



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Campus Iztacala

801024/94

Ej. 2

"EFECTO DE LA CONCENTRACION  
DE MACRONUTRIENTES Y LA  
FUENTE DE NITROGENO EN LA  
GERMINACION Y CRECIMIENTO DE  
*Lemboglossum cervantensii*  
(LLAVE ET LEX) HALBINGER".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

JOSE LUIS PEREZ LEAL

México D.F. 1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"EFECTO DE LA CONCENTRACION  
DE MACRONUTRIENTES Y LA  
FUENTE DE NITROGENO EN LA  
GERMINACION Y CRECIMIENTO DE  
*Lemboglossum cervantensii*  
(LLAVE ET LEX) HALBINGER".

Este trabajo se realizó en el JARDIN BOTANICO-INVERNADERO de la  
ENEP IZTACALA

A mis padres

Gloria Leal Flores  
Salvador Pérez Paz

A mis hermanos

Miguel, Salvador, Rosa María, Martín†, Federico† y Jorge †.

A mi esposa

Norma

A mi hija

Normita

A mis maestros y amigos

Enrique y Amaya, Jose Angel, Estanislao, Antonio Meyran y Jaime Angeles.

A Isidro †, por su constante apoyo.

Mi más sincero agradecimiento al Biólogo Alberto Arriaga Frías  
por dedicarme gran parte de su tiempo y compartir sus conocimientos  
y brindarme su amistad.

Agradezco a las siguientes personas por la atenta revisión del trabajo y las sugerencias al mismo, como por formar parte del jurado.

Biol. Alberto Arriaga Frías  
M. en C. Ernesto Aguirre León  
Biol. Manuel Mandujano Piña  
Biol. Gerardo Ortiz Montiel  
Biol. Roberto Moreno Colin

Así como al Biol. Jacobo D. Martínez M. por el apoyo brindado en el

**JARDIN BOTANICO-INVERNADERO de la ENEP IZTACALA**

# INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVO	3
REVISION DE LITERATURA	
FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA GERMINACION DE SEMILLAS DE ORQUIDEAS	
FACTORES INTERNO	
VIABILIDAD Y VIDA MEDIA	3
FACTORES EXTERNO	
AGUA, TEMPERATURA, LUZ Y COMPOSICIÓN DE GASES	4
NUTRICION MINERAL	6
NITROGENO	7
HIPOTESIS	8
MATERIAL Y METODOS	9
DISEÑO EXPERIMENTAL	10
RESULTADOS	11
ANALISIS DE RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFIA	20

# RELACION DE FIGURAS

## ESQUEMA 1.- Desarrollo de *Cattleya*

Figura 1.- Porcentaje de germinación de los medios utilizados

Figura 2.- Velocidad de crecimiento

Figura 3a.- Porcentaje de germinación: Nitrato - Amonio

Figura 3b.- Porcentaje de germinación: Nitrato

Figura 3c.- Porcentaje de germinación: Amonio

Figura 4a.- Velocidad de crecimiento: Nitrato - Amonio

Figura 4b.- Velocidad de crecimiento: Nitrato

Figura 4c.- Velocidad de crecimiento: Amonio

# RELACION DE CUADROS

Cuadro 1.- Distribución de los tratamientos de los medios de cultivo

Cuadro 2.- Porcentajes de los estadios de desarrollo de las seis revisiones

Cuadro 3.- Indices de crecimiento de las seis revisiones efectuadas

Cuadro 4.- Porcentajes de germinación

Cuadro 5.- Velocidad de crecimiento

Cuadro 6.- Correlación de concentración molar y velocidad de crecimiento

Cuadro 7.- Correlación de concentración molar y germinación

Cuadro 8.- Porcentaje de germinación

ANEXO 1.- Composición química de los medios utilizados

ANEXO 2.- Composición y concentración de los medios Murashige-Skoog y Knudson

ANEXO 3.- Concentración molar de los diferentes medios.



# RESUMEN

Se implementó una metodología para la propagación de la orquídea ***Lemboglossum cervantesii*** (Llave et Lex) Halbinger por medio de semillas utilizando el medio de cultivo Murashige & Skoog (M/S) con 27 combinaciones de macronutrientes y fuentes de nitrógeno; el medio Knudson C (KN-C) con tres combinaciones en la fuente de nitrógeno. Evaluando la germinación y el crecimiento, se observan profundas diferencias en estas, atribuyendo el efecto a las combinaciones y concentraciones de los nutrientes empleados. Se realizó una prueba estadística de correlación de Spearman y se encontró que la concentración molar de los nutrientes y las fuentes de nitrógeno influyen directamente de manera negativa en la germinación y el crecimiento de ***L. cervantesii***.

Se discute el uso del medio KN-C, ya que el M/S modificado demostró ser más eficaz en combinación y concentración apropiada de macronutrientes incluyendo las fuentes de nitrógeno.

# INTRODUCCION

La orquídea ***Lemboglossum cervantesii*** (Llave et Lex) Halbinger, pertenece a uno de los géneros más hermosos del grupo, con su riqueza de floración y elegancia; es una planta resistente que florece a la intemperie en la Ciudad de México, incluso en las épocas más frías del año. En la región del Estado de México se encuentra en bosques húmedos, sobre árboles de encino (*Quercus spp.*), conviviendo con otras orquídeas de los géneros *Laelia*, *Oncidium*, *Epidendrum* y *Pleurotallis*, entre otras.

El género ***Lemboglossum*** presenta numerosos híbridos fértiles en cultivo y, aun cuando pocas especies mexicanas se han usado en la producción de híbridos, existe un buen porvenir para la mayoría de las especies de orquídeas, (Wright, 1958).

La sobreexplotación de los bosques y el avance de la agricultura en el país, y en el caso que nos ocupa, en el Estado de México, han provocado que se vean disminuidas las poblaciones naturales de orquídeas, aunado a que las semillas en el campo solo germinan si son infectadas por un hongo que deja a disposición azúcares solubles y vitaminas principalmente, (Daubenmire, 1976). De las semillas producidas menos del 5% logran germinar (Rao, 1977), este porcentaje se reduce todavía debido a que las plántulas tienen pocas probabilidades de establecerse en un sitio propicio para su desarrollo y llegar al estado adulto, (Dressler, 1981).

El cultivo "in vitro" de semillas de orquídeas permite la obtención de un considerable número de plantas con un manejo apropiado permitiría la repoblación de nuevas áreas en reservas ecológicas y/o jardines botánicos, este cultivo bajo condiciones axénicas, solo fue posible después que el Dr. Lewis Knudson formuló el primer medio básico en 1921 (Ospina, 1958; Arditti, 1967) y desde entonces muchos estudios se han hecho de los factores internos y externos que influyen en la germinación de semillas de orquídeas: internos (viabilidad y vida media) y externos (agua, temperatura, luz y composición de gases).

# OBJETIVO

Este trabajo pretende determinar el efecto que tiene el nitrógeno en la germinación y crecimiento sobre las semillas de orquídea *Lemboglossum cervantesii*, suministrado en forma de: amonio, nitrato y ambos; así como conocer la influencia de diferentes concentraciones de la fuente de nitrógeno y por último saber la consecuencia de varias concentraciones de macronutrientes, utilizando los medios Knudson C (KN-C) y Murashige y Skoog (M/S)

## REVISION DE LITERATURA

### **FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA GERMINACION DE SEMILLAS DE ORQUIDEAS**

#### **FACTORES INTERNOS**

##### VIABILIDAD Y VIDA MEDIA

El lapso de tiempo que las semillas pueden retener su capacidad para germinar se denomina "*VIABILIDAD*", esta es extremadamente variable y está determinada genéticamente, así la viabilidad y las condiciones de almacenaje pueden tener un efecto decisivo en la vida media de las semillas, (Mayer, 1982).

En general la viabilidad es conservada mejor bajo condiciones en las cuales la actividad metabólica se encuentra reducida, por ejemplo: baja temperatura, humedad ambiental reducida y alta concentración de bióxido de carbono, (Davis, 1946).

En las semillas de orquídeas la vida media es muy variable, desde nueve meses en algunos casos, hasta menos de dos meses. En condiciones especiales de temperatura y humedad relativa se han logrado mantener hasta 18 años (Arditti, 1967). En algunos casos las semillas pueden ser apomícticas (Arditti, 1967), por lo que no existe un embrión y de estar presente no es viable, pudiéndose comprobar con la prueba de Cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC), (Fretz et al, 1979).

## FACTORES EXTERNOS

### AGUA, TEMPERATURA, LUZ Y COMPOSICION DE GASES

Las variaciones de estos requerimientos oscilan de acuerdo a las especies y están determinadas por las condiciones que prevalecen durante la formación de semillas, y más aun por factores hereditarios, (Mayer, 1982). La entrada de agua a la semilla depende de: la composición de la semilla, la permeabilidad de las cubiertas de la semilla o el fruto y la disponibilidad del agua en forma líquida o gaseosa. En especies de semilla grande, el agua es de suma importancia ya que permite el rompimiento de las cubiertas que protegen a ésta. En las orquídeas es de considerable importancia el agua ya que debido a las estructuras especializadas del embrión y las cubiertas, no se imbiben fácilmente.

En el laboratorio las semillas son generalmente colocadas en agar, el cual proporciona hasta 100% de humedad relativa (Murshige, 1974), humedad suficiente para germinar. Arditti (1967) considera una humedad relativa óptima para germinar semillas de orquídea la de un 70 a 80%.

Existen diferentes intervalos de temperatura en los cuales las semillas pueden determinar, dependiendo de la especie, así se encuentra que hay un máximo y un mínimo de temperatura en las cuales la germinación está disminuida pero no evitada y usualmente entre éstas hay un óptimo en el cual ocurre un máximo porcentaje de germinación en el tiempo más corto, por otro lado se sabe que existen requerimientos de temperaturas altas y bajas alternadas para que ocurra la germinación en especies como *Rumex crispus*, *Cynodon dactylon*, *Nicotiana tabacum*, *Holcus lanatus* y *Agrostis alba* entre otras.

En las orquídeas los datos sobre requerimientos de temperatura han sido muy escasos, debido tal vez a que germinan bien, y especies de difícil germinación como *Vanilla spp.*, *Galeola septentrionalis* y *Cattleya sp.*, la información en general concierne a la temperatura que está a disposición como subproducto de otro tipo de investigación; o de experiencias de propagadores prácticos, ya que las condiciones experimentales así como

las técnicas y medios de cultivo varían considerablemente y es difícil delimitar conclusiones válidas, por lo que en general se aceptan intervalos de 6° a 40°C con "óptimos" de 20° a 25°C, (Arditti, 1967).

En las plantas silvestres existe mucha variabilidad en el comportamiento respecto a la luz, por lo que se han dividido en plantas que germinan en la oscuridad; en luz continua; en oscuridad con corta iluminación e indiferentes a la presencia o ausencia de luz, (Cronquist, 1981).

En orquídeas no se reportan estudios de calidad de luz, enfocándose los que hay en duración e intensidad, así especies terrestres como *Vanilla* y *Cypripedium* germinan bien en oscuridad, algunas en luz u oscuridad (Arditti, 1967), pero en estadios posteriores el desarrollo se ve afectado si no hay luz, formándose protocormos pequeños, hojas escamiformes y, no hay desarrollo de raíces, (Kohl, 1962). En general las especies epífitas germinan en presencia de luz u oscuridad, mientras que las especies terrestres requieren oscuridad para germinar (Arditti y Ernts, 1984; Van Waes, (1986). Los fotoperíodos utilizados varían de 12 a 18 horas de luz, con intensidades de 100 a 200 bujías-pie (Arditti, 1977).

La germinación como proceso relacionado a los seres vivos requiere un suministro de energía, ésta es usualmente proporcionada por procesos de oxidación en presencia o ausencia de oxígeno (respiración o fermentación), en estos fenómenos intervienen intercambios de gases como salida de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y entrada de oxígeno (O<sub>2</sub>), consecuentemente la germinación de semillas se ve afectada por la composición de la atmósfera.

La mayoría de las semillas germinan en una atmósfera normal que contiene 20% de O<sub>2</sub> y 0.03% de CO<sub>2</sub>. Algunos autores han mostrado que ciertas especies como *Xanthium* y algunos cereales responden en un incremento de germinación a aumentos de oxígeno por encima del 20%, a niveles inferiores casi todas las especies muestran menor germinación, algunas como la lechuga presentan un 96% de germinación a 20% de O<sub>2</sub>, un 79% a 15% de O<sub>2</sub> y un 58% de germinación a 5% de O<sub>2</sub>, sin embargo el crecimiento de las plántulas se detiene a 15% de oxígeno (Harel y Mayer, 1963, cit. por Mayer, 1982).

Anteriormente se aceptaba que el arroz germinaba en condiciones de anaerobiosis, sin embargo se demostró que tales condiciones llevaban a la formación de plántulas anormales y esto se corrige por la presencia de oxígeno (Tang, Wang y Chih, 1950 y Chu Tang, 1979, cit. por Mayer, 1982). En contraste un cierto número de especies muestran un incremento de germinación cuando se disminuye el contenido de oxígeno por debajo del 20%, esto se observa en plantas como *Typha latifolia* y *Cynodon dactylon*, las cuales germinan mejor a niveles de oxígeno de 8% en el aire. Otro caso como *Trifolium subterraneum*, pre-incubando sus semillas en ausencia de oxígeno da como resultado subsecuente una alta germinación, este podría ser un caso de rompimiento de dormancia, (Dormancia: impermeabilidad de las cubiertas de las semillas a ciertos gases). En 1969, Veyret mostró que la cutícula de ciertas orquídeas terrestres provocan un tipo de dormancia mecánica, ya que la cutícula le impide el paso de nutrientes, (Withner, 1974).

El efecto del CO<sub>2</sub> es generalmente contrario al del oxígeno, en la mayoría de las semillas decae su germinación al incrementar el nivel normal de CO<sub>2</sub>, sin embargo, en algunos casos la presencia de pequeñas cantidades de éste, en casos como *Phlenum pratense* que la germinación se incrementa al aumentar el nivel de CO<sub>2</sub>, (Maier, 1933, cit. por Mayer, 1982).

En las técnicas empleadas para la germinación de orquídeas, el problema de la composición y el intercambio de gases han sido considerados (Arditti, 1967), en pruebas con diferentes recipientes y tapas muestran que en la mayoría de los casos la cantidad y naturaleza del intercambio gaseoso es satisfactorio, que la plántula y semillas en germinación puede adaptarse a una variedad de condiciones atmosféricas, así semillas de *Calanthe discolor* y *C. d. x C. sieboldii*, germinan bien en recipientes herméticos o aireados.

Las semillas de la orquídea terrestre *Galeola septentrionalis* solo germinan en recipientes herméticos (Arditti, 1977), a concentraciones de oxígeno de 5% (25% del normal atmosférico) y bióxido de carbono de 8% (25000% más de la normal atmosférico) que son esenciales para la germinación de esta especie terrestre. En especies epífitas, la mayor germinación se logra con 10% de O<sub>2</sub> y 6% de CO<sub>2</sub>, los rangos de tolerancia fueron de 12% a 15% de oxígeno y presiones de 1.1 a 2.0 Kg X cm<sup>-2</sup> (Nakamura et al, cit. en Alditti, 1984). Otros gases como el etileno se ha visto que promueven la germinación de algunas semillas, a concentraciones de 2 a 8 ml X l<sup>-1</sup> se ha visto favorecida la germinación.

El uso de presiones da hasta 200 atmósferas han tenido poco efecto en la germinación de semillas, (Vidaver, 1972, cit. por Mayer, 1982). En las técnicas empleadas para la germinación de orquídeas, el problema de la composición y el intercambio de gases han sido considerados, en general, la germinación de orquídeas en recipientes herméticos es igual que en no herméticos, en pruebas con diferentes recipientes y tapas muestran que en la mayoría de los casos la cantidad y naturaleza del intercambio gaseoso es satisfactorio o que las plántulas y semillas en germinación pueden adaptarse a una variedad de condiciones atmosféricas, (Arditti, 1967).

## NUTRICION MINERAL

En general se acepta que la mayoría de los medios de cultivo utilizados para la germinación de las semillas de orquídeas proveen una cantidad "apropiada" de nutrientes y que además, las orquídeas pueden adaptarse a una amplia gama de concentraciones que varían desde 102 ppm, hasta muchas veces esta concentración, (Arditti, 1984). Por lo que tentativamente se establece generalizaciones; así, especies terrestres requieren para germinar medios de cultivo tan diluidos como el medio Knudson B (Lugo-Lugo, 1955) o medios de cultivo sin macronutrientes en especies terrestres europeas (Van Waes, 1986).

Lo que hoy día ha llevado a la formulación de medios de cultivo para semillas de orquídeas que intentan ser los más generalmente aceptables para determinado grupo de orquídeas, (ANEXO I).

## NITROGENO

Considerado como un factor relevante en la germinación de las semillas de orquídeas, (Arditti, 1967), el nitrógeno no solo influye en el rango de crecimiento, sino también en la actividad metabólica, síntesis natural de productos, biomasa y gran parte de la morfología celular y desarrollo de los tejidos. Ha permitido que sea utilizado ampliamente medios de cultivo con amonio, nitrato o combinaciones de ambos, (Filner, 1982; Yoshida, 1982), e incluso con otras fuentes de nitrógeno como la urea, aminoácidos y nucleótidos (Curtis, 1947; Spoerl, 1948).

Se ha observado que la variación de la concentración de nitrógeno tiene un efecto directo en la germinación de las semillas de orquídeas (Arditti, 1967; 1977), en bajas concentraciones la germinación se ve favorecida, mientras que altas son inhibitorias (Lugo-Lugo, 1955; Arditti, 1977).

Algunas orquídeas durante los primeros estadios son incapaces de utilizar el nitrógeno en forma de nitrato, hasta la aparición de la enzima nitrato-reductasa (Raghavan y Torrey, 1964; Withner, 1974), enzima que permite la utilización del nitrato (Fletcher, 1982; Strasburger, 1985; Arditti, 1967; Dougal, 1980) y aparece con el desarrollo de la capacidad fotosintética (Raghavan y Torrey, 1964).

La absorción del nitrógeno es modificada por el pH, oxígeno, algunos micronutrientes, luz (Wiesman, 1956), carbohidratos (Yates y Curtis, 1949) y algunos macronutrientes como el potasio (Curtis y Spoerl, 1948).

Más recientemente se acepta que en la asimilación de nitrato, se encuentra mediada por dos enzimas separadas: nitrato reductasa, la cual reduce el nitrato a nitrito y la nitrito reductasa, la cual reduce el nitrito a amonio. La primera se localiza en el citoplasma de las células, es activa mientras exista nitrato y se inhibe en presencia de amonio y ciertos aminoácidos o amidas. La segunda se encuentra presente en los cloroplastos, convierte el nitrito en amonio, (Marschner, 1986).

Mientras el nitrato pueda ser almacenado en vacuolas sin decremento, el amonio a bajas concentraciones es tóxico, la forma principal por la cual se evita esta toxicidad es la incorporación en la formación de aminoácidos, amidas y compuestos afines. La asimilación de amonio en las raíces requiere de un suministro grande de carbohidratos por la necesidad de esqueletos de carbono en la síntesis de aminoácidos y amidas. Esto mismo es verdadero en la asimilación de amonio por la reducción de nitrato o en la fijación de nitrógeno.

El uso de amonio como fuente única de nitrógeno es muy limitado, ya que a medida que es absorbido, al pH baja, al quedar libres los radicales Cl o SO<sub>4</sub>, (Fowler, 1982), así en la germinación de las semillas de *Vanilla*, el amonio resulta menos inhibitorio que el nitrato (Lugo-Lugo, 1955). En *Cymbidium cattleya* el amonio es bueno, pero inhibitorio en *Vanda*, (Curtis y Spoerl, 1948). El uso del amonio en combinación con el nitrato es la forma más utilizada y en *Cattleya* da buenos resultados, (Curtis, 1947).

El uso de la urea ha dado resultados contradictorios, aún en especies del mismo género; la germinación es inhibida en *Cimbidium*, *Dendrobium* y *Phalaenopsis* e incrementada en *Vanilla*, (Lugo-Lugo, 1985).

El cultivo de los tejidos, los aminoácidos pueden afectar o no la nitrato-reductasa, resultando dos grupos. En primero en el cual se encuentran amoniácidos que pueden inhibirla están: alanina, aspargina, metionina, aspartato, glutamato y glutamina; y en el segundo grupo arginina y ornitina pueden reemplazar a el nitrato de amonio en cultivos de *Cattleya*, y resultan inhibitorios los aminoácidos glicina, β- alanina, valina, ácido amino butírico, leucina, fenil-glicina, hidroxiprolina, canavanina y treonina, (Raghavan y Torrey, 1964; Spoerl y Curtis, 1948).

El uso de nucleótidos y componentes relacionados presentan efectos variados en la germinación de las semillas de orquídeas y sus efectos pueden ser difíciles de evaluar, ya que los componentes de los nucleótidos son muy lábiles y pueden haber sido modificados al someterse a la esterilización en el autoclave, (Arditti, 1967).

Existen otros factores que también modifican la respuesta germinativa, como son los carbohidratos, vitaminas, hormonas y aditivos complejos como el agua de coco, la emulsión de pescado y otros, pero que no son considerados en este trabajo por ser de composición indefinida.



# HIPOTESIS

Como se tiene en antecedentes, la concentración molar de los medios de cultivo influye directamente sobre la germinación de las semillas, concentraciones molares altas provocan bajo porcentaje de germinación. Además la naturaleza de las fuentes de nitrógeno influye también en la germinación, por lo tanto se espera que a:

- una concentración de nutrientes "baja" (considerando baja la utilizada en el medio Fast, anexo 1) o "media" (medio Knudson C, anexo 1) favorecerá el porcentaje de germinación, permitiendo el crecimiento, en el medio que provea en este experimento, la fuente o fuentes de nitrógeno apropiada, y en la concentración adecuada, cuadro 1.
- una concentración "elevada" de macronutrientes (considerando a la utilizada en el medio M/S 1, anexo 1), inhibirá la germinación, aún cuando se utilicen concentraciones bajas de nitrógeno y con diferentes fuentes.
- una concentración molar "baja" del medio M/S lo más cercana a Knudson C, producirá una mayor germinación y crecimiento ya que se considera más apropiado el medio M/S que el medio Knudson C.

# MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron semillas provenientes de cápsulas de la orquídea *Lemboglossum cervantesii* (Llave et Lex) Halbinger, colectadas en el pedregal de Santa Mónica, Ocuilán, Estado de México; en Noviembre de 1986.

La cápsula se desinfectó externamente con hipoclorito de sodio al 1% (Cloro comercial: hipoclorito de sodio 4-6%) dentro de una cámara de siembras en condiciones asépticas; las semillas se tomaron con pinzas de punta fina y se sembraron al azar en frascos (Gerber de 120 ml.), que contenían 20 ml. del medio de cultivo y posteriormente se adicionó 1 ml. de agua destilada estéril. Las técnicas asépticas empleadas se encuentran descritas por Street, 1973; Harrison y Arditti, 1972 y Takeuchi, 1973.

Las condiciones ambientales de incubación fueron de 28° a 29°C de temperatura con iluminación; 21° a 22°C sin iluminación; un fotoperíodo de 16 horas de luz (240 bujías-pie ) y ocho de oscuridad diaria, la iluminación la proporcionan 10 lamparas de luz fría fluorescente de 40 W, general electric.

Los factores fueron los medios de cultivo Murashige y Skoog (M/S) y Knudson C (KN-C), (ANEXO 2), a los cuales se les modificó en la parte inorgánica la concentración de macronutrientes, la fuente de nitrógeno y la concentración de la fuente de nitrógeno, estableciéndose 30 tratamientos, (Cuadro 1, ANEXO 3).

Todos los medios se ajustaron a un pH de 5.3 - 5.5, con HCl 0.1 N y/o NaOH 0.1 N.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y con unidad experimental correspondiente a un frasco con 20 ml de medio de cultivo.

Se realizaron evaluaciones a los 13, 38, 67, 144, 179 y 237 días a partir de la siembra, en las que se determinaron los estadios de desarrollo considerando los descritos por Arditti 1967 y Flamee 1978, y son los que se establecen a continuación.

### ESTADIO

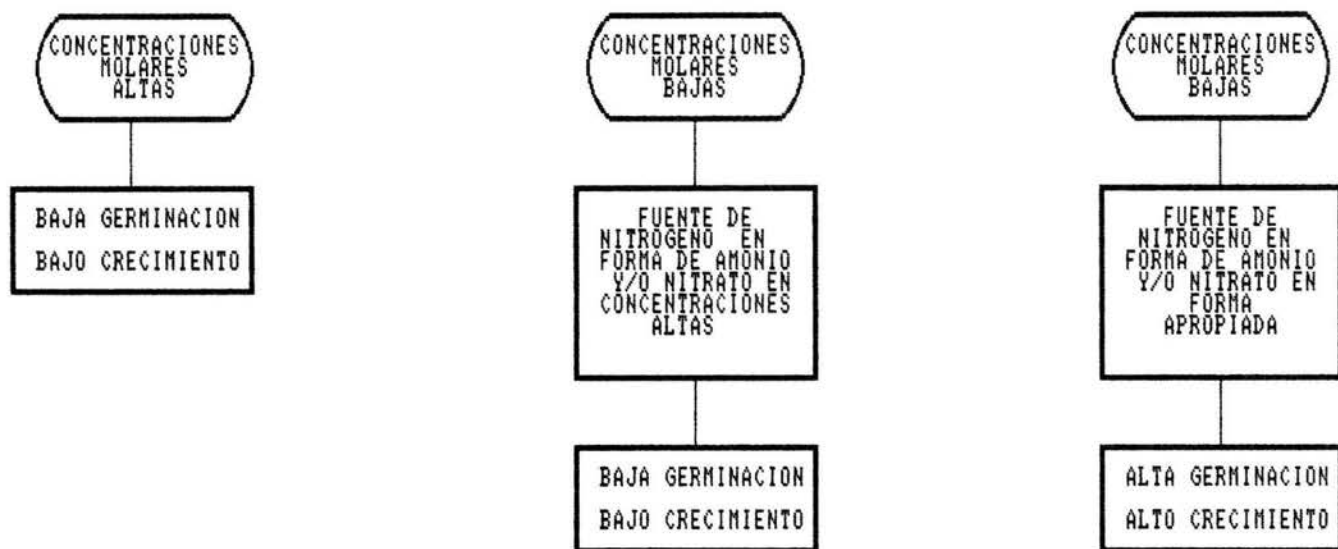
### CARACTERISTICAS

1	Semilla intacta, sin hinchar
2	Embrión hinchado sin color verde
3	Embrión hinchado con color verde, liberación del embrión de las cubiertas de la semilla
4	Protocormo temprano que muestra un ápice de crecimiento
5	Protocormo tardío discoide, mostrando primordios foliares.
6	Plántula con dos hojas extendidas
7	Plántula con dos hojas extendidas y con una o más raíces

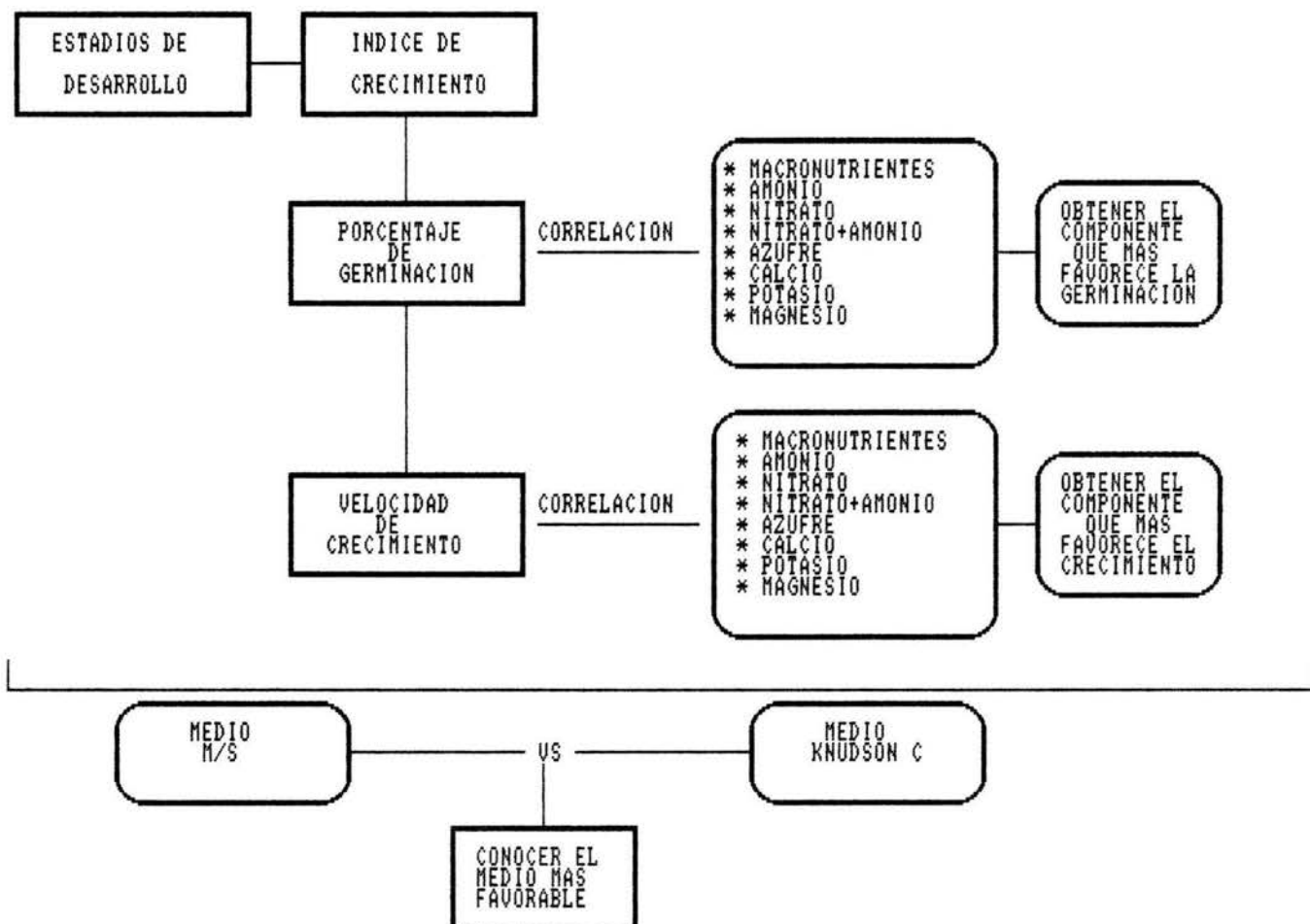
Usando el valor de los estadios de desarrollo se calcula el valor de los índices de crecimiento: en muestras aleatorias de 200 plántulas se clasifican clases 1, 2, 3 y así sucesivamente, que contienen los diferentes estadios de desarrollo, el porcentaje de cada clase se multiplica por el número de clase y los productos finales se suman, (tomado de Curtis, 1947; Yates y Curtis, 1949), así en un tratamiento tenemos el 50% en estadio clase 1, 20% en estadio 2 y 30% en estadio 3, resulta:  $50 \times 1=50$ ,  $20 \times 2=40$  y  $30 \times 3=90$ , esto es igual al índice de crecimiento de 180.

Además de la evaluación de estadios de desarrollo, se determinó el porcentaje de germinación, para el presente trabajo se consideró definirlo como el porcentaje que alcanza al llegar al estadio de protocormo temprano; se comparó la composición de los medios de cultivo: amonio, nitrate, nitrógeno total, potasio, azufre, calcio, magnesio, macronutrientes totales y componentes totales contra el porcentaje de germinación y contra la velocidad de respuesta; adicionalmente se evaluó el porcentaje de contaminación.

# DIAGRAMA DE FLUJO DE INVESTIGACION



## GERMINACION Y CRECIMIENTO



# RESULTADOS

## ESTADIOS DE DESARROLLO

En el Cuadro 2, se presentan los valores en porcentajes de estadios de desarrollo, (Esquema 1), las columnas corresponden a las seis revisiones efectuadas a los 13, 38, 67, 144, 179 y 237 días de la siembra, estos valores se utilizaron para calcular los índices de crecimiento.

## INDICES DE CRECIMIENTO

Los índices de crecimiento se obtienen según Curtis 1947, Yates y Curtis 1949, representados en el Cuadro 3, estos valores proporcionan una buena forma para comparar la evolución de el medio de cultivo, pero no posibilita la comparacion entre los diferentes tratamientos M/S y KNC, debido a lo limitado de los tratamientos de KNC.

## PORCENTAJES DE GERMINACION

En la Figura 1, se muestran los resultados, nótese los valores más altos alcanzados en los medios M/S 7, 16, 17, 25 y KN 3, así como los valores más bajos de los medios M/S 1, 10, 20 y KN 1, (Cuadro 4).

## VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Para poder evaluar el efecto de los 30 tratamientos en el crecimiento de los protocormos se calcula la velocidad de crecimiento, que es en este caso la pendiente de la recta obtenida en la regresión lineal de los índices de crecimiento y el tiempo a partir de la siembra de unidades de día, estos valores los encontramos en Cuadro 5 y la Figura 2. Pueden observarse que los valores de velocidad de crecimiento más altos corresponden a los medios M/S 6, 7, 16, 17, 22, 24 y 25, los de más baja a los medios M/S 1, 14, 15, 19, 20 y KN 1.

## COMPONENTES DE LOS TRATAMIENTOS Y

### LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Para determinar el o los componentes de los medios de cultivo que más influyen en la velocidad de crecimiento se aplicó una prueba de regresión lineal y un análisis de correlación, entre la concentración molar de los componentes de cada uno de los tratamientos (amonio, nitrato, nitrógeno total, potasio, azufre, calcio, magnesio, total de macronutrientes y total de componentes (ANEXO 1), contra la velocidad de crecimiento en el Cuadro 5, estos valores de correlación los tenemos en el Cuadro 6, encontrando que los valores de más correlación corresponden a macronutrientes totales y de menor correlación al azufre, esto es para el medio M/S, para el medio KN se observa algunas diferencias que se discuten más adelante.

## COMPONENTES DE LOS TRATAMIENTOS Y LA GERMINACION

De igual forma que en la prueba anterior, en el Cuadro 7, se observan los valores correspondientes de el análisis de correlación de los componentes de los tratamientos y los porcentajes de germinación, de lo que se observa para el medio M/S los componentes totales, seguido de macronutrientes totales y nitrógeno total, son los que más afectan la germinación y en último lugar a el magnesio; para el medio KN los componentes que más afectan son componentes totales, macronutrientes totales y nitrógeno total, y por último el nitrato.

## PORCENTAJES DE CONTAMINACION

Finalmente se evaluó el porcentaje de contaminación, (Cuadro 8), de los medios de cultivo, encontrando valores inicialmente a los 13 días de 0.33%, hasta llegar a un 6.6% de contaminación, esto se explica por la constante manipulación que se realizó en todas las evaluaciones.

# ANALISIS DE RESULTADOS

## PORCENTAJES DE ESTADIOS DE DESARROLLO

Los valores obtenidos denotan el grado de desarrollo a través del tiempo de *Lemboglossum cervantessi* en los diferentes tratamientos. Estos valores se utilizan para obtener los índices de crecimiento (Cuadro 3). Los índices de crecimiento muestran como el medio M/S 1 inicialmente presenta un índice de crecimiento de 200, y por lo contrario el M/S 27 un índice de 184.4 y ya en la 6a. revisión el índice en M/S 1 es de 30 mientras que en M/S 27 conserva un buen índice de 406.25. Para los medios Knudson se observan valores altos en KNC 3 y en orden decreciente KNC 2 y KNC 1.

Con estos datos no se puede diferenciar con más certeza el desempeño final en cada medio de cultivo.

## PORCENTAJE DE GERMINACION

Como a la fecha se sabe, la mayoría de los medios usados en la germinación de semillas de orquídeas son más concentrados que las soluciones que nutren las plántulas de orquídeas en la naturaleza (Arditti, 1984). En el presente trabajo se puede observar que la concentración molar de los medios de cultivo influye directamente en la germinación de las semillas de *Lemboglossum cervantessi*, (Cuadro 4 y Fig. 1) se tiene que medios de concentración molar elevada de todos los componentes como en el caso de los medios M/S 1, 10, 14, 15, 16, 18, 19, 20, y KNC 1 los cuales presentan valores de germinación bajos, y por el contrario una baja concentración molar de todos los componentes tiene un efecto favorable en la germinación en el caso de los medios 7, 16, 17, 25, 26 y KNC 3 (Arditti 1984 y Van Waes 1986).

Estos mismos resultados reordenados en las figuras 3a, 3b y 3c, nos muestran más claramente el efecto de los tratamientos con una relación casi lineal en los medios que utilizan ambas fuentes de nitrógeno (nitrato y amonio) y con un efecto en la germinación que a mayor concentración, menor germinación medios M/S 1, 4, 7, M/S 10, 13, 16, M/S 19, 22, 25, (Anexo 3). En los medios con únicamente nitrato como fuente de nitrógeno y a concentraciones de macronutrientes de 100 y 50% la germinación es menor (M/S 3, 6, 9, 12, 15 y 18) que a concentraciones de macronutrientes de 25% medios M/S 21, 24 y 27. En los medios con solo amonio como fuente de nitrógeno observamos una mayor germinación

usando macronutrientes a 25% medios M/S 20, 23 y 26, con una menor germinación a 50% y 100% de macronutrientes medios M/S 11, 14, 17, 2, 5 y 8..

En las variantes de los medios Knudson se observa un mejor comportamiento utilizando las dos fuentes de nitrógeno, en seguida el nitrato muestra ser más efectivo y finalmente el amonio. Sin embargo se reporta que entre el amonio y nitrato, es el primero el que mayor efecto tiene en la germinación de *Lemboglossum cervantessi*, *Cattleya* y *Vanda* (Curtis y Spoerl 1948; Rahavan y Torrey 1964) y *Vanilla* (Lugo-Lugo, 1955) posiblemente por ser la forma de nitrógeno más asimilable (Fowler, 1982).

## VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Denominada como la pendiente de la regresión lineal con los índices de crecimiento en el tiempo (Cuadro 5) permite ver medios que presentan la más alta velocidad de crecimiento M/S 7, 16, 17 y KNC 3, y por el contrario los medios con la más baja velocidad en los medios M/S 1 (Fig. 2).

Realizando un arreglo de esta en las figuras 4a, 4b y 4c, se puede ver el efecto de las fuentes de nitrógeno y al igual que en la germinación, el crecimiento se ve favorecido por la mezcla de las fuentes a baja concentración. El efecto que presenta el nitrato y el amonio solos, no es fácil de interpretar, por lo que se aplica una regresión seguida de una correlación (Cuadro 6) y en la que se obtiene que el mayor efecto sobre el crecimiento lo tiene macronutrientes totales. En los medios M/S 1, 10 y 19 con concentraciones molares de 98.75, 86.27 y 84.53 respectivamente, se observa una baja velocidad de crecimiento. Los medios M/S 7, 16 y 25 con concentraciones de 30.64, 27.16 y 42 respectivamente son los que presentan una velocidad de crecimiento óptima.

En segundo término y con igual valor de correlación entre sí, se encuentran los componentes totales y nitrógeno total, el efecto negativo de el nitrógeno en la germinación lo reportan Lugo-Lugo 1955 y Van Waes 1986, el hecho que la velocidad de crecimiento sea similar usando nitrógeno total y los componentes totales, puede significar el grado de efecto que tiene la concentración total del medio de cultivo para influir en el desarrollo de los protocormos.

En el efecto de las fuentes de nitrógeno el valor más alto lo obtiene el nitrato, seguido de amonio y por último en este orden potasio, magnesio y azufre. Ahora bien este índice sugiere que el amonio como fuente única de nitrógeno parece ser más efectivo (menos inhibitorio) que el nitrato, de manera similar que en *Cattleya* (Curtis y Spoerl 1948).

En el caso en que se utilizan amonio y nitrato juntos se logran los más altos valores de velocidad de crecimiento justo en las combinaciones de 34.3% de amonio y 65.7% de nitrato de los medios M/S 7, 16 y 25, lo cual concuerda con lo propuesto por Uesato en 1973 (cit, por Arditti, 1984) y que propone el balance más favorable para el crecimiento de plántulas de 20-30% de amonio y 70-80% de nitrato, pero no solo es necesaria una baja



concentración de macronutrientes y un balance apropiado de amonio y nitrato, es necesaria una concentración apropiada de potasio, magnesio y aún azufre, puesto que concentraciones bajas de potasio parecen ser favorables (medios M/S 7, 9, 16, 25 y 27), así como en los medios con la concentración más baja de magnesio que es de 0.375 molar parecen también ser favorables para el crecimiento, en el caso del azufre se dificulta decir cual es el efecto que tiene sobre el crecimiento.

Esta correlación se aplica también a el medio Knudson y se obtienen los valores más altos de correlación en macronutrientes totales y nitrógeno total seguido de componentes totales, el amonio presenta más valor de correlación que el nitrato.

Al igual que en el crecimiento, en la germinación se dificulta interpretar el efecto de los elementos de los medios de cultivo por lo que se obtienen los valores de correlación en los medios M/S y Knudson (Cuadro 7), de manera similar que en el coeficiente de correlación del crecimiento, el coeficiente de correlación en la germinación es más alto para macronutrientes totales, seguida de componentes totales y nitrógeno total, y a diferencia de crecimiento, el amonio presenta un coeficiente más alto que el nitrato, seguido de potasio, azufre y magnesio, y para el medio Knudson de mayor efecto tenemos juntos macronutrientes totales, componentes totales y nitrógeno total, seguido de amonio y azufre y por último nitrato.

En suma los componentes que afectan la germinación son: macronutrientes totales, componentes totales, seguidos de nitrógeno total, concordando con lo propuesto en la hipótesis. En seguida se encontró que el uso de ambas fuentes de nitrógeno favorece la germinación y el crecimiento, y por último el efecto de las fuentes solas: nitrógeno y amonio afectan de manera diferente, siendo que afecta más el amonio en la germinación y el nitrato en el crecimiento. En el caso del medio Knudson C los resultados son inversos con las fuentes de nitrógeno, pero estos resultados pueden ser debidos a los pocos tratamientos establecidos para Knudson C, más aún recientemente Aguirre (comunicación personal) reportan mayor germinación usando el medio Knudson C "normal" (concentración completa de componentes) que "Ligero" (a la mitad de la concentración total de componentes).

## DISCUSION

Como a la fecha se sabe, la mayoría de los medios de cultivo usados en la germinación de semillas de orquídeas, tienen concentraciones molares más altas que las soluciones que nutren las plántulas de orquídeas en la naturaleza (Arditti, 1984). En el presente trabajo se puede observar que la concentración molar de los medios de cultivo influye directamente en la germinación de las semillas de ***Lemboglossum cervantesii***: medios de concentración molar elevada de todos los componentes, como los medios M/S 1, 10 y 19, (Anexo 3) son en los que se obtienen los valores de germinación más bajos, (Fig. 3a); por otro lado los medios con concentraciones molares bajas de componentes totales, tiene un efecto favorable en la germinación, por ejemplo, los medios M/S 7 y 16, y alcanzando valor óptimo de germinación el medio M/S 25 con una concentración molar de 116 mM.

Total de macronutrientes es el siguiente componente que influye sobre la germinación de ***Lemboglossum cervantesii***, seguido de nitrógeno total, lo que confirma el efecto que tiene la concentración molar de los medios de cultivo en la germinación, (Arditti, 1984; Van Waes, 1986).

De menor efecto sobre la germinación se encuentran los componentes amonio y nitrito, siendo el primero, el que mayor efecto tiene en la germinación de ***L. cervantesii***, de igual manera que en *Cattleya* y *Vanda*, (Curtis & Spoerl, 1948; Raghavan & Torrey, 1964) y *Vanilla* (Lugo-Lugo, 1955), posiblemente por ser la forma de nitrógeno más asimilable (Fowler, 1982).

Y por último de menor efecto sobre la germinación de ***L. cervantesii***, se tiene al potasio, azufre y magnesio, (en ese orden), aún cuando el índice de correlación es muy bajo, nos da una idea del efecto relativo que tienen sobre la germinación de las semillas de las orquídeas utilizados en el medio M/S.

Al analizar el medio Knudson C, no es posible afirmar lo anterior ya que aun cuando existen diferencias notorias en el proceso de germinación entre los medios KN C 1, 2 y 3, lo limitado en las variantes de la composición usada no permite confirmar el efecto de los componentes en la germinación y solo podemos afirmar que el alto valor de ésta en el medio KN 3 pudo ser debido a la relación amonio/nitrato que se utilizó en este medio.

Al analizar el efecto de los componentes sobre la velocidad de crecimiento, se observa que, al igual que en la germinación existe una correlación negativa que indica el efecto que ejercen los componentes del medio de cultivo en el crecimiento de ***L. cervantesii***, a lo que se tiene que el componente que influyó más fue el de macronutrientes totales, ya que a concentraciones como de los medios M/S 1, 10 y 19 con concentración

molar de 98.75, 86.27 y 84.53 mM, respectivamente, se observa una baja velocidad de crecimiento, en los medios 7, 16 y 25 con concentraciones de 30.64, 27.16 y 25.42 mM, respectivamente, son los que presentan una velocidad de crecimiento óptima.

En segundo término y con igual valor de correlación entre sí, se encuentran componentes totales y nitrógeno total, el efecto negativo de el nitrógeno en la germinación lo reportan Lugo-Lugo, (1955); Van Waes, (1986), el hecho que la velocidad de crecimiento sea similar usando nitrógeno total y componentes totales, puede significar el grado de efecto que tiene la concentración total del medio de cultivo para influir en el desarrollo de los protocormos.

De acuerdo al índice de correlación entre las fuentes de nitrógeno sugiere que el amonio como fuente única de nitrógeno parece ser más efectivo (o menos inhibitorio) que el nitrato, de manera similar que en *Cattleya* (Curtis & Spoerl, 1948) y al igual que en *Cattleya*, en este caso aparece la enzima nitrato-reductasa desde los primeros estadios de desarrollo ya que en los medios con nitrato como única fuente de nitrógeno no existe una inhibición de la germinación; en el caso que se utilizan amonio y nitrato juntos se logran los más altos valores de velocidad de crecimiento justo en la combinación de 34.3% de amonio y 65.7% de nitrato de los medios M/S 7, 16 y 25 y lo cual concuerda en lo propuesto por Uesato en 1973, (cit. por Arditti, 1984) y que propone el balance más favorable para el crecimiento de plántulas de 20-30% de amonio y 70-80% de nitrato, pero no solo es necesaria una baja concentración de macronutrientes y un balance apropiado de amonio/nitrato, es necesaria una concentración apropiada de potasio, magnesio y aún azufre, puesto que en concentraciones bajas de potasio parecen ser favorables (medios M/S 7, 9, 16, 25 y 27), así como en los medios con la concentración más baja de magnesio que es de 0.375 mM parecen también ser favorables para el crecimiento. Para el caso del azufre se dificulta decir cual es el efecto que tiene sobre el crecimiento.

De igual manera que en la germinación, el medio KN C no permite aventurar una hipótesis sobre el crecimiento debido a lo limitado de pruebas, pero es posible vislumbrar el efecto favorable que ejerce la combinación de nitrato y amonio para generalizar este medio el efecto que pudiera tener una alta concentración de nutrientes sobre el crecimiento que aún cuando la concentración de macronutrientes totales de los medios M/S 6 y 7 se asemeja a KN 3, los medios M/S parecen tener una mayor ventaja y permitir un mayor crecimiento, por lo que se considera superior el medio M/S sobre KN.

# C O N C L U S I O N E S

1.- La concentración molar de componentes totales influye en la germinación de *Lemboglossum cervantesii*

2.- La naturaleza de la fuente de nitrógeno influye en la germinación de *L. cervantesii*, siendo el amonio la forma de nitrógeno que afecta ligeramente más a la germinación, inhibiéndola o favoreciéndola en relación a la disponibilidad.

3.- La concentración de macronutrientes es el componente que influyó más en el crecimiento de los protocormos de *L. cervantesii*.

4.- El nitrato es la forma de nitrógeno que afecta menos el crecimiento de los protocormos.

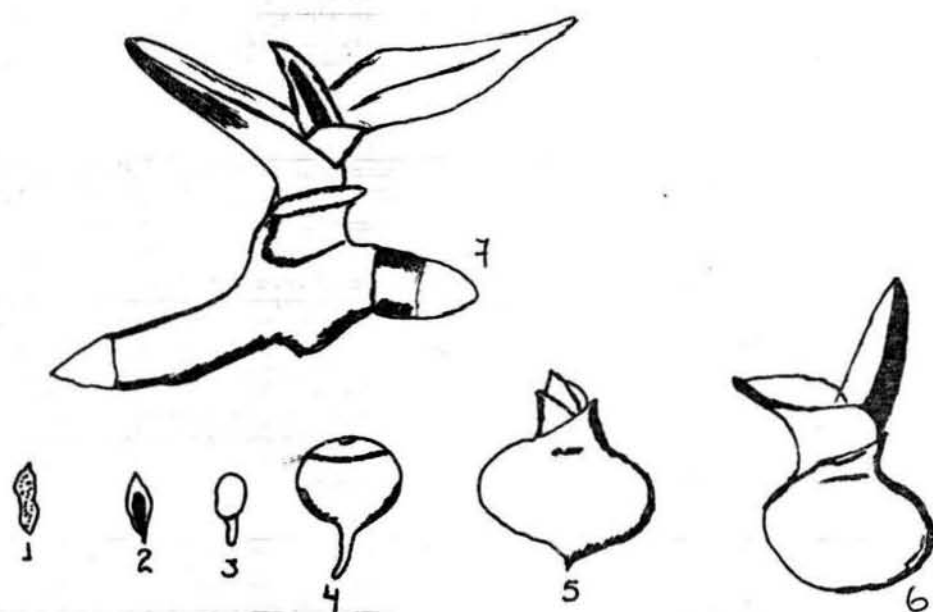
5.- Se sugiere el uso de una combinación adecuada de macronutrientes y fuente de nitrógeno que incluya amonio y nitrato en la proporción y concentraciones utilizadas en el tratamiento M/S 25 para la germinación de esta especie de orquídea.

6.- Se recomienda el uso del medio M/S modificado sobre el medio Knudson

7.- Es importante mencionar que los resultados obtenidos pueden ser validos solo para la especie estudiada en las condiciones empleadas, por lo que se propone este mismo esquema en otras especies de orquídeas mexicanas en futuras investigaciones.

## ESTADIOS DE DESARROLLO DE EMBRIONES Y PLANTULAS DE *Cattleya* spp.

- 1.- Semilla intacta sin hinchar
- 2.- Embrión hinchado sin color verde
- 3.- Embrión hinchado con color verde, liberación del embrión de las cubiertas de la semilla



- 4.- Protocormo temprano que muestra un ápice de crecimiento
- 5.- Protocormo tardío discoide, mostrando primordios foliares
- 6.- Plantulas con dos hojas extendidas
- 7.- Plantula con dos hojas extendidas y con una o más raíces.

Esquema 1, (Tomado de Arditti, 1967)

DISTRIBUCION DE LOS TRATAMIENTOS DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (M/S) Y KNUDSON (KN).

MACRONUTRIENTES SIN CONSIDERAR EL NITROGENO	CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO	FUENTE DE NITROGENO	MEDIO
	:..	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 1
	:	100% ..... : NH <sub>4</sub>	M/S 2
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 3
	:	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 4
100%.....	:	50% ..... : NH <sub>4</sub>	M/S 5
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 6
	:	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 7
	:	25%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 8
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 9
	:..	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 10
	:	100%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 11
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 12
	:	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 13
50%.....	:	50%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 14
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 15
	:	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 16
	:	25%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 17
	:..	: NO <sub>3</sub>	M/S 18
	:..	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 19
	:	100%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 20
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 21
	:	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 22
25%.....	:	50%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 23
	:	: NO <sub>3</sub>	M/S 24
	:	: NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	M/S 25
	:	25%..... : NH <sub>4</sub>	M/S 26
	:..	: NO <sub>3</sub>	M/S 27
	:..	100%..... : NH <sub>4</sub>	KN 1
100%.....	:	100%..... : NO <sub>3</sub>	KN 2
	:..	100%..... : NH <sub>4</sub> Y NO <sub>3</sub>	KN 3

Cuadro 1: TRATAMIENTOS

PORCENTAJES DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO (E.D.) EN LAS SEIS REVISIONES EFECTUADAS DE LOS MEDIOS M/S Y KNUDSON C

MEDIO	1 <sup>a</sup> E.D.		2 <sup>a</sup> E. D.		3 <sup>a</sup> E.D.		4 <sup>a</sup> E.D.		5 <sup>a</sup> E. D.		6 <sup>a</sup> E. D.	
M/S 1	5 90 5	1 2 3	95 5	3 4	68 32	3 4	80.9 19.1	1 3	96.5 3.5	3 3	90 10	3 3
M/S 2	8 60 2	1 2 3	95 5	3 4	82.7 17.3	3 4	10 75 15	1 2 4	38 62	3 4	42 58	3 4
M/S 3	10 90	1 2	95 5	3 4	33.3 66.7	3 4	98.1 1.9	3 4	72.3 27.7	3 4	3.7 77.5 18.7	3 3 4
M/S 4	9 90 1	1 2 3	20 80	2 3	81.5 18.5	3 4	77 23	3 4	20 61.1 18.8	3 3 4	8.3 20.8 70.8	3 3 4
M/S 5	10 90	1 2	10 90	2 3	17.5 92.5	3 4	100	3	100	3	85 15	3 4
M/S 6	10 90	1 2	20 80	2 3	90 10	3 4	72 28	3 4	13 87	3 4	17.7 70	3 4
M/S 7	10 90	1 2	10 90	2 3	74 26	3 4	27 73	3 4	84	4	2.3 87.5	3 4
M/S 8	10 90	1 2	10 90	2 3	1.1 93 5.9	1 3 4	3 86.9 10.1	2 3 4	73.9 26.1	3 4	100	4
M/S 9	10 90	1 2	20 80	2 3	20 80	1 3	100	3	90.5 9.5	3 4	37.5 62.5	3 4
M/S 10	10 90	1 2	20 80	2 3	90 10	3 4	100	3	96 4	3 4	98 2	3 4
M/S 11	10 90	1 2	20 80	2 3	91 9	3 4	97.5 2.5	3 4	2 36	3 3	56.2 43.7	3 4
M/S 12	10 90	1 2	20 80	2 3	10 90	1 3	10 90	2 3	64 36	3 4	36.2 63.7	3 4
M/S 13	10 90	1 2	20 80	2 3	10.6 88.8 0.5	1 3 4	100	3	60 40	3 4	36.7 64.3	3 4
M/S 14	10 90	1 2	5 95	2 3	10 88 2	1 3 4	5 85.5 9.5	1 2 3	100	3	60 40	3 4
M/S 15	5 95	1 2	5 90 5	1 2 3	10 90	1 3	100	3	100	3	40 60	3 4
M/S 16	3.3 96.6	1 2	60 40	2 3	69 31	3 4	14.5 85.5	3 4	16.5 81.5	3 4	2.5 96.2	3 4
M/S 17	9.1 90.9	1 2	40 60	2 3	69 31	3 4	32 68	3 4	25 75	3 4	10 90	3 4

M/S 18	10.9 89.1	1 2	5 90 5	1 2 3	5 5 90	1 2 3	94 6	3 4	92.4 7.6	3 4	55 45	3 4
M/S 19	12.6 87.3	1 2	90 5 5	2 3 4	90 10	3 4	66.6 33.3	3 4	90 10	* 4	99.8 1.2	* 4
M/S 20	7.2 92.8	1 2	10 90	1 2	100	3	10 81	1 3	96.1	3	83.5	3
M/S 21	10 90	1 2	10 90	1 2	84.4 15.6	3 4	91 9	3 4	38.9 61.1	3 4	10 90	3 4
M/S 22	10 90	1 2	20 80	2 3	72 28	3 4	34.6 56.8	3 4	64	4	58.7 10.3	* 4
M/S 23	12.3 87.7	1 2	5 53 42	1 2 3	4 89 7	1 3 4	3.5 57 34.5	2 3 4	76 24	3 4	20 80	3 4
M/S 24	14.3 85.7	1 2	10 80 10	1 2 3	2.2 97.8	1 3	36	3	51.1	3	8.5 58.5 32.8	3 4 5
M/S 25	10 90	1 2	10 80 10	2 3 4	74.5 24.5	3 4	1 96.5 3.4	3 4 5	64.4 35.6	4 5	30 50 20	4 5 6
M/S 26	12 88	1 2	38 62	2 3	4 41 55	1 3 4	10 19.7 65.5	1 3 4	69 31	4 5	70 10.2 19.5	* 4 5
M/S 27	15.3 84.6	1 2	12 77 11	1 2 3	42.2 57.8	3 4	6.9 85.5 7.1	* 3 4	70 30	3 4	93.7 6.3	4 5
KN 1	16.5 81.5	1 2	80 18.8 1.1	2 3 4	7.5 85 7.5	1 3 4	9 91	2 3	74 26	2 3	81.3 18.7	3 4
KN 2	13.3 86.7	1 2	10 82 8	1 2 3	7 80 13	1 2 4	39 61	2 3	48	3	61.3	3
KN 3	16.8 83.2	1 2	90 10	2 3	80 20	3 4	12.8 87.2	3 4	17.1 82.9	3 4	2 98	3 4

Cuadro 3: NOTESE QUE EN EL MEDIO M/S1 A PARTIR DE LA TERCER REVISION, EMPIEZA A DECAER, (\*=PROTOCOLORMOS MUERTOS EN ALGUNOS MEDIOS COMOEL M/S6 QUE LLEGAN AL ESTADIO QUINTO EN LA SEXTA REVISION



INDICES DE CRECIMIENTO DE LAS SEIS REVISIONES DE LOS MEDIOS M/S 1 AL 27 Y  
KN 1, 2 Y 3

MEDIOS	1a	2a	3a	4a	5a	6a
M/S 1	200	305	332	57.3	10.5	30
M/S 2	194	305	317.3	285	362	358
M/S 3	190	305	366.7	301.9	327.7	307.5
M/S 4	192	280	318.5	323	258.5	345.72
M/S 5	190	290	382.5	300	300	315
M/S 6	190	280	310	328	387	394.6
M/S 7	190	290	326	373	416	408.9
M/S 8	190	290	303.7	307.1	326.1	400
M/S 9	190	280	260	300	309.5	326.5
M/S 10	190	280	300	300	304	302
M/S 11	190	280	309	302.5	356	343.75
M/S 12	190	280	280	290	336	363.75
M/S 13	190	280	379.32	300	340	367.3
M/S 14	190	295	282	204.5	300	340
M/S 15	190	200	280	300	300	360
M/S 16	196.5	300	331	385.5	375.5	389.75
M/S 17	190.9	260	331	368	375	390
M/S 18	189.1	200	285	306	307.6	345
M/S 19	187.35	195	310	333.4	220	204.4
M/S 20	192.8	190	300	289	303.9	316.43
M/S 21	190	190	315.6	309	361.1	390
M/S 22	190	280	328	365.4	436	216.51
M/S 23	187.7	237	292	336	324	380
M/S 24	186.04	200	295.6	364	348.9	424.24
M/S 25	190	300	325.5	406	435.6	490
M/S 26	188	262	347	355.1	431	145.5
M/S 27	184.5	199	357.8	284.9	330	406.25
KN 1	181.44	220.8	282.5	291	226	318.75
KN 2	186.65	198	299	261	452	338.75
KN 3	183.16	210	320	387.11	382.86	398

Cuadro 3: SE PUEDE OBSERVAR COMO EL MEDIO M/S 1 TIENE UN CRECIMIENTO RAPIDO, PERO TAMBIEN SU VALOR BAJA ABRUPTAMENTE; EN OTROS MEDIOS EL VALOR NO CAE TAN RAPIDO, INCLUSO EN OTROS COMO EL M/S 25 Y KN 3, QUE AUMENTA EN LA SEXTA REVISION

PORCENTAJE DE GERMINACION DE LOS MEDIOS  
M/S 1 AL 27 Y KN 1, 2 Y 3

---

MEDIO	PORCENTAJE DE GERMINACION
M/S 1	6.17
M/S 2	26.22
M/S 3	20.01
M/S 4	21.85
M/S 5	17.92
M/S 6	34.55
M/S 7	49.48
M/S 8	23.68
M/S 9	12
M/S 10	2.67
M/S 11	19.54
M/S 12	16.63
M/S 13	17.47
M/S 14	7
M/S 15	10
M/S 16	49.58
M/S 17	44
M/S 18	9.77
M/S 19	9.92
M/S 20	4.89
M/S 21	29.28
M/S 22	39.11
M/S 23	24.25
M/S 24	34.05
M/S 25	55.58
M/S 26	42.55
M/S 27	32.48
KN 1	4.55
KN 2	17.28
KN 3	48.02

---

Cuadro 4: GERMINACION

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS  
M/S 1 AL 27 Y KN 1, 2 Y 3

MEDIO	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO INDICE DE CRECIMIENTO/TIEMPO
M/S 1	2.783
M/S 2	6.822
M/S 3	6.811
M/S 4	6.429
M/S 5	6.720
M/S 6	7.212
M/S 7	7.759
M/S 8	6.806
M/S 9	6.221
M/S 10	6.297
M/S 11	6.744
M/S 12	6.496
M/S 13	7.046
M/S 14	5.807
M/S 15	6.165
M/S 16	7.618
M/S 17	7.412
M/S 18	6.211
M/S 19	5.688
M/S 20	6.045
M/S 21	6.751
M/S 22	7.177
M/S 23	6.706
M/S 24	7.053
M/S 25	8.331
M/S 26	6.904
M/S 27	6.727
KN 1	5.725
KN 2	6.705
KN 3	7.406

Cuadro 5:NOTESE QUE LOS MEDIOS M/S-1, M/S-19 Y KN-1 PRESENTAN BAJA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MIENTRAS QUE EN LOS MEDIOS M/S-25 Y KN-3 LA VELOCIDAD ES ALTA

CORRELACION DE LA CONCENTRACION MOLAR DE LOS  
TRATAMIENTOS Y LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE  
LOS MEDIOS M/S Y KN

COMPONENTES	MEDIO MURASHIGE Y SK006 (-)	MEDIO KNUDSON C (-)
AMONIO	0.414	0.725
NITRATO	0.450	0.723
NITROGENO TOTAL	0.535	0.814
POTASIO	0.356	
AZUFRE	0.054	0.725
MAGNESIO	0.182	
MACRONUTRIENTES TOTALES	0.561	0.814
COMPONENTES TOTALES	0.535	0.813

Cuadro 6: EN ESTE CUADRO LOS VALORES ALTOS DE  
CORRELACION SON MACRONUTRIENTES TOTALES Y  
NITROGENO TOTAL PARA AMBOS MEDIOS

CORRELACION DE LA CONCENTRACION MOLAR DE  
 LOS TRATAMIENTOS Y LA GERMINACION DE LOS  
 MEDIOS M/S Y KN

COMPONENTES	MEDIO MURASHIGE Y SK006 (-)	MEDIO KNUDSON C (-)
AMONIO	0.384	0.462
NITRATO	0.293	0.460
NITROGENO TOTAL	0.402	0.959
POTASIO	0.277	
AZUFRE	0.212	0.462
MAGNESIO	0.137	
MACRONUTRIENTES TOTALES	0.453	0.959
COMPONENTES TOTALES	0.469	0.959

Cuadro 7: OBSERVE QUE PARA AMBOS MEDIOS LOS VALORES  
 MAS ALTOS SON DE NITROGENO TOTAL, MACRONUTRIENTES  
 TOTALES Y COMPONENTES TOTALES

PORCENTAJES DE GERMINACION REGISTRADO

PORCENTAJE DE CONTAMINACION	TIEMPO EN DIAS
0.33	13
1.0	38
2.6	62
2.6	144
2.6	179
6.6	237

Cuadro 8: REGISTRO DE CONTAMINACION

A N E X O 1

COMPOSICION DE ELEMENTOS MAYORES (MILIMOLES) DE VARIOS MEDIOS USADOS PARA LA GERMINACION DE ORQUIDEAS Y CULTIVO DE PLANTULAS, ADEMAS NUTRIENTES DE ORQUIDEAS DE LAVADOS DE TRONCOS

ION	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
NITRATO	8.4	8.4			5.71	5.71	3.96	2.77	1.36	8.76	8.76	10.37	8.76
AMONIO	3.8	3.8	7.56		2.75	2.75	7.57	2.07	0.81		0.005	5.13	
UREA											1.752	2.02	
FOSFATO	3.2	1.4	6.86	3.11	0.9	0.88	1.84	0.61	0.24	1.47	1.47	1.47	1.47
SULFATO	2.9	2.9	5.04	1.71	1.06	1.08	4.8	0.34	0.13				
POTASIO	4.6	6.2	8.58	5.12	0.88	0.88	5.79	2.83	0.68	4.79	4.79	4.79	4.79
CALCIO	4.2	4.2	0.68	0.68	1.48	1.48	0.13	0.35	0.28	3.39	3.39	1.69	3.39
MAGNESIO	1	1	1.22	1.01	1.06	1.06	1.01	0.34	0.13	0.81	0.81	0.81	0.81
CITRATO		0.43									*0.003	*0.08	*0.003
HIERRO	0.07	0.07	0.04	0.7	0.02	0.02	10	0.014	0.012		*0.004	*0.1	*0.004
MANGANESO											0.002	0.002	0.002
SODIO			1.71										
CLORO		3.4	3.07	1.36				2.22	0.44	1.34	1.34	1.34	1.34
TOTALES	28.17	31.8	34.76	13.69	13.86	13.86	6.91	11.54	4.08	21.37	21.38	26.59	21.38

ION	N	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
NITRATO	12.72	14.38	8.48	8.48	8.4			0.99	0.99			8.73
AMONIO	3.78	3.39	3.78	7.66	7.6	1.52		0.99	0.99	1	20.61	
UREA							4.16					
FOSFATO	3.56	3.39	3.28	2.16	1.8	1.5	1.95	2.76	2.76	2.98	1.24	1.46
SULFATO						0.2	4.79	1.43	1.43	1.43	1.5	0.81
POTASIO	3.28	7.38	4.72	1.83	1.8	0.74	1.84	1.98	1.98	1.98	20.03	4.77
CALCIO	4.24	3.49	4.24	4.24	4.2		4.24	0.85	0.85	0.46	2.99	3.38
MAGNESIO	1.01	0.7	1.01	1.01	1	0.2	1.01	0.97	0.97	0.97	1.5	0.81
CITRATO												
HIERRO	0.42		0.07	0.33	0.09		0.11	0.009	0.009	0.009		
MANGANESO					0.034							
SODIO							7.56					
CLORO							8.48				5.98	1.34
TOTALES	31.39	33.43	28.55	30.5	29.72	4.16	34.14	10.06	10.06	8.91	93.25	21.3

ION	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
NITRATO		2	11.57	8.4	10.06		0.0025	5.19	8.48	3.33	9.8	7.8
AMONIO		2	7.27	10.6	5.5	2.99	0.088	7.56	7.56			
UREA						8.99						
FOSFATO	1.72	2.76	2.2	2.94	2.2	2.99	0.0105	3.14	1.84	0.12	2.5	3.8
SULFATO	0.41	1.43	1.22	6.5	2.16	1.49	0.0052	4.83	4.79	4.38	1.23	9.7
POTASIO	2.88	1.98	6.16	2.94	6.16	3.88	0.0770	7.03	1.84	0.79	2.5	19.4
CALCIO		0.85	0.63	4.8		0.49	0.025	1.95	4.24	1.27	4.9	1.9
MAGNESIO	0.41	0.97	0.67	1.2	0.74	1.49	0.177	1.01	1.01	2.92	1.23	3.9
CITRATO				1.89								
HIERRO	0.42		0.09	0.67	0.07		0.0073	0.19	0.004	0.13		
MANGANESO								0.04		0.03		
SODIO							0.131			2.94		
CLORO							0.143					
TOTALES	5.84	12.99	30.46	39.94	24.3	22.43	0.686	30.94		15.91	22.16	46.5

A=BURGEFF Egi  
 B=BURGEFF N F  
 C=BURGEFF MN+N  
 D=BURGEFF SIN N  
 E=CURTIS 1936  
 F=CURTIS MODIFICADO  
 G=FAST 1971  
 H=FAST F, 1976  
 I=FAST FN, 1978  
 J=PFEFFER

K=HARVAIS 1973  
 L=HARVAIS 1974  
 M=HARVAIS 1972  
 N=HENRIKSSON 1951  
 N̄=ICHIHASHI Y  
 YAMASHITA  
 O=KAEWBANRUNG 1967  
 P=KNUDSON B  
 Q=KNUDSON C  
 R=LUCKE CI-1 1976

S=LUGO-LUGO 1955  
 T=MEAD Y BULARD 1975  
 U=MEAD Y BULARD 1979  
 V=  
 W=MURASHIGE Y SKOOG  
 X=PFEFFER  
 Y=NUTRIENTES DE  
 POLIPODIUM  
 Z=RAGHAVAN Y TORREY  
 AA=RE

AB=SLADDEN, MODIF. BURGEFF  
 AC=THOMALE GD  
 AD=THOMSON  
 AE=LAVADO DE TRONCO DE ARBOL  
 AF=VACIN Y WENT  
 AG=VEYRET 1969  
 AH= WHITE MODIFICADO  
 AI=WYND  
 AJ=WYND

A N E X O 2

COMPOSICION Y CONCENTRACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG Y KNUDSON C, (mg/Lt).  
(MURASHIGE Y SKOOG, 1962; OSPINA, 1958).

	MEDIO M/S	MEDIO KN C
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	-
KNO <sub>3</sub>	1900.00	-
Ca(NO <sub>3</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	-	1000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	238.68
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370.00	250
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.30	7.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440.00	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	0.056
KI	0.83	-
NaMoO <sub>4</sub>	0.25	-
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.60	0.0331
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.040
CoCL <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30	-
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.80	-
MoO <sub>3</sub>	-	0.016
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	7.83



A N E X O 3

CONCENTRACION MOLAR DE LOS COMPONENTES DE LOS DIFERENTES MEDIOS

MEDIO	AMONIO	NITRATO	NITROGENO TOTAL	POTASIO	AZUFRE	CALCIO	MAGNESIO	MACRONUTRIENTES TOTALES	COMPONENTES TOTALES
M/S 1	20.6139	39.4057	60.0196	20.6405	1.7309	3.9641	1.501	89.755	186.3559 °
M/S 2	20.6139		20.6139	1.8487	12.036	3.9641	1.501	41.8586	138.4595
M/S 3		18.7918	18.7918	20.6405	1.7309	3.9641	1.501	48.5272	145.128
M/S 4	10.307	19.7028	30.0098	11.2446	1.7309	3.9641	1.501	50.3493	146.9252
M/S 5	10.305		10.305	1.8487	6.8835	3.9641	1.501	26.4011	123.002
M/S 6		9.3959	9.3959	11.2446	1.7309	3.9641	1.501	29.7354	126.3363
M/S 7	5.1535	9.8514	15.0049	6.5467	1.7309	3.9641	1.501	30.6455	127.2474 ■
M/S 8	5.1525		5.1525	1.8473	4.3072	3.9641	1.501	18.6724	115.2733
M/S 9		4.6979	4.6979	6.5467	1.7309	3.9641	1.501	20.3195	116.9204
M/S 10	20.6139	39.4057	60.0196	20.6405	0.9804	1.9821	0.7505	86.2719	198.9088 °
M/S 11	20.61		20.61	1.8487	11.2855	1.9821	0.7505	38.3755	131.0123
M/S 12		18.7918	18.7918	20.6405	0.9804	1.9821	0.7505	45.0441	137.6809
M/S 13	10.307	19.7028	30.0098	11.2446	0.9804	1.9821	0.7505	46.8662	139.503
M/S 14	10.305		10.305	1.8487	6.1329	1.9821	0.7505	22.918	115.5548
M/S 15		9.3959	9.3959	11.2446	0.9804	1.9821	0.7505	26.2523	118.8891
M/S 16	5.1535	9.8514	15.0049	6.5667	0.9804	1.9821	0.7505	27.1634	119.8001 ■
M/S 17	5.1525		5.1525	1.8487	3.5567	1.9821	0.7505	15.1893	107.826
M/S 18		4.6979	4.6979	6.5467	0.9804	1.9821	0.7505	16.8564	109.4982
M/S 19	20.6139	39.4057	60.0196	20.6405	0.6052	0.991	0.3752	84.5304	175.1851 °
M/S 20	20.61		20.61	1.8487	10.9102	0.991	0.3752	36.634	127.2887
M/S 21		18.7918	18.7918	20.6405	0.6052	0.991	0.3752	43.3025	133.9572
M/S 22	10.307	19.7028	30.0098	11.2446	0.6052	0.991	0.3752	45.1247	135.7794
M/S 23	10.305		10.305	1.8487	5.7577	0.991	0.3752	21.1765	111.8312
M/S 24		9.3960	9.396	11.2446	0.6052	0.991	0.3752	24.5108	115.1655
M/S 25	5.1534	9.8514	15.0049	6.5467	0.6052	0.991	0.3752	25.4218	116.0765 ■
M/S 26	5.1525		5.1525	1.8487	3.1814	0.991	0.3752	13.4477	104.1024
M/S 27		4.6979	4.6979	6.5467	0.6052	0.991	0.3752	15.1149	105.7696
KN 1	16.1999		16.1999	1.8437	9.2732		1.0142	30.2299	88.9278
KN 2		16.1999	16.1999	1.8437	1.1732	8.0999	1.0142	30.2299	88.9278
KN 3	5.3784	10.7891	16.1676	1.8437	3.8624	5.3946	1.0142	30.1813	88.8792 ■

# PORCENTAJE DE GERMINACION DE *Lemboglossum cervantessi*

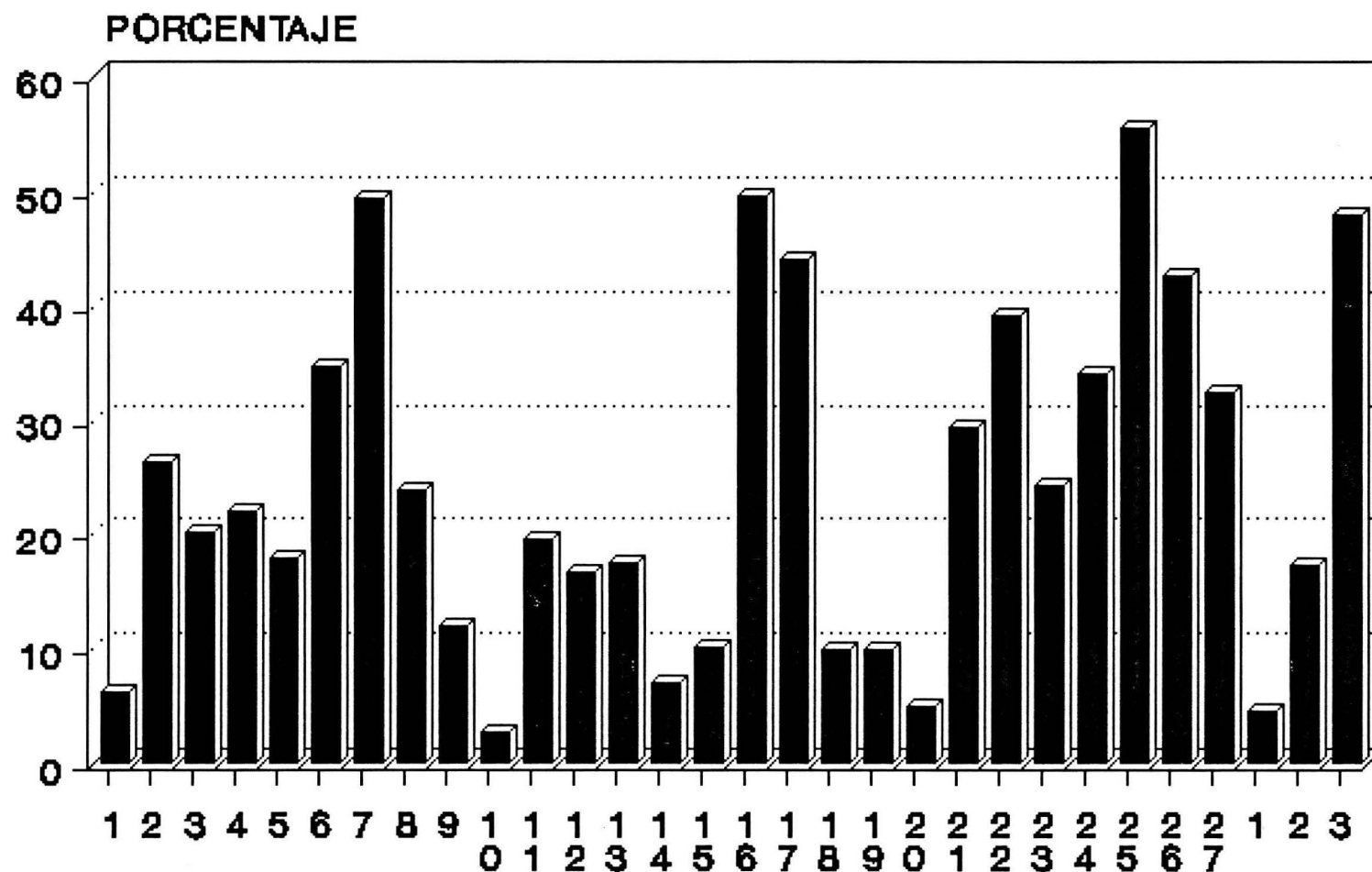


Fig. 1: Germinación en los diferentes medios utilizados (MS 1 - 27 y KN 1 - 3)

# VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Lemboglossum cervantessi*

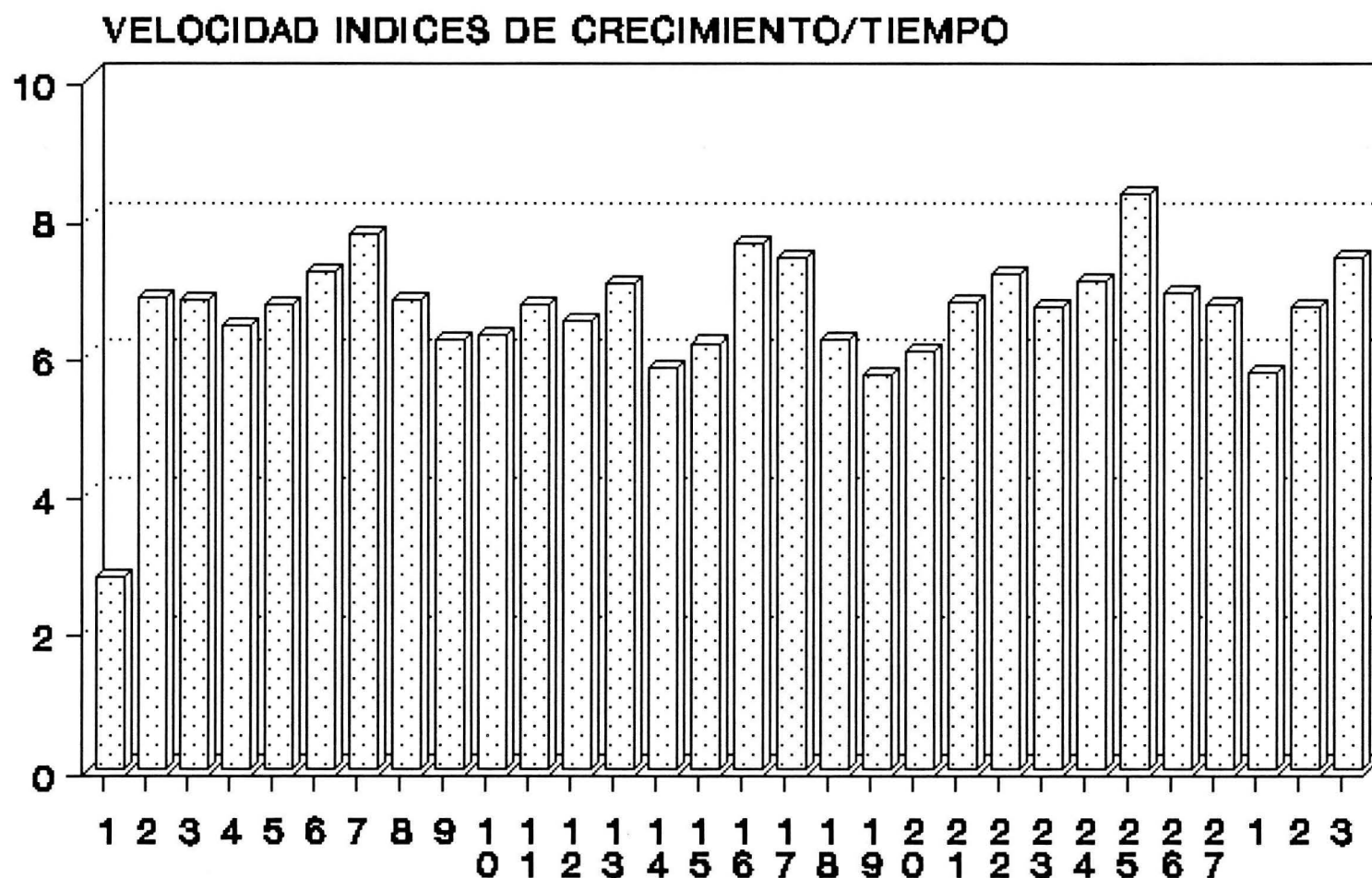


Fig. 2: Crecimiento en los diferentes medios utilizados (MS 1 - 27 y KN 1-3)

# Porcentaje de germinación de *Lemboglossum cervantesii*

MACRONUTRIENTES(100)
  MACRONUTRIENTES(50)
   
 MACRONUTRIENTES(25)

## NITRATO Y AMONIO

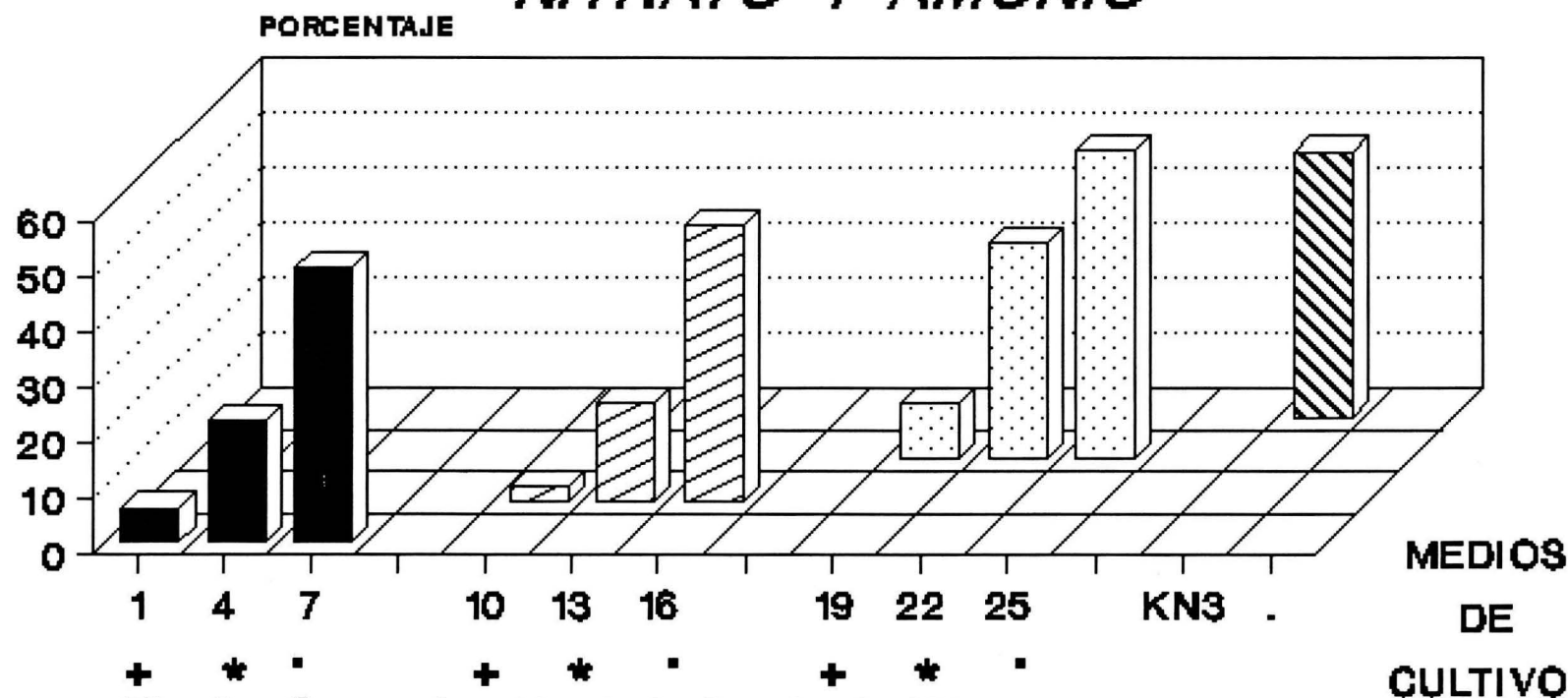


Fig. 3a: Concentración de la fuente de Nitrógeno (+) al 100, (•) al 50 y (.) al 25.

# Porcentaje de germinacion de *Lemboglossum cervantesii*

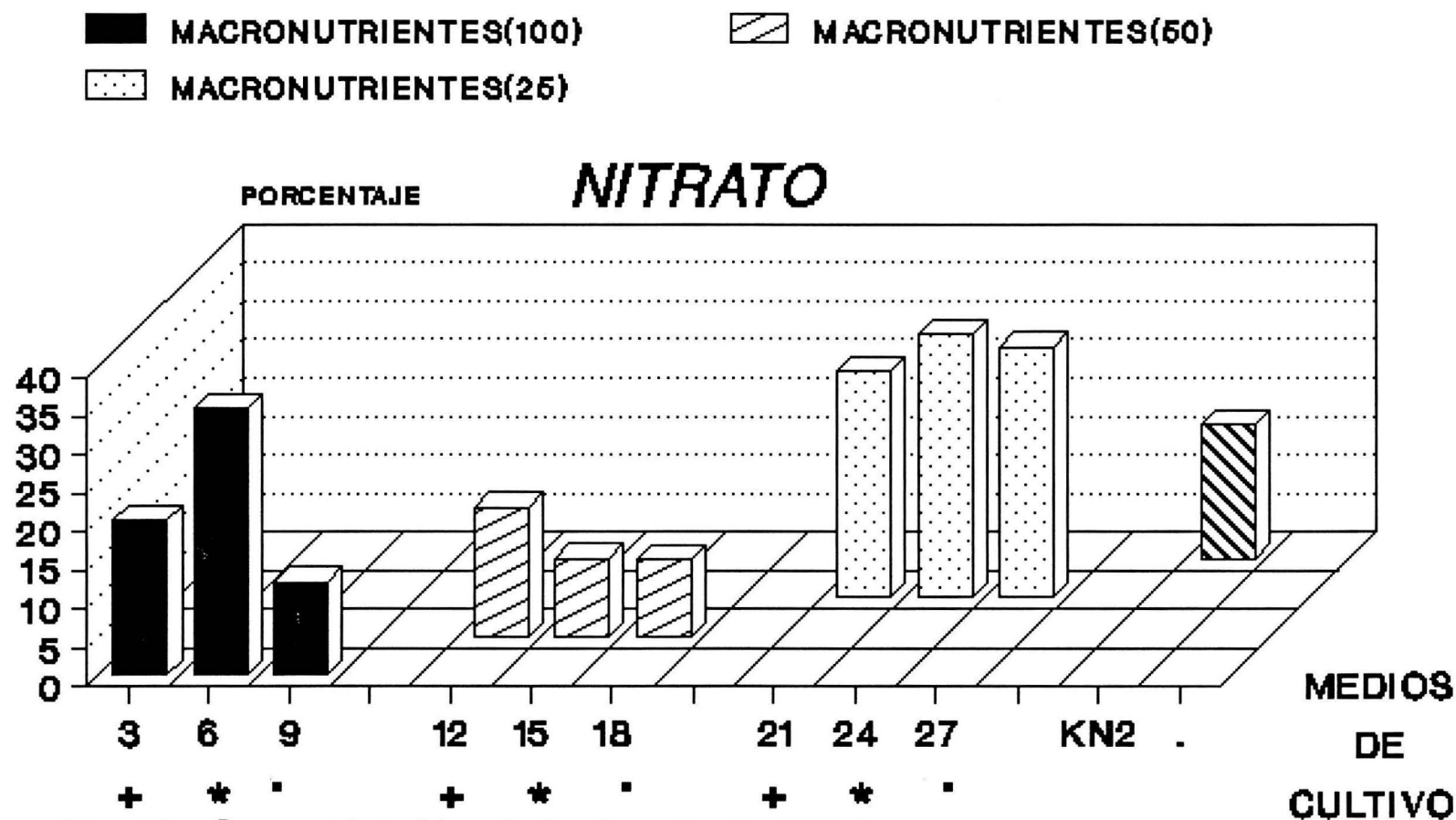


Fig. 3b: Concentración de la fuente de Nitrógeno  
 (+) al 100, (\*) al 50 y (.) al 25

# Porcentaje de germinacion de *Lemboglossum cervantesii*

MACRONUTRIENTES(100)
  MACRONUTRIENTES(50)
  MACRONUTRIENTES(25)

## AMONIO

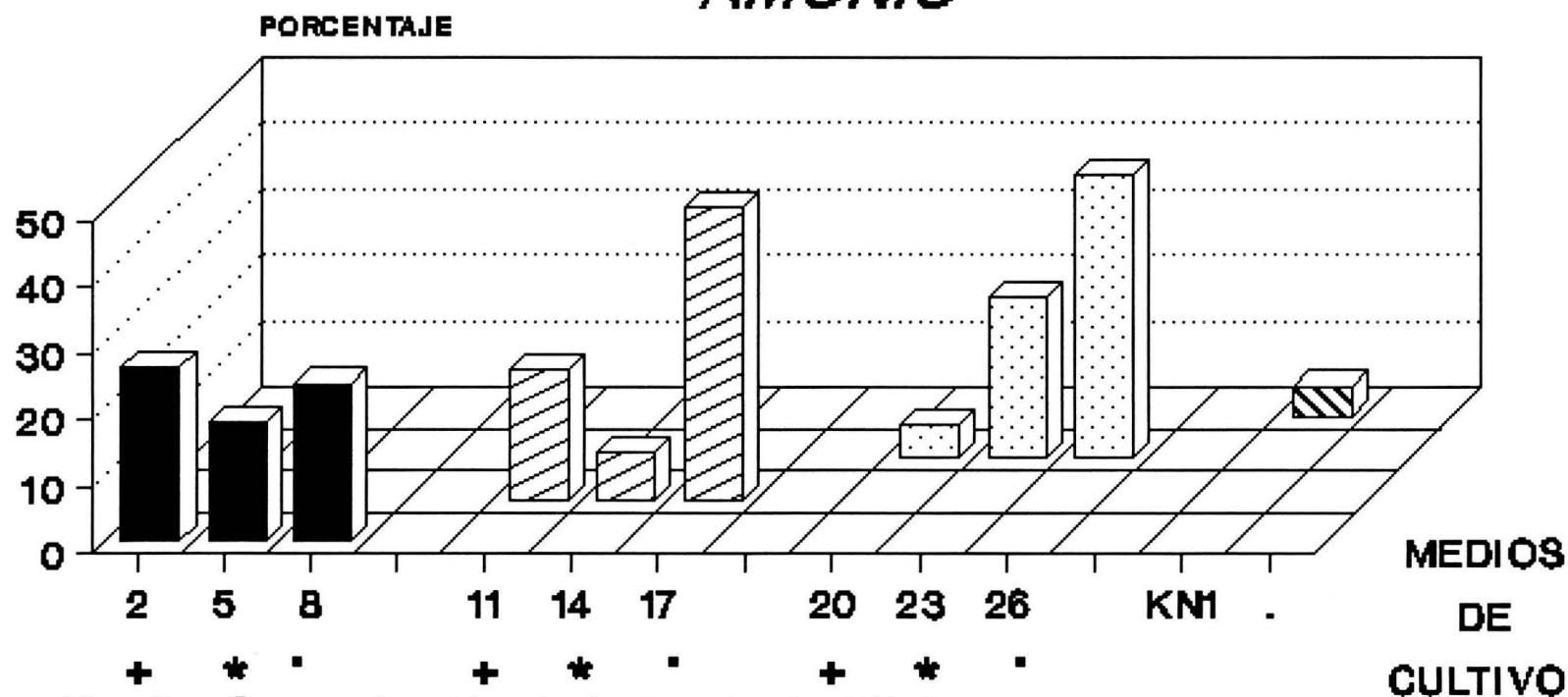


Fig. 3c: Concentración de la fuente de Nitrógeno  
(+) al 100, (•) al 50 y (.) al 25

# Velocidad de crecimiento de *Lemboglossum cervantesii*

MACRONUTRIENTES(100)
  MACRONUTRIENTES(50)
   
 MACRONUTRIENTES(25)

## NITRATO Y AMONIO

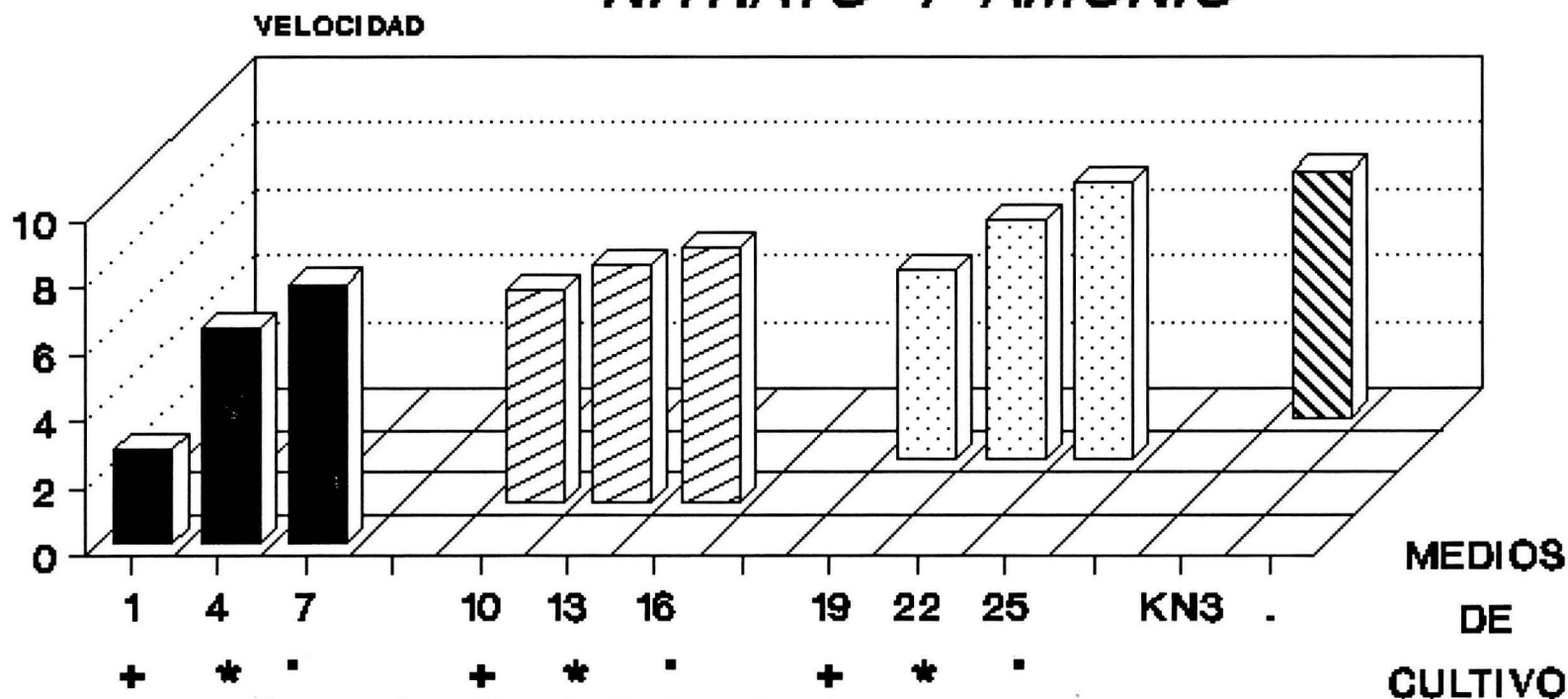


Fig. 4a: Concentración de la fuente de Nitrógeno (+) al 100, (\*) al 50 y (.) al 25.

# Velocidad de crecimiento de *Lemboglossum cervantesii*

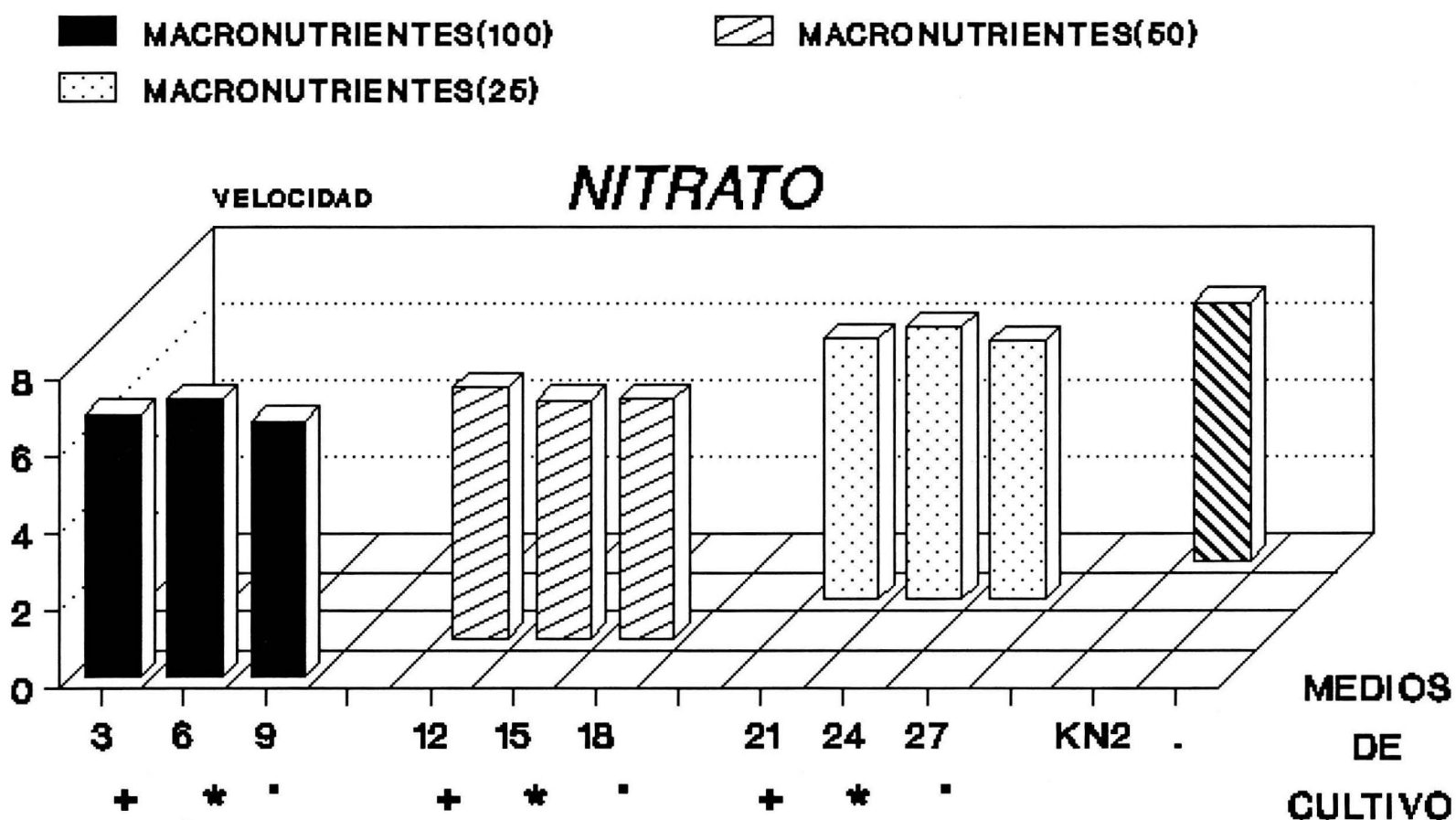


Fig. 4b: Concentración de la fuente de Nitrógeno  
 (+) al 100, (+) al 50 y (.) al 25



# Velocidad de crecimiento de *Lemboglossum cervantesii*

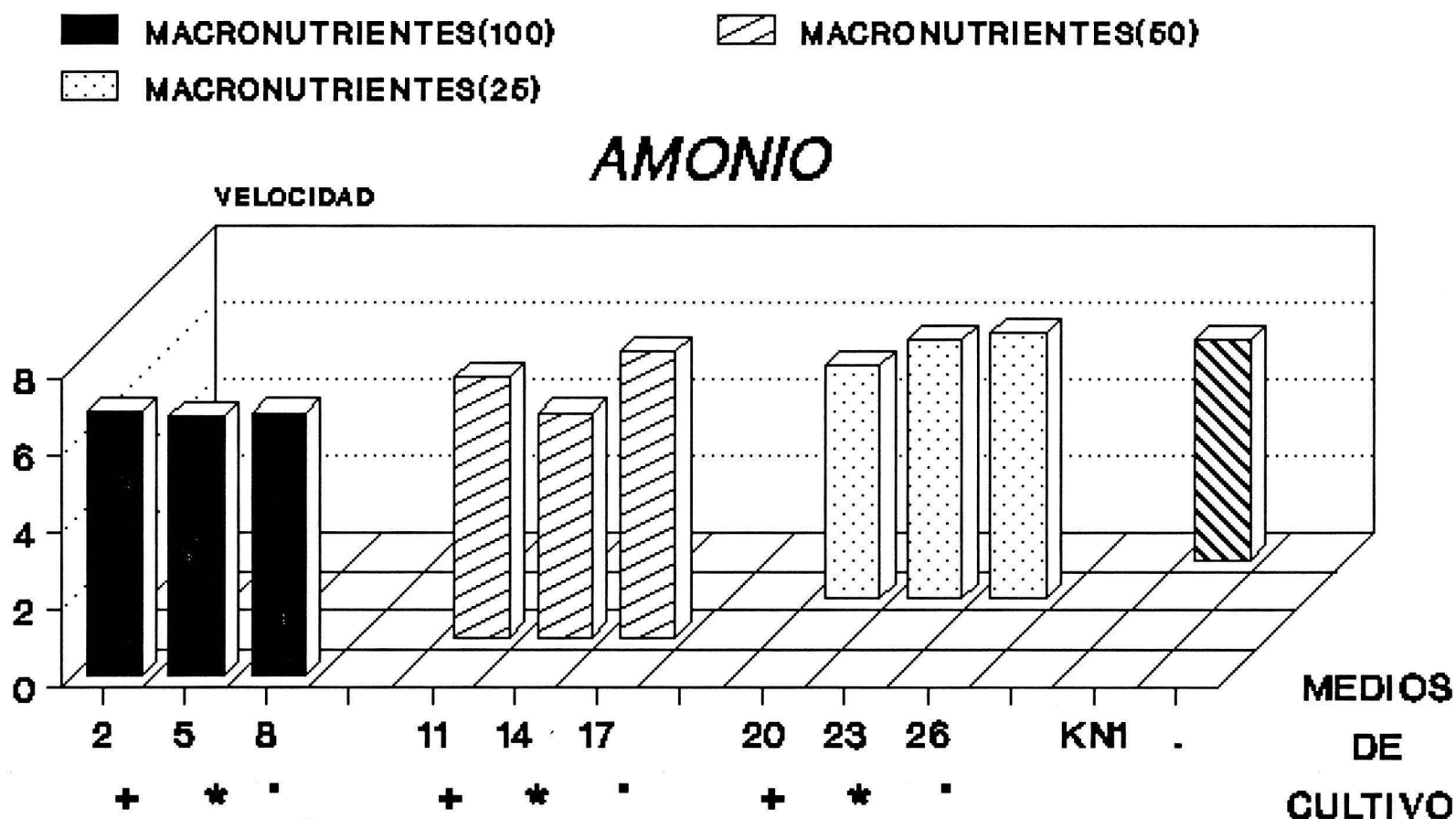


Fig. 4c: Concentración de la fuente de Nitrógeno  
 (+) al 100, (\*) al 50 y (.) al 25

# BIBLIOGRAFIA

1. Aguirre, L. E., 1993. Comunicación personal.
- 2.- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*. 33(1):1-97
- 3.- Arditti, J. 1977. *Orchid biology: reviews and perspectives*. Cornell University Press. USA. 310 p.
- 4.- Arditti, J. y Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In: *Orchi biology, reviews and perspectives III*. Cornell University Press. USA. pp. 177-222.
- 5.- Cronquist, A., 1981, *Introducción a la botánica*. Ed. CECSA, México, pp. 612-619.
- 6.- Curtis, J. y Spoerl, E. 1948. Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 17(2):111-114.
- 7.- Curtis, J. y Spoerl, E. 1948. Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 17(2):111-114.
- 8.- Daubenmire, R. F. 1979. *Ecología Vegetal*. Limusa. México. 496 p.
- 9.- Davis, A. 1946. Orchid seed and germination. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 15(5):218-223.
- 10.- Dougal, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. In: *Plant tissue as a source of biochemicals*. CRC Press. Florida USA.
- 11.- Dressler, R. L. 1981. *The Orchids. Natural history and classification*. Harvard University Press. USA. 332p.
- 12.- Filner, P. 1982. Heritable increases in urease-limited growth of cultured tobacco cells. *Proc. 5° Int. Plant tissue and cell culture*. pp. 235-236.
- 13.- Flamee, M. 1978. Influence of selected media and supplements on the germination and growth of *Phaphiopedilum* seedlings. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 47:419-423.
- 14.- Fletcher, J. S. 1982. Control of nitrogen assimilation in suspension cultures of Paul Scarlet rose. *Proc. Int. Plant tissue and cell culture*. pp. 229-230.
- 15.- Fretz, T. A., Read, P. E. y Peele, M. C. 1979. *Plant propagation lab manual*. Burgess Pub. Co. USA. 317p.

- 16.- Harrison, C. R. y Ardiditti, J. 1972. Cultivo de la orquídea por semilla. Asoc. Mex. Orq. México. pp. 91-90.
- 17.- Hartman, W. L. 1971. Introduction to the cultivation of orchids. Editorial Fournier S. A. 106 p.
- 18.- Kohl, H. C. 1962. Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet. Amer. Orch. Soc. Bull. 31:117-120.
- 19.- Lugo - Lugo, H. 1955. The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia* Amer. Jour. Bot. 42(7):679-684.
- 20.- Marschner, H. 1986. Mineral nutrition of higer plants. Ed. Academic Press. USA. pp. 179-199.
- 21.- Mayer, A. M. y Poljacoff-Mayber, A. 1982. The germination of seeds. Pergamon Press. England. 211p.
- 22.- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- 23.- Murashige, T. 1974. Plant propagation throught tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166.
- 24.- Ospina, H. M. 1958. Orquideas Colombianas. Publicaciones Tecnicas. Bogota, Colombia. 305 p.
- 25.- Raghavan, V. y Torrey, J. G. 1964. Inorganic nitrogen nutrition of embryos of the seedlings of the Orchid *Cattleya*. Amer. Jour. Bot. 51(3):264-274.
- 26.- Rao, A. N. 1977. Tissue culture in orchid industry. En: Aplied and fundamental aspects of plant cell tissue and cell culture. (Reiner, J. y Bajaj, Y. P. S. ED.) Springer-Verlag.
- 27.- Spoerl, E. 1948. Amino acids as sources of nitrogen nut orchid embryos. III. Amer. Jour. Bot. 35(2):88-95.
- 28.- Spoerl, E. Curtis, J. T. 1948. Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos. III. Amino acid nitrogen. Amer. Orch. Soc. Bull. 17:307-312.
- 29.- Strasburger, E; F. Noll; H. Schenck y A. F. W. Schimper. 1986. Botanica. Editorial Marin México. 1098 p.
- 30.- Street, H. E. 1973. Plant tissue and cell culture. Botanical Monogr. Vol. II. Blackwell Scientific Pub. London. 503 p.

- 31.- Takeuchi, M. 1973. Métodos de cultivo de tejidos vegetales. Colegio de Posgraduados, rama de genética. Chapingo. México. s. p.
- 32.- Tornelli, C. 1982. Effects of D-aminoacids analogs on embryo cultures of proline requiring mutants in *Zea mays*. Proc. 5° Int. Plant tissue and cell culture. pp. 237-238.
- 33.- Van Waes, J. M. y Debergh, P. C. 1986. In vitro germination of some western European orchids. *Physiol Plant* 67:253-261.
- 34.- Withner, C. L. 1974. The orchids, Scientific Studies. (C. L. Withner ed.) Wiley-Interciencia, N. Y. USA.
- 35.- Wrigh, N. P. 1958. Orquideas de México. ED. Fournier S.A. 23 p. (40 laminas en color).
- 36.- Yates, R. C. y Curtis, J. T. 1949. The effect of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedlings. *Amer. Jour. Bot.* 36:390-396.
- 37.- Yoshida, F. y Kohno, H. 1982. Effects of media containing  $\text{NH}_4$  as the sole nitrogen source on cultured cells of tobacco and rice. Proc. 5° Int. Cong. Plant Tissue and cell culture. pp. 231-232.
- 38.- Weisman, G. S. 1950. Growth and nitrogen absorption of weat seedlings as in influenced by the ammonium:nitrate ratio and the hidrogen-ion concentration. *Amer. Jour. Bot.* 37:725-738.