 1995; Torres-Olivar *et al*., 2014). Es difícil que el NH_4^+ se desprenda del suelo, ya que puede adsorberse a las cargas superficiales negativas de las partículas de arcilla del suelo. En comparación, el NO_3^- cargado negativamente es repelido por las cargas negativas del suelo y es fácilmente lixiviado (Owen y Jones, 2001; Britto y Kronzucker, 2013; Nacry *et al*., 2013). La asimilación de N en la forma de NH_4^+ por las plantas requiere menor consumo de energía, debido a su incorporación directa en la cadena de carbono, sin la necesidad de las fases de reducción por la acción enzimática, con gasto de energía, como ocurre para el NO_3^- (Bittsánszky *et al*., 2015), pudiendo incrementar la eficiencia de uso del mismo (Sarasketa *et al*., 2014).

La absorción de N en la forma amoniacal puede tener como ventaja el hecho de que el N esté en forma reducida; Sin embargo, el flujo de amonio es de difícil control, debido a la necesidad de la homeostasis celular del elemento, pudiendo inducir toxicidad a las plantas (Bittsánszky *et al*., 2015). En este sentido, la mayoría de las plantas superiores desarrollan síntomas de toxicidad, cuando se cultivan sólo con amonio, pudiendo ocasionar la muerte de los vegetales (Horchani *et al.,* 2011). Sin embargo, las respuestas que las plantas presentan cuando absorben N amoniacal o nítrico son muy amplias, aunque sean de la misma especie, de manera que hay diferencias entre variedades en cuanto al desarrollo bajo aplicación de amonio y de nitrato (Cruz *et al*., 2011, Huang *et al*., 2013), por lo que las especies de plantas pueden ser tolerantes o no al exceso de amonio en el medio de cultivo, de modo que el efecto tóxico de esta forma de N influye en el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Cruz *et al*., 2011).

La relación amonio y nitrato influyen en el metabolismo del nitrógeno y la absorción de nutrientes (Helali *et al*, 2010), la síntesis de hormonas (Li *et al*., 2014) y la fotosíntesis (Bittsánszky *et al*., 2015), lo que se refleja en la producción de materia seca de las plantas, sin embargo las plantas se benefician de una mezcla de NO_3^- y NH_4^+, aunque la relación óptima y la concentración de N varía dependiendo de la especie, edad de la planta y pH del medio de crecimiento (Miller y Cramer, 2004).

La absorción y asimilación del amonio por las plantas requiere menos energía que la absorción y asimilación del nitrato, lo que lleva a la propuesta de que, de los dos, el amonio puede ser la fuente de nitrógeno más eficiente y ventajosa. Sin embargo, se ha demostrado que el crecimiento y desarrollo de las plantas de cultivo cultivadas sin suelo pueden ser más dependientes del nitrato que el amonio. También está claro que la disponibilidad relativa de las dos formas de nitrógeno difiere entre ambientes (Britto *et al.*, 2001a, b), haciendo que la fuente de nitrógeno sea una consideración importante en la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo, a pesar de la importancia del suministro de N para las plantas, todavía existen dudas sobre la relación óptima de amonio y nitrato en el medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo de las orquídeas *L. speciosa y L. autumnalis.*

Las especies de orquídeas presentan demandas nutricionales específicas, sin embargo, la mayoría de los productores utilizan los abonos convencionales disponibles en el mercado, desarrollados para atender a los cultivos de producción de alimentos (Takane, *et al.,* 2010).

La fertilización nitrogenada es una práctica imprescindible para el cultivo de orquídeas, pero poco se sabe en cuanto a las proporciones ideales de nitrato y amonio que deben ser suministradas. No existe recomendación de la proporción ideal de nitrato y amonio durante el ciclo total de producción de orquídeas hasta la floración, sólo los resultados de experimentos en períodos restringidos de crecimiento para *Dendrobium Sonia* 'Ear Sakul' (Ruamrungsri *et al*., 2014) *Phalaenopsis* (Wang , 2008) y *Cymbidium* (Pienaar, Combrink, 2007). Sin embargo, a pesar de la importancia del suministro de N para las plantas, todavía existen dudas sobre la relación óptima de amonio y nitrato en el medio de cultivo.

Frente a lo expuesto, el objetivo con este trabajo fue evaluar la respuesta de las orquídeas epífitas *Laelia autumnalis* y *L. speciosa* en función de la aplicación de nitrógeno en diferentes concentraciones y determinar la mejor proporción de nitrato y amonio en el cultivo de orquídeas de importancia económica durante la fase de crecimiento y desarrollo bajo condiciones *in vitro* utilizando el medio ER (Arditti y Ernst, 1984) como base para la elaboración de los tratamientos.

Se determinó utilizar el medio ER como base debido a que Duran-Mendoza (2005) evaluó el desarrollo de plantas de *Laelia albida* y *L. autumnalis* en los medios ER, KC-C, MS 100%, MS 50% y MS 25% obteniendo el mejor desarrollo de plántulas bajo condiciones *in vitro* en el medio ER, reportando un desarrollo foliar grande cuando hay un exceso de amonio y un desarrollo radicular mínimo.

Estos estudios sobre la relación óptima de amonio y nitrato pueden contribuir a la mejora en el crecimiento y desarrollo de plántulas de orquídeas y disminuir el tiempo de cultivo de las mismas.

2. HIPÓTESIS

El desarrollo y crecimiento de *Laelia autumnalis y L. speciosa* se favorece en altas concentraciones de N (36.6mM), suministrado en una combinación de las formas NH_4^+ y NO_3^- (40:60 y 20:80) en cultivo *in vitro.*

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de tres concentraciones de Nitrógeno y seis diferentes proporciones de NH_4^+ y NO_3^- sobre el desarrollo *In Vitro* de plántulas de *L. speciosa* (Kunth) Schltr y *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de tres concentraciones de N (9.2, 18.3 y 36.6 mM) y de seis proporciones amonio-nitrato (0 : 100, 20 : 80, 40 : 60, 60 :40, 80 : 20 y 100 :0) y su interacción en el medio de cultivo *in vitro* sobre el crecimiento de plántulas de *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. y *L. speciosa* (Kunth) Schltr.

- Determinar el porcentaje de N total en parte aérea y raíz de *L. speciosa* (Kunth) Schltr y *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl bajo tres concentraciones de N (9.2, 18.3 y 36.6 mM) y las formas NH_4^+ y NO_3^- en seis proporciones (0 : 100, 20 : 80, 40 : 60, 60 : 40, 80 : 20 y 100 : 0 respectivamente) bajo condiciones *in vitro.*

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material biológico

Las semillas de *Laelia speciosa y L. autumnalis* fueron colectadas en poblaciones silvestres alrededor de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Las semillas de ambas especies fueron germinadas en medio ER (Arditti y Ernst, 1984), combinando previamente las semillas de siete capsulas de diferentes plantas.

Los protocormos de *L. speciosa y L. autumnalis* utilizados para la realización del proyecto se obtuvieron en el Laboratorio de Biotecnología y Genética del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) a partir de las semillas colectadas.

4.2. Lavado general del material de cristalería

4.2.1. Descripción del procedimiento de lavado propuesto por Obregón R., (2015).

1 Enjuagar todo el material con abundante agua de la llave antes de usar detergente.
2 Introducir el material en una tina y lavarlo con detergente biodegradable al 5% frotando con un escobillón adecuado para cada elemento.
3 Enjuagar con abundante agua de la llave hasta asegurarse de haber eliminado toda traza de detergente. Dejar escurrir.
4 Enjuagar con abundante agua destilada.
5 Escurrir en un recipiente adecuado y proteger con papel kraft las superficies.
6 Secar el material a temperatura ambiente o en estufa.
7 Guardar el material seco en el lugar definido que sea un sitio libre de polvo. Proteger el material de la contaminación tapando con papel kraft la boca y los orificios de cada elemento en forma individual, ajustando el papel con bandas de caucho.

4.2.2. Lavado de material con tratamiento especial

- **Material utilizado para determinar amonio, nitratos o nitritos**

  Realizar el lavado general y luego del enjuague con agua de la llave, sumergirlo en un baño de ácido sulfúrico (H_2SO_4), al 1 % por 30 minutos, para luego enjuagar con agua destilada, secar y guardar.

4.3. Preparación de medio ER para la germinación de semillas de orquídeas.

Para la preparación de 1000 ml de medio de cultivo ER se disolvieron en 500 ml de agua destilada las sales minerales que lo componen (ANEXO 2) se le adicionaron 20 g de sacarosa y se aforó con agua destilada al volumen requerido (1000 ml); con un pH-metro (FisherScientific) se ajustó el pH a 5.2 con Hidróxido de Potasio (KOH) y/o Ácido Clorhídrico (HCl) 1.0, 0.5 ó 0.1 N. Finalmente se adicionaron 8 g de agar agar (Sigma) a la solución nutritiva. El medio resultante se esterilizó en una autoclave (Felisa) a una presión de 1.5 kg/cm^2 durante 15 minutos. Posteriormente, en una campana de flujo laminar (Veco) previamente esterilizada se vertieron 30 ml del medio de cultivo ER sin gelificar en cajas de Petri estériles de 100 x 156 mm.

4.4. Esterilización y siembra de las semillas colectadas.

4.4.1. Esterilización de semillas por el método de “paquete”.

Se tomaron varias muestras de las semillas con una espátula y cada una fue colocada en un cuadro de papel filtro previamente cortado de 4 x 4 cm y posteriormente doblado en cuatro y engrapándolo. Los paquetes de papel filtro con las semillas dentro fueron colocados en solución de Hipoclorito de Calcio al 3.5% (250 ml) adicionándole dos gotas de Tween 20. La solución de Hipoclorito de Calcio con los paquetes fueron colocados en un agitador magnético (Fisher Scientific) a 300 rpm durante 30 minutos. Transcurrido los 30 minutos los paquetes de semillas en papel filtro fueron sacados de la solución de Hipoclorito de Calcio y se colocaron dentro de una campana de flujo laminar previamente esterilizado y se pasaron por tres frascos con agua destilada previamente esterilizada en una autoclave a una presión de 1.5 kg/cm^2 durante 15

minutos para su enjuague. Los paquetes se colocaron dentro de una caja de Petri de cristal y se abrieron con ayuda de un bisturí y una espátula (todo el material previamente esterilizado a una presión de 1.5 kg/cm^2 durante 15 minutos). Se tomó una muestra de las semillas con una espátula y se sembraron en cajas Petri con 30 ml de medio de cultivo ER previamente esterilizado. Este procedimiento se llevó a cabo para ambas especies (*L. speciosa y L. autumnalis).*

Los protocormos resultantes de la siembra de semillas de *L. speciosa y L. autumnalis* fueron utilizados para el establecimiento de los dos ensayos a evaluar.

4.5. Preparación de los medios de cultivo a utilizar para la evaluación del crecimiento y desarrollo de plántulas *in vitro*.

En este ensayo se evaluaron dos factores: 1) concentración de N en el medio de cultivo y 2) proporción de NH_4^+ : NO_3^- en el medio de cultivo (Anexo 1). El primer factor se integró de tres niveles de concentración de N: 36.6, 18.3 y 9.2 mM. El segundo factor constó de seis niveles, representando seis diferentes proporciones de los iones NH_4^+ : NO_3^- en el medio de cultivo: 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 respectivamente. La combinación de estos factores originó 18 tratamientos, cada uno de los cuales fue repetido cinco veces generando de esta manera 90 unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo conformada por 10 frascos, los cuales contuvieron 5 protocormos cada uno, arrojando un total de 50 protocormos por unidad experimental. Las unidades experimentales se distribuyeron completamente al azar. Lo descrito anteriormente se llevó a cabo tanto para *L. speciosa* como para *L. autumnalis*.

Para la elaboración de las soluciones nutritivas se tomó como base el medio ER (Arditti y Ernst, 1984) (Anexo 2), eliminando Nitrato de Amonio y agregando sulfato de potasio, sulfato de calcio y sulfato de magnesio (Anexo 4). Las 18 soluciones nutritivas estuvieron formuladas con un total de 41.10 Meq L^{-1} (Anexo 3) y micronutrientes del medio de cultivo MS al 10% (Murashige y Skoog 1962) (Anexo 5), al cual se le adicionaron 30 g L^{-1} de sacarosa y se aforó con agua destilada al volumen requerido (1000 ml); el pH se ajustó con un pH-metro a 5.2 con Hidróxido de Potasio (KOH) y/o Ácido Clorhídrico (HCl) 1.0, 0.5 ó 0.1 Normal. Finalmente se adicionaron 8 g L^{-1} de agar a la solución nutritiva. Una vez diluido el agar con la solución nutritiva,

el medio resultante se esterilizó en una autoclave a una presión de 1.5 kg/cm^2 durante 15 minutos. Posteriormente, en una campana de flujo laminar se vertieron 30 ml de medio de cultivo previamente esterilizado sin gelificar de los 18 diferentes tratamientos en frascos de 170 ml. Este procedimiento se realizó para ambas especies (*L. speciosa* y *L. autumnalis).*

4.6. Crecimiento y desarrollo de plántulas *in vitro*

Se colocaron 5 protocormos de cada una de las dos especies en frascos con los 18 medios de cultivo de las respectivas proporciones NH_4^+ : NO_3^- y diferentes concentraciones de N, dichos protocormos se colocaron en círculo, aproximadamente a 10 mm de la pared del frasco. Todos los tratamientos fueron incubados en un cuarto de cultivo con condiciones controladas, a una temperatura de 27ºC y fotoperiodo de 16 h luz (1500 lux) y 8 hrs oscuridad.

4.7. Muestreos

Después de establecidos los tratamientos se realizó el muestreo a los 270 días para evaluar el desarrollo de las plántulas con los diferentes tratamientos. Las variables evaluadas en cada uno de los muestreos fueron: peso fresco y peso seco de la parte aérea y la raíz, longitud de raíz, altura de parte aérea, número de hojas, número de raíces, número de brotes, número de cuerpos parecidos a protocormos o PLB´s (protocorm like bodies), número de bulbos y nitrógeno total. Cada muestreo constó de 25-30 plantas por tratamiento. La determinación del contenido de nitrógeno total se realizó en parte aérea y en raíz mediante el método de Dumas en un analizador elemental de N, moliendo previamente la parte aérea y la raíz en mortero con ayuda del pistilo y posteriormente pesando 10 mg de muestra molida para colocar en el analizador elemental de N.

4.8. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STADISTICA versión 10.0 para Windows, con el cual se realizaron análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y la prueba de medias TUKEY con una $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación del efecto de tres concentraciones de N y seis proporciones de las formas NH_4^+ y NO_3^- y su interacción sobre variables de crecimiento en plántulas de *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. bajo condiciones *in vitro.*

5.1.1. Número de raíces

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 1). Las plantas con concentraciones altas en N (36.6 mM) y con la proporción NH_4^+:NO_3^- (40:60) presentaron el mayor número de raíces a comparación de los 11 tratamientos restantes. El número de raíces aumenta a medida que se incrementa la concentración de N, presentando en las tres concentraciones (9.2, 18.3 y 36.6 mM de N) la mayor cantidad de raíces en la proporción de NH_4^+:NO_3^- (40:60).

Cuadro 1: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de raíces de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		NÚMERO DE RAÍCES		
Nivel de Nitrógeno (N)		***		
9.2 mM		5.25	b	
18.3 mM		6.14	b	
36.6 mM		9.39	a	
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***		
0:100		5.27		c
20:80		7.73	b	
40:60		9.06	a	
60:40		5.42		c
N x P		***		
9.2 mM	0:100	4.17		c
	20:80	6.03	b	c
	40:60	5.60		c
	60:40	5.20		c
18.3 mM	0:100	5.50		c
	20:80	5.93		c
	40:60	8.57	b	
	60:40	4.57		c
36.6 mM	0:100	6.32	b	c
	20:80	11.23	a	
	40:60	13.00	a	
	60:40	6.50	b	c

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.2. Número de hojas

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 2). Las plantas con concentraciones altas en N (36.6 mM) y con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80 y 40:60) presentaron el mayor número de hojas a comparación de los 10 tratamientos restantes. Las proporciones altas en las formas NH_4^+ y NO_3^- presentaron la menor cantidad de hojas, mientras que las proporciones intermedias presentaron la mayor cantidad de hojas bajo las tres concentraciones de N.

Cuadro 2: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de hojas de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**NÚMERO DE HOJAS**					
Nivel de Nitrógeno (N)		***					
9.2 mM		12.89			b		
18.3 mM		14.09			b		
36.6 mM		22.96		a			
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***					
0:100		13.92			b		
20:80		19.82		a			
40:60		19.81		a			
60:40		12.53			b		
N x P		***					
9.2 mM	0:100	11.37					e
	20:80	16.80			b	c d	
	40:60	12.57				d	e
	60:40	10.83					e
18.3 mM	0:100	12.93				c d	e
	20:80	12.67				d	e
	40:60	19.37			b		
	60:40	11.40					e
36.6 mM	0:100	18.16			b	c	
	20:80	30.00		a			
	40:60	27.50		a			
	60:40	15.37			b	c d	e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.3. Número de pseudobulbos

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 3). Las plantas con la concentración 36.6 mM de N y en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentaron la mayor cantidad de pseudobulbos en comparación de los tratamientos restantes, a excepción del tratamiento 9.2 mM de N y NH_4^+:NO_3^- (20;80) con el cual estadísticamente no hay diferencia significativa.

Cuadro 3: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de pseudobulbos de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**NÚMERO DE PSEUDOBULBOS**					
Nivel de Nitrógeno (N)		*					
9.2 mM		0.72	a	b			
18.3 mM		0.59		b			
36.6 mM		0.81	a				
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***					
0:100		0.71		b			
20:80		1.22	a				
40:60		0.74		b			
60:40		0.14			c		
N x P		***					
9.2 mM	0:100	0.77			c		
	20:80	1.33	a	b			
	40:60	0.57			c	d	e
	60:40	0.20				d	e
18.3 mM	0:100	0.80		b	c		
	20:80	0.70			c	d	
	40:60	0.80		b	c		
	60:40	0.17				d	e
36.6 mM	0:100	0.52			c	d	e
	20:80	1.63	a				
	40:60	0.87		b	c		
	60:40	0.17				d	e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.4. Número de brotes

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 4). Las plantas con la concentración 36.6 mM de N y en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentó la mayor cantidad de brotes.

Cuadro 4: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de brotes de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		NÚMERO DE BROTES	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		2.03	b
18.3 mM		1.84	b
36.6 mM		2.63	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		1.79	c
20:80		3.06	a
40:60		2.32	b
60:40		1.46	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	1.80	c
	20:80	2.87	b
	40:60	1.87	c
	60:40	1.57	c
18.3 mM	0:100	1.97	c
	20:80	1.80	c
	40:60	1.97	c
	60:40	1.63	c
36.6 mM	0:100	1.56	c
	20:80	4.50	a
	40:60	3.13	b
	60:40	1.17	c

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.5. Altura parte aérea

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 5). Las plantas con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentaron la mayor altura bajo las tres concentraciones de N (9.2, 18.3 y 36.6 mM de N) y las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (60:40) presentaron la menor altura bajo las tres concentraciones de N (9.2, 18.3 y 36.6 mM de N).

Cuadro 5: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la altura de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**ALTURA PARTE AÉREA (mm)**						
Nivel de Nitrógeno (N)		***						
9.2 mM		38.38		b				
18.3 mM		43.73	a					
36.6 mM		46.78	a					
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***						
0:100		41.63			c			
20:80		56.39	a					
40:60		51.07		b				
60:40		22.49				d		
N x P		***						
9.2 mM	0:100	34.99					e	
	20:80	53.89	a	b	c			
	40:60	40.02				d	e	
	60:40	24.64						f
18.3 mM	0:100	43.92			c	d	e	
	20:80	60.98	a					
	40:60	49.43		b	c	d		
	60:40	20.59						f
36.6 mM	0:100	46.84		b	c	d		
	20:80	54.29	a	b				
	40:60	63.75	a					
	60:40	22.25						f

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.6. Longitud total de raíces

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 6). Las plantas presentan una menor longitud de las raíces conforme aumenta la concentración de N en el medio, presentándose el mayor promedio en las en las dos proporciones bajas en Amonio en las tres concentraciones de N (9.2, 18.3 y 36.6 mM).

Cuadro 6: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la longitud promedio de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		LONGITUD DE RAÍCES (mm)							
Nivel de Nitrógeno (N)		***							
9.2 mM		82.34		b					
18.3 mM		80.78		b					
36.6 mM		103.91	a						
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***							
0:100		88.51		b					
20:80		111.74	a						
40:60		110.16	a						
60:40		44.79			c				
N x P		***							
9.2 mM	0:100	79.83			c	d	e	f	
	20:80	123.27	a	b					
	40:60	73.04				d	e	f	
	60:40	53.23					e	f	g
18.3 mM	0:100	94.55		b	c	d			
	20:80	84.24			c	d	e		
	40:60	110.80	a	b	c				
	60:40	33.55							g
36.6 mM	0:100	91.69		b	c	d			
	20:80	127.70	a	b					
	40:60	146.64	a						
	60:40	47.58						f	g

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.7. Materia fresca de la raíz

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 7). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (40:60) con la concentración 36.6. mM de N presentaron el mayor peso fresco de raíces en comparación del resto de los tratamientos a excepción del tratamiento con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) bajo la misma concentración, con el cual no hubo una diferencia significativa. Bajo proporciones más altas de Amonio las plantas presentan un menor peso fresco en raíces.

Cuadro 7: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el peso fresco de las raíces de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO FRESCO RAÍZ (mg)**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		103.74	b
18.3 mM		96.30	b
36.6 mM		166.71	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		120.33	b
20:80		162.79	a
40:60		162.44	a
60:40		40.86	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	102.55	d e f
	20:80	185.19	b c
	40:60	81.89	e f g
	60:40	45.32	f g
18.3 mM	0:100	113.57	d e
	20:80	97.93	d e f
	40:60	143.81	c d
	60:40	29.90	g
36.6 mM	0:100	149.79	b c d
	20:80	205.24	a b
	40:60	261.60	a
	60:40	47.36	f g

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.8. Materia seca de la raíz

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 8). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (40:60) con la concentración 36.6. mM de N presentaron el mayor peso seco de raíces en comparación del resto de los tratamientos a excepción del tratamiento con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) con la misma concentración, con el cual no hubo una diferencia significativa. Con proporciones más altas de Amonio las plantas presentan una menor biomasa en raíces.

Cuadro 8: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el peso seco de las raíces de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO SECO RAÍZ (mg)**					
Nivel de Nitrógeno (N)		***					
9.2 mM		6.86		b			
18.3 mM		7.41		b			
36.6 mM		12.34	a				
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***					
0:100		8.58		b			
20:80		11.07	a				
40:60		11.87	a				
60:40		3.74			c		
N x P		***					
9.2 mM	0:100	6.94			c	d	e
	20:80	10.91		b			
	40:60	6.00				d	e
	60:40	3.56					e
18.3 mM	0:100	8.82		b	c	d	
	20:80	6.89			c	d	e
	40:60	10.79		b	c		
	60:40	3.13					e
36.6 mM	0:100	10.26		b	c		
	20:80	15.40	a				
	40:60	18.83	a				
	60:40	4.52					e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.9. Materia fresca de la parte aérea

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 9). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (40:60) con la concentración 36.6. mM de N presentaron el mayor peso fresco de la parte aérea en comparación del resto de los tratamientos a excepción del tratamiento con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) bajo la misma concentración, con el cual no hubo una diferencia significativa. Con proporciones más altas de Amonio las plantas presentan un menor peso fresco de la parte aérea y al incrementarse la concentración de Nitrógeno en el medio tienen un mayor peso fresco de la parte aérea.

Cuadro 9: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el peso fresco de la parte aérea de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO FRESCO P. AÉREA (mg)**				
Nivel de Nitrógeno (N)		***				
9.2 mM		102.04		b		
18.3 mM		99.09		b		
36.6 mM		252.10	a			
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***				
0:100		117.97		b		
20:80		212.21	a			
40:60		230.41	a			
60:40		36.25			c	
N x P		***				
9.2 mM	0:100	73.95				d
	20:80	186.98		b		
	40:60	111.90		b	c	d
	60:40	35.34				d
18.3 mM	0:100	87.27			c	d
	20:80	110.34		b	c	d
	40:60	174.24		b	c	
	60:40	24.50				d
36.6 mM	0:100	207.64		b		
	20:80	339.32	a			
	40:60	405.11	a			
	60:40	48.93				d

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.1.10. Materia seca de la parte aérea

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 10). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (40:60) con la concentración 36.6. mM de N presentaron el mayor peso seco de la parte aérea en comparación del resto de los tratamientos a excepción del tratamiento con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) con la misma concentración, con el cual no hubo una diferencia significativa. Con proporciones más altas de Amonio las plantas presentan un menor peso seco de la parte aérea y al incrementarse la concentración de Nitrógeno en el medio tienen un mayor peso seco de la parte aérea.

Cuadro 10: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el peso seco de la parte aérea de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO SECO P. AÉREA (mg)**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		8.38	b
18.3 mM		9.53	b
36.6 mM		22.40	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		9.86	b
20:80		18.22	a
40:60		20.81	a
60:40		4.15	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	5.15	c
	20:80	15.05	b
	40:60	9.28	b c
	60:40	4.05	c
18.3 mM	0:100	9.05	b c
	20:80	9.51	b c
	40:60	16.50	b
	60:40	3.05	c
36.6 mM	0:100	16.49	b
	20:80	30.09	a
	40:60	36.66	a
	60:40	5.35	c

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2. Evaluación del efecto de tres concentraciones de N y seis proporciones de las formas NH_4^+ y NO_3^- y su interacción sobre variables de crecimiento en plántulas de *L. speciosa* (Kunth) Schltr. bajo condiciones *in vitro*.

5.2.1. Número de raíces

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 11). Las plantas con concentraciones medias en N (18.3 mM) y con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentaron el mayor número de raíces en comparación de los 7 tratamientos restantes. El menor número de raíces se presentó en el tratamiento con una concentración 36.6 mM de N y proporción de NH_4^+:NO_3^- 40:60.

Cuadro 11: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de raíces de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN			NÚMERO DE RAÍCES	
Nivel de Nitrógeno (N)			***	
	9.2 mM		4.92	c
	18.3 mM		10.64	a
	36.6 mM		7.80	b
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)			***	
	0:100		8.51	b
	20:80		12.16	a
	40:60		2.69	c
N x P			***	
	9.2 mM	0:100	6.03	d
		20:80	5.76	d
		40:60	2.96	e
	18.3 mM	0:100	9.69	c
		20:80	17.11	a
		40:60	5.11	d e
	36.6 mM	0:100	9.80	c
		20:80	13.61	b
		40:60	0.00	f

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.2. Número de hojas

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 12). Las plantas con concentraciones altas en N (36.6 mM) y con la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentó el mayor número de hojas a comparación de los 8 tratamientos restantes. Las proporciones altas en las formas NH_4^+ y NO_3^- presentaron la menor cantidad de hojas, mientras que las proporciones intermedias presentaron la mayor cantidad de hojas bajo las tres concentraciones de N.

Cuadro 12: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de hojas de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		NÚMERO DE HOJAS	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		20.67	c
18.3 mM		85.42	a
36.6 mM		77.39	b
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		69.01	b
20:80		93.61	a
40:60		20.87	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	20.65	e
	20:80	20.65	e
	40:60	20.73	e
18.3 mM	0:100	92.07	c
	20:80	122.30	b
	40:60	41.88	d
36.6 mM	0:100	94.30	c
	20:80	137.88	a
	40:60	0.00	f

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.3. Número de pseudobulbos

La interacción entre la concentración y forma de N no mostró diferencias significativas (P < 0,001) entre los tratamientos (Cuadro 13) pero si la hubo en el nivel de nitrógeno y la proporción NH_4^+:NO_3^-. Las plantas bajo la concentración 18.3 mM de N y en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentaron la mayor cantidad de pseudobulbos en comparación de los tratamientos restantes.

Cuadro 13: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de pseudobulbos de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**NÚMERO DE PSEUDOBULBOS**				
Nivel de Nitrógeno (N)		***				
9.2 mM		1.41	a			
18.3 mM		1.71	a			
36.6 mM		0.87		b		
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***				
0:100		1.00		b		
20:80		2.28	a			
40:60		0.71		b		
N x P		NS				
9.2 mM	0:100	0.92			c	d
	20:80	2.38	a	b		
	40:60	0.92			c	d
18.3 mM	0:100	1.19			c	
	20:80	2.73	a			
	40:60	1.23			c	
36.6 mM	0:100	0.88			c	d
	20:80	1.73		b	c	
	40:60	0.00				d

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, P < 0.001) entre los tratamientos.

5.2.4. Número de brotes

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 14). Las plantas con la concentración 18.3 mM y36.6 mM de N en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) tiene una diferencia significativa en comparación con el resto de los tratamientos, presentando la mayor cantidad de brotes.

Cuadro 14: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de brotes de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		NÚMERO DE BROTES			
Nivel de Nitrógeno (N)		***			
9.2 mM		4.57		c	
18.3 mM		20.03	a		
36.6 mM		15.79		b	
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***			
0:100		14.62		b	
20:80		21.24	a		
40:60		4.53		c	
N x P		***			
9.2 mM	0:100	4.11			d
	20:80	4.73			d
	40:60	4.88		c	d
18.3 mM	0:100	20.80		b	
	20:80	30.57	a		
	40:60	8.73		c	
36.6 mM	0:100	18.96		b	
	20:80	28.42	a		
	40:60	0.00			e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.5. Número de PLB´s

Cuadro 15: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre el número de PLB´s de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		NÚMERO DE PLB´s	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		0.00	b
18.3 mM		0.00	b
36.6 mM		52.55	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		0.00	b
20:80		0.00	b
40:60		52.55	a
N x P		***	
9.2 mM	0:100	0.00	b
	20:80	0.00	b
	40:60	0.00	b
18.3 mM	0:100	0.00	b
	20:80	0.00	b
	40:60	0.00	b
36.6 mM	0:100	0.00	b
	20:80	0.00	b
	40:60	157.65	a

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.6. Altura parte aérea

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 16). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) presentaron la mayor altura bajo las concentraciones de N 18.3 y 36.6 mM.

Cuadro 16: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la altura de la parte aérea de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**ALTURA PARTE AEREA (mm)**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		15.13	b
18.3 mM		21.46	a
36.6 mM		12.88	c
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		16.53	b
20:80		22.10	a
40:60		10.85	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	14.87	d e
	20:80	18.35	c d
	40:60	12.18	e
18.3 mM	0:100	19.39	c
	20:80	24.63	a
	40:60	20.36	b c
36.6 mM	0:100	15.32	d e
	20:80	23.32	a b
	40:60	0.00	f

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.7. Longitud total de raíces

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 17). Las plantas presentan una menor longitud de las raíces conforme aumenta la concentración de N en el medio, presentándose la mayor longitud de raíces con la concentración de N 18.3 mM y la NH_4^+:NO_3^- 20:80.

Cuadro 17: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la longitud de raíces de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**LONGITUD DE RAÍCES (mm)**				
Nivel de Nitrógeno (N)		***				
9.2 mM		67.11		b		
18.3 mM		114.05	a			
36.6 mM		69.18		b		
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***				
0:100		85.31		b		
20:80		140.33	a			
40:60		24.70			c	
N x P		***				
9.2 mM	0:100	79.53			c	
	20:80	95.23		b	c	
	40:60	26.55				d e
18.3 mM	0:100	90.57			c	
	20:80	204.03	a			
	40:60	47.56			d	
36.6 mM	0:100	85.83			c	
	20:80	121.73		b		
	40:60	0.00				e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.8. Materia fresca de la raíz

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 18). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) bajo la concentración 18.3 mM de N presentaron el mayor peso fresco de raíces en comparación del resto de los tratamientos.

Cuadro 18: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la materia fresca de las raíces de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		PESO FRESCO RAÍZ (mg)	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		77.52	c
18.3 mM		184.31	a
36.6 mM		116.78	b
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		130.09	b
20:80		217.49	a
40:60		31.03	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	97.49	d e
	20:80	105.90	c d e
	40:60	29.16	f g
18.3 mM	0:100	142.57	c d
	20:80	346.42	a
	40:60	63.94	e f
36.6 mM	0:100	150.20	b c
	20:80	200.16	b
	40:60	0.00	g

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.9. Materia seca de la raíz

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 19). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) bajo la concentración 18.3 mM de N presentaron el mayor peso seco de raíces en comparación del resto de los tratamientos.

Cuadro 19: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la materia seca de las raíces de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO SECO RAÍZ (mg)**				
Nivel de Nitrógeno (N)		***				
9.2 mM		6.45	b			
18.3 mM		15.53	a			
36.6 mM		8.73		b		
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***				
0:100		11.40		b		
20:80		16.38	a			
40:60		2.93			c	
N x P		***				
9.2 mM	0:100	7.21			c	d
	20:80	9.23		b	c	d
	40:60	2.91				d e
18.3 mM	0:100	13.83		b		
	20:80	26.86	a			
	40:60	5.90				d e
36.6 mM	0:100	13.14		b	c	
	20:80	13.05		b	c	
	40:60	0.00				e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.10. Materia fresca de la parte aérea

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 20). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) bajo la concentración 36.6. mM de N presentaron el mayor peso fresco de la parte aérea en comparación del resto de los tratamientos.

Cuadro 20: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la materia fresca de la parte aérea de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO FRESCO P. AÉREA (mg)**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		84.39	c
18.3 mM		772.17	b
36.6 mM		864.89	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		490.61	b
20:80		986.58	a
40:60		244.27	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	75.18	e
	20:80	106.80	e
	40:60	71.20	e
18.3 mM	0:100	675.27	c
	20:80	1324.08	b
	40:60	317.16	d
36.6 mM	0:100	721.36	c
	20:80	1528.85	a
	40:60	344.45	d

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.2.11. Materia seca de la parte aérea

La interacción entre la concentración y forma de N mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Cuadro 21). Las plantas en la proporción NH_4^+:NO_3^- (20:80) bajo la concentración 18.3 mM de N presentaron el mayor peso seco de la parte aérea en comparación del resto de los tratamientos.

Cuadro 21: Efecto de la concentración de N y proporción de las formas NH_4^+:NO_3^- y su interacción sobre la materia seca de la parte aérea de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**PESO SECO P. AÉREA (mg)**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		7.25	b
18.3 mM		45.41	a
36.6 mM		43.44	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		28.93	b
20:80		50.95	a
40:60		16.22	c
N x P		***	
9.2 mM	0:100	5.66	f
	20:80	10.06	f
	40:60	6.04	f
18.3 mM	0:100	35.13	d
	20:80	78.51	a
	40:60	22.60	e
36.6 mM	0:100	45.99	c
	20:80	64.30	b
	40:60	20.02	e

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

5.3. Determinación del porcentaje de N total en parte aérea y raíz de *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. y *L. speciosa* (Kunth) Schltr. bajo tres concentraciones de N y seis proporciones de las formas NH_4^+ y NO_3^- en condiciones *in vitro.*

Cuadro 22: Contenido de nitrógeno en parte aérea de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**% N**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		2.49	c
18.3 mM		3.31	b
36.6 mM		4.75	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		2.61	b
20:80		3.57	a
40:60		3.49	a
60:40		4.09	a
N x P		NS	
9.2 mM	0:100	2.08	d
	20:80	2.51	c d
	40:60	2.63	c d
	60:40	2.78	c d
18.3 mM	0:100	2.51	c d
	20:80	3.58	a b c d
	40:60	3.21	b c d
	60:40	4.18	a b c
36.6 mM	0:100	3.39	b c d
	20:80	5.07	a b
	40:60	5.03	a b
	60:40	5.90	a

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

Cuadro 23: Contenido de nitrógeno en raíz de *L. autumnalis* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		% N	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		2.04	c
18.3 mM		3.21	b
36.6 mM		5.02	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		2.25	c
20:80		3.12	b
40:60		3.62	a b
60:40		4.15	a
N x P		NS	
9.2 mM	0:100	1.59	h
	20:80	1.92	g h
	40:60	2.36	e f g h
	60:40	2.40	e f g h
18.3 mM	0:100	2.14	f g h
	20:80	2.97	d e f g
	40:60	3.55	b c d e
	60:40	4.71	a b c d
36.6 mM	0:100	3.34	c d e f
	20:80	5.32	a b c
	40:60	5.64	a b
	60:40	6.32	a

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

Cuadro 24: Contenido de nitrógeno en parte aérea de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**% N**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		2.39	c
18.3 mM		2.71	b
36.6 mM		4.62	a
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		2.36	c
20:80		2.99	b
40:60		4.24	a
N x P		NS	
9.2 mM	0:100	1.89	e
	20:80	2.21	d e
	40:60	3.25	c
18.3 mM	0:100	2.08	e
	20:80	2.64	d
	40:60	3.63	c
36.6 mM	0:100	3.33	c
	20:80	4.59	b
	40:60	6.47	a

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

Cuadro 25: Contenido de nitrógeno en raíz de *L. speciosa* a los 270 días de establecidas.

FUENTE DE VARIACIÓN		**% N**	
Nivel de Nitrógeno (N)		***	
9.2 mM		2.05	c
18.3 mM		3.26	a
36.6 mM		2.63	b
Proporción NH_4^+:NO_3^- (P)		***	
0:100		2.35	b
20:80		3.33	a
40:60		2.25	b
N x P		***	
9.2 mM	0:100	1.45	e
	20:80	2.03	d
	40:60	2.94	c
18.3 mM	0:100	2.32	d
	20:80	3.83	c
	40:60	3.91	b
36.6 mM	0:100	3.86	b
	20:80	4.73	a
	40:60	------	

Letras diferentes y *** indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P < 0.001$) entre los tratamientos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico de los datos indicó que hay una alta diferencia significativa (Tukey, $P < 0.001$) en relación al nivel de nitrógeno, proporción nitrato-amonio y la interacción entre ambos factores en la mayoría de las variables evaluadas para ambas especies. Los mejores resultados de las variables evaluadas para *L. autumnalis* se obtuvieron con la combinación 36.6 mM y la proporción 20:80 y 40:60 de $NH_4^+ : NO_3^-$, solamente las variables longitud de raíces y altura de la plántula tuvieron un mejor resultado con un nivel de nitrógeno de 9.2 mM y 18.3mM. Estos últimos resultados coinciden con los obtenidos por Jampeetong *et al.* (2012) en un estudio con plantas de *Salvinia cucullata* donde observaron que concentraciones superiores a 5 mmol L^{-1} de NH_4^+ disminuyeron el crecimiento de la raíz y de la parte aérea.

En el caso de *L. speciosa* se obtuvieron los mejores resultados con la combinación 18.3 mM y 36.6 mM y con la proporción 20:80 de $NH_4^+ : NO_3^-$; en esta especie se presentó la generación de PLB´s en el tratamiento con una concentración 36.6 mM de N y la proporción de $NH_4^+ : NO_3^-$ (40:60); Diferentes autores han demostrado que en dependencia del cultivo con que se trabaje, cuando este balance amonio-nitrato favorece al nitrato en determinada proporción, entonces se inicia la formación de embriones somáticos en etapa globular (Grimes y Hodges, 1990).

En el caso de los tratamientos donde los niveles de amonio fueron altos los protocormos murieron; para *L. autumnalis* los tratamientos en donde se vieron afectados los protocormos por el exceso de amonio fueron las proporciones $NH_4^+ : NO_3^-$ 80:20 y 100:0 en los tres niveles de N (9.2 mM, 18.3 mM y 36.6 mM) y para *L. speciosa* fueron las proporciones $NH_4^+ : NO_3^-$ 60:40, 80:20 y 100:0 en los tres niveles de N (9.2 mM, 18.3 mM y 36.6 mM, en total para *L. autumnalis* 6 tratamientos se vieron afectados por el exceso de amonio en el medio de cultivo y para *L. speciosa* fueron 9 tratamientos los afectados; en las dos especies los protocormos, detuvieron su crecimiento y finalmente murieron; Según George y Klerk (2008), en un medio de cultivo enriquecido con nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), los cultivos tienen preferencia por el nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) y su asimilación implica la liberación al medio de cultivo de hidrógeno (H+) lo que provoca una disminución en los valores de pH. Esta condición (la acidez del medio de cultivo) favorece la absorción del nitrógeno en forma de

nitrato, dando como resultado la formación de grupos hidroxilos (OH-) en el medio de cultivo y en consecuencia un gradual incremento en los valores del pH. En las plantas, el exceso de amonio provoca la reducción del pH citoplasmático y la activación de especies reactivas de oxígeno, relacionadas con daño a la membrana plasmática y a la estructura de la pared celular (Li *et al*., 2014) y también disminuye la absorción de K, Ca y Mg (Borgognone *et al*., 2013), pudiendo provocar perjuicios a la producción de biomasa. El amonio cuando está presente en exceso, es perjudicial para muchas especies de plantas. Un síntoma visible de la toxicidad del amonio es que atrofia el crecimiento. El suministro de NH_4^+ en exceso puede disminuir la eficiencia de uso de N en las raíces y en la parte aérea, posiblemente debido al consumo en exceso del nutriente (Xu *et al*., 2012), también puede provocar un desequilibrio iónico, acidificación apoplástica, limitación de los hidratos de carbono en la raíz o déficit de energía (Britto y Kronzucker 2002). Se ha reportado frecuentemente que la actividad NR (nitrato reductasa) está asociada positivamente con la concentración de NO_3^- en tejidos foliares (Jampeetong y Brix, 2009; Munzarova *et al*., 2006) y se ha descrito que disminuye dramáticamente o incluso completamente cuando las plantas se suministran con amonio que con nitrato (Konnerup y Brix, 2010) además de causar deterioro del metabolismo de las enzimas N (Claussen y Lenz, 1999, Tabatabaei *et al*., 2008).

Los estudios en solución nutritiva con diferentes formas de nitrógeno relatan que el incremento del amonio en relación al nitrato disminuyó la producción de diferentes especies, como *Eustoma grandiflorum* (Mendoza-Villarreal *et al*., 2015), *Eucalyptus urophylla* (Guimaraes, *et al.*, 2014) en la mayoría de los casos e induce la deficiencia de nutrientes (Mendoza-Villarreal *et al*., 2015). En general, los síntomas de toxicidad del NH_4^+ en plantas se deben, entre otros factores, al alto consumo de energía para el eflujo de ese ion, manteniendo baja su concentración en el citosol de la célula (Britto *et al*., 2014).

Bar-Tal *et al*. (2001) y Konnerup y Brix (2010), concluyeron que una disminución de la proporción de nitrato-amonio dio como resultado una mayor concentración de N en el tallo, las hojas y los frutos de la pimienta.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos bajo condiciones *in vitro* demuestran que el mayor crecimiento y desarrollo a partir de protocormo para *L. autumnalis* se presenta con una concentración de N 36.6 mM en proporción 20:80 y 40:60 de NH_4^+ y NO_3^-. En el caso de *L. speciosa* su crecimiento y desarrollo se vio favorecido con dos concentraciones de N, 18.3 mM y 36.6 mM y con la proporción 20:80 de NH_4^+ y NO_3^-. La concentración 36.6 mM de N y proporción 40:60 de NH_4^+ y NO_3^- produjo PLB´s solamente en esta especie. Por lo que los resultados demuestran que es factible disminuir la fertilización nitrogenada y además de brindarle a la planta el N necesario para su optimo crecimiento y desarrollo en condiciones *in vitro* y tomar como base este medio de cultivo para futuros trabajos relacionados con estas dos especies.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ammirato, P. V., Evans, D. R. Sharp, W. R. y Bajaj, Y. P. S. (eds). 1990. Hybook of plant cell culture. Vol. 5. Ornamental Species. McGraw-Hill Piblishing Company. N. Y. USA. Pp. 599.
2. Arditti J. y T. Kull. 2002. Orchid biology Rewiews and perspectives VIII. Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands. 1-81p.
3. Arditti, J. y Abdul, G. A. K. 2000. Numerical y physical properties of orchid seeds y their biological implications. New Phytol. Tansley Review No. 110. 145: 367-421
4. Bar-Tal, A., Aloni, B., Karni, L., Oserovitz, J., Hazan, A., Itach, M., Gantz, S., Avidan, A.,Posalski, I., Tratkovski, N., 2001. Nitrogen nutrition of greenhouse pepper. I.Effects of nitrogen concentration and NO3NH4ratio on yield, fruit shape, andthe incidence of blossom-end rot in relation to plant mineral composition.HortScience 36, 1244–1251.
5. Beltrán-Rodríguez, L.A.; B. Martínez-Rivera, y A. Paulo-Maya, 2012. "Etnoecología de la flor de catarina *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. (Orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso y preservando saberes populares". Etnobiología, 10: 1-17.
6. Bernhard, A. *Nature Educ. Knowl.* 3, 25 (2010).
7. Betancur J, Sarmiento-L H, Toro-González L, Valencia J (2015) Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC
8. Bittsánszky, A.; Pilinszk, K.; Gyulai, G.; Komives, T. Over coming ammonium toxicity. Plant Science, Limerick, v. 231, n. 4, p.184-190, 2015.
9. Bonomelli, C., Cisterna, D., & Reciné, C. (2005). Effect of nitrogen fertilization on Echinacea purpurea mineral composition. *Ciencia e Investigación Agraria*, *32*(2), 85-91.
10. Borgognone, D., Colla, G., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Rea, E., Schwarz, D., 2013.Effect of nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineralcomposition of self-grafted and grafted tomatoes. Sci. Hort. 149, 61–69.
11. Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH4+ toxicity in higher plants: a critical review. J Plant Physiol 159(6):567–584

12. Britto, D. T.; Balkos, K. D.; Becker, A.; Coskun, D.; Huynh, W. Q.; Kronzucker, H. J. Potassium and nitrogen poising: Physiological changes and biomass gains in rice and barley. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v. 94, p.1085-1089, 2014.
13. Britto, D.T., Glass, A.D., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., 2001a. Cytosolicconcentrations and transmembrane fluxes of NH4+/NO3−. An evaluation ofrecent proposals. Plant Physiol. 125, 523–526.
14. Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2013. Ecological significance and complexity ofN-source preference in plants. Ann. Bot.-Lond. 112, 957–963.
15. Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., Kronzucker, H.J., 2001b. Futiletransmembrane NH4+cycling: a cellular hypothesis to explain ammoniumtoxicity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 4255–4258.
16. Calderón de Rzedowski, G., & Rzedowski, J. (2005). Flora Fanerogámica del Valle de México. Segunda edición. I de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
17. Carpena, O., Rodríguez, A. M., & Sarro, M. J. (1987). Evaluación de los contenidos minerales de raíz, tallo y hoja de plantas de tomate como índices de nutrición. *An. Edafol. Agrobiol*, *46*, 117-127.
18. Cavero, M., Collantes, B., & Patroni, C. (1991). *Orquídeas del Perú*. Centro de Datos para la Conservación del Perú.
19. Chugh S, Guha S, Rao IU. 2009.Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. SciHortic 122:507–520.
20. Claussen, W., & Lenz, F. (1999). Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and soil*, *208*(1), 95-102.
21. Colombo, L. A.; Faria, R. T.; Carvalho, J. F. R. P.; Assis, A. M.; Fonseca, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento in vitro de duas espécies de orquídeas brasileiras. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 26, n. 2, p. 253-258, 2004.
22. Cruz, C.; Domínguez-Valdivia, M. D.; Aparicio-Tejo, P. M.; Lamsfus, C.; Bio, A.; Martins-Loução, M. A.; Moran, J. F. Intra-specific variation in pea responses to

ammonium nutrition leads to different degrees of tolerance. Environmental and Experimental Botany, Amsterdam, v. 70, n. 2-3, p. 233-243. 2011.

23. Curtis, F. D., & Urban, J. (1949). *Biology in daily life*. Ginn.
24. Díaz-Toribio M.H., Toledo A.T., MataRosas M., Mehltreter K., Hernández-Rojas A.C., Mejía A.J., GarcíaFranco J.G. 2013. Manual de cultivo de orquídeas, bromelias y helechos en cafetales de sombra. Instituto Nacional de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz, México. 119 pp.
25. Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*, *13*(1), 373-394.
26. Durán M. E. 2014. Germinación asimbiotica, viabilidad de semillas y desarrollo en plantulas de *Laelia spp* (rchidaceae) almacenadas para su conservación. Tesis de Licenciatura. 1-49 p.
27. Ernst, R., & Arditti, J. (1984). Biological Effects Of Surfactants Vii Growth And Development Of Brassocattleya (Orchidaceae) Seedlings. *New phytologist*, *96*(2), 197-205.
28. Faria, R. T.; Santiago, D. C.; Saridakis, D. P.; Albino, U. B.; Araújo, R. Preservation of the brazilian orchid Cattleya walkeriana Gardner using in vitro propagation. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 2, n.3, p. 489-492, 2002.
29. Flores P., A. y S. Valencia D. 2007. "Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes". *Biological Conservation*. 136: 372 –387.
30. García-Cruz, J., y Sosa, V. 1998. Orchidaceae I. Clave de Subfamilias y Tribus. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Ver., México. Fascículo 106. pp 13.
31. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Micropropagation: uses and methods. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 29-64). Springer Netherlands.
32. Glass, A.D., 2005. Homeostatic processes for the optimization of nutrientabsorption: physiology and molecular biology. In: BassiriRad, H. (Ed.), NutrientAcquisition by Plants. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 117–145.
33. Grimes, H. D., & Hodges, T. K. (1990). The inorganic NO3-: NH4+ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (Oryza sativa L.). *Journal of plant physiology*, *136*(3), 362-367.

34. Guimarães, M. M. C., Cairo, P. A. R., & Neves, O. S. C. (2014). Crescimento de Eucalyptus urophylla em meio hidropônico com diferentes proporções de nitrato e amônio. *Floresta e Ambiente*, *21*(1), 52-61.
35. Hágsater, E., M. Á. Soto A., G.A. Salazar Ch., R. Jiménez M., M.A. López R. y R.L. Dresler. 2005. Orquídeas y Gente. En Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, México. pp: 38-71.
36. Halbinger, F. y M. Soto. 1997. *Laelias* of Mexico. Orqídea (Méx.) Herbario AMO. Mexico city. pp 13–14, 17, 135-144.
37. Helali, S. M.; Nebli, H.; Kaddour, M.; Mahmoudi, H.; Lachaâl, M.; Ouerghi, A. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of Arabidopsis thaliana. Plant and Soil, Dordrecht, v. 336, n. 1-2, p. 65-74, 2010.
38. Hernández, F., 1959. Historia Natural de Nueva España. Tomo II y VII. UNAM, México.
39. Horchani, F.; Hajri, R.; Aschi-Smiti, S. Is the sensitivity to ammonium nutrition related to nitrogen accumulation? Current Botany, Vidyanagar, v. 2, n. 1, p. 18-22, 2011.
40. Hossain, M. M., Kant, R., Van, P. T., Winarto, B., Zeng, S., & Teixeira da Silva, J. A. (2013). The application of biotechnology to orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *32*(2), 69-139.
41. Huang, L.; Lu, Y.; Gao, X.; Du, G.; Ma, X.; Liu, M.; Guo, J.; Chen, Y. Ammonium-induced oxidative stress on plant growth and antioxidative response of duckweed (Lemna minor L.) Ecological Engineering, Amsterdam, v. 58, p. 355-362, 2013.
42. Jampeetong, A., Brix, H., 2009. Nitrogen nutrition of Salvinia natans Effects ofinorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity anduptake kinetics of ammonium and nitrate. Aquat. Bot. 90, 67–73.
43. Jampeetong, A., Konnerup, D., Piwpuan, N., Brix, H., 2013. Interactive effects ofnitrogen form and pH on growth, morphology, N uptake and mineral contentsof Coix lacryma-jobi L. Aquat. Bot. 111, 144–149.
44. Jampeetong, A.; Brix, H.; Kantawanichkul, S. Effects of inorganic nitrogen forms on growth, morphology, nitrogen uptake capacity and nutrient allocation of four tropical aquatic macrophytes (Salvinia cucullata, Ipomoea aquatica, Cyperus involucratus and Vetiveria zizanioides). Aquatic Botany, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 10-16, 2012.

45. Kirkby, E.A., Knight, A.H., 1977. Influence of the level of nitrate nutrition on ionuptake and assimilation organic acid accumulation, and cation-anion balancein whole tomato plants. Plant Physiol. 60, 349–353.
46. Konnerup, D., Brix, H., 2010. Nitrogen nutrition of canna indica: effects ofammonium versus nitrate on growth, biomass allocation, photosynthesis,nitrate reductase activity and N uptake rates. Aquat. Bot. 92, 142–148.
47. Leake, J. R. (1994). The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, *127*(2), 171-216.
48. Li Yh, Zhao Sc, Ma Jx, Li D, Yan L, Li J. *et al.* (2013). Molecular footprints of domestication and improvement in soybean revealed by whole genome re-sequencing. BMC Genomics 14: 579.
49. Li YH, Zhou GY, Ma JX, Jiang WK, Jin LG, Zhang ZH *et al.* (2014). De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. Nat Biotechnol 32: 1045–1052.
50. Lindley, J. 1842. *Bo/. Reg.* 28: sub t. 62.
51. Luan, L. Q., Nagasawa, N., Tamada, M., & Nakanishi, T. M. (2006). Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by molecular weight fractionation. Radioisotopes, 55, 21–27.
52. Lunt, O. R. and A.M. Kofranek. 1961. Exploratory nutritional studies on Cymbidium using two textures of fir bark. Amer. Orchid Soc. Bul. 30:297-302.
53. Manning JC, van Staden J. 1987. The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. Australian Journal of Botany 35: 343–353.
54. Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2012. 643 p.
55. Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, New York.
56. Martínez A., B. R. y A. P. Maya. 2012. Etnoecología de la flor de Catarina *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex) Lindl. (Orchidaceae) en la comunidad campesina del sur del estado de Morelia, México: Conservando un recurso y preservando saberes populares. Etnobiología. 10(1): 1-17.
57. Martinez, B., Beltrán Rodríguez, L., Calderón Gutiérrez, L. A., & Ise, M. L. (2009). 374. Etnoecología de La Flor de Calavera: El futbol y las barras bravas, identidad, juntud

y violencia; Un acercamiento a Pirotecnia de Hilda Mundy Cincuenta chispas para un olvido.

58. Menchaca, A. R. G. y D. M. Moreno. 2011. Conservación de orquídeas una tarea de todos. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México 41 p.
59. Mendoza-Villarreal, R.; Valdez-Aguilar, L. A.; Sandoval-Rangel, A.; Robledo-Torres, V.; Benavides-Mendoza, A. Tolerance of lisianthus to high ammonium levels in rockwool culture. Journal of Plant Nutrition, New York, v. 38, n. 1, p. 73-82, 2015.
60. Merckx, V. S. (2013). Mycoheterotrophy: an introduction. In *Mycoheterotrophy*(pp. 1-17). Springer New York.
61. Miller, A. J., Marsh, S., Zhang, X. H., & Pearson, J. (2004). Tree leaf biomarkers for atmospheric nitrogen deposition. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, *4*(6), 241-250.
62. Miller, A.J., Cramer, M.D. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*. Vol. 274, p. 1–36.
63. Miller, A.J., Cramer, M.D., 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. In:Lambers, H., Min, X., Siddiqi, M., Guy, R., Glass, A., Kronzucker, H., 1998.Induction of nitrate uptake and nitrate reductase activity in trembling aspenand lodgepole pine. Plant, Cell & Environment. 21, 1039-1046.
64. Molina, A., 2004. Vocabulario en lengua Castellana y Mexicana y Mexicana y Castellana. Editorial Porrúa. 5a. ed., pp. 151-152.
65. Munzarova, E., Lorenzen, B., Brix, H., Vojtiskova, L., Votrubova, O., 2006. Effect ofNH4+/NO3−availability on nitrate reductase activity and nitrogenaccumulation in wetland helophytes Phragmites australis and Glyceriamaxima. Environ. Exp. Bot. 55, 49–60.
66. Murashigue T y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiología Plantarum 15:473-497.
67. Nacry, P., Bouguyon, E., Gojon, A., 2013. Nitrogen acquisition by roots,physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to afluctuating resource. Plant Soil 370, 1–29.
68. Nava, B.J.H., 2008. Las Orquídeas del municipio de Ocuilan de Arteaga, Estado de México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Estado de México. 281 pp.

69. Navarro-López, E. R., Vázquez, I. G., Cruz-San Pedro, E. V. y Bastida- Tapia, A. 2001. Botánica e Identificación de Orquídeas. Serie AGRIBOT No. 6. Chapingo, Estado de México, México. p 54.
70. Owen, A.G., Jones, D.L., 2001. Competition for amino acids between wheat rootsand rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant Nacquisition. Soil Biol. Biochem. 33, 651–657.
71. Pedroza-Manrique, J. A., Serrato-Muñoz, L. C., & Castaño-Robayo, M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de Masdevallia coccinea Linden ex Lindl. y Maxillaria nutans Lindl.. In vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *12*(2), 86.
72. Pienaar, D., & Combrink, N. J. J. (2007). The effects of N-source, shading and root zone cooling on two Disa hybrids. *South African Journal of Plant and Soil*, *24*(3), 166-171.
73. Piwpuan, N., Zhai, X., Brix, H., 2013. Nitrogen nutrition of Cyperus laevigatus andPhormium tenax Effects of ammonium versus nitrate on growth, nitratereductase activity and n uptake kinetics. Aquat. Bot. 106, 42–51.
74. Poole, H.A. 1971. Effects of nutrition and media on growth and chemical composition of mericloned plants of Cattleya. MS Thesis. Univ. of Florida, Gainesville.
75. Rahman ARM, Islam MO, Prodhan AKM A, Syoichi I. Effects of carbohydrates on callus growth and callus derived plantlet regeneration in Doritaenopsis. Journal of Orchid. Biotechnology 2005; 4:126-131.
76. Ramage, C. M., & Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *38*(2), 116-124.
77. Ramírez, J. 2004.Orquídeas de México. Biodiversitas No. 5. CONABIO. México.
78. Rasmussen HN, Whigham D. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new technique and its application to terrestrial orchids. American Journal of Botany 80: 1374–1378.
79. Rasmussen HN, Whigham D. 1998. The underground phase: a special challemge in studies of terrestrial orchid populations. Botanical Journal of the Linnean Society 126: 49–64.
80. Rasmussen, A. (2002). The effects of climate change on the birch pollen season in Denmark. *Aerobiologia*, *18*(3-4), 253-265.

81. Rehfeldt, J. (1984). Microevolution of conifers in the northern Rocky Mountains: a view from common gardens. In *8. north American forest biology workshop, Logan, Utah (USA), 30 Jul-1 Aug 1984*. Dept. of Forest Resources, Utah State Univ.
82. Reséndiz Machón, J. F., Martínez Rivera, B., Beltrán Rodríguez, L., Maya, A. P., & Campillo, F. (2010). 444. Los Chalchihuites de Tepoztécatl, centro del mundo y gracia del Dios; Dinámica ceremonial en los días de Muertos al sur del estado de Morelos; Subyacentes Emociones para El Diario de Campo.
83. Roberts, D. L.; Dixon, K. W. Orchids. Current Biology, v. 18, n, 8. p. 325-329, 2008.
84. Ruamrungsri, S., & Hongpakdee, P. (2014, August). Comparisons of nutrient status between regular season and off-season cropping of Curcuma alismatifolia Gagnep. In *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1104*(pp. 475-480).
85. Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1990. Flora fanerogámica del valle de México. Instituto de Ecología. 1ª. Edición. Vol. III. México. pp. 340-341
86. Sahagún, B. 1975. Historia General de las Cosas de Nueva España. Editorial Porrúa. México.
87. Salazar, G. A., J. Reyes, C. Brachet Y J. Pérez. 2006. Orquídeas y otras plantas nativas de la Cañada, Cuicatlán, Oaxaca, México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
88. Salazar-Rojas, V., E. Herrera-Cabrera, A. Flores-Palacios y I. Ocampo-Fletes. 2007. Tradicional use and conservation of the "Calaverita" Laelia anceps subs. dawsonii f. chilapensis Soto-Arenas at Chilapa, Guerrero, México. Lankesteriana 7(1-2): 368-370.
89. Salgado-Garciglia, R., Díaz-Morales, D., & Espinoza-Calderón, J. C. (1997). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y su aplicación biotecnológica. *Ciencia Nicolaita*, *14*, 75-90.
90. Salisbury, Frank y Ross, Cleon. Fisiología vegetal. Editora Iberoamérica, México, 1994. 759 p.
91. Sánchez, S. O. 1978. La Flora del Valle de México. Edit. Herrero. México. pp. 114.
92. Sarasketa, A.; González-Moro, M. B.; González-Murua, C.; Marino, D. Exploring ammonium tolerance in a large panel of Arabidopsis thaliana natural accessions. Journal of Experimental Botany, Lancaster, v. 65, n. 20, p. 6023-6033, 2014.

93. Schortemeyer, M., Feil, B., & Stamp, P. (1993). Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system. *Annals of botany*, *72*(2), 107-115.
94. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (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 de diciembre de 2010. México D.F. México. pp 1-78.
95. Silva, P. C. C.; Couto, J. L.; Santos, A. R. Absorção dos íons amônio e nitrato e seus efeitos no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, v.10, n. 2, p. 97-104, 2010.
96. Simeón. R., 2004. Diccionario de la lengua náhuatl o mexicana. México, Siglo XXI, pp. 4.
97. Smith, R. L., & Smith, R. L. (1986). *Elements of ecology* (No. 04; QH541, S6 1986.).
98. Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbioses 2nd ed. London, England: Academic Press.
99. Soto-Arenas MA, Solano-Gómez AR. 2007. Ficha técnica de *Laelia speciosa*. In: Soto-Arenas MA, ed. *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000*. México. D.F: Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029.
100. Srivastava, H. S., Saxena, D. K., & Saxena, A. N. U. J., (1999). Heavy metal accumulation and in vivo nitrate reductase activity in the Sphagnum squarrosum Cram. Samml. *PROCEEDINGS-NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES INDIA SECTION B*, *69*(3/4), 307-312.
101. Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, *15*(2), 134-154.
102. Steiner, A. A. (1973, May). The selective capacity of tomato plants for nutrient ions in a solution. In *Proc. 3rd International Congress on Soilless Culture, IWOSC. Sassari, Italy* (pp. 7-12).

103. Steiner, A. A. 1984. The universal nutrition solutions. *In*: Proceeding sixth International Congress on Soilless Culture, ISOSC. Lunteren, The Netherlands. 633-650.

104. Tabatabaei, S., Yusefi, M., Hajiloo, J., 2008. Effects of shading and NO3: NH4ratio onthe yield, quality and N metabolism in strawberry. Sci. Hort. 116, 264–272.

105. Takane, R. J., Yanagisawa, S. S., & Pivetta, K. F. L. (2010). Cultivo moderno de orquídeas Cattleya e seus híbridos. *Fortaleza: UFC. 179p.[Links]*.

106. Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment*, *23*(10), 1005-1024.

107. Torres-Olivar, V., Villegas-Torres, O.G., Domínguez-Pati˜no, M.L., Sotelo-Nava, H.,Rodríguez-Martínez, A., Melgoza-Alemán, R.M., Valdez-Aguilar, L.A.,Alia-Tejacal, I., 2014. Role of nitrogen and nutrients in crop nutrition. J. Agric.Sci. Technol. B4, 29.

108. Wang Y. T. 2008. High NO3-N to NH4-N ratios promote growth and flowering of a hybrid *Phalaenopsis* grown in two root substrates. HortScience 43:350–353.

109. Wang, Y. T and Konow E. A. 2002. Fertilizer source and medium, composition affect vegetative growth and mineral nutrition of a hybrid month orchid. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 442-447.

110. Xu G, Fan X, Miller AT (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annu Rev Plant Biol 63:153–182

111. Yágodin, B. A. (1986). Agroquímica. Trad. al español por R. Rincón-Zabaco y F. Vargas-Salazar. Tomo I. *Mir. Moscú. Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas.*

9. ANEXOS

Anexo 1: Tratamientos de los factores evaluados.

Tabla 1.- Tratamientos de los factores evaluados

TRATAMIENTO	FACTORES	
	Concentración de Nitrógeno mM	Formas de Nitrógeno $NH_4^+ : NO_3^-$
1	9.2	0 : 100
2	9.2	20 : 80
3	9.2	40 : 60
4	9.2	60 : 40
5	9.2	80 : 20
6	9.2	100 : 0
7	18.3	0 : 100
8	18.3	20 : 80
9	18.3	40 : 60
10	18.3	60 : 40
11	18.3	80 : 20
12	18.3	100 : 0
13	36.6	0 : 100
14	36.6	20 : 80
15	36.6	40 : 60
16	36.6	60 : 40
17	36.6	80 : 20
18	36.6	100 : 0

FUENTE: Elaboración propia

Anexo 2. Medio de cultivo ER para la germinación de semillas de orquídeas

Medio de cultivo "ER" para la germinación de semillas de orquídeas.	
Stocks	g l^{-1}
Stock I Sulfato de Amonio $(NH_4)_2\ SO_4$ Nitrato de Amonio NH_4NO_3 Nitrato de Potasio KNO_3 Nitrato de Magnesio $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	 1.5 4.0 4.0 1.0
Stock II Nitrato de Calcio $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	 1.5
Stock III Fosfato de Potasio KH_2PO_4	 3.0
Stock IV Sulfato ferroso $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	 0.25
Sacarosa Aforar con agua destilada Ajustar pH 5.2 Agar bacteriológico	20.0 1000 ml 8.0

Anexo 3. Soluciones nutritivas para la elaboración de medios de cultivo

Solución de cultivo concentración 36.6 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 0 : NO_3^- 100				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	26.33	2.20	2.30	30.83
Ca^{++}	6.17	♦	♦	6.17
Mg^{++}	4.11	♦	♦	4.11
NH_4^+	♦	♦	♦	0.00
∑	36.60	2.20	2.30	41.10

Solución de cultivo concentración 36.6 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 20 : NO_3^- 80				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	21.06	2.20	2.08	25.34
Ca^{++}	4.93	♦	0.14	5.07
Mg^{++}	3.29	♦	0.09	3.38
NH_4^+	♦	♦	7.32	7.32
∑	29.28	2.20	9.62	41.10

Solución de cultivo concentración 36.6 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 40 : NO_3^- 60				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	15.80	2.20	1.85	19.85
Ca^{++}	3.70	♦	0.27	3.97
Mg^{++}	2.47	♦	0.18	2.65
NH_4^+	♦	♦	14.64	14.64
∑	21.96	2.20	16.94	41.10

Solución de cultivo concentración 36.6 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 60 : NO_3^- 40				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	10.53	2.20	1.63	14.36
Ca^{++}	2.47	♦	0.41	2.87
Mg^{++}	1.64	♦	0.27	1.91
NH_4^+	♦	♦	21.96	21.96
∑	14.64	2.20	24.26	41.10

Solución de cultivo concentración 36.6 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 80 : NO_3^- 20				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	5.27	2.20	1.40	8.87
Ca^{++}	1.23	♦	0.54	1.77
Mg^{++}	0.82	♦	0.36	1.18
NH_4^+	♦	♦	29.28	29.28
∑	7.32	2.20	31.58	41.10

Solución de cultivo concentración 36.6 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 100 : NO_3^- 0				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	0.00	2.20	1.18	3.38
Ca^{++}	0.00	♦	0.68	0.68
Mg^{++}	0.00	♦	0.45	0.45
NH_4^+	♦	♦	36.60	36.60
∑	0.00	2.20	38.90	41.10

Solución de cultivo concentración 18.3 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 0 : NO_3^- 100				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	18.30	2.20	10.33	30.83
Ca^{++}	♦	♦	6.17	6.17
Mg^{++}	♦	♦	4.11	4.11
NH_4^+	♦	♦	♦	0.00
∑	18.30	2.20	20.60	41.10

Solución de cultivo concentración 18.3 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 20 : NO_3^- 80				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	14.64	2.20	11.24	28.08
Ca^{++}	♦	♦	5.62	5.62
Mg^{++}	♦	♦	3.74	3.74
NH_4^+	♦	♦	3.66	3.66
∑	14.64	2.20	24.26	41.10

Solución de cultivo concentración 18.3 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 40 : NO_3^- 60				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	10.98	2.20	12.16	25.34
Ca^{++}	♦	♦	5.07	5.07
Mg^{++}	♦	♦	3.38	3.38
NH_4^+	♦	♦	7.32	7.32
∑	10.98	2.20	27.92	41.10

Tabla 11.- Solución de cultivo concentración 18.3 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 60 : NO_3^- 40				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	7.32	2.20	13.07	22.59
Ca^{++}	♦	♦	4.52	4.52
Mg^{++}	♦	♦	3.01	3.01
NH_4^+	♦	♦	10.98	10.98
∑	7.32	2.20	31.58	41.10

Solución de cultivo concentración 18.3 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 80 : NO_3^- 20				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	3.66	2.20	13.99	19.85
Ca^{++}	♦	♦	3.97	3.97
Mg^{++}	♦	♦	2.65	2.65
NH_4^+	♦	♦	14.64	14.64
∑	3.66	2.20	35.24	41.10

Solución de cultivo concentración 18.3 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 100 : NO_3^- 0				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	♦	2.20	14.90	17.10
Ca^{++}	♦	♦	3.42	3.42
Mg^{++}	♦	♦	2.28	2.28
NH_4^+	♦	♦	18.30	18.30
□	0.00	2.20	38.90	41.10

Solución de cultivo concentración 9.2 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 0 : NO_3^- 100				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	□
K^+	9.20	2.20	19.43	30.83
Ca^{++}	♦	♦	6.17	6.17
Mg^{++}	♦	♦	4.11	4.11
NH_4^+	♦	♦	♦	0.00
∑	9.20	2.20	29.70	41.10

Solución de cultivo concentración 9.2 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 20 : NO_3^- 80				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	7.36	2.20	19.89	29.45
Ca^{++}	♦	♦	5.89	5.89
Mg^{++}	♦	♦	3.93	3.93
NH_4^+	♦	♦	1.84	1.84
∑	7.36	2.20	31.54	41.10

Solución de cultivo concentración 9.2 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 40 : NO_3^- 60				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	5.52	2.20	20.35	28.07
Ca^{++}	♦	♦	5.61	5.61
Mg^{++}	♦	♦	3.74	3.74
NH_4^+	♦	♦	3.68	3.68
∑	5.52	2.20	33.38	41.10

Solución de cultivo concentración 9.2 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 60 : NO_3^- 40				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	3.68	2.20	20.81	26.69
Ca^{++}	♦	♦	5.34	5.34
Mg^{++}	♦	♦	3.56	3.56
NH_4^+	♦	♦	5.52	5.52
∑	3.68	2.20	35.22	41.10

Solución de cultivo concentración 9.2 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 80 : NO_3^- 20				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	1.84	2.20	21.27	25.31
Ca^{++}	♦	♦	5.06	5.06
Mg^{++}	♦	♦	3.37	3.37
NH_4^+	♦	♦	7.36	7.36
∑	1.84	2.20	37.06	41.10

Solución de cultivo concentración 9.2 mM de Nitrógeno y forma en proporción NH_4^+ 100 : NO_3^- 0				
Meq L^{-1}	**NO_3^-**	**$H_2PO_4^-$**	**$SO_4^=$**	∑
K^+	♦	2.20	21.73	23.93
Ca^{++}	♦	♦	4.79	4.79
Mg^{++}	♦	♦	3.19	3.19
NH_4^+	♦	♦	9.20	9.20
∑	0.00	2.20	38.90	41.10

Anexo 4: Elaboración de soluciones nutritivas

		Fuente de nutrientes (mg L^{-1})							
Concentración de N (mM)	**Proporción NH_4^+:NO_3^-**	**KH_2PO_4**	**$Ca(NO_3)_2.4H_2O$**	**$(NH_4)_2SO_4$**	**K_2SO_4**	**KNO_3**	**$Mg(NO_3)_2.6H_2O$**	**$CaSO_4.2H_2O$**	**$MgSO_4.7H_2O$**
36.6	0:100	299.4	727.93	0	200.45	2661.46	526.92	0	0
	20:80	299.4	582.35	483.63	180.84	2129.17	421.54	11.62	11.09
	40:60	299.4	436.76	967.26	161.23	1596.87	316.15	23.25	22.19
	60:40	299.4	291.17	1450.9	141.62	1064.58	210.77	34.87	33.28
	80:20	299.4	145.59	1934.53	122.01	532.29	105.38	46.49	44.37
	100:0	299.4	0	2418.16	102.4	0	0	58.12	55.46
18.3	0:100	299.4	0	0	899.82	1850.13	0	530.81	506.56
	20:80	299.4	0	241.82	979.57	1480.1	0	483.54	461.45
	40:60	299.4	0	483.63	1059.31	1110.08	0	436.27	416.34
	60:40	299.4	0	725.45	1139.05	740.05	0	389.0	371.23
	80:20	299.4	0	967.26	1218.79	370.03	0	341.73	326.12
	100:0	299.4	0	1209.08	1298.54	0	0	294.46	281.01
9.2	100:0	299.4	0	0	1692.89	930.12	0	530.81	506.56
	80:20	299.4	0	121.57	1732.98	744.1	0	507.04	483.88
	60:40	299.4	0	243.14	1773.07	558.07	0	483.28	461.2
	40:60	299.4	0	364.71	1813.16	372.05	0	459.52	438.52
	20:80	299.4	0	486.28	1853.24	186.02	0	435.75	415.85
	0:100	299.4	0	607.84	1893.33	0	0	411.99	393.17

Anexo 5: Micronutrientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 1962.

Tabla 21
Solución micronutrientes

Micronutrientes del Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 1962	
Stock	mg l^{-1}
Yoduro de Potasio KI	0.83
Ácido Bórico H_3BO_3	6.2
Sulfato de Manganeso $MnSO_4 \cdot H_2O$	16.9
Sulfato de Zinc $ZnSO_4 \cdot H_2O$	8.3
Molibdato de Sodio $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
Sulfato Cúprico Anhidro $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025

Anexo 6: Imágenes *L. autumnalis*

Raíz Parte aérea

36.6 mM N NH_4^+:NO_3^- 20:80

Raíz Parte aérea

36.6 mM N NH_4^+:NO_3^- 40:60

Anexo 7: Imágenes *L. speciosa*

Raíz

Parte aérea

18.3 mM N NH_4^+:NO_3^- 20:80

Raíz

Parte aérea

36.6 mM N NH_4^+:NO_3^- 20:80