



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

CULTIVO *IN VITRO* DE *DIONAEA MUSCIPULA*

TESIS;

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÍCOLA

PRESENTA:

ANA BEATRIZ CARRANZA CANO

ASESOR: MC. FRANCISCO CRUZ PIZARRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVO E HIPOTESIS	2
3. MARCO TEORICO	3
3.1 Antecedentes.....	3
3.2 Cultivo de plantas carnívoras.....	3
a) Tipos de plantas carnívoras	4
b) Generalidades biológicas de la especie <i>Dionaea muscipula</i>	5
c) Requerimientos del cultivo.....	9
d) Propagación de plantas carnívoras.....	9
3.3 Generalidades del cultivo <i>in vitro</i>	11
3.4 Morfogénesis <i>in vitro</i>	14
3.4.1 Organogénesis.....	15
3.4.2 Propagación vía Organogénesis.....	17
3.5 Componentes del medio de cultivo	18
3.5.1 Nutrientes minerales	20
3.5.2 Sustancias vitamínicas	22
3.5.3 Sustancias reguladoras del crecimiento	22
3.5.4 Otros componentes del medio.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Ubicación del experimento	27
4.2 Material vegetativo.....	27
4.3 Tratamientos y Diseño experimental	27
4.4 Preparación de medios de cultivo	28
4.5 Implantación o siembra.....	28
4.6 Condiciones de incubación	28
4.7 Variables de estudio.....	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1 Numero de brotes	29
5.2 Longitud de brotes	34

5.3 Longitud de raíz	39
5.4 Número de hojas.....	43
6. CONCLUSIONES.....	47
7. BIBLIOGRAFIA.....	49
8. ANEXOS	52

Indicé de Cuadros

Cuadro 1. Forma de aplicación y principales funciones de macroelementos y microelementos del medio de cultivo.....	20
Cuadro 2. Composición del medio basal Cruz- Pizarro (2000).....	26
Cuadro 3 .Tratamientos para la proliferación <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	27
Cuadro 4. Comparación de medias que muestran las diferentes respuestas de los tratamientos en la variable Número de Brotes.....	30
Cuadro 5. Comparación de medias que muestran las diferentes respuestas de los tratamientos en la variable longitud de brotes.....	35
Cuadro 6. Longitud promedio del desarrollo de raíz de <i>Dionaea muscipula</i> , obtenidos en distintos tratamientos.....	39
Cuadro 7. Numero de hojas de <i>Dionaea Muscipula</i> , obtenidos en los distintos tratamientos.....	44

Indicé de Figuras

Figura 1.Morfología de Dionaea muscipula.....	8
Figura 2.Balance de auxinas y citocininas en un medio de cultivo.....	24
Figura 3.Conjunto de brotes que desarrollaron muy comprimidos y no presentan sus estructuras completas.....	31
Figura 4.Hoja de Dionaea muscipula sin desarrollo de trampa en la parte final de la hoja.....	32
Figura 5.Desarrollo óptimo de Dionaea muscipula con estructuras bien formadas y diferenciadas.....	33
Figura 6. Desarrollo óptimo de brotes.....	37
Figura 7. Desarrollo de brotes de Dionaea muscipula, con estructuras diferenciadas pero con aspecto clorótico.....	38
Figura 8.Desarrollo limitado de brotes, de mínima longitud, con estructuras diferenciadas.....	42
Figura 9. Proliferación de brotes con desarrollo mínimo de raíz.....	42
Figura 10. Desarrollo de hojas de Dionaea con estructuras diferenciadas y definidas.....	45

Indicé de graficas

Grafica 1. Numero de brotes promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable Número de brotes.....	30
Grafica 2. Longitud de brotes promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable longitud de brotes.....	35
Grafica 3. Longitud de raíz promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable longitud de raíz.....	40
Grafica 4. Numero de hojas promedio obtenidas en los tratamientos para la variable número de hojas.....	44

1. INTRODUCCION

Las llamadas plantas carnívoras son plantas que originariamente se encuentran en zonas pantanosas, situadas en medios pobres en nutrientes, debido a esto, estas plantas han desarrollado una capacidad para atraer a los insectos a sus órganos aéreos, adaptados para atraparlos y transformarlos en sustancias nutritivas digeribles.

Existen distintas especies de plantas carnívoras que presentan órganos muy diferentes entre sí y generalmente de aspecto atractivo, por lo tanto la importancia económica que presentan estas plantas es muy amplia. Recientemente las plantas carnívoras están siendo utilizadas para la investigación y el uso de extracciones químicas, debido a que estas plantas contienen glucósidos, vitaminas, antocianinas y algunas enzimas importantes, las plantas carnívoras no presentan ningún peligro para el hombre aunque en contraparte muchas especies de plantas carnívoras han desaparecido por la contaminación, la destrucción de su hábitat, y las especies más exóticas son objeto de recolecciones masivas por parte de coleccionistas, por eso la importancia de propagar estas especies vegetales a fin de conservar la biodiversidad. Una manera de propagar estas especies es la implementación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, pues genera la oportunidad de obtener plantas sanas y vigorosas, libres de enfermedades. La especie *Dionaea muscipula*, al igual que las demás especies de plantas carnívoras en su medio natural no localizan los nutrientes necesarios para sobrevivir, por lo tanto atrapan insectos que les proporcionen los nutrimentos necesarios para un desarrollo óptimo.

Un punto clave en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales es el medio de cultivo que se utilizará pues es en éste donde se adicionan y complementan una mezcla de nutrientes que servirán para el desarrollo de las plantas, es por esto que se establecerá el material vegetal en el medio de cultivo "Cruz Pizarro" en 3 diferentes concentraciones, así como la adición de hormonas. De esta manera se podrá definir el medio de cultivo en el cual desarrollara mejor esta especie así como la concentración adecuada pues no se conoce a ciencia cierta la proporción de nutrimentos que requieren estas plantas que no crecen en su medio natural con la finalidad de reconocer la concentración adecuada en donde los nutrimentos que requiera no sean elevados, así como evitar deficiencias, pues la técnica de cultivos de tejidos vegetales genera gran inversión.

2. OBJETIVO E HIPOTESIS

OBJETIVO GENERAL:

Analizar el comportamiento de la proliferación de *Dionea muscipula* en el medio de cultivo “Cruz Pizarro” a diferentes concentraciones añadiendo hormonas, determinando la óptima para su desarrollo, bajo técnicas de cultivo de tejidos.

HIPÓTESIS:

- Al utilizar diferentes concentraciones del medio de cultivo Cruz Pizarro así como la adición de hormonas, se obtendrá la combinación óptima para el desarrollo de *Dionea muscipula* bajo técnicas de cultivo de tejidos vegetal.
- Si la capacidad de organogénesis está determinada, entre otros factores, por la nutrición *in vitro*, al variar la composición del medio de cultivo existirán diferencias en este proceso que se reflejarán en el número y calidad de brotes.

3. MARCO TEORICO

3.1 Antecedentes

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postulo el principio de totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*. (Pierik, 1990)

Las herramientas que hicieron posible el avance de estas técnicas, tales como el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores de crecimiento, no estuvieron disponibles hasta finales de los años 50. A partir de ese momento se sucedieron una serie de acontecimientos como la regeneración de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert, 1958; Steward y col. 1958) y posteriormente la demostración de que estos embriones somáticos se originaban a partir de células aisladas (Backs-Husemann y col. 1970, Reinert et al. 1971), los cuales confirmaron totalmente la capacidad de totipotencia de las células vegetales.

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. (Pierik, 1990)

Constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Nash y Davies, 1972; Komamine et al. 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1955), la propagación masiva (Vasil, 1994, Kitto, 1977), la conservación de germoplasma (Whithers, 1985), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994) el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y selección *in vitro* (Pérez y col. 1998) y la ingeniería genética (Herrera, 1983).

A partir de los avances alcanzados en la regeneración de plantas *in vitro*, se ha desarrollado toda una industria de micropropagación, que se inició por los países desarrollados de Europa y Estados Unidos y en la actualidad se ha extendido al resto del mundo incluyendo a países de América Latina y Asia. (Pérez P. 1998)

3.2 Cultivo de plantas carnívoras

Las llamadas plantas carnívoras son plantas que originariamente se encuentran en zonas pantanosas, situadas en medios pobres de nutrientes, estas plantas han desarrollado una capacidad para atraer a los insectos a sus órganos aéreos, adaptados para atraparlos y transformarlos en sustancias nutritivas digeribles. Son

plantas de un gran interés científico porque siendo vegetales, actúan como cepos. (Lecoufle, 2006)

a) Tipos de plantas carnívoras

Existen bastantes géneros y especies de plantas carnívoras, dotadas de órganos de captura y digestión de pequeños animales como los insectos. Estos órganos son muy diferentes entre sí y generalmente de aspecto atractivo. Una planta normal toma del aire el anhídrido carbónico y mediante la función clorofílica elabora sus hidratos de carbono. Las sales minerales y principalmente el Nitrógeno, Fósforo, Calcio, Potasio, etc., los toma en soluciones a través de las raíces. Pero existen suelos y terrenos que son muy pobres o carecen de esos elementos. Muchas plantas que viven en estos suelos emplean diversos medios para sobrevivir. Algunas se convierten en parásitos y toman esas sales directamente de la savia de otras plantas. Pero otras recurren a un procedimiento análogo a la forma en que los animales se proveen de esos elementos: capturando y digiriendo presas vivas, generalmente insectos. La mayor parte de las plantas carnívoras viven en turberas o suelos arenosos húmedos y ácidos, muy pobres en elementos minerales. (Lecoufle, 2006)

Una planta carnívora en la oscuridad o desprovista de anhídrido carbónico muere porque forma sus hidratos de carbono igual que todas las plantas a partir de la función clorofílica y en presencia de la luz. Las raíces de las plantas carnívoras son débiles y poco eficientes para la absorción de sales minerales. Si ponemos plantas carnívoras en medios artificiales con abundantes sales minerales, su desarrollo no es satisfactorio. En cambio crecen muy bien cuando obtienen elementos minerales a partir de las presas obtenidas por sus órganos de captura de insectos. Hay muchas plantas que han desarrollado las flores para eso. (Lecoufle, 2006)

Los insectos atrapados en el interior de las flores se mueven activamente y se cargan de polen, y de forma natural son puestos en libertad, transportando ese polen a otras flores para fecundarlas. En estos sistemas hay órganos sensibles que aprecian la presencia del insecto y que provocan un movimiento en otros órganos que cierran la trampa que lo apresa. En las plantas carnívoras los órganos de captura se han formado a partir de adaptaciones de las hojas y son bastante variables. Pero todos esos órganos requieren unos sistemas que noten la presencia del insecto y otros que produzcan los movimientos necesarios para apresarlo y luego para expulsar los restos ya digeridos. (Lecoufle, 2006)

b) Generalidades biológicas de la especie *Dionaea muscipula*

Clasificación;

Clase; Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Droseráceas

Género: *Dionaea muscipula*

Nombre común o vulgar: Dionea, Venus atrapamoscas, Diana atrapamoscas, Atrapamoscas.

Dionaea muscipula fue descrita por primera vez por el naturalista británico John Ellis en 1768 que informó a Carolus Linnaeus, mediante una carta que se titulaba "A botanical description of the *Dionaea muscipula*, or Venus's flytrap. En esta carta, además de una completa descripción botánica de las principales características de la *Dionaea muscipula*, se incluían también figuras que ilustraban el aspecto de la planta. Desde entonces ha sido cultivada en invernaderos y jardines de todo el mundo por motivos lúdicos y de investigación. Su nombre científico se lo dio John Ellis *Dionaea muscipula* en honor a Diana, diosa griega hermana de Apolo y amante de los bosques y de la caza y muscipula significa en latín atrapamoscas. (Lecoufle, 2006)

Hábitat:

Es originaria de la costa Este de los Estados Unidos (Carolina del Norte y Carolina del Sur), donde el clima no es demasiado extremo, puede bajar de cero grados en invierno, pero en este tiempo entra en un estado de letargo. Vive en zonas pantanosas de suelos muy pobres y ácidos, con mucha humedad ambiental; mucha luminosidad, pobres en nutrientes, crecen en sabanas, dentro de turba, de arena o de musgo, en suelos con un pH comprendido entre 3.5 y 5. Están expuestas al sol bajo la sombra de hierbas o de pocos árboles dispersos. Estos lugares son favorables para otras plantas carnívoras de los géneros *Drosera*, *Pinguicula*, *Sarracenia* y *Utricularia*. Se dice que esta planta así como la mayoría de plantas carnívoras eran muy abundantes pero las exportaciones, la pérdida de su hábitat, la contaminación, etc. han acabado con esta planta, actualmente existe en un radio muy pequeño pero estas son zonas protegidas bajo el gobierno y sus leyes. Actualmente no se explota la planta de su hábitat, existen laboratorios encargados de reproducirla a través de cultivo de tejidos en reproducciones masivas de estas plantas con un fin comercial. (Lecoufle, 2006)

Morfología:

Es una pequeña planta herbácea que oscila entre los 5 y los 15cm, con hojas verde claro dispuestas en forma de roseta que emergen de un tallo subterráneo de tipo, este permite que la planta vuelva a desarrollarse después de un incendio, las raíces son fibrosas y negras y miden una decena de centímetros de largo. (Lecoufle, 2006)

Cada hoja mide de 3 a 8 cm. de longitud, se divide en 2 partes:

- Una proximal compuesta por dos lóbulos alargados y simétricos de un color verde que puede variar en intensidad en cuyo extremo se localizan las trampas.
- Una terminal que constituye la trampa formada por dos lóbulos también simétricos, de forma ovalada, de color normalmente roja en su interior por la presencia de una antocianina. Dicho pigmento se localiza en las glándulas digestivas las cuales secretan además un líquido dulce que, junto al color rojo, sirve para atraer insectos. La concentración de la antocianina y del líquido depende de la variedad considerada y de factores medioambientales, como la intensidad y el número de horas de luz solar que reciba la planta.

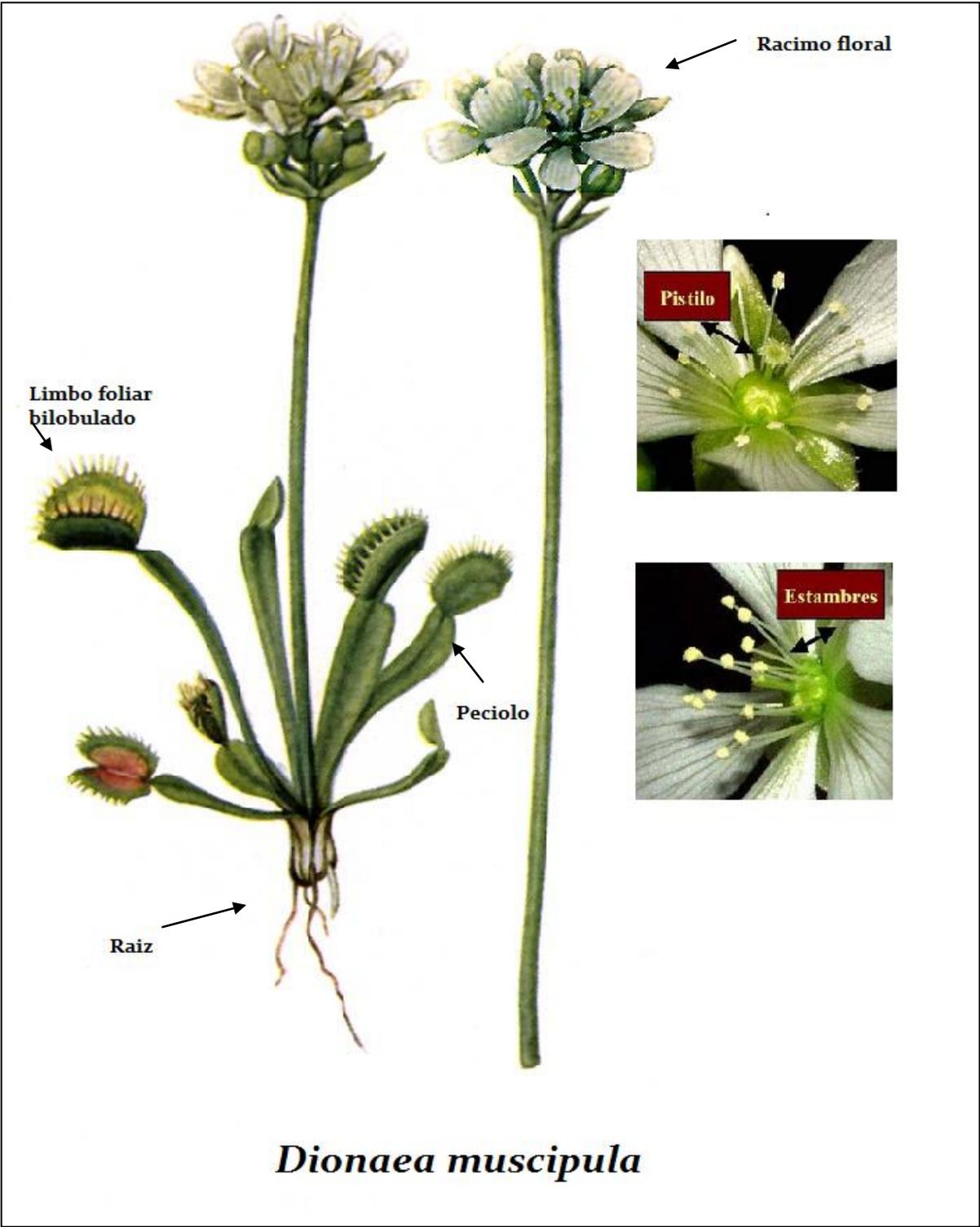
En los bordes de la trampa hay unas prolongaciones que mejoran su cierre como una trampa, mientras que en su interior existen unas finas estructuras denominadas pelos sensoriales o disparadores, estos son los responsables de activar el mecanismo. Su número oscila en torno a 6 y siempre que algo logre tocar dos veces en un mismo cilio o dos cilios separados, este doble contacto indica a la planta la presencia real de una presa. El cierre es de orden 1/50 de segundo cuando hace sol. Esta rapidez disminuye con la edad de la planta y con la temperatura, al cerrarse la trampa, los dientes se entrecruzan, lo que deja un cierre incompleto para que se escapen las presas demasiado pequeñas y poco interesantes. Si la víctima es una mosca, el cierre progresivo y lento aplasta al insecto y sus partes asimilables son digeridas por la secreción de las glándulas digestivas, que contienen ácidos y enzimas. El tiempo de digestión es de 1 a 2 semanas. Si no ha habido captura, la trampa vuelve a abrirse al cabo de 24 horas como mínimo. (Lecoufle, 2006)

El número de capturas por hoja suele ser de 4 insectos. Las plantas privadas de insectos tienen un crecimiento más lento. Los insectos deben capturarse vivos; un trozo de carne no haría otra cosa que pudrirse, ya que se trata de una planta esencialmente insectívora. Curiosamente un fragmento de pelo que pesa apenas unos pocos miligramos hace mover los tentáculos, mientras que las gotas de lluvia

más grandes no tienen efecto sobre ellos. Las jóvenes plantas se fortalecen a medida que pasan los años; son adultas a los 4 o 5 años de cultivo, pero hacen falta de 7 a 10 años para obtener ejemplares fuertes. Las hojas son persistentes con clima cálido y soleado, pero en cultivo es indispensable el reposo de 4 a 6 meses tan pronto como las hojas ennegrecen en otoño. Las floraciones son en mayo o junio, o 3 meses después del inicio de la vegetación. (Lecoufle, 2006)

Las varas florales, que miden de 10 a 35 cm. de altura, llevan de 1 a 15 flores blancas de 3cm. de diámetro, regulares y en forma de estrella, con 5 sépalos verdes, 5 pétalos blancos y unos quince estambres. Cada planta tiene cuatro floraciones anuales como media. Cuando no se desee obtener semillas, será preferible suprimir las varas florales tan pronto como aparezcan para dar más vigor a la planta.

Figura 1. Morfología de *Dionaea muscipula*



c) Requerimientos del cultivo

Al igual que los demás cultivos, esta especie requiere de diferentes factores ambientales como lo son:

- Luz: Sitio de semi-sombra. Dependiendo del clima también puede soportar sol directo, luz solar de 4 a 5 horas.
- Temperatura: en estado vegetativo requiere una temperatura de 15-38 °C, soporta heladas de -5°C, el invierno es el descanso de la planta y es necesario bajar la temperatura a 5 °C para plantas mayores a 3 años.
- Humedad ambiental: Requiere una humedad de 40% y 70%. El sustrato siempre debe estar muy húmedo, ya que estas plantas se crían en pantanos.(Lecoufle, 2006)
- Sustrato: La turba es apropiada para su desarrollo, algunas mezclas de sustrato son; mezcla de peat-moss (esfagno) 60%, arena silíceo 20% y 20% vermiculita. El pH debe ser inferior a 6.5.

d) Propagación de plantas carnívoras

Reproducción sexual:

En los cultivos el aire libre, los insectos fecundan las flores de forma natural y las semillas maduran unas 5 semanas después de la fecundación. La vara floral se produce en primavera y tarda unas cuantas semanas en crecer y desarrollarse, para cuando las flores se abran estas serán de color blanco con 5 pétalos, 5 sépalos, 5 estambres y 1 pistilo en uno o dos días el pistilo será receptible y esta listo para la fecundación. Las semillas se forman en el interior de las piezas florales que se extraen una vez que se ha ennegrecido el pedúnculo. Las pequeñas semillas se recogen sacudiendo con cuidado los tallos sobre una hoja de papel. (Lecoufle, 2006)

Las semillas de las droseras son minúsculos bastoncillos oblongos que forman un polen negro apenas perceptible; las de la *Dionaea* parecen pequeños puntos negros y las de las *Sarracénias* miden 1-2 mm, son ovaladas y finalmente cinceladas. Como norma general, no es bueno conservar semillas demasiado tiempo, después de seis meses, su poder germinativo empieza a reducirse notablemente. Para que perduren por más tiempo, se ponen las semillas en refrigeración a 4 °C, se establece una mezcla con turba y arena para que tomen consistencia, se esparcen por una capa de turba húmeda y se tapa con un plástico para retener la humedad. Para evitar la formación de hongo se puede adicionar algún fungicida, al paso de unas semanas, despuntarán las minúsculas plántulas.

La *Dionaea* reproducida con este método puede vivir hasta veinte años, pero tiene un crecimiento lento, por el contrario, las *Droseras* sembradas en primavera ya habrán alcanzado dimensiones considerables y producirán flores al final de la estación. Para facilitar la germinación, es necesario establecer condiciones de temperatura de 25 °C. La germinación de *Sarracenia*, en cambio, es más compleja. Para acelerar el proceso se aconseja poner semillas en refrigeración durante un mes, sumergirlas en agua para ablandar la corteza, y posterior a esto se sembraran. Los géneros en que las semillas necesitan estratificación previa son la *Dionaea*, *Darlingtonia*, *Sarracenia* y las *Droseras nordicas* y necesitan una conservación de 4-8 semanas en refrigeración antes de sembrarlas.(Lecoufle, 2006)

Multiplicación vegetativa;

Las plantas producen varios tipos de brotes, después de desprenderse del organismo madre y dan vida a ejemplares idénticos, las formas de multiplicación son las siguientes;

- a) Por esquejes de hojas: Se extraen las hojas enteras antiguas y se coloca la base del peciolo dentro de turba o de esfagnos, así mismo es necesario mantener el cultivo húmedo, con mucha luz y una temperatura superior a 20 °C. Al cabo de 8 a 10 semanas se forman pequeños brotes, los cuales se desarrollan en plantas completas, que pueden trasplantarse cuando sus raíces lo permitan. (Lecoufle, 2006)
- b) El acodo; La longitud del tronco de la *Nepenthes* favorece la creación de plantas secundarias. Se hace un corte por la mitad del tronco y se inserta en una maceta con esfagno. (Lecoufle, 2006)
- c) Por esquejes de las escamas; las escamas se forman en torno al rizoma, por las bases de las antiguas hojas; estas se extraen y para su cultivo se procede como en los esquejes de hoja. (Lecoufle. 2006)
- d) Por hijuelos; Cuando las plantas son fuertes, producen hijuelos en su base, los cuales son brotes laterales, que nacen en la base del tallo de algunas plantas herbáceas y que crece horizontalmente, pueden ser desprendidos después de que se desarrollan las raíces. Si se dispone de una planta suficientemente grande, se puede desprender gran parte de brotes y replantarla, está presentes en algunas especies como *Darlingtonia*, *Drosera*, *Utricularia terrestre* con las *Dionaeas* y *Sarracenas*, este es un sistema mas rapido que la siembra convencional. (Lecoufle, 2006)
- e) Micropropagación; Las técnicas mencionadas anteriormente son eficaces, pero si se emplea como un sistema de producción se opta por esta alternativa que es más eficiente, confiable y segura para obtener plantas

sanas, vigorosas, haciendo esta propagación en todo el año y en cualquier época. La técnica de cultivo de tejidos es utilizada para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por la ingeniería genética. Se utiliza también para multiplicar obtener plantas libre de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente por métodos convencionales. (Lecoufle, 2006)

Muchos tipos de semillas germinadas en estas condiciones tienden a crecer muy rápido en comparación a ser sembradas en los medios convencionales, mediante el uso de tejido de la planta, es posible producir copias exactas de la planta donante. Esto es muy útil para las plantas que genéticamente tienen características deseables debido a que pueden crear muchos clones de una planta en particular mucho más rápido que los métodos de propagación tradicionales. Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante, durante un periodo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En este ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

3.3 Generalidades del cultivo *in vitro*

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, los tejidos o células cultivadas en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición. La capacidad de ciertos tejidos vegetales, como el callo y las suspensiones de células, así como aquellas de varios órganos de plantas tales como tallos, flores, raíces y embriones, de crecer de manera definida, se ha utilizado durante muchas décadas en los laboratorios científicos como un instrumento de investigación por genetistas, botánicos y fitopatólogos. A estos métodos se les ha llamado colectivamente “cultivo de tejidos”, una expresión que en ocasiones se usa como sinónimo de micropropagación. Los procedimientos de cultivo de tejidos utilizan un sistema de producción *in vitro* que requiere instalaciones de tipo laboratorio y técnicas asépticas similares a las empleadas para cultivar hongos, bacterias y otros microorganismos. (Hartmann, 1984)

Cultivo de tejidos

El establecimiento de los principios biológicos del cultivo de órganos y tejidos ha sido acreditado al alemán Haberlandt, fisiólogo vegetal, quien los enunció por primera vez en 1902. Para 1934, P.R. White pudo cultivar raíces de tomate continuamente *in vitro* proporcionándoles extracto de levadura. Los ingredientes esenciales resultaron ser algunas vitaminas B, en especial la B1 (tiamina). En 1939, Nabecourt y Gautheret en Francia y White en los E.U.A, reportaron en forma independiente el cultivo indefinido de tejido de callo vegetal en un medio sintético. El descubrimiento de las citocininas y del control hormonal en la regeneración de tallos y raíces logradas de callo de tabaco por Skoog y sus colaboradores en 1948 en la Universidad de Wisconsin establecieron las bases para manipular la iniciación de órganos y proporcionaron el principio en que se basa toda la micropropagación. Otro avance importante fue el logro de la regeneración de estructuras de tipo embrión (embriones somáticos o embrioides) de suspensiones de células de callos. Otros procesos importantes comprendieron el descubrimiento de la formación de plantas haploides a partir de granos de polen en desarrollo, el aislamiento de protoplastos vegetales y la hibridación artificial (para sexual) de protoplastos vegetales en cultivos asépticos. (Hartmann, 1984)

Micropropagación

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos a la regeneración y propagación comercial de las plantas es un desarrollo reciente que se ha convertido en una alternativa importante de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies de plantas.

El descubrimiento de la micropropagación de puntas de tallo resultó de los intentos de obtener plantas libres de virus a través del aislamiento de meristemos no infectados. Usando este procedimiento para las orquídeas *Cymbidium*, Morel, descubrió que las puntas de tallo proliferaban para formar masas de protocormos, los cuales podían ser divididos y vueltos a cultivar para producir nuevas plantas. (Hartmann, 1984)

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hughes, 1981 y más recientemente, en especies leñosas (Thorpe, 1983). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados.
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Conservación del germoplasma.
- Mejora por mutagénesis y selección *in vitro*.
- Ingeniería Genética.

Fases en la micropropagación

En los sistemas de micropropagación se reconocen 4 estados secuenciales:

I. Establecimiento del cultivo:

La función de esta etapa es establecer un explante estéril en un medio de cultivo, los factores que afectan esta etapa incluyen, la selección del explante, la eliminación de contaminantes del mismo y las condiciones de cultivo que comprenden: ingredientes, luz, temperatura y selección de sostén del explante. (Thorpe, 1993).

II. Proliferación o multiplicación.

La función de esta etapa de multiplicación es incrementar el número de propágulos para su enraizamiento posterior hasta el estado de una planta completa. Los explantes expandidos de la etapa I se cortan y los brotes se vuelven a cultivar a un nuevo medio. La multiplicación de brotes vegetativos depende, ya sea de la reproducción continuada de brotes axilares, o de la iniciación de brotes adventicios en la masa de tejido de tipo callo. (Thorpe, 1993).

III. Enraizamiento.

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales, por ejemplo el medio Murashige et al. (1962), diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1993).

IV. Aclimatación

La etapa de trasplante abarca la transferencia de la planta del medio aséptico del cultivo al ambiente de vida natural en el invernadero y luego a su sitio final. Al principio de esta etapa la planta puede estar enraizada o no; en cualquiera de los casos, para que pueda sobrevivir, el propágulo debe pasar por un periodo de aclimatación. Como se deben volver autótrofas, tienen que desarrollar raíces, brotes funcionales y aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos. (Thorpe, 1993).

En algunas especies resulta esencial apegarse estrictamente a esta secuencia, mientras que en otras la secuencia puede variarse para adaptarla a los requerimientos de las especies y las necesidades del propagador.

3.4 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis puede definirse como la génesis o la iniciación de la forma y de la función de los organismos vivos. El estudio de la morfología vegetal tiene como objetivo fundamental identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de la planta. (Villalobos, 1990)

A nivel experimental se utiliza el término morfogénesis para describir el origen de la forma de la planta, entendiendo por forma: la organización estructural de la célula individual o ultra estructura; la organización de células para formar tejidos o anatomía, y cuerpo de la planta o morfología. (Villalobos, 1990)

Todos los organismos, especialmente las plantas, muestran una tendencia a restaurar o reemplazar partes que les han sido removidas, produciendo nuevamente una estructura completa a cierta distancia de la superficie herida; a este proceso se denomina regeneración y se refiere a la organización de estructuras fisiológicamente aisladas del organismo. Sin embargo, en la mayoría de los reportes de cultivo de tejidos se utiliza este término asociado estrechamente con el de "totipotencia", para referirse a la organización de plantas completas a partir de células o tejidos. (Villalobos, 1990)

El desarrollo histórico de la tecnología del cultivo *in vitro* va ligado a los intentos por demostrar experimentalmente la totipotencia celular; es decir, la capacidad de las células para regenerar el fenotipo de la planta de la que se derivan. El proceso de diferenciación celular no implica pérdida de material genético sino expresión diferencial de los genes. Por ello, la mayoría de las células vegetales pueden, en

principio, considerarse totipotentes, siendo la base de la multiplicación vegetativa. (Villalobos, 1990)

Los trabajos ya clásicos de Skoog y Miller(1957) en tabaco y los de Steward,al (1958) y Reinert (1959) en células somáticas de zanahoria, crearon las bases para el desarrollo de la morfogénesis *in vitro* de las plantas superiores. Actualmente se sabe que las células en cultivo pueden manifestar totipotencia regenerando plantas completas siguiendo dos rutas alternativas:

- Organogénesis: que conducen a la diferenciación de meristemos caulinares y/o radicales, que originan tallos (caulogenesis) o de raíces adventicias (rizogenesis).
- Embriogénesis somática; que lleva a la formación de embriones somáticos a partir de células somáticas embriológicamente competentes, siguiendo las fases del embrión cigótico (globular, corazón, torpedo, cotiledonar), aunque obviamente, sin fecundación. (Villalobos, 1990)

En las dos rutas siempre es posible distinguir dos modelos de desarrollo morfo génico:

- Morfogénesis directa, cuando los órganos o embriones se originan directamente del explante (parte de la planta utilizada para establecer el cultivo) en ausencia de proliferación de callo (masa celular sin diferenciación aparente).
- Morfogénesis indirecta, en la que la formación de callo es previa al desarrollo de estructuras organizadas.

3.4.1 Organogénesis

La organogénesis involucra procesos de diferenciación e interacción celular y reacción a señales específicas, mediante los cuales es posible la generación de brotes adventicios a partir de tejido somático. Estos brotes se caracterizan por ser estructuras unipolares conectadas físicamente al tejido que les dio origen (conexión vascular con el tejido del que derivan). (Villalobos, 1990)

Mediante este proceso morfogénico pueden diferenciarse *in vitro* brotes adventicios o axilares, que son susceptibles a enraizar y formar plantas completas.

En la organogénesis los brotes pueden generarse directamente del explante (organogénesis directa) o bien generarse a partir de callo (organogénesis indirecta). Esta vía de regeneración se ha utilizado en genotipos mejorados con baja tasa de propagación *in vitro*, en especies de difícil propagación por métodos

convencionales y en especies susceptibles a plagas y enfermedades. La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías; la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias. (Villalobos, 1990)

a) Formación de yemas axilares

Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente (Hu y Wang, 1983). Este método, a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial, debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética. Su principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por la mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante, existen posibilidades de automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de biorreactores y sistemas de inmersión temporal de los explantes. (Pérez, 1998)

b) Formación de yemas adventicias

Es la formación de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citocininas (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para su producción (Akita y col., 1994). Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento – enraizamiento. Adicionalmente presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias (Reuveni y col., 1985). Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema. (Pérez, 1998)

La respuesta morfogénica por dichas vías de regeneración es estimulada por el tipo de explante, medio de cultivo, tipo y concentración de fitohormonas (Christian

y Warnick,1988) y factores ambientales, por lo que en un protocolo de manipulación *in vitro* deben considerarse dichos aspectos. La capacidad de regeneración a través de los procesos de diferenciación está determinada por la interacción de factores intrínsecos y extrínsecos de la planta que, en condiciones de cultivo *in vitro* pueden ser controladas. (Pierik, 1990)

Los factores intrínsecos están involucrados con el genotipo y estado de desarrollo de la planta y el explante, mientras que los extrínsecos incluyen:

a) Condiciones ambientales del medio como el suministro de nutrimentos orgánicos e inorgánicos y hormonas.

b) condiciones físicas como la consistencia del medio de cultivo, la luz, la temperatura y el pH.

3.4.2 Propagación vía Organogénesis

El estado secuencial II de la micropropagación es la fase de multiplicación y es esta la más importante y determinante en todo el programa de propagación *in vitro*, pues es en ella donde se realiza la verdadera multiplicación de una especie o variedad definiéndose no solo el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética, por ser esta fase en la que se producen variantes somaclonales. (Pérez, 1998)

La proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro*, puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras del crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*. Los explantes, al ser divididos en condiciones estériles y cultivados nuevamente en el medio fresco, inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de propágulos deseados para pasar a la fase de enraizamiento. El método de propagación a emplear yemas axilares o yemas adventicias, debe sustentarse en un estudio exhaustivo de la frecuencia de variantes somaclonales o fisiológicas que se producen *in vitro*, de la especie o variedad que se multiplicará y el objetivo de la multiplicación. La regulación química de la morfogénesis en tejidos *in vitro* ha sido bien documentada desde que ,en 1957, Skoog y Miller demostraron la importancia del balance hormonal auxina-citocinina, sin embargo, muchas especies no responden a los procedimientos lógicos de cultivo por lo que se continua investigando sobre los posibles mecanismos de cultivo involucrados en el proceso. (Pérez, 1998)

Si bien la expresión *in vitro* de una determinada repuesta morfogénica (regeneración de raíces y tallos o embriones) viene determinada por la interacción

de numerosos factores, es indudable que las fitohormonas desempeñan un papel fundamental en el control de la morfogénesis. De esta forma, la respuesta morfogénica influye tanto los niveles endógenos de auxinas y citocininas, como la relación exógena de fitohormonas del medio de cultivo. (Pérez, 1998)

Skoog y Miller demostraron que el proceso organogénico está determinado por un balance entre auxinas y citocininas; la influencia de este balance la estudiaron en *Nicotina tabacum L.* y encontraron que una proporción mayor de auxinas con relación a citocininas indujo raíces, mientras una porción opuesta indujo la formación de brotes. Estos resultados demostraron que el balance hormonal, marca el destino de las células morfológicamente competentes, donde auxinas como 2,4-D, ANA y AIB son importantes en la inducción de raíces y callo, mientras que citocininas como; BA, Kinetina y Zeatina son necesarias para mantener el crecimiento celular del tejido a inducir regiones meristematicas. (Pérez, 1998)

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citocininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Su concentración varía dependiendo del balance endógeno de auxinas y citocininas en los explantes. La 6-Benzilaminopurina (6-AP) es en general, la citocininas más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares, seguida en orden decreciente por la Kinetina y la Zeatina.

El balance auxinas y citocininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que la lograr un balance adecuado, es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación. Sin embargo es necesario tener cuidado en el manejo de los reguladores del crecimiento en esta fase, ya que con el empleo continuo de altas concentraciones de citocininas en el medio de cultivo se puede inducir la formación de yemas adventicias, lo cual representa un inconveniente dentro del proceso de propagación. No obstante aun en bajas dosis la formación de yemas adventicias puede ser observada en ocasiones y está muy relacionada con el manejo de los explantes y el número de subcultivos. (Pérez, 1998)

La manipulación de las concentraciones de auxinas y citocininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo además la base de gran parte de los protocolos de la propagación vegetativa *in vitro* existentes en la actualidad. (Thorpe, 1981)

3.5 Componentes del medio de cultivo

El éxito del cultivo de plantas depende del uso del medio nutritivo adecuado, y de la composición química del mismo y de otros factores como; tejidos viables, incubación y calidad de reactivos. (Gamborg, 1976)

El medio de cultivo es una solución acuosa que está formada por tres clases de sustancias; compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte, requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos *in vitro*. Se hallan numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. Existen en reportes cerca de 2,000 medios de cultivo, de los cuales los más usados son 16, además de considerar que algunos de ellos presentan particularidades en la inducción de una vía específica en la morfogénesis vegetal. (Gamborg, 1976)

La mayoría de las formulas salinas basales de las soluciones de cultivo que se tienen actualmente como estandar deberían ser mas que suficiente para suministrar un minimo esencial de los elementos requeridos, sin embargo seria util ensayar estas soluciones a diferentes concentraciones totales: por ejemplo, el de Murashige es un medio con relativamente “alto contenido de sales”, mientras el medio de White generalmente se considera con un bajo contenido de sales, muchos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, lo que se puede hacer agregando sales de NH_4 o suplementado con urea. Todos los medios parecen beneficiarse en cierto grado con los suplementos vitamínicos, a menos que las células se vuelvan verdes, los aditivos mínimos usuales son la tiamina o el ácido nicotínico y la piridoxina. Se sabe que es un problema mayor estudiar todas las interacciones de los componentes (orgánicos e inorgánicos) de un medio de cultivo, y generalmente no es rentable hacerlo en alguna etapa de conocimiento, no obstante, se puede utilizar un medio sencillo y luego complementario de diferentes formas; el “arte” consiste en llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido la mejor oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca para crecer. (Gamborg, 1976)

El medio que se emplea con mayor frecuencia en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán es un medio elaborado por el profesor Francisco Cruz Pizarro, con los componentes básicos y una concentración media de sales, se ha empleado en distintas especies, como frutales, ornamentales, forestales e industriales, la determinación de la concentración de nutrimentos (principalmente N-NO_3^- y N-NH_4^+) se determinó mediante el uso de electrodos ion-selectivo (Cruz-Pizarro, 2000) la respuesta en la proliferación de estas plantas ha sido extraordinaria, cabe mencionar que este medio solamente es usado con fines de investigación, la composición del medio puede verse en el cuadro 1.

Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- I. Nutrientes minerales
- II. Sustancias vitamínicas
- III. Sustancias reguladoras del crecimiento
- IV. Otros compuestos; agua, agente gelificante y una fuente de carbono.

3.5.1 Nutrientes minerales

Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na_2EDTA), lo que lo hace disponible es un amplio rango de pH. Las sales minerales se dividen en dos grandes grupos que contienen diferentes elementos, donde cada uno de ellos muestra una particular influencia, su composición se puede ver en el cuadro 1.

a) Macro elementos: Los tejidos requieren de una fuente continua de compuestos orgánicos. Además de carbono, hidrogeno y oxigeno; son sustancias que se agregan al medio en cantidades mínimas, y son los siguientes; nitrógeno, fosforo, potasio, calcio, magnesio y Azufre.

b) Micro elementos; Para una adecuada actividad metabolica , las celulas requieren de microelementos, siendo el Zn,Bo,Cu,Co,Mo los elementos fundamentales para la sintesis de la clorofila y en la funcion de los cloroplastos, y se adicionan al medio de cultivo en cantidades pequeñas.

Cuadro 1. Forma de aplicación y principales funciones de macroelementos y microelementos del medio de cultivo.

MACRO ELEMENTOS

Sales Inorgánicas	Forma de aplicación	Influye
Nitrógeno	Las fuentes de N para el medio de cultivo son compuestos de amonio y nitratos.	Influye en el índice de crecimiento de la planta, elemento esencial en la composición molecular de la clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos y aminoácidos.
Fosforo	Las fuentes de fosforo utilizadas <i>in vitro</i> son el fosfato de sodio y de potasio	Su principal utilidad es como activador de enzimas.

Potasio	Es suministrado como nitrato de potasio y fosfato de potasio.	Influye en la división celular , en la síntesis de carbohidratos y proteínas
Calcio	Generalmente es incluido como cloruro de calcio y nitrato de calcio.	Es parte integral de la pared celular de la planta y juega un papel en la permeabilidad de la misma. Facilita el movimiento de los carbohidratos y aminoácidos.
Magnesio	La fuente de magnesio es el sulfato de magnesio.	Es el elemento central de la molécula de la clorofila y es importante como activador de enzimas.
Azufre	Se suministra en forma de Sulfatos.	Este elemento está presente en algunas proteínas y promueve el desarrollo de raíces y de follaje verde.

(Kyte, 1990)

MICRO ELEMENTOS

Sales Inorgánicas	Forma de aplicación	Influye
Fierro	La fuente de este elemento es el sulfato ferroso.	Participa en la síntesis de la clorofila, en la conversión de energía en la fotosíntesis y la respiración.
Manganeso	Es utilizado como sulfato de manganeso.	Es necesario para el mantenimiento de la estructura y el proceso fotosintético. Además es esencial en la membrana del cloroplasto.
Zinc	Es suministrado como Sulfato de Zinc.	Elemento vital en varias enzimas así como en la síntesis del ácido indolacético.
Boro	Es adicionado como Ácido Bórico.	Necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática.
Cobre	El suministro de este elemento es el, sulfato de cobre.	Es necesario en la conversión de energía como alternante de los estados cuprosos y cúpricos.
Cobalto	Suministrado como cloruro de cobalto.	Elemento de la molécula de la vitamina B12 que es esencial para la fijación de N.
Molibdeno	Suministrado como Molibdato de Sodio.	Participa en la conversión del N en amoníaco y en la fijación del N.
Cloro	Está incluido en grandes cantidades como cloruro de calcio.	Esencial para estimular a fotosíntesis.

Yodo	Adicionado como yoduro de potasio.	No es considerado como esencial, aunque es componente de algunos aminoácidos
------	------------------------------------	--

(Kyte, 1990)

3.5.2 Sustancias vitamínicas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las vitaminas suministradas *in vitro*, pertenecen al grupo B y son:

- Tiamina, ayuda a la respiración en el ciclo de Krebs.
- Acido Nicotínico, constituyente de coenzimas en las reacciones luminosas.
- Piridoxina, sirve como coenzima en las vías metabólicas.
- Ácido Pantotenico, coenzima en el metabolismo de las grasas.
- Ácido fólico, su función como vitamina B2 demuestra su actividad como coenzima.
- Inositol, no es del complejo B, sino un azúcar-alcohol, estimula la morfogénesis, participa en la vía biocinética del ácido galacturónico.

Aminoácidos: Los aminoácidos no son esenciales para el cultivo de tejidos, pero proporciona una fuente inmediata de N y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado al medio. Las funciones de los aminoácidos *in vitro* son específicas como: la glutamina y la asparagina son transportadoras de nitrógeno, la arginina estimula la raíz; la serina es empleada en el cultivo de micro esporas y la cisteína es agente reductor. (Pierik, 1990)

3.5.3 Sustancias reguladoras del crecimiento

Las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugares diferentes a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta. (Pierik, 1990)

Existen cinco grupos principales de reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno, manteniendo cada grupo respuestas fisiológicas diferentes; sin embargo, Azcon-Bieto y Talon (1993) mencionaron que existen otros grupos de sustancias reguladoras del crecimiento, que ejercen una influencia similar a las hormonas vegetales en muchas funciones de las plantas, como son: brasinoesteroides, poliaminas y oligosacáridos; donde solo las dos últimas han sido utilizadas en algunos casos como moduladores en la morfogénesis *in vitro*. (Pierik, 1990)

En el cultivo *in vitro*, adicionalmente a los nutrimentos, es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citocininas, y ocasionalmente giberelinas o ácido abscísico, para orientar una vía específica de organogénesis (caulogénesis o rizogénesis) por vía indirecta o directa. Por otro lado, los requerimientos y las respuestas a estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro*. (Villalobos, 1990)

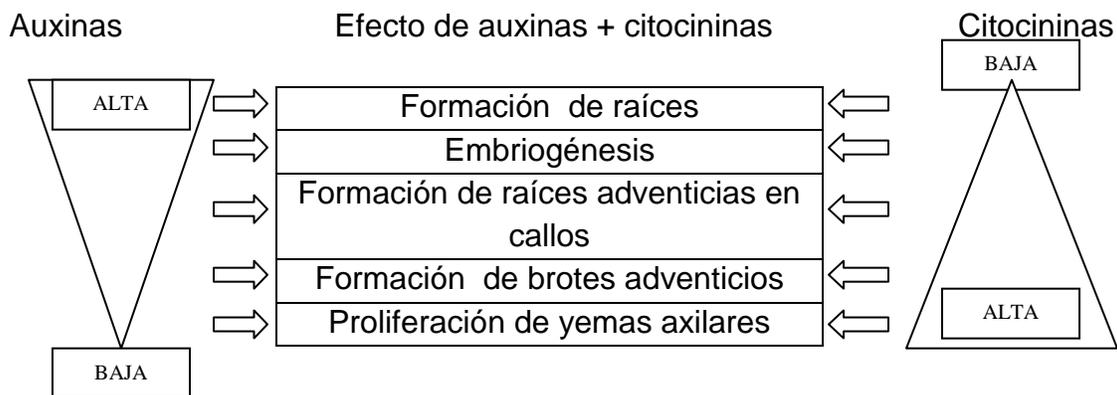
Las tres clases restantes de hormonas (giberelinas, etileno y ácido abscísico) no son esenciales para la inducción de órganos, pero actúan como moduladores de la respuesta morfogénica.

Auxinas: se relacionan con la extensión y alargamiento de las células, tropismos, dominancia apical, diferenciación del tejido vascular, abscisión de frutos y hojas, enraizamiento, promoción de la floración y la promoción de la biosíntesis del etileno. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la inducción de raíces y la formación y desarrollo de callo. Las auxinas más utilizadas son: AIB (ácido indol-3 butírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). (Pierik, 1990)

Citocininas: Salisbury y Ross (1994) definen a las citocininas como compuestos derivados de la adenina que promueven la división celular en algunos tejidos vegetales, inhiben la dominancia apical mediante la formación y desarrollo de brotes ya sea de origen lateral o adventicio; promueven la diferenciación de tallos, la expansión de hojas y el desarrollo de cloroplastos, entre otros. Existen diferentes tipos de citocininas que se encuentran con más frecuencia en varias plantas: zeatina, dihidrozetina, isopentil adenina (IPA), furfúril-aminopurinacetina (KIN) y una citocinina sintética, la benciladenina (BA). En los medios de cultivo usado para la propagación *in vitro* se incorporan citocininas para promover el desarrollo de brotes, ya sea de origen lateral o adventicio. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical.

Giberelinas: existe un gran número de giberelinas conocidas, la de mayor uso es la AG3, pero debe tenerse en cuenta que es muy termolábil (pierde el 90% de su actividad después del autoclave); comparado con las auxinas y citocininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. (Pierik, 1990)

Figura 2. Balance de auxinas y citocininas en un medio de cultivo



3.5.4 Otros componentes del medio

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la plantas, pero sin agua una planta no puede vivir en condiciones *in vitro*, es por esto que existen otros componentes que se adicionan al medio de cultivo, la cuales complementan y transfieren las propiedades concretas a un medio de cultivo, como lo son los el agua, azúcares, agentes solidificantes, colorantes, etc. (Levitus, 2010)

a) Agua

El agua es uno de los componentes químicos más importantes ya que constituye el 95% del medio nutritivo. El agua utilizada para la elaboración de medio debe ser destilada, bidestilada o desmineralizada y su almacenamiento debe ser por poco tiempo, debido a que pueden disolverse sustancias químicas de los recipientes. (Pierik, 1990)

b) Fuente de carbono

Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100 mg/L) suele ser incorporado a los

medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos, la concentración de CO₂ en el tubo de ensayo puede ser un factor limitante para la fotosíntesis (Gibson, 1967) y en la práctica es muy difícil y caro suministrar el CO₂. A veces, como resultado de un intercambio gaseoso pobre, la concentración de CO₂ en los tubos o recipientes puede llegar a ser demasiado alta y hacerse tóxica. La concentración de azúcar depende mucho del tipo y edad del material vegetal; por ejemplo, los embriones muy jóvenes requieren concentraciones de azúcar relativamente altas. El azúcar comercial resulta generalmente adecuada, pues se trata de un producto purificado, de acuerdo con los análisis de los fabricantes, se compone del 99.94% de sacarosa, 0.02% de agua y 0.04% de otras sustancias (elementos inorgánicos y también, fructosa y glucosa). No existe ninguna indicación de que estos constituyentes puedan causar toxicidad *in vitro*. (Levitus, 2010)

c) Agentes gelificantes

Comúnmente se ha empleado el agar como agente gelificante para la preparación de los medios sólidos o semisólidos, agar es una mezcla de polisacáridos derivados de extractos de varias algas rojas, aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. (Levitus, 2010)

Sus ventajas son:

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100 °C y se solidifican a 45 °C siendo estable en todas las temperaturas de incubación.
- No es alterado por las enzimas vegetales.
- No reacciona con los constituyentes del medio.
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Por lo general se utilizan 6 gr/lit. Pero la solidez varía con la fórmula del medio usado, la fuente y el origen del agar. Se han empleado otros compuestos para sustituir el agar, sin embargo pocos han tenido éxito. El gelrite es el que tiene mayor popularidad, los geles del gelrite son más caros y también cuajan más rápido que el agar y se utiliza 2gr./lit, también pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfergel»(2,0-2,60%), «Phytagel» (0,25- 0,40%) y agarosa(0,80-0.90%).El crecimiento *in vitro* puede ser afectado de forma negativa si la concentración de agar es demasiado elevada. El tipo de agar también afecta al crecimiento y desarrollo, cuanto mayor es la cantidad y la pureza del agar, mejor gelifica. (Levitus, 2010)

Cuadro 2. Composición del medio basal Cruz- Pizarro (2000).

Compuesto Químico	PM	μM ómM	Mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃ *	80	2.50 mM	200
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O*	236	2.50 mM	590
KH ₂ PO ₄	136	1.25 mM	170
MgSO ₄ 7H ₂ O	246	1.50 mM	369
KNO ₃ *	101	2.50 mM	252.5
FeSO ₄ 7H ₂ O	278	0.09 mM	25
Na Edta	380	0.10 mM	38
MnSO ₄ H ₂ O	169	5 μM	0.84
H ₃ BO ₃	62	100 μM	6.1
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	242	1 μM	0.24
ZnSo ₄ 5H ₂ O	287	30 μM	8.6
CuSO ₄ 5H ₂ O	249	0.1 μM	0.0000249
CoCl ₂ 6H ₂ O	238	0.1 μM	0.0000238
Mio-inositol	180	0.55 mM	100
Tiamina	337	0.29 μM	0.1
Piridoxina	205	2.44 μM	0.5
Ac. Nicotínico	123	4.07 μM	0.5
BA	225	2.22 μM	0.5
AIB	203	0.49 μM	0.1
Agar			6000
Azúcar			60000

pH ajustado a 5.7

Fuente: Cruz-Pizarro, 2000.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

Los trabajos se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, ubicado en el área de Agrícola, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, campo cuatro, ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

4.2 Material vegetativo

Se utilizaron explantes de 2 cm de longitud de la especie *Dionaea muscipula* que fueron previamente establecidos en condiciones *in vitro* en forma aséptica a partir de estructuras somática de esta especie.

4.3 Tratamientos y Diseño experimental

En este ensayo se probaron 3 concentraciones del medio de cultivo, las diluciones se hicieron tomando en cuenta el medio del cuadro 2, del medio Cruz Pizarro, partiendo de la concentración al 100% , se realizaron dos diluciones al 50% y 25%, también se añadieron hormonas y se ajustó a un pH de 5.7

El diseño experimental utilizado fue el de completamente al azar. La unidad experimental estuvo formada por cinco tubos de ensaye con 4 repeticiones con un total de 20 tubos por cada tratamiento, generando así 6 tratamientos como se ve en el siguiente cuadro;

Cuadro 3 .Tratamientos para la proliferación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

Tratamientos	Concentración del medio, con base en medio Cruz Pizarro (%)	Presencia de hormonas (BA / AIB)
		mg.l ⁻¹
T.1	25%	0.0/0.0
T.2	50%	0.0/0.0
T.3	100%	0.0/0.0
T.4	25%	0.5/0.1
T.5	50%	0.5/0.1
T.6	100%	0.5/0.1

Desarrollo del experimento

4.4 Preparación de medios de cultivo

Se elaboraron seis medios con diferentes concentraciones y para cada uno se preparó a una cantidad de 250 ml. Después de la elaboración del medio de cultivo se dejó pasar algunos días y exactamente transcurridos 10 días se realizó la implementación de los explantes.

4.5 Implantación o siembra

La siembra se realizó bajo condiciones de asepsia, dentro de una campana de aire de flujo laminar horizontal, reduciendo al máximo la presencia de patógenos presentes en el aire, desinfectando mediante inmersión en alcohol etílico y flameado bisturís, pinzas y cajas de Petri. Se sembraron dos explantes por cada tubo de ensaye.

4.6 Condiciones de incubación

Al término de la siembra, se colocaron los explantes en el cuarto de cultivo, donde se mantuvieron a una temperatura media de 27 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz. La intensidad luminosa fue de 49 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg dffa}$.

4.7 Variables de estudio

Se consideraron como índices de proliferación las siguientes variables:

- *Numero de brotes*, obtenido de cada una de las unidades experimentales, para la que se realizó un conteo y a continuación se registraron los resultados.
- *Longitud de brotes*, se observaron los brotes obtenidos de los explantes, los cuales se midieron sacando los explantes del tubo e individualizando cada uno de ellos para medir sobre una hoja milimétrica a fin de obtener mediciones exactas.
- *Longitud de raíz*, esta medición se realizó de la misma manera en que se evaluó la longitud de los brotes de cada unidad experimental, señalando las características que presentaba este órgano.
- *Numero de hojas*, de cada explante se contó el número de hojas que presentaba, señalando los explantes que no habían obtenido el desarrollo de este órgano, así como las malformaciones que se presentaron.
- *Porcentaje de contaminación*, se cuantificó el porcentaje de contaminación visualizando por fuera del tubo de ensaye la presencia de hongos o bacterias.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se establecieron las condiciones *in vitro* para la inducción de la proliferación de brotes múltiples de *Dionaea muscipula* y se caracterizó por la capacidad de respuesta de cada tratamiento. Los resultados evaluados señalan características importantes en el desarrollo de esta especie reflejado en las variaciones morfológicas y en la calidad del número de brotes que pudieron generarse con este método de cultivo de tejidos.

Dentro de todas las variables evaluadas también se tomó en cuenta el porcentaje de contaminación y de oxidación pues en todo el experimento se presentó, el 1% y solo se observó en 2 tratamientos pero no afectó la unidad experimental que fue evaluada.

5.1 Numero de brotes

En la proliferación, de acuerdo al análisis de varianza realizado (anexo..), se encuentran diferencias significativas para esta variable. Al analizar la concentración y presencia hormonal, el promedio general fue de 29 brotes por cada explante establecido, los cuales constituyen una tasa de proliferación alta, esta especie vegetal a menudo se desarrolla en medios donde los suelos y terrenos son muy pobres y carecen de elementos como fósforo, calcio, potasio, etc. Lecoufle (2006). Por lo tanto al establecer un explante en un medio nutritivo óptimo, favorece el desarrollo efectivo.

La concentración del medio de cultivo que fue utilizado, así como la presencia de reguladores de crecimiento, influyen directamente en el proceso de organogénesis, la cual involucra procesos de diferenciación y reacción a señales específicas; mediante los cuales es posible la generación de brotes axilares y adventicios a partir de tejido somático. Mediante este proceso morfogénico pueden diferenciarse *in vitro* vástagos, que son susceptibles a enraizar y formar plantas completas. Villalobos (1990).

El modo de acción de los reguladores de crecimiento en la organogénesis indica que el proceso está regulado por tipo, concentración y balance que se establezca entre los niveles aplicados de auxinas y citocininas (Azcón- Bieto, 1993).

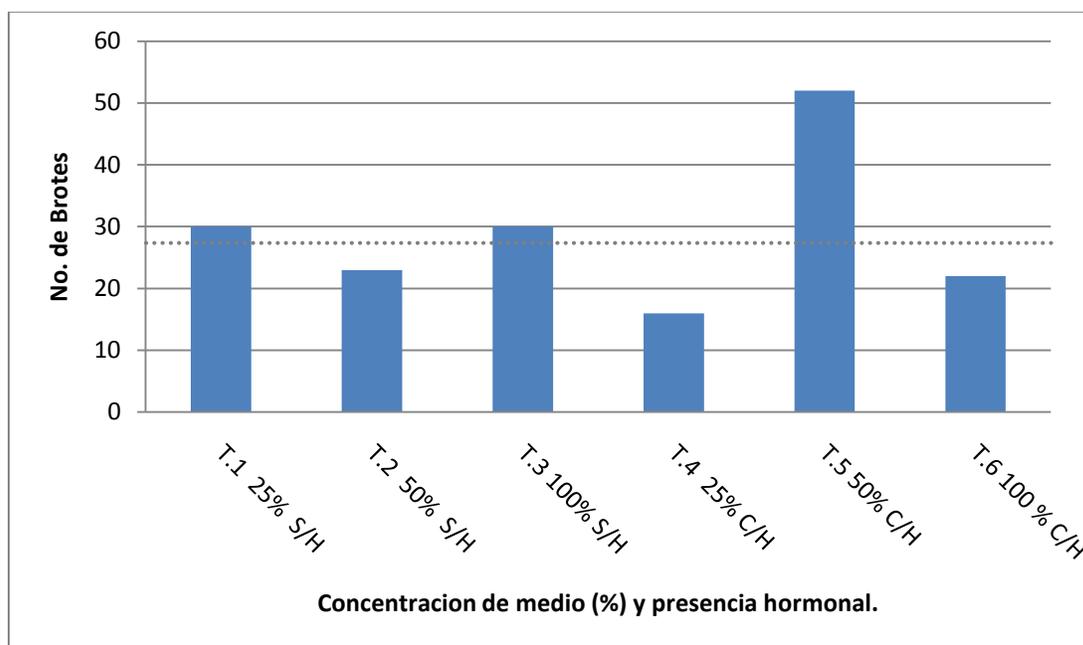
Para la evaluación de la proliferación se realizó la comparación de medias, de la variable número de brotes, donde se encontraron diferencias significativas, entre los tratamientos utilizados, como se puede ver en cuadro 4.

Cuadro 4. Comparación de medias que muestran las diferentes respuestas de los tratamientos en la variable Número de Brotes.

Tratamientos	Concentración del medio	Presencia hormonal	No. de brotes
T.5	50%	C/H	52 a*
T.1	25%	S/H	30 b
T.3	100%	S/H	30 b
T.2	50%	S/H	23 b c
T.6	100 %	C/H	22 b c
T.4	25%	C/H	16 c
Promedio general			28,83

Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey (≤ 0.05)

Grafica 1. Numero de brotes promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable Número de brotes.



Al emplear una concentración del medio al 50% se obtuvo una respuesta promedio de 37.5 brotes por explante lo cual representa el 30 % más respecto a la media general, como se distingue en la gráfica 1.

En los tratamientos con las demás concentraciones (25 % y 100%) se obtuvieron 23 y 26 brotes por explante lo que representa el 21% y 10% respectivamente, por debajo del promedio general, lo cual indica que el tratamiento 5 con una concentración del 50% es el óptimo para la proliferación de nuevos brotes debido a los niveles de sales minerales y componentes del medio que favorecieron esta respuesta, lo cual puede estar asociado a los ambientes donde prospera esta especie, pues esta planta crece en medios pobres en nutrientes y a diferencia en estos tratamientos se han añadido componentes, donde tal vez las concentraciones no sean las óptimas.

Al emplear la concentración del medio al 100%, esta no estimulo una mayor formación de brotes debido a que la concentración pudo haber sido excesiva, que limitó el desarrollo de brotes además de presentar variaciones morfológicas en hojas y raíz, pues los brotes formados estaban incompletos ya que no presentaban trampas al final de la hoja, además de formar conjuntos de brotes muy comprimidos y no se podían individualizar fácilmente, y a diferencia de la concentración al 25 % la proliferación se vio disminuida debido a la deficiencia en sales minerales que limitó la tasa de proliferación, como se observa en la siguientes figuras;

Figura 3. Conjunto de brotes que desarrollaron muy comprimidos y no presentan sus estructuras completas.



Figura 4. Hoja de *Dionaea muscipula* sin desarrollo de trampa en la parte final de la hoja.



En especies como *Anthurium* se ha estudiado el efecto que tiene la dilución de sales en el medio reportado por Kunisaki (1980) que al utilizar medios en concentraciones más elevadas se inhibe el desarrollo de brotes. Lee et. Al (2003) señalan que al cultivar ápices de *Anthurium* en medios con diferentes concentraciones de sales del medio MS al 37.5%, 50% y 100%, la mejor respuesta en la inducción de brotes múltiples se obtuvo en la concentración mínima de sales utilizada, presentando hasta 7.3 brotes por explante, comparado con concentraciones más elevadas donde se obtuvieron 1.3 brotes para las concentraciones de 50% y 100%. En el desarrollo de este trabajo se presentó una tendencia similar, es decir, la mejor proliferación de brotes se obtuvo al utilizar el medio en una concentración diluida.

Respecto a la adición de hormonas de BA/AIB (0.5/0.1 mg./l.⁻¹) la respuesta mayor se obtuvo al utilizar dichas hormonas que represento el 4% más en la proliferación de nuevos brotes respecto a la media, aunque a su vez el desarrollo sin la adición de hormonas se limitó en un 4% menos, respecto a la utilización de hormonas. La manipulación de las concentraciones de auxinas y citocininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, así como la tasa de proliferación entre otras variables, constituyendo además, la base de gran parte de los protocolos de propagación vegetativa *in vitro* existentes en la actualidad. Thorpe (1981).

Al considerar la interacción entre la concentración del medio y la presencia de hormonas se observó que en el tratamiento 5 (con hormonas) y al 50% de la concentración de sales minerales, se desarrollaron 52 brotes por explante, representando el 80% más respecto al promedio general, con estructuras morfológicas sin alteración o variación, como se observa en la figura 3.

Figura 5. Desarrollo óptimo de *Dionaea muscipula* con estructuras bien formadas y diferenciadas.



De la misma forma en el tratamiento 1 (s/h al 25%) y en el tratamiento 3 (s/h al 100%) se desarrollaron 30 brotes con estructuras completas, lo cual representa 4 % más respecto al promedio general; por otra parte algunos tratamientos se registraron por debajo del promedio como lo son: el tratamiento 2 (s/h al 50%) el cual desarrollo 23 brotes con estructuras bien formadas y definidas, colocándolo con 22% menos del promedio general, en el tratamiento 6 (c/h al 100%) se desarrollaron 22 brotes representando 24 % menos del promedio y finalmente el tratamiento 4 (c/h al 25%) que resulto muy por debajo del promedio general con 16 brotes que representa el 55% menos en la proliferación promedio.

Lo anterior coincide con las investigaciones realizadas por Vallejo, C. (2007), quien efectuó la multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando como explante vitroláminas foliares y tejido callogénico, en donde evaluó la interacción entre las concentraciones de citocininas y auxinas adicionadas al medio de cultivo; los resultados obtenidos señalan que la mayor formación de brotes (6 brotes) se observó utilizando 0.5 y 3 μ M de 2,4-D y BAP, respectivamente, lo cual explica que la relación alta de auxinas y baja en citocininas estimula una alta producción de brotes.

Existen distintos factores intrínsecos y extrínsecos involucrados en el estado de desarrollo de esta especie como lo son: a) condiciones ambientales del medio como el suministro de nutrimentos orgánicos e inorgánicos y hormonas; y b) condiciones físicas como la consistencia del medio de cultivo, la luz, la temperatura, el pH, etc. Sin embargo muchas especies no responden a los procedimientos lógicos de cultivo por lo que se continúa investigando sobre los posibles mecanismos de cultivo involucrados en el proceso.

5.2 Longitud de brotes

En la evaluación de esta variable el promedio general obtenido fue de 1.16 cm. por cada explante establecido, lo cual constituye un buen desarrollo pues existe una relación estrecha entre la variables número y longitud de brotes, dado que disminuye el crecimiento longitudinal al tener mayor número de estos, estableciendo una relación directa entre la demanda de los órganos.

Otros factores que influyen en la respuesta a la longitud de brote son las concentraciones de reguladores de crecimiento que se adicionan al medio, el balance auxinas- citocininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando, la efectividad del método de micropropagación. El ácido giberelico (GA), es poco utilizado en este sistema de propagación, su empleo ha sido utilizado para especies cuyo sistema de propagación se basa en alargamiento de brotes y la división por entrenudos, como en la papa (*Solanum tuberosum*). Pérez (1998).

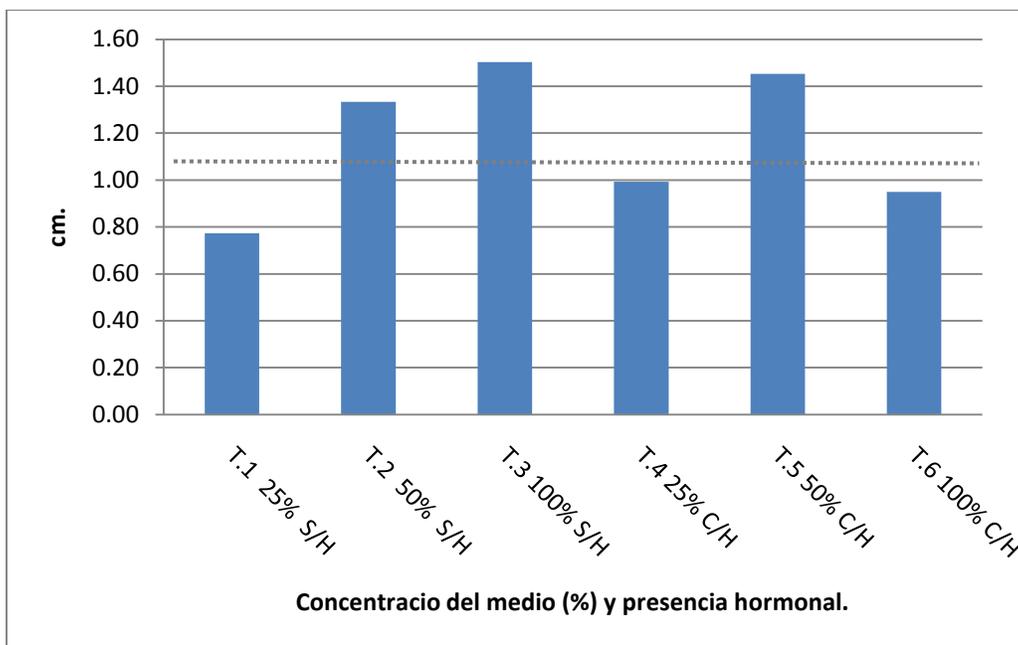
Para la evaluación de la proliferación de brotes se realizó la comparación de medias, donde se muestra la diferencia significativa de las respuestas en los diferentes tratamientos, tal y como se observa en el cuadro 5.

Cuadro 5. Comparación de medias que muestran las diferentes respuestas de los tratamientos en la variable longitud de brotes.

Tratamientos	Concentración del medio	Presencia hormonal	Longitud de Brotes
T.3	100%	S/H	1,50 a*
T.5	50%	C/H	1,45 a*
T.2	50%	S/H	1,33 b
T.4	25%	C/H	0,99 c
T.6	100%	C/H	0,95 c
T.1	25%	S/H	0,77 c
Promedio general			1,16

Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey (≤ 0.05)

Grafica 2. Longitud de brotes promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable longitud de brotes.



Al emplear el medio al 50% de su concentración se obtuvo una respuesta promedio de 1.39 mm de longitud lo que representa el 19 % más respecto a la media general, como se ve en la gráfica 2.

En los tratamientos con las demás concentraciones al (100% y 25 %) se observó una respuesta muy por debajo del promedio general que representan el 31% y

25% menos del valor general, respectivamente; al igual que la variable número de brotes en la concentración del medio al 50 % los explantes reaccionaron de forma similar, presentando la máxima respuesta en dicha concentración, señalando a su vez que una alta concentración de sales minerales no estimula la proliferación de esta especie, debido a que esta planta vive en humedales con suelos arenosos húmedos y ácidos, carentes en elementos minerales esenciales para su proliferación, es por ello que esta especie de planta carnívora recurre a un procedimiento análogo a la forma en que los animales se proveen de esos elementos, capturando y digiriendo presas vivas, generalmente insectos. Lecoufle (2006)

Al utilizar el medio con una concentración del 100% se desarrollaron brotes pequeños de color verde intenso, pero el porcentaje de brotación fue reducido y a su vez se presentó variación morfológica en la estructura de sus hojas. El tratamiento al 25% de concentración presentó una longitud por debajo de la media general y no generó gran número de brotes; cabe señalar que los nuevos brotes presentaban buenas características físicas como estructuras bien formadas y definidas. Generalmente en la brotación y la longitud de los brotes se presenta una inhibición correlativa; es decir, a menor número de brotes una mayor longitud potencial de los mismos (Zimmeman 1991, Cruz Pizarro 2000, y Harta 1988).

Respecto a la presencia hormonal de BA/AIB (0.5/0.1 mg. /l.-¹) respectivamente, los resultados indican un efecto directo de la acción de los reguladores de crecimiento exógenos aplicados. Según Durand-Cresswell et al. (1982) y Ahuja (1993), el desencadenamiento de la caulogénesis *in vitro* depende de una relación óptima entre las concentraciones totales de citocininas-auxinas exógenas y endógenas. Sin embargo, la respuesta es muy variable dependiendo de la especie y del tipo de explante utilizado. Sánchez (1996). En el caso de esta especie se establecieron brotes individuales a fin de generar brotación por medio de organogénesis directa. La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citocininas en el medio de cultivo para romper con la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Su concentración varía en dependencia del balance endógeno de auxinas y citocininas en los explantes. (Pérez, 1998)

La respuesta mayor presentada para esta variable representó más del 2 % del promedio general al utilizar el medio sin la adición de hormonas; sin embargo, con presencia hormonal se limitó la longitud de los brotes en un 4% menos, a pesar de que se suministraron auxinas y citocininas al medio. Cabe señalar que no se aplicó ninguna giberelina al medio de cultivo ya que la función de esta sustancia es inducir el alargamiento celular, así como elongación de entrenudos y

crecimiento de meristemas, también se tomó en cuenta que inhiben la formación de raíces adventicias y la formación de vástagos adventicios, por lo tanto, si se hubiera empleado alguna de estas sustancias se vería disminuida la proliferación. Las concentraciones utilizadas de BA y AIB indujeron una proliferación media de los explantes, el objetivo de esta investigación se basó en la proliferación de un número óptimo de brotes de alta calidad, por lo que no se esperaba que la longitud de los brotes sobresaliera en el desarrollo. Las características morfológicas que presentaron los brotes en el medio de cultivo sin hormonas, fueron de manera general brotes de color verde intenso y con hojas bien definidas, tal y como se observa en la figura 6.

Figura 6. Desarrollo óptimo de brotes.



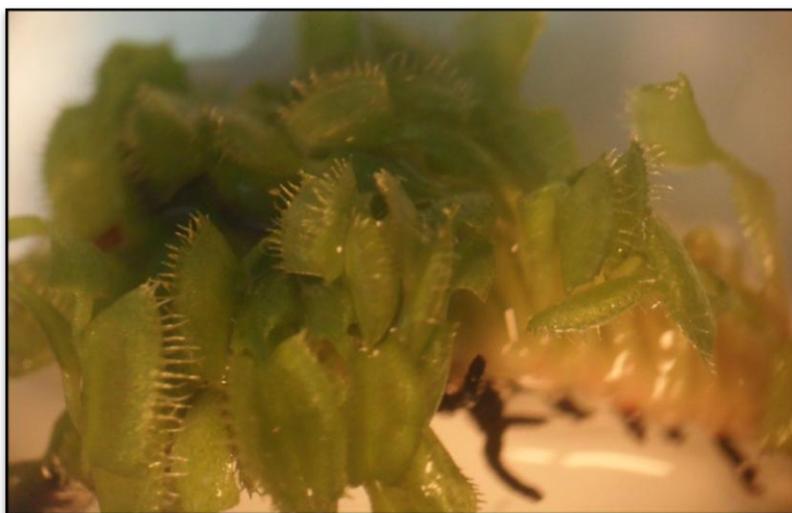
Esto coincide con lo mencionado por Sánchez (2009) quien realizó la investigación en el cultivo *in vitro* de *Nothofagus procera*, a partir de embriones maduros, se trabajó la etapa de proliferación con inducción hormonal en los tratamientos. En la etapa de inducción de múltiples yemas adventicias a partir de segmentos nodales, se obtuvo la mejor respuesta con el medio MS completo (100 % de su concentración) suplementado con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP y $0,07 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB, a diferencia de otro tratamiento adicionado con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP y $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB, se observó que muchos puntos de crecimiento no desarrollaron su longitud a estas concentraciones, lo que indica una mayor formación de puntos de crecimiento generado por las citocininas y un mayor alargamiento de estos puntos de crecimiento, como resultado de un balance auxínico adecuado.

Al considerar la interacción entre la concentración del medio y la presencia de hormonas se observó que en el tratamiento 3 (s/h y al 100%) la longitud fue de

1.50 mm, lo que representa el 28% más del promedio general, presentando brotes altos respecto a la media general, de color verde claro, con estructuras morfológicas diferenciadas sin variación tal y como se distingue en la siguiente imagen. Al igual que el tratamiento anterior, en el tratamiento 5 (c/h al 50%) la longitud fue de 1.39 mm lo que genera el 24 % más del promedio general, con 1.45 mm de longitud; otro de los tratamientos en los que se generó una respuesta efectiva fue el tratamiento 2 (s/h al 50 %) que representó el 14 % más del promedio general con 1.33 mm de longitud, presentando brotes medianos respecto a la media general, con características físicas en color verde intenso y tamaño uniforme en todos los brotes.

Por otra parte, algunos tratamientos se registraron por debajo del promedio como lo son: el tratamiento 4 (c/h al 25%) en donde la longitud fue de 0.99 mm lo que representa el 15 % menos del promedio general; el tratamiento 6 (c/h al 100%) con una longitud de 0.95 mm represento el 19% menos del promedio general y finalmente, el tratamiento 1 (s/h al 25%) con 0.77 mm de longitud representado menos del 44% de la media, colocando este tratamiento muy por debajo de la longitud promedio. Las características morfogénicas que presentaron los brotes sometidos a los anteriores tratamientos se caracterizaron por tener aspecto clorótico, con tejidos y estructuras amarillentas, poco desarrollo y con estructuras diferenciadas pero demasiado pequeñas en algunos casos y otros con variaciones morfológicas, como se puede ver la figura7.

Figura 7. Desarrollo de brotes de *Dionaea muscipula*, con estructuras diferenciadas pero con aspecto clorótico.



La etapa de multiplicación es considerada la fase más importante y determinante en los esquemas de propagación *in vitro*, pues es en ella donde se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie, definiéndose no solo el número de plantas o propágulos a obtener, sino la calidad que está dada por las características de los brotes obtenidos (numero, longitud, hojas y raíz) en su caso; además en esta fase es en donde se ha asociado que se producen las variantes somaclonales. Pérez (1998).

5.3 Longitud de raíz

Para esta variable, el promedio general obtenido fue de 0.22 mm por cada explante establecido, lo cual constituye un desarrollo mínimo de raíz. La especie *Dionaea muscipula* presenta solamente una raíz principal y esta fue la que se midió en cada uno de los brotes. Debido a que se dio preferencia a una fase inicial en orientación a la multiplicación y proliferación de un mayor número de brotes, tal y como lo menciona Pérez (1998), donde la multiplicación *in vitro* de las diferentes especies vegetales, requiere de cambios en el manejo y manipulación de los explantes para lograr una adecuada tasa de proliferación, sin afectar las características morfológicas de las plantas obtenidas en la primera etapa de la multiplicación y obtener así brotes de un tamaño adecuado para pasar a la fase de Inducción y desarrollo de raíces.

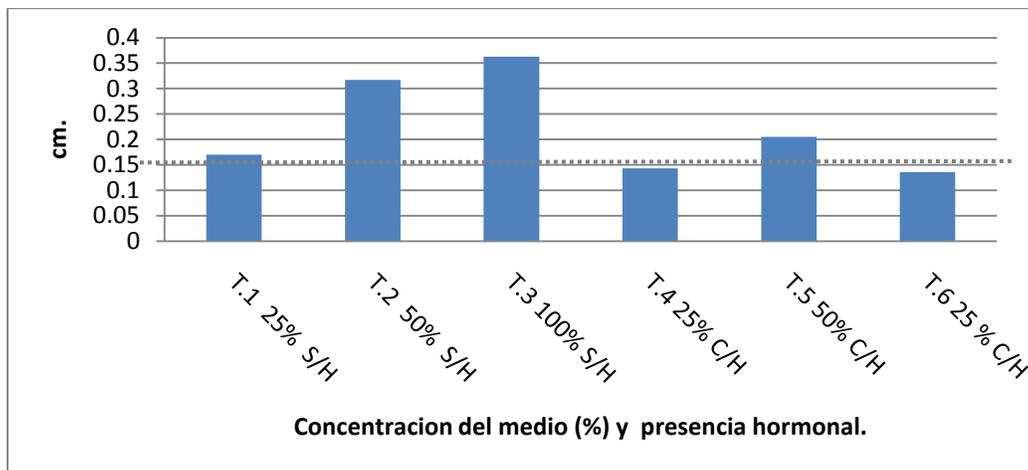
Para la evaluación de la longitud de raíz se tomó en cuenta el promedio de longitud del sistema radical, en los brotes obtenidos *in vitro*, tal como se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6. Longitud promedio del desarrollo de raíz de *Dionaea muscipula*, obtenidos en distintos tratamientos.

Tratamientos	Concentración del medio	Presencia hormonal	Longitud de raíz (mm)
T.3	100%	S/H	0,36
T.2	50%	S/H	0,31
T.5	50%	C/H	0,20
T.1	25%	S/H	0,17
T.4	25%	C/H	0,14
T.6	25%	C/H	0,14
Promedio general			0,22

En la evaluación del desarrollo de raíz al emplear el medio al 50 % de su concentración se obtuvo una respuesta promedio de 0.26 mm de longitud lo que constituye el 17 % más respecto a la media general; de la misma forma, en la concentración al 100 % se generó una respuesta aceptable que representa el 12% más del promedio general, obteniendo como resultado un desarrollo de raíz satisfactorio en estos tratamientos, pero con desarrollo abundante de pelos radicales. A diferencia de esta respuesta, en el medio empleado con la concentración del 25 % se desarrollaron raíces muy pequeñas, lo cual represento menos del 30% respecto a la media general , estableciendo que las concentraciones mínimas del medio de cultivo inhibieron el desarrollo de raíces. El comportamiento de cada uno de los tratamientos respecto a la media general se observa con claridad en la gráfica siguiente;

Grafica 3. Longitud de raíz promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable longitud de raíz.



La rizogénesis uno de los factores involucrados en la organogénesis vegetal, en esta etapa ocurre una serie de eventos de tipo anatómico y fisiológico, los que comprenden la inducción, iniciación y diferenciación radical, requiriendo de una modificación en la proporción citocinina/auxina, a favor de estas últimas involucradas directamente en el proceso de enraizamiento (Azcón–Bieto 1993; Salisbury 2000; Hartmann, 1988).

Respecto a la presencia hormonal de BA/AIB (0.5/0.1 mg. /l.-¹) respectivamente, la respuesta mayor para la variable de longitud de brotes represento más del 53% en un medio sin adición de hormonas, y a su vez en el medio con presencia de hormonas se generó el 24% menos respecto al promedio general.

En algunos casos las auxinas cumplen un papel importante en el enraizamiento, siendo su aplicación un hecho común en la mayoría de los sistemas de propagación. Para muchas especies de plantas se ha demostrado que la auxina más importante para la inducción de raíces es el ANA, (Kitto y Young, 1978). Sin embargo, ya que los brotes jóvenes en desarrollo son una fuente rica en la producción de auxinas, la adición de éstas a los medios de cultivo durante la fase de enraizamiento, se ha encontrado que es innecesaria para muchas especies (Orellana, 1995). En tal sentido, los ácidos naftalenacético (ANA) e indolbutírico (IBA) son las fitohormonas más empleadas y la forma en que se apliquen incide en el éxito del proceso morfogénico. (Luna, 2004). Probablemente lo que ocasionó que no se generara un alto desarrollo de raíz, fue por las concentraciones de hormonas empleadas, pues la concentración de citocininas fue mayor respecto a las auxinas en proporción 5:1, cabe señalar que el objetivo de la presente investigación se basa principalmente en la fase de proliferación así como del desarrollo de brotes y no a una fase de enraizamiento.

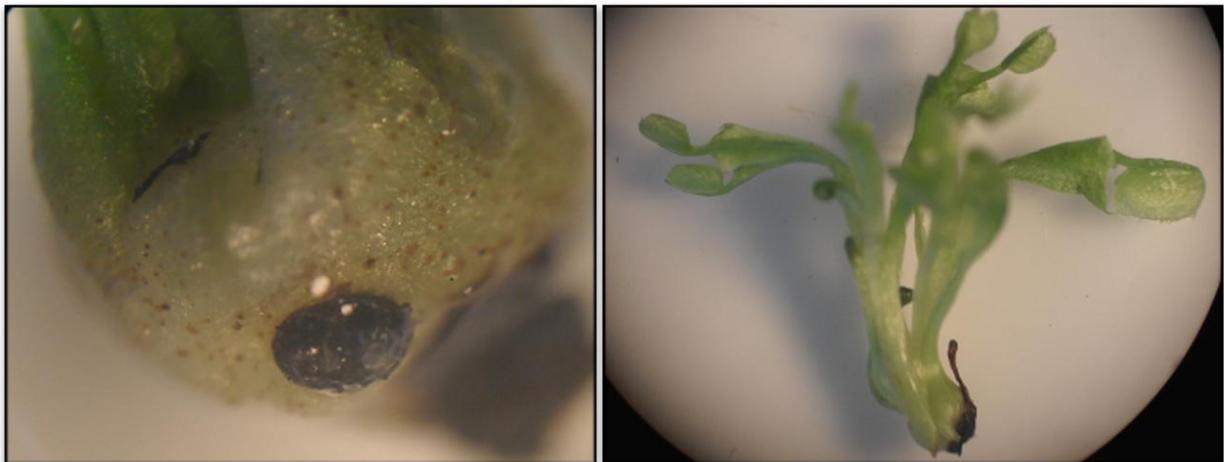
Al considerar la interacción entre la concentración del medio y la presencia de hormonas se obtuvo que en el tratamiento 3 (s/h y al 100%) se presentó una longitud de 0.34 mm, lo que representa el 53 % más del promedio general, presentando raíces más largas respecto a la media general, pero con la presencia de abundantes pelos radicales. En el tratamiento 2 (s/h al 50%) y el tratamiento 5 (c/h al 50%) se desarrollaron longitudes altas lo que representa el 42% y 8% respectivamente, mayor al promedio general donde las características morfológicas de estas raíces fueron el tamaño medio con desarrollo normal de pelos radicales.

Por otra parte en algunos tratamientos se registraron longitudes por debajo del promedio como lo fueron; el tratamiento 1 (s/h al 25%) en donde la longitud fue de 0.17 mm lo que representa menos 25 % del promedio general; el tratamiento 4 (c/h al 25%) representó una longitud de 0.14 mm colocando este tratamiento con un valor de 36% menos respecto a la media general y finalmente el tratamiento 6 (c/h al 100%) que presentó 0.13 mm de longitud, generando de igual manera el 39% menor, colocando este tratamiento muy por debajo de la longitud promedio, en general, en estos tratamientos se presentaron brotes de longitud muy corta con raíces demasiado pequeñas y con presencia de pelos radicales pequeños como se observa en la figura 8 y 9.

Figura 8. Desarrollo limitado de brotes, de mínima longitud, con estructuras diferenciadas.



Figura 9. Proliferación de brotes con desarrollo mínimo de raíz.



5.4 Número de hojas

En la evaluación de esta variable el promedio general obtenido fue de 6.56 hojas por cada explante establecido, lo cual se considera como una proliferación alta, con desarrollo de brotes de buena calidad y con presencia de un gran número de hojas, respecto a lo que describe (Lecoufle, 2006) señala que las hojas de la *Dionaea* tienen aproximadamente un desarrollo máximo de 3 a 8 cm de longitud, los cuales nacen en el mismo rizoma y se desarrollan en roseta. Una de las características principales de esta especie son sus hojas pues el limbo es una extraordinaria trampa con mordazas, compuesta de dos lóbulos semicirculares y la base es una bisagra que permite el cierre instantáneo de la trampa, todas estas características son primordiales para esta especie pues están destinadas a atraer a los insectos en su medio natural ya que son el soporte para suministrar sus requerimientos nutricionales que la planta necesita.

Debido a las generalidades de la especie la calidad de los brotes producidos *in vitro* de *Dionaea* es de suma importancia ya que en etapas posteriores a la proliferación, las hojas serán parte esencial del desarrollo de esta especie para los procesos de aclimatación.

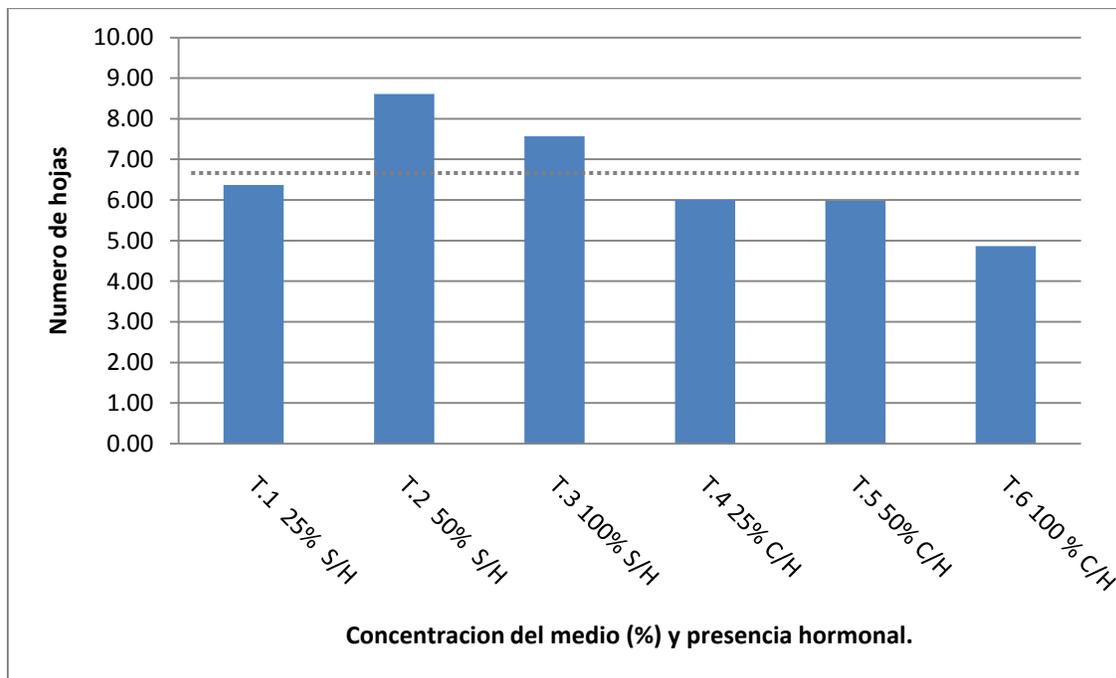
Para la evaluación del número de hojas se consideró el promedio de hojas desarrolladas de cada explante en los diferentes tratamientos, tal y como se observa en el cuadro 7.

La evaluación del desarrollo de hojas al emplear el medio al 50% de su concentración obtuvo una respuesta promedio de 7.29 hojas lo que constituye el 11% más del promedio general, las características morfológicas presentadas fueron hojas de color verde brillante, con limbos bien diferenciados y vigorosas, como se puede ver en la imagen... A diferencia de esta respuesta en el medio empleado con la concentración del 25% y al 100% de su concentración se desarrollaron un menor número de hojas, lo cual represento 9% y 6% respectivamente por debajo de la media general, estableciendo que en la concentración mínima del medio no desarrollara a un número mayor de hojas, la proliferación de cada uno de los tratamientos se puede observar en la gráfica 4.

Cuadro 7. Numero de hojas de *Dionaea Muscipula*, obtenidos en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Concentración del medio	Presencia hormonal	Numero de hojas
T.2	50%	S/H	8,61
T.3	100%	S/H	7,57
T.1	25%	S/H	6,37
T.4	25%	C/H	6,17
T.5	50%	C/H	6,00
T.6	100%	C/H	4,86
Promedio general			6,60

Grafica 4. Numero de hojas promedio obtenidas en los tratamientos para la variable número de hojas.



Respecto a la presencia hormonal de BA/AIB (0.5/0.1 mg. /l.-1) respectivamente, la respuesta mayor para la variable número de hojas represento más del 14% respecto de la media general con un promedio de 7.51 hojas que se desarrollaron en un medio sin adición de hormonas, y a su vez en el medio con presencia hormonal generó el 15% menos respecto al promedio general con 5.61 hojas. Señalando así que esta especie, por si misma, no necesita de la adición de

reguladores de crecimiento que intervengan en el desarrollo de hojas, ya que la especie *Dionaea* desarrolla por si misma los órganos que le servirán de sostén tanto en un medio artificial como en uno natural.

Al respecto, Olivera (2000) señala en su investigación el interés de evaluar la respuesta organogénica de *Garbera jamesonii* bajo cultivo *in vitro*, donde se establecieron brotes individuales con un tamaño aproximado de 2 cm de longitud y fueron establecidos en el medio Murashige y Skoog (MS); además se adiciono BA en tres concentraciones (2,2; 4,4 y 8,8 μ molar). La mejor respuesta para la proliferación de hojas se obtuvo con la concentración de BA de 2.2 μ molar donde el número de hojas fue de 11.2, señalando que la concentración mínima utilizada de este regulador de crecimiento generó la mejor respuesta, al igual que el desarrollo que se obtuvo en *Dionaea* donde esta no requirió de altas concentraciones de BA.

Al considerar la interacción entre la concentración del medio y la presencia de hormonas se obtuvo que en el tratamiento 2 (s/h y al 50%), se presentó el desarrollo más alto con 8.6 hojas por explante, lo que representa el 31% más del promedio general, presentando hojas de color verde intenso, de gran tamaño con desarrollo de estructuras diferenciadas, como se observa en figura 10.

Figura 10. Desarrollo de hojas de *Dionaea* con estructuras diferenciadas y definidas.



En el tratamiento 3 (s/h al 100 %) se generó de igual manera un alto número de hojas desarrollando 7.56 hojas por explante, lo que representa el 15 % más del promedio general, desarrollando hojas medianas con aspecto clorótico pero de gran tamaño, lo cual se atribuyó al aumento del crecimiento longitudinal si se genera un menor número de brotes, estableciendo una relación directa entre la demanda de los órganos. Cabe señalar que estos dos tratamientos desarrollaron un número de brotes medio, respecto al promedio general, por lo tanto el desarrollo de hojas aumento.

Por otra parte algunos tratamientos se registraron por debajo del promedio como lo fueron el tratamiento 1 (s/h al 25%) en el que se desarrollaron 6.36 hojas lo que representa el 4% menos del promedio general, presentando hojas pequeñas, con estructuras bien formadas y de color verde brillante. Así mismo en el tratamiento 4 (c/h y al 25%) y el tratamiento 5 (c/h y al 50%) generaron un numero de hojas de 6 y 5.9 respectivamente, colocando estos tratamientos en un promedio de 9% por debajo del promedio general, donde las características de las hojas fueron de color verde claro, de aspecto clorótico, de baja longitud y con estructuras pequeñas pero diferenciadas.

Finalmente en el tratamiento 6 (c/h al 100%) se desarrollaron 4.86 hojas, representando el 26% por debajo del promedio general donde se presentó variación morfológica en estas estructuras, atribuido a las concentraciones altas del medio de cultivo y de hormonas, generando hojas deformadas sin desarrollo de limbo ò trampa que es característica primordial de esta especie, además de presentar hojas plegadas de color verde ligero.

6. CONCLUSIONES

- La proliferación *in vitro* de la especie *Dionaea muscipula* es posible en el medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000) con una concentración total de sales reducida a un 50% de su concentración, indicando que la adición hormonal generó una respuesta considerable en esta fase de multiplicación, alcanzando una tasa de proliferación elevada que permite la efectividad del método de micropropagación.
- Para la variable número de brotes, los explantes establecidos generaron una mayor respuesta empleando un medio al 50% de su concentración obteniendo éste una tasa mayor de proliferación, siendo 37.5 el número de brotes generados por cada explante .
- La mayor longitud de brotes se logró empleando el medio al 50% de su concentración, obteniendo brotes de 1.39 mm de longitud, con características de color verde brillante y estructuras bien formadas así como un tamaño uniforme en los explantes generados, los cuales no presentaron variación morfológica.
- Para la variable longitud de raíz se generó una mayor respuesta al emplear el medio al 50% de su concentración con una longitud de 0.26 mm, señalando que el desarrollo observado fue mínimo presentando sólo una raíz principal, lo cual es claro para esta fase de multiplicación y posteriormente seguir a una fase de enraizamiento.
- Respecto a la variable número de hojas al igual que las demás variables, se observó una mayor respuesta utilizando el medio al 50% de su concentración de sales generando 7.2 hojas por explante con características de color verde intenso y estructuras diferenciadas, mencionando que el desarrollo de hojas de esta especie es de gran importancia ya que en etapas posteriores a la proliferación estas serán parte esencial para la fase de aclimatación.
- Con las concentraciones del medio al 25% y 100% se presentó una tasa de proliferación baja desarrollando brotes pequeños de color verde intenso, con aspecto clorótico y a su vez con presencia de variación morfológica en la estructura de sus hojas.

- El balance empleado de los reguladores de crecimiento de auxinas y citocininas BA/AIB (0.5/0.1 mg./l.⁻¹) fue determinante en el coeficiente de multiplicación, pues para esta fase se obtuvo una respuesta superior en todas las variables, debido a que influyen en el proceso de organogénesis del cultivo *in vitro* de *Dionaea muscipula*.
- Es factible la propagación y proliferación de la especie *Dionea muscipula*, con la técnica empleada de cultivo de tejidos pues esta especie presentó una respuesta diferencial a las concentraciones del medio y niveles hormonales, señalando que el medio de cultivo del T.5 con una concentración del 50% y la adición de hormonas BA/AIB (0.5/0.1 mg./l.⁻¹), generaron un balance óptimo para el desarrollo de esta especie, obteniendo plantas completas, con estructuras diferenciadas, presentando características de sanidad y vigor deseable.

7. BIBLIOGRAFIA

- Avelino T. A. 2002. Niveles de nitrógeno en el cultivo *in vitro* de *Gladiolos sp.* Tesis de Licenciatura. UNAM F.E.S. Cuautitlan. Cuautitlan Izacalli. Edo de Mexico 100 p.
- Azcon- Bieto, J., Talon M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal . 1ª edición. Madrid España. pp 285-392
- Curkovic, P.M. and Berjak. 1996 *In vitro* growth and regeneration of *Drosera spatulata*. Labill on various Media. Hort science 31(6): 1033-1034.
- Cruz-Pizarro, F. 1983. Propagación *in vitro* de manzano (*Malus pumilla* Mill) Tesis Prof. Ingeniería Agrícola FES-C. UNAM. 68 p.
- Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ en el cultivo *in vitro* de vid (*Vitis vinifera*) 'Málaga Roja' Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De Méx. 78p.
- Declerck, V y Shuyler S. Korban. 1994 Effects source of macronutrients and plant growth regulator concentrations on shoot proliferation of *Comus florida*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 38:57-60.
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A. and Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro*, 12: 473-478
- Gonzales, R.E. 2001. Micropropagación de *Mammillaria sp.* Tesis de Licenciatura, FESC UNAM. Cuatitlan Izacalli, Edo de Mexico . 67 p.
- Grewal, H. S., Rajvir, K. y Kaur, R. 1999. Effects of growth regulators on shoot and root formation in *Dracaena* . Indian Journal of Horticulture 56:4, 375-381.
- Hartmann, H. T. y D. E. Kester. 1984. Propagación de plantas. Principios y prácticas. CECSA México. 610 p.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester and F. T. Davies Jr. 1990. Plant Propagation, Principles and Practices. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey. USA 647p.

- Hinnen M., Pierik R. and Brosema F. 1989 The influence of micronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis hybrid* seedlings *in vitro*. *Sientia Horticulturae*. 41:105-116.
- Kyte, L. 1990. Plants from test tubes. An Introduction to Micropropagation. Timber Press. Portland, Oregon USA. pp. 62-70
- Kunisaki, J.T.1975. *In vitro* propagation of *Cordyline terminalis* (L.)Kunth. *HortScience* 10:601-602.
- Lee, N., Hazel y ., Wetzstein and Harry E.S.1986 .The effect of agar vs liquid medium on rooting of cultured Sweetgum. *HortScience* 21 (2): 317-318.
- Lecoufle ., M. 2006 Plantas Carnívoras, Francia, Edt Omega. 123 p.
- Levitus, G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. 2010. Ed. INTA pp. 15-40
- Little, M. y Hills, J. 1991 .*Metodos Estadísticos para la Investigación en la Agricultura*. Edt. Trillas . Mexico D.F. pp. 41-85
- Lillo, C. 1989 Effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 19: 103-111
- Lopez A., Pliego A. and Barcelo M. 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behavior of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Horticultural Science*. 64(4) .625-637
- Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In. *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Edt. Echenique, V., Rubinstein C. y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina.. Ed. INTA pp. 35-42
- Olivera V. y Gutierrez M. 2000. Cultivo *in vitro* de (*gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12 (3) 75-80.
- Perez P. 1998. Propagación y mejora de plantas por Biología. Edt. Santa Clara, Cuba. pp.151-176.

- Robert, M Y. A. Garcia . 1985. El cultivo de tejidos vegetales y su posible aplicacion en le mejoramiento genico de las agavaceas . En (eds.) Biologia y aprovechamiento integral del henequen y otro agaves. Mexico, Centro de investigacion cientifica de Yucatan, A.C. pp 83-89.
- Salisbury,F.B y C. W. Ross. 1994. Fisiologia Vegetal Ed. Iberoamericana S.A. de C.V. 1a Impresion en español. Mexico. Pp 395-423.
- Selby, R. L. Harvey B.M.R 1989. The efectos of culture medium rigidity on adventitious bud production and tissue vitrification in needle cultured of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong.) *New Phytol.* 113:203-210.
- Skoog, F. y Miller, C.O. 1967. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* .Symposium of the Society for Experimental Biology, 11:118-131.
- Thorpe,T. A.,Kumer, P.P.Cellular control morphogenesis.En :Ahuja M.R. 1993. Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. pp 11-29.
- Teo by C.K. y L.K. Chan. The effects of agar content , nutrient comcentration, genotype and light intensity on the *in vitro* rooting of ppaya microcottings. *Journal of Horticultura Science* 69(2) 267- 273).
- Urbina, P.R. 1996. Efecto de agentes gelificantes en le cultivo *in vitro* de vid (*Vitis vinifera*) cv. Malaga Roja. Tesis profesional . UNAM- FESC Cuautitlan Izcalli Mexico. 45 pp.
- Villalobos, A. V. 1990. Organogéneis. In: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. Rosell, C. H y Villalobos A. V. Estudio FAO Producción y Protección vegetal 105: 29-32
- Warening, P.F., y Phillips I. D. 1987. The control of grow and differentiation in plantas 2ª Ed. Oxford, Pergamon Press Ltd. 347 p.

8. ANEXOS

Tabla 1. ANOVA para la variable Numero de Brotes.

Fuente de Variacion	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo	5%	1%
Media	1	19952.66	19952.66	1095.09	2.101	1.878
A	1	32.67	32.67	1.79		
B	2	937.34	468.66	25.72		
AB	2	2169.33	1084.66	59.53		
Error exp.	18	328	18.22			
	24	23420				

Tabla 2. ANOVA para la variable longitud de Brotes.

Fuente de Variacion	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo	5%	1%
Media	1	32.5734	32.5734	201.69	2.101	2.878
A	1	0.0294	0.0294	0.1820		
B	2	1.0836	0.5418	3.354		
AB	2	0.7012	0.3506	2.1708		
Error exp.	18	2.9248	0.1615			
	24	37.3124				

Cuadro 8. Medio de cultivo Cruz- Pizarro

Núm.	Compuesto	Solución madre (50 ml) Solución concentrada	1 litro de solución	
			ml de solución MS- 50%	ml de solución MS- 100%
1	NH ₄ NO ₃ - Nitrato de amonio	9.5 g	2.5	5.0
2	KNO ₃ - Nitrato de Potasio	13.0 g	2.5	5.0
3	Ca (NO ₃) ₂ 4H ₄ - Nitrato de Calcio tetra hidratado	6.0 g	2.5	5.0
4	MgSO ₄ 7H ₂ O- Sulfato de magnesio heptahidratado	3.7 g	2.5	5.0
5	KH ₂ PO ₄ - Fosfato diácido de Potasio	1.7 g	2.5	5.0
M I C R O S	KI Yoduro de Potasio	8.3 g	2.5	5.0
	H ₃ BO ₃ - Ácido Bórico	62 mg		
	MnSO ₄ 4H ₂ O Sulfato de magnesio tetra hidratado	223 mg		
	ZnSO ₄ 7H ₂ O Sulfato de Zinc heptahidratado	86 mg		
	Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O Molibdato de Sodio dehidratado	2.5 mg		
	CuSO ₄ 5H ₂ O Sulfato de cobre pentahidratado	0.25 mg		
	CoCl ₂ 6 H ₂ O Cloruro de Cobalto hexahidratado	0.25 mg		
	FeSO ₄ 7 H ₂ O Sulfato de Hierro heptahidratado	278 mg		
7	Na ₂ - EDTA 2H ₂ O Edta-Sodio dihidratado	373	2.5	5.0
8	Mioinositol	1 g – 100 ml	10	10
9	Acido nicotínico	10 mg – 50 ml	2.5	2.5
10	PiridoxinaHCl	10 mg – 50 ml	2.5	2.5
11	Timina HCl	2 mg – 50 ml	2.5	2.5
12	Agar	6-8 g/ litro		
13	Azúcar	30 g/ litro		
14	BA – Bencil adenina	10 mg/ 50 ml	5.0	5.0
15	AIB – Acido indolbutírico	2 mg/ 50 ml	5.0	5.0

pH de 5.7

Cuadro 9. Cuadro resumen para la propagación *in vitro* de *Dionaea Muscipula*

En este cuadro se muestran los valores generados en cada uno de los tratamientos donde se observa la media general registrada para cada variable.

Tratamientos	Numero de Brotes	Longitud de Brotes	Longitud de raíz	Numero de Hojas
T.1 25% S/H	30	0,77	0,17	6,37
T.2 50% S/H	23	1,33	0,32	8,60
T.3 100% S/H	30	1,50	0,36	7,57
T.4 25% C/H	16	0,99	0,14	6,0
T.5 50% C/H	52	1,45	0,20	5,98
T.6 100% C/H	22	0,95	0,13	4,86
Media general	28.83	1.16	0.22	6.56

Variaciones morfológicas



Figura 12. Desarrollo de hojas sin limbo (trampa).



Figura 11. Desarrollo de brotes



Figura 13. Variación morfológica de la hoja.



Figura 14. Desarrollo de abundantes pelos radicales

Proliferación óptima



Figura 15. Desarrollo de brotes con estructuras completas y sin variación morfológica.



Figura 16. Limbo cerrado de la hoja (trampa), compuesta por dos lóbulos semicirculares.



Figura 17. Desarrollo inicial del sistema radical.