

## EFFECTO DE N<sup>6</sup>-BENCILADENINA Y FOTOPERIODO EN LA FLORACIÓN DE PROTOCORMOS *in vitro* DE *Bletia urbana* (ORCHIDACEAE)

## EFFECT OF N<sup>6</sup>-BENZYLADENINE AND PHOTOPERIOD ON THE FLOWERING OF *in vitro* PROTOCORMS OF *Bletia urbana* (ORCHIDACEAE)

Susana Guillén-Rodríguez<sup>1</sup>, Cecilia Cruz-López<sup>1</sup>, José Guadalupe Martínez-Avalos<sup>2</sup> y Alejandro Martínez-Palacios<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Forestales, Xalapa, Veracruz, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, Instituto de Ecología Aplicada, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. <sup>3</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Tarímbaro, Michoacán, México.

\*Autor de correspondencia (alejandro.palacios@umich.mx)

### RESUMEN

La floración es la etapa de inicio de la fase reproductiva en las plantas, ésta inicia cuando se presentan condiciones ambientales específicas que inducen la producción de hormonas. En orquídeas diversos factores inducen la floración *in vitro*, destacando la adición de citocininas al medio de cultivo; sin embargo, su efecto no es claro debido a su uso combinando con otras hormonas y bajo diversas condiciones de fotoperiodo. Para conocer el efecto de la N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) y el fotoperiodo sobre la floración *in vitro* de *Bletia urbana* (especie en riesgo) se cultivaron protocormos (tejido inmaduro) en medio Knudson C (KC) con diferentes concentraciones de BA (1, 5, 10, 15, 20 y 30 µM) e incubados bajo cinco regímenes de fotoperiodo: corto, neutro, largo y combinación corto/neutro y corto/largo; adicionalmente, en otro experimento, se registró la floración de plantas cultivadas en medio KC basal e incubadas en condiciones ambientales naturales. Después de 35 semanas del cultivo se contabilizó el número de flores, brotes y hojas, y se registró el crecimiento de las plantas en términos de altura y longitud de las raíces. Se utilizaron modelos bayesianos, modelos lineales generalizados y modelos lineales para las distintas respuestas. Los modelos mostraron mayor probabilidad de floración con concentraciones de 20 y 30 µM de BA; sin embargo, bajo tales condiciones las plantas tuvieron menor producción de brotes, hojas y menor crecimiento. Las plantas cultivadas en condiciones naturales generaron flores, frutos y semillas viables, coincidiendo con su fenología. Las flores desarrolladas por protocormos presentaron anomalías en color y diámetro, no así las desarrolladas por plantas maduras. En protocormos de *B. urbana* la BA induce la floración *in vitro*, con anomalías que podrían deberse al uso de tejido inmaduro, al alto efecto inductor de la BA y al uso de un medio de cultivo pobre en nutrientes.

**Palabras clave:** *Bletia urbana*, benciladenina, medio KC, morfogénesis, orquídea, protocormos.

### SUMMARY

Flowering is the initial stage of the reproductive phase in plants, it begins when specific environmental conditions occur that induce the production of hormones. In orchids, various factors induce flowering *in vitro*, including the addition of cytokinins to the culture medium; however, its effect is not clear due to its use in combination with other hormones and under various photoperiod conditions. In order to know the effect of N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) and photoperiod on *in vitro* flowering of *Bletia urbana* (an endangered species) protocorms (immature tissue) were cultured in Knudson C (KC) medium with

different concentrations of BA (1, 5, 10, 15, 20 and 30 µM) and incubated under five photoperiod regimes: short, neutral, long and short/neutral and short/long combinations; additionally, in another experiment, the flowering of plants cultured in basal KC medium and incubated at natural environmental conditions was recorded. After 35 weeks of culture, the number of flowers, shoots and leaves was counted, and the growth of the plants in terms of height and root length was recorded. Bayesian models, generalized linear models and linear models were used for the different responses. Models showed greater probability of flowering with concentrations of 20 and 30 µM of BA; however, under such conditions the plants showed lower production of shoots, leaves and lower growth. Plants grown under natural conditions generated viable flowers, fruits and seeds, coinciding with their natural phenology. The flowers developed by protocorms presented abnormalities in color and diameter, unlike those developed by mature plants. In *B. urbana* protocorms BA induces flowering *in vitro*, with abnormalities that might be due to the use of immature tissue, the high inducing effect of BA, and the use of a nutrient-poor culture medium.

**Key Words:** *Bletia urbana*, benzyladenine, KC medium, morphogenesis, orchid, protocorms.

### INTRODUCCIÓN

*Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) es endémica de México, y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se encuentra amenazada (SEMARNAT, 2010). Esta especie se distribuye en el Estado de México, Oaxaca, Puebla y Morelos (CONABIO, 2021); sin embargo, en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA, CDMX) se encuentra la mayor población, aunque ésta no sobrepasa los 20 individuos, por lo que *B. urbana* está en grave riesgo de desaparecer, debido principalmente al constante crecimiento urbano (Palacio y Guilbaud, 2015). Desde la década de los 1980s, *B. urbana* ha sido reconocida internacionalmente como modelo de numerosos estudios *in vitro* enfocados en la micropropagación, germinación asimbiótica y simbiótica, y la eco-restauración, cuyos resultados han ayudado a generar estrategias de conservación *in situ* para esta y

otras especies de orquídeas (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco, 2007).

A pesar de que *B. urbana* ha sido ampliamente estudiada, poco se conoce acerca de su fisiología. La floración es la fase morfológica que indica el inicio de la madurez de la planta y la finalización de la etapa juvenil o vegetativa. Las orquídeas, en muchos casos, se caracterizan por una etapa juvenil muy larga, acentuándose bajo condiciones naturales desfavorables, en estos casos las estructuras de reserva les permiten permanecer latentes por más de un año, prolongando su periodo vegetativo y de supervivencia (Shefferson *et al.*, 2018).

Los factores que determinan si una planta de orquídea florecerá o no, y su contribución a la dinámica poblacional son complejos y poco conocidos (Hurskainen *et al.*, 2018); sin embargo, se sabe que la probabilidad que tiene una orquídea de florecer en un año determinado depende por un lado de factores intrínsecos (*e.g.* madurez fisiológica de cada especie, acumulación de reservas y tamaño de las estructuras vegetativas) de cada especie y también de factores externos (*e.g.* temperatura, fotoperiodo) a los que estén expuestos (Song *et al.*, 2013). En condiciones *ex situ* las señales que disparan el cambio del destino del meristemo apical incluyen la madurez de la planta, la temperatura y el fotoperiodo (Wen *et al.*, 2017). En condiciones *in vitro* se ha inducido la floración en aproximadamente seis meses, lo cual está relacionado con los componentes del medio de cultivo (*e.g.* la concentración de sales minerales, sacarosa, diferentes reguladores del crecimiento) (Teixeira da Silva *et al.*, 2014).

La floración *in vitro* se considera floración precoz, debido a que en algunos casos se ha iniciado a partir de semillas y protocormos. Esta respuesta se ha atribuido a la adición al medio de cultivo de citocininas, auxinas, giberelinas y otras sustancias, así como la modificación de la fuente de carbono, destacando N<sup>6</sup>-benciladenina (BA), que tiene un fuerte efecto en la inducción de la floración (Chang y Chang, 2003; Lee y Chen, 2014; Teixeira da Silva *et al.*, 2014).

El uso de la BA como inductor de floración *in vitro* se remonta a los trabajos con *Vitis vinifera* L. (Srinivasan y Mullins, 1978); en orquídeas, Duan y Yazawa (1995) fueron de los primeros en reportar su efecto en *Phalaenopsis*; por su parte, Rubluo *et al.* (1989), al evaluar el efecto de la BA en la inducción *in vitro* de brotes en secciones de protocormos de *Bletia urbana*, observaron que algunos explantes expresaron floración. Estudios de la luz, el fotoperiodo y la temperatura en la inducción de la floración han sido pocos y pobremente abordados (Teixeira da Silva

*et al.*, 2014), aunque estos factores inducen el proceso de floración (Salisbury, 1981), no se conoce la magnitud de su efecto, o si un factor sustituye a otro. *Dendrobium nobile* Lindl. requiere de temperaturas bajas o días fríos para iniciar la floración, también se registra que el frío puede ser sustituido por la aplicación de BA *ex vitro* (Wen *et al.*, 2017). El cultivo de *Psychmorchis pusilla* Dodson y Dressler en días largos resultó en un mayor crecimiento de hojas y niveles altos de azúcar soluble y almidón, que derivó en la formación de espigas florales (Vaz *et al.*, 2004).

Bajo este marco teórico, la expresión errática de floración en *B. urbana* requiere ser investigada con mayores bases junto con el fotoperiodo. Aunque se trata de una especie que ha sido muy estudiada, no se conoce el efecto de la N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) en la inducción de la floración *in vitro* y menos aún el efecto del fotoperiodo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de BA y fotoperiodo en la inducción de floración *in vitro* de *Bletia urbana* y otras respuestas morfogénicas en protocormos y en plantas, todos derivadas de semillas. Los resultados de este estudio pueden aportar conocimiento acerca de la fisiología de las orquídeas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se usaron semillas de tres cápsulas dehiscentes de *Bletia urbana* colectadas en la Reserva Ecológica Pedregal de San Ángel (REPSA), ubicada al suroeste de la Ciudad de México (19° 14' a 19° 25' N y 99° 08' a 99° 15' W) y comprende 237 ha (Callejas-Chavero *et al.*, 2015), registra una altitud de 2200 a 2277 msnm y presenta un clima templado subhúmedo, con una precipitación y temperatura promedio anual de 835 mm y 15.5 °C, respectivamente (Castillo *et al.*, 2016). Las semillas recolectadas *in situ* se depositaron en un sobre de papel y se transportaron al IIAF-UMSNH. Además de las semillas producidas *in situ*, se utilizaron semillas producidas *in vitro* por plantas cultivadas en medio KC basal (Knudson, 1946) e incubadas en una cámara rústica. La región de San Pedro Atocpan, Delegación Milpa Alta en Ciudad de México, donde se ubica la cámara, reportó intervalo de temperatura de 3 a 27 °C entre los meses de su cultivo y una temperatura media anual de 14.5 °C (García, 2004). Los cultivos estuvieron expuestos a 1200 lux en las horas de máxima radiación de la luz natural registrada por la tarde, debido a la exposición al poniente de la ventana. Estas plantas florecieron a fines de julio y el fruto se obtuvo en diciembre. El uso de semillas producidas *in vitro* tuvo el propósito de registrar la viabilidad, derivada de la autopolinización.

### Germinación asimbiótica

Las semillas provenientes de la reserva se desinfectaron y se colocaron en un vidrio de reloj con hipoclorito de calcio 7 %; posteriormente, se agitaron vigorosa y manualmente durante 30 min usando una aguja de disección. La solución desinfectante se absorbió con ayuda de una jeringa y las semillas se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada esterilizada. Las semillas producidas *in vitro* no requirieron desinfección y fueron plantadas directamente en el medio de cultivo. Para la evaluación de germinación se usaron cajas de Petri (100 × 15 mm) esterilizadas con 15 mL de medio KC. Se sembraron aproximadamente 150 semillas por caja en cuatro réplicas. Previo a su uso, todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave vertical (Felisa FE399, Zapopan, Jalisco, México) a 1.47 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 120 °C por 15 min. Las cajas de Petri con semillas se incubaron bajo 16/8 h luz/oscuridad, la radiación fotosintéticamente activa y la temperatura se mantuvieron constantes a 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 27 ± 2 °C, respectivamente.

### Evaluación de respuesta morfológica en protocormos

A los 30 días de sembradas las semillas se obtuvieron protocormos esféricos de 1 mm de diámetro (Etapa 1), se subcultivaron a frascos de 120 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo KC, suplementado con BA a diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10, 15, 20 y 30 μM), lo cual generó siete tratamientos. En cada frasco se establecieron ocho protocormos y cada tratamiento de BA tuvo cuatro réplicas, lo que dio un total de 28 frascos. Con la finalidad de probar el efecto del fotoperiodo, las siete concentraciones de BA se analizaron de manera independiente bajo cinco condiciones de fotoperiodo: 1) corto, 8 h luz y 16 h oscuridad, 2) neutro, 12 h luz y 12 h oscuridad, 3) largo, 16 h luz y 8 h oscuridad, 4) combinación, corto (8/16 h luz/oscuridad) durante los primeros 60 días y posteriormente incubados en fotoperiodo neutro (12/12h luz/oscuridad) hasta el final del experimento, este tratamiento de fotoperiodo se registró como (8/16 → 12/12 h luz/oscuridad), y 5) corto (8/16 h luz/oscuridad) los primeros 60 días y posteriormente incubados en fotoperiodo largo (16/8h luz/oscuridad) hasta el final del experimento, este tratamiento se registró como (8/16 → 16/8 h luz/oscuridad). En total, los 35 tratamientos y 140 frascos se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar, incubados bajo condiciones constantes de intensidad luminosa de 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y temperatura de 27 ± 2 °C. Después de 35 semanas de incubación sin aplicación de subcultivos, se registró la respuesta morfológica de los protocormos mediante un conteo del número de flores, raíces, hojas y brotes; además, se evaluó el crecimiento de

las plantas midiendo su altura (cm) y longitud de raíces (mm).

### Subcultivo de plántulas en medio KC basal en condiciones ambientales naturales

Doce plantas provenientes de la germinación asimbiótica de semillas de campo se subcultivaron en tubos de ensayo de 70 mL capacidad, cada tubo contenía 25 mL de medio KC basal. Se incubaron desde el mes de enero en una cámara rústica (condiciones descritas arriba), con protección o cortina para permitir sólo la entrada de luz indirecta.

### Análisis estadístico

Los datos del número de flores, brotes y hojas generados a partir de los diferentes tratamientos se modelaron a través de distribuciones Poisson (P), binomial negativa (BN), Poisson inflada con ceros (PIC) y binomial negativa inflada con ceros (BNIC), debido al exceso de ceros que tenían algunas variables. Para estimar los modelos se utilizó el algoritmo de aproximación anidada integrada de Laplace, o INLA, basado en inferencia bayesiana (Rue *et al.*, 2009) a partir de modelos aditivos generalizados (GAM, Generalized Additive Models) como función de suavizamiento. Para evaluar la calidad de ajuste de los modelos se utilizaron los indicadores Criterio de Información de Desviación (DIC, por sus siglas en inglés) (Acquah, 2010), que proporciona la bondad de ajuste, y el Criterio de información Watanabe-Akaike (WAIC) (Watanabe, 2010), que trabaja con la densidad de probabilidad predictiva de las variables observadas. Para el crecimiento de los brotes (altura) y las raíces (longitud) se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple con las variables transformadas debido a que no se cumplían los supuestos del modelo. usando la transformación de logaritmo natural para la altura y raíz cuadrada para la longitud; sin embargo, el efecto de los niveles de los tratamientos fue el mismo con o sin transformación de la variable. Los análisis fueron realizados utilizando el programa R versión 4.0.5 (R Core Team, 2021).

## RESULTADOS

### Germinación asimbiótica de semillas

El inicio de la germinación fue evidente a los 10 días del cultivo de las semillas, cuando presentaron hinchamiento y color verde claro. Las semillas producidas *in situ* registraron un promedio de 92 % de germinación y las semillas producidas *in vitro* registraron un promedio de germinación de 89 %.

### Efecto de la BA y fotoperiodo en la respuesta morfológica (flores, brotes, hojas y crecimiento) de protocormos

El inicio de la floración *in vitro* a partir de protocormos se observó después de 26 semanas de iniciar el tratamiento; sin embargo, la evaluación se realizó a las 35 semanas, hasta que se estabilizaron las respuestas en todos los tratamientos. Se registró un alto número de protocormos sin respuesta de floración (670 observaciones). Después de construir los diferentes modelos que evaluaron el efecto de la BA y el fotoperiodo sobre el número de flores, brotes y hojas, se encontró que el modelo con mayor ajuste para el número de flores fue BNIC (DIC = 1693.29, WAIC = 1693.39). El suavizamiento mostró que a partir de la concentración 5  $\mu$ M de BA algunos protocormos producen flores; sin embargo, las concentraciones 20 y 30  $\mu$ M registraron la mayor respuesta de floración (Figura 1A). Para el número de brotes y hojas el modelo con mayor ajuste también fue BNIC (brotes DIC = 4446.83; WAIC = 4449.16; hojas DIC = 5233.28; WAIC = 5236.28) en 5  $\mu$ M de BA, con el cual se aumentó la producción de brotes y hojas, a 15  $\mu$ M llegó a su máximo y a partir de 20  $\mu$ M disminuyó (Figuras 1B y C). Al modelar las variables respuesta con fotoperiodo, usando modelos lineales generalizados, se encontró que sólo el fotoperiodo largo (16 h luz) fue significativo con la variable brotes; sin embargo, el efecto fue negativo (-0.33), lo que indica que bajo este fotoperiodo disminuye el número de brotes (Figura 2 A-C).

La regresión lineal de la altura de las plantas (transformada con log) fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) explicada por los tratamientos de BA y fotoperiodos neutro (12 h), largo (16 h) y corto neutro (8/12 h). El efecto de los coeficientes estimados fue negativo en todos los niveles de BA y fotoperiodo largo (16), indicando que la altura de las plantas disminuyó conforme aumentó la concentración de BA bajo el fotoperiodo largo (Figuras 1D, 2D). La regresión lineal de la longitud de la raíz (transformada con raíz cuadrada) fue significativa ( $P < 0.05$ ) y explicada por todos los tratamientos de BA que resultaron con un efecto negativo, el cual implica una disminución en la longitud de las raíces conforme aumentó la concentración de BA; en cambio, el fotoperiodo largo tuvo un efecto positivo que mostró aumento en la longitud de las raíces (Figuras 1E, 2E). En todos los modelos se incluyó la interacción entre BA y fotoperiodo, pero no resultó significativa.

Las flores desarrollaron todas las estructuras; sin embargo, mostraron diferencias morfológicas a lo largo del gradiente de concentración de BA. En los medios con 1-10  $\mu$ M de BA las flores fueron blancas, con pétalos y sépalos, de textura firme y más grandes en comparación con las generadas en concentraciones mayores (Figura 3 C-I).

### Efecto de los factores ambientales en la inducción de floración *in vitro* en plantas de *Bletia urbana*

Solamente una planta floreció y fructificó de las desarrolladas *in vitro* (Figura 3B) y subcultivadas en tubos de ensaye en medio basal después de siete meses en cultivo (Figura 3K). La flor midió aproximadamente 24 mm de la base al extremo distante y los pétalos y sépalos presentaron tonalidades suaves de color rosa-salmón, fue muy semejante a los colores intensos que presentan las flores de las plantas que crecen *in situ* (Figura 3A). Después de cinco meses adicionales se pudo observar el desarrollo de un fruto como resultado de la autogamia, y posteriormente, la formación de semillas con capacidad de germinar.

### Discusión

De acuerdo con los resultados, *B. urbana* florece *in vitro*. La inducción de floración *in vitro* fue observada por primera vez en orquídeas (*Laelia*  $\times$  *Cattleya hybrid*) en 1929 (Knudson, 1930); sin embargo, nunca se determinó el factor que estimuló esta respuesta. Los primeros reportes registran a las citocininas entre los reguladores del crecimiento que promueven la floración en diversos grupos de plantas, acción que se ha registrado también *in vitro* (Peeters *et al.*, 1991). El estímulo de floración *in vitro* en *B. urbana* requirió más de seis meses de cultivo en presencia de hormonas. En los diversos reportes se registra el requerimiento de un periodo de cuatro a ocho meses para expresar la floración a partir del inicio de la estimulación a través de hormonas (Teixeira da Silva *et al.*, 2014). La adición de BA al medio KC indujo en *B. urbana* la respuesta de floración en tejido inmaduro (protocormo) y este efecto fue aún más contundente cuando se observó que el número de flores por individuo incrementó con la concentración de la hormona. Dentro de la familia Orchidaceae, la BA sola o combinada con otros reguladores del crecimiento induce la formación de flores *in vitro* sólo en algunos géneros, entre los que destacan por su importancia comercial *Cymbidium* (Chang y Chang, 2003), *Dendrobium* (Lee y Chen 2014; Sim *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2017) y *Phalaenopsis* (Duan y Yazawa, 1995).

En presencia de BA, los protocormos de *B. urbana* desarrollaron flores morfológicamente completas; sin embargo, conforme aumentó la concentración de BA se presentaron anomalías como la disminución del diámetro de las flores y del color de los sépalos y pétalos. La BA en concentraciones altas genera anomalías florales, como la ausencia de estructuras florales y flores con colores y tamaños diferentes a los normales (Tee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). En *B. urbana* las anomalías en cuanto al color y diámetro de las flores podrían deberse a

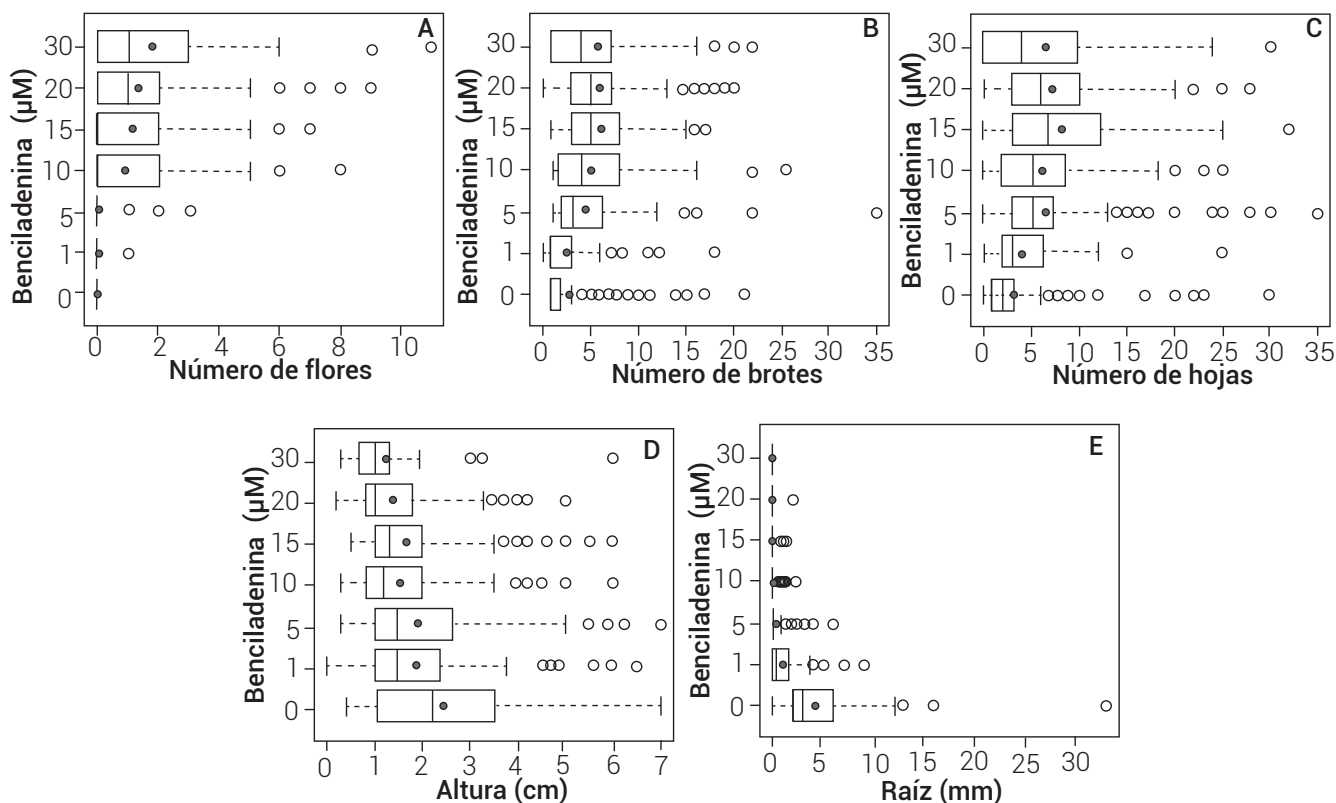


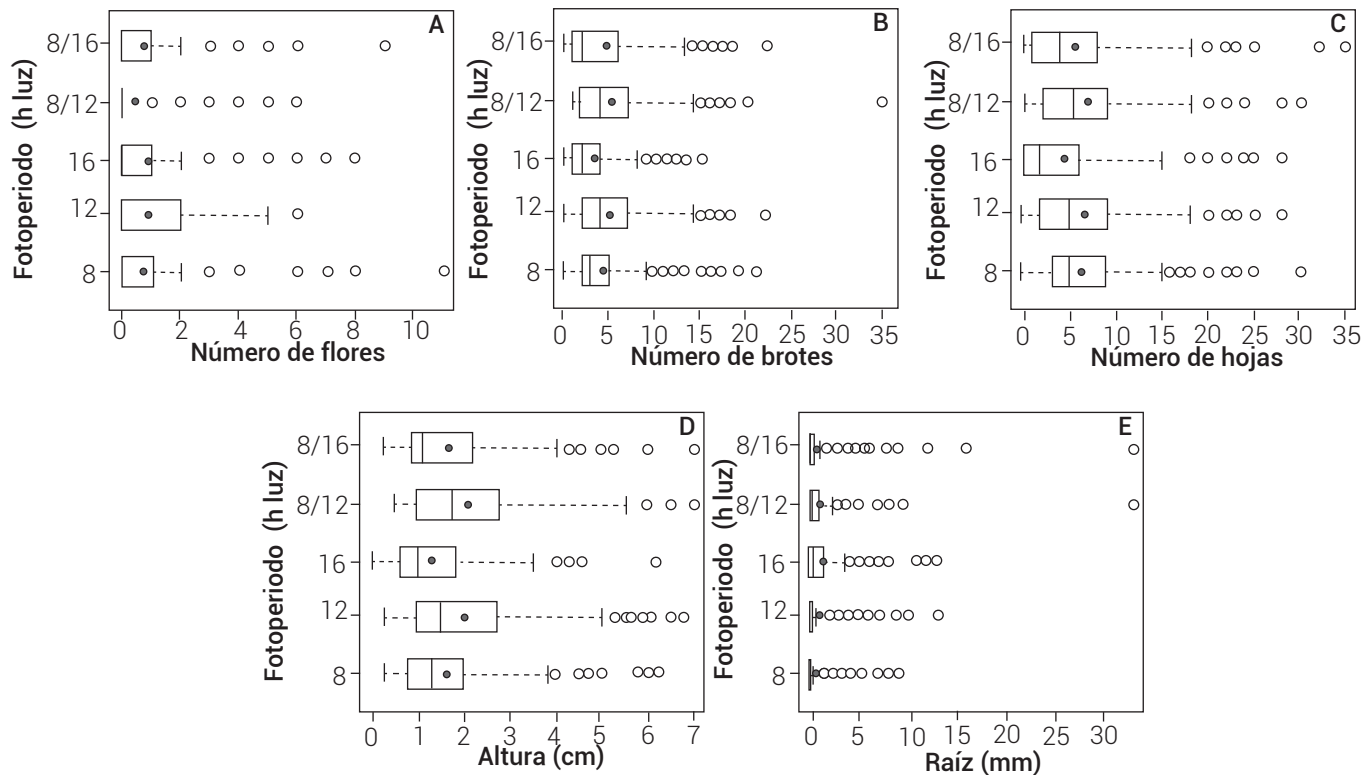
Figura 1. Respuesta morfológica *in vitro* en protocormos de *Bletia urbana* cultivados en 0, 1, 5, 10, 15, 20 y 30  $\mu\text{M}$  de Benziladenina (BA) (Cuadrado: media; línea: mediana).

factores como el uso de protocormos, que es considerado como un estado inmaduro de las plantas y carente de reservas, otro factor podría ser el sobreestímulo de respuesta por la acción de la BA y también el uso del medio KC, que se considera pobre en sales minerales y fuente de carbono (azúcar), carente de vitaminas, aminoácidos y extractos orgánicos (Mohanty *et al.*, 2012).

En *B. urbana*, un fotoperiodo neutro mostró la mayor floración, lo que podría explicarse por adaptaciones que la especie ha desarrollado en su hábitat. La ubicación geográfica del hábitat natural de esta especie está dentro de las coordenadas de la región tropical, donde las horas de oscuridad y luz por día, a lo largo del año varían poco (Palacio y Guilbaud, 2015). Por otro lado, en su hábitat, *B. urbana* florece en verano entre los meses de julio y septiembre (Téllez y Flores, 2007). Antes de que la floración ocurra, las plantas han estado expuestas a diversos factores ambientales que estimulan o desencadenan el inicio de este proceso. En su ambiente natural, los cormos de *B. urbana* son las únicas estructuras perennes durante el periodo de secas, éstos permanecen enterrados cerca de la superficie del escaso suelo y están expuestos a las bajas temperaturas del invierno que ocurren de diciembre

a marzo; esta vernalización podría ser el estímulo inicial que desencadena la floración. Para las plántulas de *B. urbana* desarrolladas siempre en medio basal y que fueron subcultivadas en el mismo medio basal, con la variante de sujetar en cámara rústica de incubación (luz, temperatura y fotoperiodo natural del invierno del 2010-2011, con descenso de temperatura invernal de hasta de 6.2 °C), requirieron de un periodo de seis meses (26 semanas) para el surgimiento (< 10 %) de la floración *in vitro* y su posterior fecundación autógama y desarrollo a fruto. La autogamia es un sistema reproductivo común en el género *Bletia*, característica en los primeros estados de sucesión de las plantas colonizadoras (Dressler, 1968). En relación con la estimulación de la floración en medio basal y a temperaturas frías, nuevas líneas de investigación podrían ser orientadas a explorar la vernalización en esta especie.

Las citocininas son inductoras de brotes adventicios y desarrollo de yemas axilares (George *et al.*, 1993). En el caso de *B. urbana*, además de inducir la floración *in vitro*, la BA también tuvo efecto en la producción de brotes y hojas, que incrementaron conforme aumentó la concentración de BA hasta llegar a un punto crítico en las concentraciones más altas, donde la producción de estructuras vegetativas



**Figura 2.** Respuesta morfológica *in vitro* en protocormos de *Bletia urbana* bajo fotoperiodo corto (8 h luz), neutro (12 h luz), largo (16 h luz), y combinación corto con neutro (8/12) y combinación corto con largo (8/16) (Cuadrado: media; línea: mediana).

disminuyó. Este efecto de la BA coincide con el reportado para yemas axilares de *Dendrobium nobile* que en 2 mg L<sup>-1</sup> de BA, que corresponde a un tratamiento intermedio de los probados en el presente estudio, registró el mayor número de brotes, a diferencia de concentraciones más altas, donde se observó necrosis en el tejido (Asghar *et al.*, 2011); sin embargo, en otras especies el efecto de la BA no es claro, pues en segmentos de protocormos de *Coelogyne cristata* se registraron las mejores respuestas de inducción de brotes, cuando se combinó BA (1 mg L<sup>-1</sup>) y ácido naftalenacético (0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>) (Naing *et al.*, 2010); por el contrario, en plántulas derivadas de la germinación de semillas de *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f, el número de brotes inducidos fue menor en presencia de BA y mayor con la sola presencia de auxinas (Tikendra *et al.*, 2018). Con todo esto queda claro que el efecto de la BA en la inducción de brotes parece variar de acuerdo con las hormonas utilizadas, su concentración y el tejido utilizado como explante.

El número de hojas en *B. urbana* hasta cierto punto es inducida por la BA, aunque esta respuesta es inversamente

proporcional a la altura de las plantas, por lo que podría haber una reasignación de recursos, aunque esto es necesario explorarlo, pues además se presentaron otras anomalías como la disminución en el crecimiento de los brotes y la inhibición del desarrollo de la raíz. Estos resultados no coinciden con los reportados en *Rhynchostylis retusa* BL., donde el número de hojas fue mayor en concentraciones bajas de BA y por arriba de 1 mg L<sup>-1</sup> de BA disminuía su respuesta (Naing *et al.*, 2010), siendo claro que el efecto de la BA parece ser muy específico.

Las hojas de *B. urbana* son caducifolias y sus flores son efímeras; sin embargo, en condiciones *in vitro* y en presencia de BA las plantas no pierden las hojas, y las flores pierden esa característica de senescencia, permaneciendo por más de cuatro semanas sin presentar cambio aparente. Se ha reportado que en los cultivos *in vitro* la BA retrasa la senescencia, incrementa la actividad fotosintética, el contenido proteico, y entre otras respuestas, incrementa la presencia de antioxidantes (Wilson-García *et al.*, 2008).

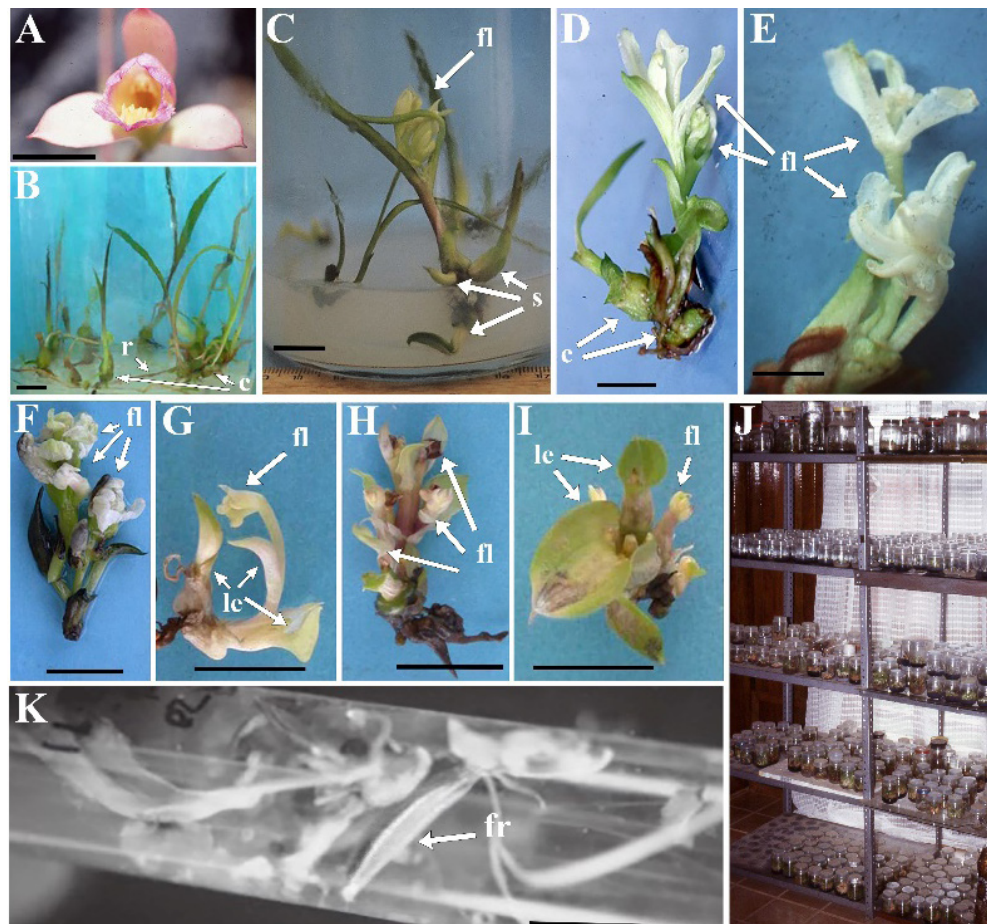


Figura 3. Floración *in vitro* de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae). A) flor de planta silvestre en la REPSA, B) plantas *in vitro* en medio KC sin hormonas derivadas de protocormos, C) planta con flor en medio KC, y D) suplementada con 1, E) 5, F) 10, G) 15, H) 20 e I) 30 µM BA, J) cámara de incubación con luz y fotoperiodo natural, K) tubo de ensaye con medio KC y planta con fruto y semillas viables en condiciones de J. fl: flor, fr: fruto, s: brote, r: raíz, le: hoja, c: cormo. La barra corresponde a 10 mm.

### CONCLUSIONES

La bencil adenina induce la floración de *B. urbana*, así como la producción de brotes y hojas en condiciones *in vitro* hasta un punto crítico, que al ser sobrepasado en concentración provoca que sólo algunos individuos logren florecer produciendo un alto número de flores, aunque anormales en tamaño y color. En altas concentraciones de BA las plantas disminuyen en altura, producen pocos brotes, hojas y raíces. Es necesario investigar con mayor detalle acerca de los factores ambientales que desencadenan el inicio de la floración que parecen estar estrechamente asociados con las condiciones del hábitat natural de las especies.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los apoyos financieros a la coordinación de la investigación científica de la UMSNH, proyecto clave 5.6.

### BIBLIOGRAFÍA

- Acquah H. G. (2010) Comparison of Akaike information criterion (AIC) and Bayesian information criterion (BIC) in selection of an asymmetric price relationship. *Journal of Development and Agricultural Economics* 2:1-6.
- Asghar S., T. Ahmad, I. A. Hafiz and M. Yaseen (2011) *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology* 10:3097-3103, <https://doi.org/10.5897/AJB10.401>
- Callejas-Chavero A., G. Castaño-Meneses, M. Razo-González, D. Pérez-Velázquez, J. G. Palacios-Vargas and A. Flores-Martínez (2015) Soil microarthropods and their relationship to higher trophic levels in the Pedregal de San Angel ecological reserve, Mexico. *Journal of Insect Science* 15:59, <https://doi.org/10.1093/jisesa/>

iev039

- Castillo A. S., Y. Martínez O., M. Nava L. y L. Almeida L. (2016) El matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y sus servicios ecosistémicos. In: La Biodiversidad en la Ciudad de México, Vol. III. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. Ciudad de México, México. pp:50-69.
- Chang C. and W. C. Chang (2003) Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 39:217-221, <https://doi.org/10.1023/A:1022892402536>
- CONABIO, Comisión Nacional para el Uso y Aprovechamiento de la Biodiversidad (2021) Observaciones. Chautle. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, iNaturalist.org. Ciudad de México. [https://www.naturalista.mx/observations?taxon\\_id=154031](https://www.naturalista.mx/observations?taxon_id=154031) (Agosto 2021).
- Dressler R. L. (1968) Notes on *Bletia* (Orchidaceae). *Brittonia* 20:182-190, <https://doi.org/10.2307/2805621>
- Duan J. X. and S. Yazawa (1995) Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43:71-74, <https://doi.org/10.1007/BF00042674>
- García E. (2004) Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (Para Adaptarlo a las Condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 90 p.
- George E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1: The Background. Exegetics Limited. Basingstoke, UK. 502 p, <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Hurskainen S., K. Alahuhta, H. Hens, A. Jäkäläniemi, T. Kull, R. P. Shefferson and J. Tuomi (2018) Vegetative dormancy in orchids incurs absolute and relative demographic costs in large but not in small plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 188:426-437, <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy065>
- Knudson L. (1930) Flower production by orchid grown non-symbiotically. *Botanical Gazette* 89:192-199.
- Knudson L. (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15:214-217.
- Lee P. L. and J. T. Chen (2014) Plant regeneration via callus culture and subsequent *in vitro* flowering of *Dendrobium huoshanense*. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:2619-2625, <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1632-7>
- Mohanty P., S. Paul, M. C. Das, S. Kumaria and P. Tandon (2012) A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. *AoB Plants* 2012:pls023, <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls023>
- Naing A. H., I. S. Park, Y. J. Hwang, J. D. Chung and K. B. Lim (2010) *In vitro* micropropagation and conservation of *Rhynchostylis retusa* BL. *Horticulture Environment and Biotechnology* 51:440-444.
- Ortega-Larrocea M. P. and M. Rangel-Villafranco (2007) Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two Mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana International Journal on Orchidology* 7:317-321, <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19558>
- Palacio P. J. L. y M. N. Guilbaud (2015) Patrimonio natural de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y áreas cercanas: sitios de interés geológico y geomorfológico al sur de la Cuenca de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 67:227-244, <https://doi.org/10.18268/BSGM2015v67n2a7>
- Peeters A. J. M., W. Gerads, G. W. M. Barendse and G. J. Wullems (1991) *In vitro* flower bud formation in tobacco: interaction of hormones. *Plant Physiology* 97:402-408, <https://doi.org/10.1104/pp.97.1.402>
- R CoreTeam. (2021) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (August 2021).
- Rubluo A., V. Chavez and A. Martinez (1989) *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* 4:68-73.
- Rue H., S. Martino and N. Chopin (2009) Approximate Bayesian inference for latent Gaussian models by using integrated nested Laplace approximations. *Journal of the Royal Statistical Society Statistical Methodology, Series B* 71:319-392, <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2008.00700.x>
- Salisbury F. B. (1981) Responses to photoperiod. In: *Physiological Plant Ecology I. Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, Vol. 12A. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond and H. Ziegler (eds.). Springer. Berlin-Heidelberg, Germany. pp:135-167, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-68090-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68090-8_6)
- SEMARNAT, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010) NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Edición 30 de diciembre de 2010. México, D. F., México.
- Shefferson R. P., T. Kull, M. J. Hutchings, M. A. Seloese, H. Jacquemyn, K. M. Kellett, ... and D. F. Whigham (2018) Drivers of vegetative dormancy across herbaceous perennial plant species. *Ecology Letters* 21:724-733, <https://doi.org/10.1111/ele.12940>
- Sim G. E., C. S. Loh and C. J. Goh (2007) High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium Madame Thong-In* (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 26:383-393, <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0242-2>
- Song Y. H., S. Ito and T. Imaizumi (2013) Flowering time regulation: photoperiod-and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science* 18:575-583, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.003>
- Srinivasan C. and M. G. Mullins (1978) Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.): formation of inflorescences *in vitro* by isolated tendrils. *Plant Physiology* 61:127-130, <https://doi.org/10.1104/pp.61.1.127>
- Tee C. S., M. Maziah and C. S. Tan (2008) Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17. *Biologia Plantarum* 52:723-726, <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0139-8>
- Télez V. y L. Flores V. (2007) Orquídeas Terrestres del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 74 p.
- Teixeira da Silva J. A., S. Zeng, J. C. Cardoso, J. Dobránszki and G. B. Kerbaux (2014) *In vitro* flowering of *Dendrobium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 119:447-456, <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0561-x>
- Tikendra L., T. Amom and P. Nongdam (2018) Effect of phytohormones on rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium thyrsoflorum* Rchb. f.: An endangered medicinal orchid. *Pharmacognosy Magazine* 14:495-500, [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_155\\_18](https://doi.org/10.4103/pm.pm_155_18)
- Vaz A. P. A., L. R. C. L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbaux (2004) Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:411-415, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.008>
- Wang Z. H., L. Wang and Q. S. Ye (2009) High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. *Scientia Horticulturae* 122:328-331, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.05.018>
- Watanabe S. (2010) Asymptotic equivalence of Bayes cross validation and widely applicable information criterion in singular learning theory. *Journal of Machine Learning Research* 11:3571-3594.
- Wen Z., W. Guo, J. Li, H. Lin, C. He, Y. Liu, ... and W. Liu (2017) Comparative transcriptomic analysis of vernalization- and cytokinin-induced floral transition in *Dendrobium nobile*. *Scientific Reports* 7:45748, <https://doi.org/10.1038/srep45748>
- Wilson-García C. Y., H. A. Zavaleta-Mancera, H. López-Delgado and A. Hernández-Garay (2008) The cytokinin BAP delays senescence and increases antioxidants, protein and growth in Orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). *Agrociencia* 42:799-806.