

## Mineral fertilization and biofertilization in physiological parameters of the orchid *Laelia anceps* subsp. *anceps*

## Fertilización mineral y biofertilización en parámetros fisiológicos de la orquídea *Laelia anceps* subesp. *anceps*

Olga Tejada-Sartorius<sup>1\*</sup>; Libia Iris Trejo-Téllez<sup>1</sup>; Yasbet Ríos-Barreto<sup>2</sup>; José Luis Rodríguez-de la O<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, México, C. P. 56230, MÉXICO.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, México, C. P. 56230, MÉXICO.

\*Corresponding author: [olgats@colpos.mx](mailto:olgats@colpos.mx), tel. 595 952 02 00 ext. 1120.

### Abstract

The use of biofertilizers in orchid growing can be an alternative to reduce the environmental impact of traditional inorganic fertilization. The aim of this research was to evaluate the effect of mineral fertilization and biofertilization on some physiological parameters of *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* seedlings in vegetative stage. Three fertilization treatments were evaluated: 1) mineral fertilization (MF), 2) biofertilization (BFERT) and 3) mineral fertilization + biofertilization (MF + BFERT). The concentration and content of chlorophylls, and the concentration of amino acids and total soluble proteins were measured. No treatment affected the concentration of chlorophylls in leaves. In general, the MF and BFERT treatments significantly increased the concentration of chlorophylls a, b and total in pseudobulbs, and their content in leaves and pseudobulbs. The concentration of amino acids in pseudobulbs was higher with MF, while the concentration of proteins in leaves was greater with MF + BFERT. Biofertilization promoted positive responses in the physiological parameters evaluated in comparison with mineral fertilization; therefore, it is considered to have potential for use in the species evaluated in this study.

**Keywords:** amino acids, chlorophyll, Orchidaceae, proteins.

### Resumen

El uso de biofertilizantes en el cultivo de orquídeas puede ser una alternativa para reducir el impacto ambiental de la fertilización inorgánica tradicional. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la fertilización mineral y la biofertilización en algunos parámetros fisiológicos de plántulas de *Laelia anceps* Lindl. subesp. *anceps* en etapa vegetativa. Se evaluaron tres tratamientos de fertilización: 1) fertilización mineral (FM), 2) biofertilización (BFERT) y 3) fertilización mineral + biofertilización (FM + BFERT). Se midió la concentración y el contenido de clorofilas, la concentración de aminoácidos y de proteínas solubles totales. Ningún tratamiento afectó la concentración de clorofilas en hojas. De manera general, los tratamientos FM y BFERT incrementaron significativamente la concentración de clorofilas a, b y totales en pseudobulbo, y su contenido en hojas y en pseudobulbos. La concentración de aminoácidos en pseudobulbo fue mayor con FM, mientras que la concentración de proteínas en hoja fue mayor con FM + BFERT. La biofertilización promovió respuestas positivas en los parámetros fisiológicos evaluados en comparación con la fertilización mineral; por lo que se considera que tiene potencial de uso en la especie evaluada en este estudio.

**Palabras clave:** aminoácidos, clorofila, Orchidaceae, proteínas.



## Introduction

Of the 25,000 species of orchids in the world, Mexico is home to around 1,260 species belonging to 170 genera (Hágsater et al., 2005); however, it is necessary to promote knowledge of their management to encourage the introduction of these native plants in Mexican floriculture.

Orchids account for around 10 % of the international flower trade, with a commercial value, from 2007 to 2012, of US\$ 483 million; likewise, in 2012 there were more than 40 countries exporting orchids and 60 importing them, with the overall value of the global trade totaling US\$ 504 million (Lakshman, Pathak, Rao, & Rajeevan, 2014). This volume of production involves costs of various kinds, among which are the fertilizers and the costs generated by their application. Therefore, ornamental horticulture, like any agricultural activity, requires the rational use of chemical fertilizers and the use of alternative sources to make it more environmentally friendly (Daughtrey & Benson, 2005), as in the case of biofertilizers (Boraste et al., 2009).

While there are studies on the use of mineral fertilizers in orchid nutrition (Bichsel & Starman, 2008; Wang, 2000; Wang, 1996; Zong-min, Ning, Shu-yun, & Hong, 2012), there are few specific ones and the application form of many others is unknown. Among the advantages of the efficient use of fertilizers are the stimulation of vegetative growth, the increase of precocity in flowering and the promotion of the symbiotic relationship with mycorrhizal fungi (Espinosa-Moreno, Gaytán-Acuña, Becerril-Román, Contreras, & Trejo-López, 2000).

On the other hand, the effectiveness of using biofertilizers in ornamental plants has been reported (Abbasniyazare, Sedaghatthoor, & Dahkaei, 2012; El-Sayed, Shahin, & Zaky, 2012; Scagel, 2003); however, information about their use in orchids is scarce. A biofertilizer is defined as a substance that contains living organisms, which when applied to the surface of the plant or to the soil colonize the rhizosphere or the interior of the tissues of the plant and promote its growth by increasing the supply or availability of nutrients (Amanullah, Kurd, Khan, Ahmed, & Khan, 2012; Youssef & Eissa, 2014). The most noteworthy microorganisms present in a biofertilizer are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Boraste et al., 2009).

The factors that determine the physiological quality of plants are those related to photosynthesis (fluorescence of photosynthetic pigments, stomatal conductance, rate of photosynthesis, concentration of chlorophylls, etc.), concentration of nutrients and reserve sugars, among others (Villar, 2003). Also, some authors report that one of the most important nutrients is nitrogen, since it is involved in the formation of

## Introducción

De las 25,000 especies de orquídeas en el mundo, México alberga alrededor de 1,260 pertenecientes a 170 géneros (Hágsater et al., 2005); no obstante, es necesario impulsar el conocimiento de su manejo para fomentar la introducción de estas plantas nativas en la floricultura mexicana.

Las orquídeas representan alrededor del 10 % del comercio internacional de flores, con un valor comercial, de 2007 a 2012, de US \$483 millones; asimismo, en 2012 se registraron más de 40 países exportadores y 60 importadores de orquídeas con un valor global de US \$504 millones (Lakshman, Pathak, Rao, & Rajeevan, 2014). Este volumen de producción implica costos de diversa índole, dentro de los que se encuentran los fertilizantes y los costos generados por su aplicación. Por ello, la horticultura ornamental, al igual que cualquier actividad agrícola, requiere del uso racional de fertilizantes químicos y el empleo de fuentes alternativas a éstos para hacerla más amigable con el ambiente (Daughtrey & Benson, 2005), como el caso de los biofertilizantes (Boraste et al., 2009).

Si bien existen estudios sobre el uso de los fertilizantes minerales en la nutrición de orquídeas (Bichsel & Starman, 2008; Wang, 2000; Wang, 1996; Zong-min, Ning, Shu-yun, & Hong, 2012), hay pocos específicos y se desconoce la forma de aplicación de muchos otros. Entre las ventajas del uso eficiente de los fertilizantes se encuentran la estimulación del crecimiento vegetativo, el aumento de la precocidad en la floración y la promoción de la relación simbiótica con hongos micorrízicos (Espinosa-Moreno, Gaytán-Acuña, Becerril-Román, Contreras, & Trejo-López, 2000).

Por otra parte, se ha reportado la efectividad del uso de biofertilizantes en plantas ornamentales (Abbasniyazare, Sedaghatthoor, & Dahkaei, 2012; El-Sayed, Shahin, & Zaky, 2012; Scagel, 2003); sin embargo, la información acerca de su uso en orquídeas es escasa. Un biofertilizante se define como una sustancia que contiene organismos vivos, que cuando se aplica en la superficie de la planta o al suelo colonizan la rizósfera o el interior de los tejidos de la planta y promueven su crecimiento mediante el incremento de la oferta o disponibilidad de nutrimentos (Amanullah, Kurd, Khan, Ahmed, & Khan, 2012; Youssef & Eissa, 2014). Entre los microorganismos presentes en un biofertilizante destacan los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Boraste et al., 2009).

Dentro de los factores que determinan la calidad fisiológica de las plantas se encuentran aquellos relacionados con la fotosíntesis (fluorescencia de pigmentos fotosintéticos, conductancia estomática, tasa de fotosíntesis, concentración de clorofilas, etc.), concentración de nutrimentos y azúcares de reserva,

amino acids, proteins and other cellular constituents (Trejo-Téllez, Gómez, Rodríguez, & Alcántar, 2005). Ling and Subramaniam (2007) analyzed the content of chlorophylls and proteins in *Phalaenopsis violacea* (Orchidaceae) to determine quality aspects in tissue culture, for breeding purposes. Hew and Yong (1994) reported an analysis of growth and photosynthesis, where they included chlorophyll content in *Oncidium 'Goldiana'*, a hybrid used for the cut flower industry.

Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of mineral fertilization and biofertilization on some physiological parameters of *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* seedlings in vegetative stage.

## Materials and methods

This research was carried out under greenhouse conditions at the *Colegio de Posgraduados*, Montecillo Campus. Two-year-old *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* seedlings propagated *in vitro* by seed and averaging 8 cm in height were used. The transplant was made from trays to 340-mL opaque plastic containers, which contained a mixture of pine bark and perlite at a ratio of 75:25 (% v/v) with a particle size of 4-6 and 2-3 mm, respectively.

**Nutrient solutions.** Different nutrient solutions, formulated from different sources of nutrients (Table 1), were applied during irrigation.

**Treatments.** 1) Nutrient solution formulated from mineral fertilization (MF), 2) biofertilization (BFERT), 3) biofertilization as the main source of the solution supplemented with minerals (MF + BFERT) and 4) control plants irrigated with distilled water (C). Treatments 1 to 3 were supplemented with micronutrients.

The nutrients and their concentration ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), in the solutions of treatments 1 to 3, were: N (225), P (75), K (75), Ca (25), Mg (12.5), Fe (1.9), Cu (0.375), Zn (0.75), Mn (0.37) and B (0.15). Additionally, biofertilization (treatments 2 and 3) contained: humic acids (15 %), amino acids (0.64 %), indole-3-butyric acid ( $98 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), *Bacillus subtilis* ( $200 \times 10^5 \text{ CFU}\cdot\text{L}^{-1}$ ), *Azospirillum brasilense* ( $40 \times 10^5 \text{ CFU}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and *Glomus intraradices* ( $6,000 \text{ spores}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

entre otros (Villar, 2003). Asimismo, algunos autores reportan que uno de los nutrimentos más importantes es el nitrógeno, ya que interviene en la formación de aminoácidos, proteínas y otros constituyentes celulares (Trejo-Téllez, Gómez, Rodríguez, & Alcántar, 2005). Ling y Subramaniam (2007) analizaron el contenido de clorofilas y proteínas en *Phalaenopsis violacea* (Orchidaceae) para determinar aspectos de calidad en el cultivo de tejidos, con propósitos de mejoramiento. Hew y Yong (1994) reportaron un análisis de crecimiento y fotosíntesis, en donde incluyeron contenido de clorofilas en *Oncidium 'Goldiana'*, un híbrido usado para la industria de la flor de corte.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la fertilización mineral y la biofertilización en algunos parámetros fisiológicos de plántulas de *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* en etapa vegetativa.

## Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en condiciones de invernadero en el *Colegio de Posgraduados*, Campus Montecillo. Se utilizaron plántulas de *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* de dos años de edad, a partir de su propagación *in vitro* por semilla, y con tamaño promedio de 8 cm de altura. El trasplante se realizó de charolas a contenedores de plástico opacos de 340 mL, que contenían una mezcla de corteza de pino y perlita, en proporción 75:25 (% v/v) con tamaño de partícula de 4 a 6 y 2 a 3 mm, respectivamente.

**Soluciones nutritivas.** Se aplicaron diferentes soluciones nutritivas durante el riego, las cuales se formularon a partir de distintas fuentes de nutrimentos (Cuadro 1).

**Tratamientos.** 1) Solución nutritiva formulada a partir de fertilización mineral (FM), 2) biofertilización (BFERT), 3) biofertilización como fuente principal de la solución complementada con minerales (FM + BFERT) y 4) plantas testigo regadas con agua destilada (TEA). Los tratamientos 1 a 3 se complementaron con micronutrientes.

Los nutrimentos y su concentración ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), en las soluciones de los tratamientos 1 a 3, fueron: N (225), P (75), K (75), Ca (25), Mg (12.5), Fe (1.9), Cu (0.375), Zn (0.75),

**Table 1. Macronutrient sources used in making the nutrient solutions.**

**Cuadro 1. Fuentes de macronutrientes usadas en la elaboración de soluciones nutritivas.**

Mineral fertilization / Fertilización mineral	Biofertilization / Biofertilización
Peters Professional® 30-10-10	Nutro nitrógeno®
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Nutro fósforo®
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Nutro potasio®
	Nutro calcio®

The pH of the solutions was adjusted to 5.5 with 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, for which a portable potentiometer (PC18, Conductronic, Mexico) was used. Application of the nutrient solutions (30 mL per container) was carried out weekly from the third week after transplant. The spatiality of the application was based on the size of the seedlings under study, size of the container, amount of N in the nutrient solutions, specific observations of the species (wild material, not adapted to ornamental culture and roots sensitive to salinity) and recommended orchid fertilization intervals (Chang, Wu, & Hsieh, 2010; Lima-do Amaral et al., 2010; Rodrigues, Ferreira-Novais, Alvarez, Moreira-Dias, & de Albuquerque-Villan, 2010; American Orchid Society, 2017). After each fertilization, three irrigations were made weekly with 200 mL of water each to avoid accumulation of salts and desiccation in the substrate.

**Study variables.** In both leaves and pseudobulbs, the concentration and content of chlorophylls were assessed, along with the concentration of amino acids and total soluble proteins.

**Concentration of chlorophylls a, b and total (mg·g<sup>-1</sup> fresh weight [FW]).** It was determined using the method described by Harborne (1973). The samples were read in a spectrophotometer (Genesys 10 UV, Thermo Fisher Scientific, USA) with an absorbance of 663 and 645 nm.

**Content of chlorophylls a, b and total (mg·plant<sup>-1</sup>).** It was estimated from the concentration values obtained from each biomolecule in leaves and pseudobulbs and by considering the fresh matter weights of these organs per plant.

**Concentration of total soluble amino acids (μM·g<sup>-1</sup> FW).** They were determined by ethanolic extraction (Geiger et al., 1998) with the ninhydrin method (Moore & Stein, 1954). Leucine was used to make the standard curve at a concentration of 0 to 250 mM. The extracts were read in a spectrophotometer (Genesys 10 UV, Thermo Fisher Scientific, USA) at 570 nm.

**Concentration of total soluble proteins (μg·g<sup>-1</sup> FW).** Protein extraction was performed on leaves and pseudobulbs at the time of cutting, according to the method described by Höfner, Vázquez-Moreno, Abou-Mandour, Bohnert, and Schmitt (1989).

The experiment was established under a completely randomized design with 15 replicates. The experimental unit consisted of a container with a plant. With the obtained data, an analysis of variance was made with the Statistical Analysis System statistical package (SAS Institute, 2010). Tukey's range test ( $P \leq 0.05$ ) was also performed.

Mn (0.37) y B (0.15). Adicionalmente, la biofertilización (tratamientos 2 y 3) contenía: ácidos húmicos (15 %), aminoácidos (0.64 %), ácido indol-3-butírico (98 mg·L<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis* (200 x 10<sup>5</sup> UFC·L<sup>-1</sup>), *Azospirillum brasilensis* (40 x 10<sup>5</sup> UFC·L<sup>-1</sup>) y *Glomus intraradices* (6,000 esporas·g<sup>-1</sup>).

El pH de las soluciones se ajustó a 5.5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 N, para lo cual se usó un potenciómetro portátil (PC18, Conductronic, México). La aplicación de las soluciones nutritivas (30 mL por contenedor) se realizó semanalmente a partir de la tercera semana del trasplante. La espacialidad de la aplicación se fundamentó en el tamaño de las plántulas en estudio, tamaño del contenedor, cantidad de N en las soluciones nutritivas, observaciones específicas de la especie (material silvestre, no adaptado a cultivo ornamental y raíces sensibles a la salinidad) y en recomendaciones de intervalos de fertilización en orquídeas (Chang, Wu, & Hsieh, 2010; Lima-do Amaral et al., 2010; Rodrigues, Ferreira-Novais, Alvarez, Moreira-Dias, & de Albuquerque-Villan, 2010; American Orchid Society, 2017). Posterior a cada fertilización, se hicieron tres riegos semanales con 200 mL de agua cada uno para evitar acumulación de sales y desecación en el sustrato.

**Variables de estudio.** Tanto en hojas como en pseudobulbos se evaluó la concentración y contenido de clorofilas, concentración de aminoácidos y proteínas solubles totales.

**Concentración de clorofilas a, b y totales (mg·g<sup>-1</sup> de peso fresco [PF]).** Se determinó por el método de Harborne (1973). La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Fisher Scientific, USA) con una absorbancia de 663 y 645 nm.

**Contenido de clorofila a, b y totales (mg·planta<sup>-1</sup>).** Se estimó a partir de los valores de concentración obtenidos de cada biomolécula en hojas y pseudobulbos, y considerando los pesos de materia fresca de estos órganos por planta.

**Concentración de aminoácidos solubles totales (μM·g<sup>-1</sup> PF).** Se determinaron mediante extracción etanólica (Geiger et al., 1998) con el método de la ninhidrina (Moore & Stein, 1954). Se utilizó leucina para elaborar la curva patrón a una concentración de 0 a 250 mM. Los extractos se leyeron en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Fisher Scientific, USA) a 570 nm.

**Concentración de proteínas solubles totales (μg·g<sup>-1</sup> PF).** La extracción de proteínas se realizó en hojas y pseudobulbos al momento del corte, de acuerdo con lo descrito por Höfner, Vázquez-Moreno, Abou-Mandour, Bohnert, y Schmitt (1989).

## Results and discussion

### Concentration and content of chlorophylls

The concentration of chlorophyll a in pseudobulbs was significantly higher ( $P = 0.007$ ) in the MF and BFERT treatments, compared to MF + BFERT. A similar trend was observed in chlorophyll b ( $P = 0.048$ ) and total chlorophylls ( $P = 0.020$ ) (Figure 1A). In leaves, the applied fertilization treatments showed no significant statistical differences among treatments in the different types of chlorophyll: a ( $P = 0.360$ ), b ( $P = 0.125$ ) and total ( $P = 0.161$ ) (Figure 1A).

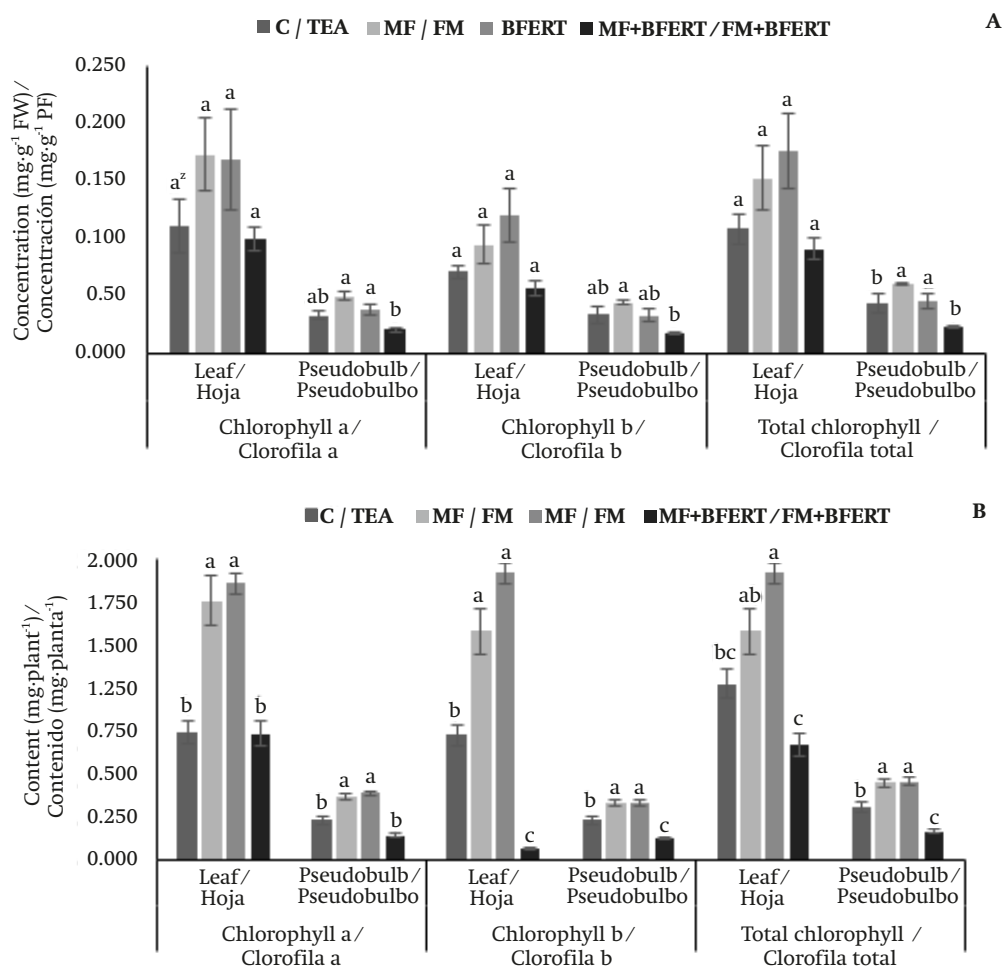
In leaves and pseudobulbs, the chlorophyll a and b contents were significantly higher ( $P \leq 0.05$ ) with MF

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 15 repeticiones. La unidad experimental constó de un contenedor con una planta. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza con el paquete estadístico *Statistical Analysis System* (SAS Institute, 2010), y una comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Concentración y contenido de clorofilas

La concentración de clorofila a en pseudobulbo fue significativamente mayor ( $P = 0.007$ ) en los tratamientos FM y BFERT, en comparación con FM + BFERT. Una tendencia similar se presentó en la



**Figure 1. Concentration (A) and content (B) of chlorophylls a, b and total in leaves and pseudobulbs of *Laelia anceps* subsp. *anceps* at the end of the experiment, with different fertilization treatments: C = control, MF = mineral fertilization, BFERT = biofertilization and MF + BFERT = mineral fertilization supplemented with biofertilization FW= fresh weight. <sup>z</sup>Means with the same letters in each plant organ do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).**

**Figura 1. Concentración (A) y contenido (B) de clorofilas a, b y totales en hojas y pseudobulbos de *Laelia anceps* subsp. *anceps* al final del experimento, con diferentes tratamientos de fertilización: TEA = testigo, FM = fertilización mineral, BFERT = biofertilización y FM + BFERT = fertilización mineral complementado con biofertilización PF= peso fresco. <sup>z</sup>Medias con letras iguales en cada órgano de la planta no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).**

and BFERT, compared to MF + BFERT and C plants. As for total chlorophylls in leaves, only the BFERT significantly increased its content ( $P = 0.0009$ ), while in pseudobulbs, both MF and BFERT gave statistically higher values ( $P = 0.0002$ ). In both organs, the chlorophyll b and total contents with MF + BFERT were significantly lower than the C plants (Figure 1B). Ling and Subramaniam (2007) found concentrations of total chlorophylls in *Phalaenopsis violacea* up to  $0.448 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , which were higher than the highest found with the MF and BFERT treatments for *L. anceps* subsp. *anceps* (from  $0.091$  to  $0.176 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Likewise, Trelka, Włodzimierz, Józwiak, and Kozłowska (2010) reported higher concentrations of chlorophyll a (from  $0.25$  to  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and b (around  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) in leaves of the *Phalaenopsis* orchid 'Sprigfield'. In *Laelia anceps* subsp. *anceps*, the concentration of chlorophyll a in leaves was higher than that reported by Hew and Yong (1994) for *Oncidium* 'Goldiana' ( $0.071 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

The results showed that the chlorophyll a, b and total contents in *L. anceps* subsp. *anceps* pseudobulbs, although they were smaller than in leaves, increased with MF and BFERT. Leaves are the main photosynthetic organs of plants; in addition, in orchids other non-foliar organs possess chlorophyll and are capable of fixing carbon dioxide, such as pseudobulbs, roots, flowers and capsules (Hew & Yong, 2004; Ng & Hew, 2000). The presence of chlorophylls in the various organs of the plant indicates that they also carry out photosynthesis (Vermaas, 1998). Additionally, the content of chlorophylls is closely related to the total nitrogen present in plant tissues, and, therefore, is an indirect indicator of the nutrient status of the plant (Zarco-Tejada et al., 2004).

### Concentration of amino acids

In pseudobulbs, the MF significantly increased ( $P = 0.0001$ ) the concentration of amino acids in relation to the rest of the treatments (Figure 2), while in leaves, fertilization treatments did not significantly ( $P = 0.549$ ) affect the concentration of amino acids.

### Concentration of proteins

In leaves, the concentration of proteins was significantly higher ( $P = 0.058$ ) with the MF + BFERT treatment than with the control. In pseudobulbs, there were no statistical differences due to the effect of treatments (Figure 3). The foliar concentration of proteins for *Laelia anceps* subsp. *anceps* was lower than that reported by Ling and Subramaniam (2007) for *Phalaenopsis violacea* ( $55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW). In several studies, the increase in total proteins has been observed in response to inoculation treatments of microorganisms or products derived from them, which

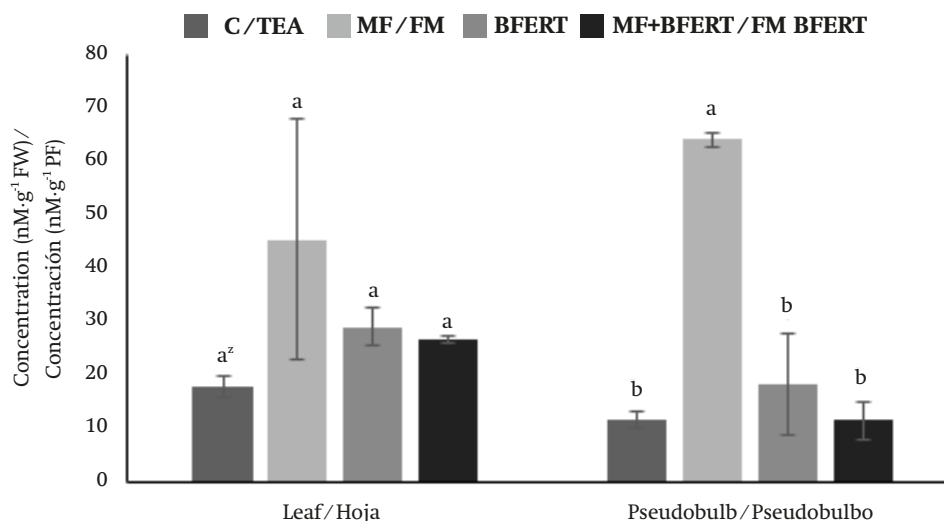
clorofila b ( $P = 0.048$ ) y clorofilas totales ( $P = 0.020$ ) (Figura 1A). En hoja, los tratamientos de fertilización aplicados no presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en los diferentes tipos de clorofila: a ( $P = 0.360$ ), b ( $P = 0.125$ ) y total ( $P = 0.161$ ) (Figura 1A).

En hojas y pseudobulbos, los contenidos de clorofila a y b fueron significativamente superiores ( $P \leq 0.05$ ) con FM y BFERT, en comparación con FM + BFERT y el TEA. Para el caso de clorofilas totales en hoja, únicamente el BFERT incrementó significativamente su contenido ( $P = 0.0009$ ); mientras que en pseudobulbo, tanto el FM como el BFERT dieron valores estadísticamente superiores ( $P = 0.0002$ ). En ambos órganos, los contenidos de clorofilas b y totales con FM + BFERT fueron significativamente inferiores al TEA (Figura 1B). Ling y Subramaniam (2007) encontraron concentraciones de clorofilas totales en *Phalaenopsis violacea* hasta de  $0.448 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , las cuales fueron superiores a las más altas encontradas con los tratamientos de FM y BFERT para *L. anceps* subsp. *anceps* (de  $0.091$  a  $0.176 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Asimismo, Trelka, Włodzimierz, Józwiak, y Kozłowska (2010) reportaron concentraciones mayores de clorofila a (de  $0.25$  a  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y b (alrededor de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en hojas de la orquídea *Phalaenopsis* 'Sprigfield'. En *Laelia anceps* subsp. *anceps*, la concentración de clorofila a en hoja fue mayor a la reportada por Hew y Yong (1994) para *Oncidium* 'Goldiana' ( $0.071 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Los resultados mostraron que los contenidos de clorofila a, b y totales en pseudobulbos de *L. anceps* subsp. *anceps*, si bien fueron menores que en hoja, incrementaron con la FM y la BFERT. Las hojas son los principales órganos fotosintéticos de las plantas, además, en orquídeas otros órganos no-foliares poseen clorofila y son capaces de fijar dióxido de carbono, tales como pseudobulbos, raíces, flores y cápsulas (Hew & Yong, 2004; Ng & Hew, 2000). La presencia de clorofilas en los diversos órganos de la planta indican que éstos también llevan a cabo la fotosíntesis (Vermaas, 1998). Adicionalmente, el contenido de clorofilas está estrechamente relacionado con el nitrógeno total presente en los tejidos vegetales, y por tanto, es un indicador indirecto del estado nutricional de la planta (Zarco-Tejada et al., 2004).

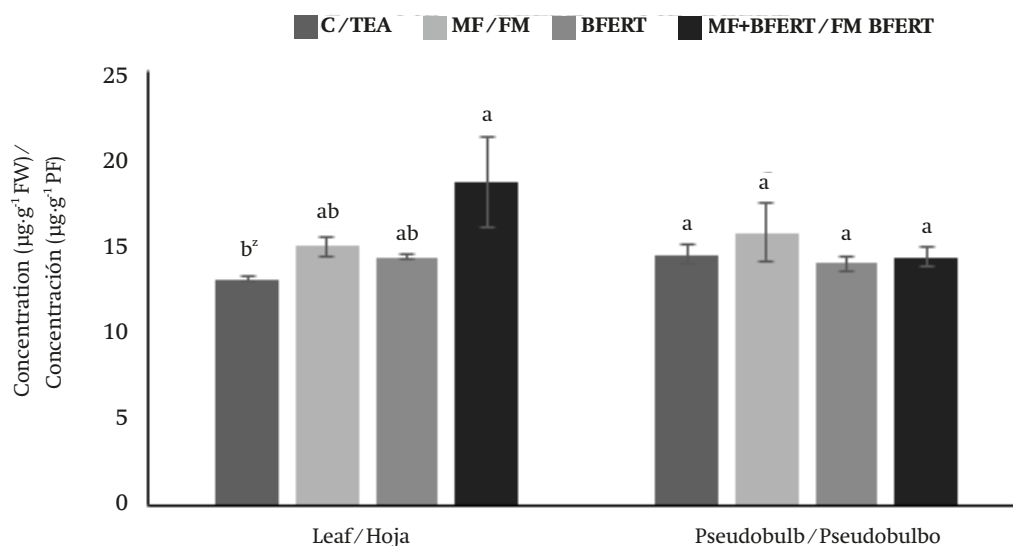
### Concentración de aminoácidos

En pseudobulbo, la FM incrementó significativamente ( $P = 0.0001$ ) la concentración de aminoácidos en relación con el resto de los tratamientos (Figura 2); mientras que en hoja, los tratamientos de fertilización no afectaron significativamente ( $P = 0.549$ ) la concentración de aminoácidos.



**Figure 2.** Concentration of total soluble amino acids in leaves and pseudobulbs of *Laelia anceps* subsp. *anceps* at the end of the experiment, with different fertilization treatments: C = control, MF = mineral fertilization, BFERT = biofertilization and MF + BFERT = mineral fertilization supplemented with biofertilization FW= fresh weight. <sup>z</sup>Means with the same letters in each plant organ do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

**Figura 2.** Concentración de aminoácidos solubles totales en hojas y pseudobulbos de *Laelia anceps* subsp. *anceps* al final del experimento, con diferentes tratamientos de fertilización: TEA = testigo, FM = fertilización mineral, BFERT = biofertilización y FM + BFERT = fertilización mineral complementado con biofertilización PF= peso fresco. <sup>z</sup>Medias con letras iguales en cada órgano de la planta no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figure 3.** Concentration of total soluble proteins in leaves and pseudobulbs of *Laelia anceps* subsp. *anceps* at the end of the experiment, with different fertilization treatments: C = control, MF = mineral fertilization, BFERT = biofertilization and MF + BFERT = mineral fertilization supplemented with biofertilization FW= fresh weight. <sup>z</sup>Means with the same letters in each plant organ do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

**Figura 3.** Concentración de proteínas solubles totales en hojas y pseudobulbo de *Laelia anceps* subsp. *anceps* al final del experimento, con diferentes tratamientos de fertilización: TEA = testigo, FM = fertilización mineral, BFERT = biofertilización y FM + BFERT = fertilización mineral complementado con biofertilización PF= peso fresco. <sup>z</sup>Medias con letras iguales en cada órgano de la planta no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

in turn is related to the crop growth and development (González-Vega, Hernández-Rodríguez, Barrios-Alonso, Velázquez-del Valle, & Hernández-Lauzardo, 2007).

In the present work, the protein concentration in leaves with BFERT showed a similar effect to that of MF. These results contrast with what was found by González, Cabrera, and Hernández (2002), who used RIZOBAC® microorganisms as bio-fertilizer in coffee plantlets and found that they had a higher concentration of total proteins than the control.

### Conclusions

The mineral fertilization and biofertilization applied individually increased the concentration of chlorophylls a, b and total in pseudobulbs, and their content in leaves and pseudobulbs. Mineral fertilization significantly increased the concentration of amino acids in pseudobulbs, and its combination with biofertilization increased the foliar concentration of proteins. The increase in the concentration of biomolecules such as chlorophylls, amino acids and proteins are directly related to plant growth, which in turn is an indicator of basic plant processes, such as photosynthesis, respiration and transpiration. It can thus be concluded that biofertilizers have potential for use in *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

### Acknowledgment

The authors are grateful to the Revocable Trust for Administration and Investment no. 167304 of the *Colegio de Postgraduados* for the partial funding granted for carrying out this research.

*End of English version*

### References / Referencias

- Abbasniayzare, S. K., Sedaghatthoor, S., & Dahkaei, M. N. P. (2012). Effect of biofertilizer application on growth parameters of *Spathiphyllum illusion*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(5), 669-673. Retrieved from [https://www.idosi.org/aejaes/jaes12\(5\)12/18.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes12(5)12/18.pdf)
- Amanullah, Kurd, A. A., Khan, S., Ahmed, M., & Khan, J. (2012). Biofertilizer -A possible substitute of fertilizers in production of wheat variety Zardana in Balochistan. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 25(1), 44-49. Retrieved from <https://www.cabi.org/gara/FullTextPDF/2013/20133358795.pdf>
- American Orchid Society (AOS). (22 de junio de 2017). [www.aos.org](http://www.aos.org)

### Concentración de proteínas

En hoja, la concentración de proteínas fue significativamente mayor ( $P = 0.058$ ) con la FM + BFERT que con el testigo. En pseudobulbo, no hubo diferencias estadísticas por efecto de tratamientos (Figura 3). La concentración foliar de proteínas para *Laelia anceps* subsp. *anceps* fue menor a la reportada por Ling y Subramaniam (2007) para *Phalaenopsis violacea* ( $55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  PF). En diversos estudios se ha observado el aumento de proteínas totales como respuesta a tratamientos de inoculación de microorganismos o productos derivados de éstos; lo que a su vez está relacionado con el crecimiento y desarrollo de los cultivos (González-Vega, Hernández-Rodríguez, Barrios-Alonso, Velázquez-del Valle, & Hernández-Lauzardo, 2007).

En el presente trabajo, la concentración de proteínas en hoja con la BFERT mostró un efecto similar al de la FM. Dichos resultados contrastan con lo encontrado por González, Cabrera, y Hernández (2002), quienes emplearon como biofertilizante microorganismos RIZOBAC® en plántulas de cafeto, y encontraron que éstas presentaron mayor concentración de proteínas totales con respecto al testigo.

### Conclusiones

La fertilización mineral y biofertilización aplicadas de manera individual incrementaron la concentración de clorofilas a, b y total en pseudobulbos, y su contenido en hojas y pseudobulbos. La fertilización mineral aumentó significativamente la concentración de aminoácidos en pseudobulbos, y la combinación de ésta con la biofertilización incrementó la concentración foliar de proteínas. El incremento de la concentración de biomoléculas como clorofilas, aminoácidos y proteínas se relacionan de manera directa con el crecimiento de la planta; que a su vez es un indicador de procesos básicos de las plantas entre los que se encuentran la fotosíntesis, respiración y transpiración. En este sentido, se detecta potencial en el uso de biofertilizantes para *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

### Agradecimiento

Los autores agradecen al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión núm. 167304 del Colegio de Postgraduados por el financiamiento parcial otorgado para la realización del presente trabajo.

*Fin de la versión en español*



- Bichsel, R. G., & Starman, T. W. (2008). Nitrogen, phosphorus, and potassium requirements for optimizing growth and flowering of the Noble *Dendrobium* as a potted orchid. *HortScience*, 43(2), 328-332. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/43/2/328.full>
- Boraste, A., Vamsi, K. K., Jhadav, A., Khairnar, Y., Gupta, N., Trivedi, S., Patil, P., Gupta, P., Gupta, M., Mujapara, A. K., & Joshi, B. (2009). Biofertilizers: A novel tool for agriculture. *International Journal of Microbiology Research*, 1(2), 23-31. doi: 10.9735/0975-5276.1.2.23-31
- Chang, K. H., Wu, R. Y., & Hsieh, T. F. (2010). Effects of fertilizer formulations on flowering of *Doritaenopsis* 'I-Hsin Madame' in gradational nutrition management. *Acta Horticulturae*, 878, 347-354. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.878.43
- Daughtrey, M. L., & Benson, D. M. (2005). Principles of plant health management for ornamental plants. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 41-69. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140007
- El-Sayed, B. A., Shahin, M., & Zaky, A. A. (2012). Effect of biofertilization on growth and chemical composition of *Gardenia augusta* Ellis. *Plant Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 4(3), 340-344. doi: 10.5829/idosi.jhsop.2012.4.3.265
- Espinosa-Moreno, J. A., Gaytán-Acuña, E. A., Becerril-Román, A. E., Contreras, D. J., & Trejo-López, C. (2000). Fertilización química y biológica de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) en condiciones de invernadero. *Terra Latinoamericana*, 18(2), 125-131. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57318204>
- Geiger, M., Walch-liu, P., Engels, C., Harnecker, J., Schulze, E. D., Ludewing, F., Sonnewald, U., Scheible, W. R., & Stitt, M. (1998). Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell & Environment*, 21(3), 253-268. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00277.x
- González, E. M., Cabrera, M., & Hernández, A. (2002). Efecto del biopreparado Rizobac sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de café (*Coffea canephora* P. var. Robusta). *Cultivos Tropicales*, 23(2), 11-14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218114002>
- González-Vega, M. E., Hernández-Rodríguez, A., Barrios-Alonso, L. M., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2007). Efecto antagónico de un producto biológico obtenido de *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holmes contra *Capnodium* spp. en plántulas de café (*Coffea canephora* P.) crecidas *in vitro* e *in vivo*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 120-126. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225205>
- Hågsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A., & Dressler, R. L. (2005). *Las Orquídeas de México*. México: Instituto Chinoín.
- Harborne, J. B. (1973). Chlorophyll extraction. In: Harborne, J. B. (Ed.), *Phytochemical Methods Recommended technique* (pp. 205-207). London: Chapman and Hall.
- Hew, C. S., & Yong, W. H. (2004). *The physiology of tropical orchids in relation to the industry*. Singapore: World Scientific.
- Hew, C. S., & Yong, W. H. (1994). Growth and photosynthesis of *Oncidium* 'Goldiana'. *Journal of Horticultural Science*, 69(5), 809-819. doi: 10.1080/14620316.1994.11516517
- Höfner, R., Vázquez-Moreno, L., Abou-Mandour, A. A., Bohnert, H. J., & Schmitt, J. M. (1989). Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27, 803-810.
- Lakshman, C. D., Pathak, P., Rao, A. N., & Rajeevan, P. K. (2014). *Commercial Orchids*. Berlin, Germany: De Gruyter Open.
- Lima-do Amaral, T., Mendes-Jasmim, J., de Paula-Araújo, J. S., Lima-Thiébaud, J. T., Cunha-Coelho, F., & Barreto-de Freitas, C. (2010). Adubação de orquídeas em substratos com fibra de coco. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(1), 11-19. doi: 10.1590/S1413-70542010000100001
- Ling, L. F., & Subramaniam, S. (2007). Biochemical analyses of *Phalaenopsis violacea* orchids. *Asian Journal of Biochemistry*, 2(4), 237-246. doi: 10.3923/ajb.2007.237.246
- Moore, S., & Stein, H. (1954). Techniques of laboratories. *Journal of Biological Chemistry*, 38, 211-907.
- Ng, C. K. Y., & Hew, C. S. (2000). Orchid pseudobulbs – 'false' bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! *Scientia Horticulturae*, 83(3-4), 165-172. doi: 10.1016/S0304-4238(99)00084-9.
- Rodrigues, D. T., Ferreira-Novais, R., Alvarez, V. H., Moreira-Dias, J. M., & de Albuquerque-Villani, E. M. (2010). Orchid growth and nutrition in response to mineral and organic fertilizers. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(5), 1609-1616. Retrieved from <http://sociales.redalyc.org/articulo.oa?id=180215650014>
- Scagel, C. F. (2003) Soil pasteurization and inoculation with *Glomus intraradices* alters over production and bulb composition of *Zephyranthes* spp. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 8(6), 798-812. doi: 10.1080/14620316.2003.11511702
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2010). *SAS/STAT user's guide, version 9.2*. Cary, USA: Author.
- Trejo-Téllez, L. I., Gómez, F., Rodríguez, N., & Alcántar, G. (2005). Fertilización foliar con urea en la partición de nitrógeno en espinaca. *Terra Latinoamericana*, 23(4), 495-503. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57311146008>
- Trelka, T., Włodzimierz, B., Józwiak, A., & Kozłowska, A. (2010). *Phalaenopsis* cultivation in different media. Part II. Nutrients and chlorophyll concentration in leaves and roots. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 9(3), 95-104. Retrieved from [http://www.hortorumcultus.actapol.net/pub/9\\_3\\_95.pdf](http://www.hortorumcultus.actapol.net/pub/9_3_95.pdf)
- Vermaas, W. (1998). *An introduction to photosynthesis and its applications*. USA: Arizona State University.
- Villar, S. (2003). Importancia de la calidad de planta en los proyectos de revegetación. In: Rey-Benayas J. M., Espigares-Pinilla, T., & Nicolau-Ibarra, J. M. (Eds.), *Restauración de Ecosistemas Mediterráneos*. España: Universidad de Alcalá - Asociación Española de Ecología Terrestre.

- Wang, Y. T. (2000). Impact of a high phosphorus fertilizer and timing of termination of fertilization on flowering of a hybrid moth orchid. *HortScience*, 35(1), 60-62. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/35/1/60.abstract>
- Wang, Y. T. (1996). Effects of six fertilizers on vegetative growth and flowering of *Phalaenopsis* orchids. *Scientia Horticulturae*, 65(2-3), 191-197. doi: 10.1016/0304-4238(96)00875-8
- Youssef, M. M. A., & Eissa, M. F. M. (2014). Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 5(1), 1-6. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/8235/92b71cb553d9893475c2f76806c5ef181c7.pdf>
- Zarco-Tejada, P., Miller, J., Harron, J., Hu, B., Noland, T., Goel, N., Mohammed, G., & Sampson, P. (2004). Needle chlorophyll content estimation through model inversion using hyperspectral data from boreal conifer forest canopies. *Remote Sensing of Environment*, 89(2), 189-199. doi: 10.1016/j.rse.2002.06.002
- Zong-min, M., Ning, Y., Shu-yun, L., & Hong, H. (2012). Nitrogen requirements for vegetative growth, flowering, seed production, and ramet growth of *Paphiopedilum armeniacum* (Orchid). *HortScience*, 47(5), 585-588. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/47/5/585.full>