



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Propagación *in vitro* de *Pinguicula
moctezumae* Zamudio et R. Z. Ortega**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :

Joab David Martinez Torres



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel
Los Reyes, Iztacala, Estado de México 2017**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"La gota horada la piedra, no por su fuerza, sino por su constancia"
Ovidio.

Dedicatoria:

Primeramente quisiera dedicar esta tesis a mi casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a ella, formarme académicamente, personalmente y además enseñarme cosas muy valiosas.

A mi madre Norma Yazmín Martínez Torres por apoyarme a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Marco, Marijose y Misael por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi trayecto.

A mis abuelos por los consejos y el techo que me han dado desde pequeño.

Agradecimientos:

Al Doctor Juan Gerardo Ortiz Montiel por todos los conocimientos enseñados y por brindarme la oportunidad de pertenecer al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

A los revisores por sus acertadas correcciones.

A mis amigos Bernabé y Abraham, por todas las charlas y vivencias que tuvimos.

A los compañeros del laboratorio, por su apoyo en cuestiones técnicas y académicas.

A Javier Jiménez Zamudio, por las fotografías proporcionadas de sus cultivos de Pinguicula.

ÍNDICE

Resumen	- 7 -
1. ANTECEDENTES	- 8 -
1.1 Biodiversidad en México	- 8 -
1.2 Lentibulariaceae	- 8 -
1.3 Género Pinguicula	- 11 -
1.4 Pinguicula moctezumae	- 18 -
1.5 Cultivo in vitro	- 23 -
1.6 Propagación del género Pinguicula	- 24 -
1.7 Embriogénesis somática	- 25 -
1.8 Hormonas.....	- 26 -
1.9 Citocininas	- 27 -
1.10 Auxinas	- 27 -
1.11 Pigmentos fotosintéticos	- 28 -
2. JUSTIFICACIÓN	- 29 -
3. OBJETIVOS.....	- 29 -
3.1 General	- 29 -
3.2 Particulares	- 30 -
4. MATERIALES Y MÉTODOS	- 31 -
4.1 Establecimiento in vitro	- 31 -
4.2 Tratamientos	- 31 -
4.3 Medición de clorofila a, b y carotenos	- 33 -

4.4 Análisis estadístico	- 33 -
5. RESULTADOS	- 34 -
5.1 Propagación de Pinguicula moctezumae	- 34 -
5.2 Cantidad de tejido desarrollado	- 39 -
5.3 Clorofila a y b.....	- 40 -
5.4 Carotenos.....	- 41 -
6. DISCUSIÓN	- 42 -
6.1 Propagación de Pinguicula moctezumae	- 42 -
6.2 Cantidad de tejido desarrollado	- 44 -
6.3 Clorofila a y b.....	- 44 -
6.4 Carotenos.....	- 45 -
7. CONCLUSIONES.....	- 46 -
Literatura citada:	- 47 -
ANEXOS:	- 53 -

ABREVIATURAS:

BAP: Bencilaminopurina

ANA: Acido Naftalenacético

MS: Murashige Skoog

NOM 059: Normal Oficial Mexicana

HR: Humedad relativa

Cl a: Clorofila a

Cl b: Clorofila b

T 1: Tratamiento 1 (0 / 0, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 2: Tratamiento 2 (0 / 0.4, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 3: Tratamiento 3 (0 / 0.5, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 4: Tratamiento 4 (0 / 0.6, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 5: Tratamiento 5 (0.4 / 0, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 6: Tratamiento 6 (0.4 / 0.4, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 7: Tratamiento 7 (0.4 / 0.5, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 8: Tratamiento 8 (0.4 / 0.6, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 9: Tratamiento 9 (0.5 / 0, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 10: Tratamiento 10 (0.5 / 0.4, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 11: Tratamiento 11 (0.5 / 0.5, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 12: Tratamiento 12 (0.5 / 0.6, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 13: Tratamiento 13 (0.6 / 0, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 14: Tratamiento 14 (0.6 / 0.4, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 15: Tratamiento 15 (0.6 / 0.5, ANA/ BAP mg L⁻¹)

T 16: Tratamiento 16 (0.6 / 0.6, ANA/ BAP mg L⁻¹)

Resumen

Pinguicula moctezumae perteneciente a la familia Lentibulariaceae, es una planta de habito carnívoro microendémica de México, que se encuentra únicamente en Querétaro e Hidalgo. Aunque es abundante localmente, los sitios donde se encuentra son escasos por lo que es vulnerable a la extinción. La micropropagación o la propagación *in vitro* es una técnica utilizada para la formación, de nuevos organismos a partir de explantes de diversas fuentes, esto se basa principalmente en la totipotencialidad de las células vegetales e incluye la división celular, la formación de un tejido calloso, la proliferación de la diferenciación del callo y regeneración por eventos que conducen a la organogénesis (formación de órganos, como brotes y / o raíces) o la embriogénesis somática (formación de embriones similares a semillas a partir de células somáticas), por lo que su uso para esta especie es determinante. Por ello el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de propagación *in vitro* para *Pinguicula moctezumae*. Para ello se utilizó medio MS a ½ de su concentración adicionado con 100 mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, pH 5.7 y 8 g L⁻¹ de agar, adicionado con distintas concentraciones de ANA y BAP.

Con un total de 16 tratamientos se realizaron seis repeticiones por cada uno, a tres se les contó el número de plántulas obtenidas y el peso del tejido desarrollado, y a tres se les cuantificó clorofila a, b y carotenos totales. El tratamiento T8 fue el que produjo una cantidad superior de plántulas con un total de 125 (n=3), el cual contenía una concentración de 0.4 mg/0.6 mg de ANA/BAP L⁻¹, respectivamente. La cantidad de clorofila a, b y carotenos totales, fue superior en los tratamientos que contenían BAP. Además de igual manera el peso en gramos fue superior, por lo que se recomienda el uso de 0.4 mg/0.6 mg de ANA/BAP L⁻¹ para la propagación exitosa de *Pinguicula moctezumae*.

1. ANTECEDENTES

1.1 Biodiversidad en México

México es uno de los cinco países megadiversos del mundo, su territorio alberga fauna y flora de dos regiones geográficas (neártica y neotropical). Es un país tropical montañoso con un elevado número de endemismos (Plascencia *et al.*, 2011). Existen más de 304 familias las cuales cuentan con un número total de 2,804 géneros y más de 23,000 especies, solo de plantas vasculares en la flora de México, se considera que 7.8 % de los géneros son endémicos de México (Villaseñor, 2004), donde al menos 20 % presenta un potencial ornamental, que se determina por motivos religiosos, culturales o económicos (Espinosa *et al.*, 2009).

La diversidad de familias de plantas carnívoras en México se limita únicamente a las familias Droseraceae y Lentibulariaceae, la primera con un género y con tan solo tres especies y la segunda con tres géneros y 57 especies en el territorio nacional (Villaseñor, 2004).

La familia Lentibulariaceae es de gran importancia ecológica para México, ya que los géneros pertenecientes a ella cuentan con características muy particulares, además de que la mayoría de las especies pertenecientes a esta, son endémicas del país (Zamudio, 2005).

1.2 Lentibulariaceae

La familia Lentibulariaceae cuenta con tres géneros *Genlisea*, *Utricularia* y *Pinguicula* y 250 especies, aproximadamente a nivel mundial (Olvera, 1996).

Los tres géneros, se describen como hierbas anuales o perennes, terrestres o acuáticas, ocasionalmente epifitas, rizomatosas o estoloníferas. Hojas alternas o en roseras (*Pinguicula* y *Genlisea*), frecuentemente dimorfas, simples o estrechamente divididas, bien desarrolladas o reducidas a escamas o ausentes, glabras o cubiertas con tricomas glandulares o formando utrículos de estructura compleja (*Utricularia*). Inflorescencias en racimos bracteados o flores solitarias terminales en escapos. Flores bisexuales, zigomorfas; caliz persistente, 2-5-dividido; corola gamopétala, bilabiada o subisoloba, imbricada; labio inferior espolonado, con o sin paladar; estambres 2, anteras unitecas, dehiscentes longitudinalmente; ovario súpero, 2 carpelar, 1-locular, óvulos 2- numerosos, placentación libre central, estilo muy corto o ausente, estigma papiloso, desigualmente 2-lobado, lóbulo superior reducido o ausente. Frutos capsulares, dehiscentes por 2-4 valvas o circuncísil; semillas pequeñas con embrión poco diferenciado y endospermo escaso (Zamudio, 2006).

Utricularia, *Genlisea* y *Pinguicula* poseen un elevado potencial ornamental, aunado a su hábito carnívoro y su particular belleza, *Utricularia* tiene flores de gran colorido y variada forma, además de que son muy hermosas y llamativas (Figura 1 A) en México existen 18 especies (Villaseñor, 2014) *Genlisea* de la misma manera cuenta con hermosas flores (Figura 1 B) y *Pinguicula* tiene características morfológicas muy peculiares, como son sus hojas gruesas y carnosas, que tienen en el haz pelos glandulares y segregan mucílago, que brilla al tener el reflejo de la luz y que tiene el papel de atraer, inmovilizar y digerir pequeños insectos, además de que presenta flores de diversos colores (Figura 2) y en algunos casos las flores al igual que en las hojas presenta pelos glandulares, esto le confiere un notable valor decorativo (Zamudio, 2005, Clapa *et al.*, 2010).



Figura 1. Flores de *Utricularia* (A) y de *Gensilea* (B), ambas especies tienen un gran valor ornamental.



Figura 2. Vista frontal de flores de distintas especies de *Pinguicula*.

Fotografías: Javier Jiménez Zamudio.

1.3 Género Pinguicula

El género *Pinguicula* perteneciente a la familia Lentibulariaceae, cuenta con aproximadamente 95 especies a nivel mundial, de las cuales más de 40, se encuentran en territorio Mexicano (Tabla 1), algunas se distribuyen en varios estados y otras se encuentran en un lugar específico por lo que son endémicas (Zamudio, 2005).

Todas las especies de *Pinguicula* consisten en un tallo vertical corto que da lugar a una roseta basal de hojas compactas, más o menos ovaladas (Legendre, 2000). Son hierbas perennes o anuales, terrestres o epífitas. Rizoma simple, corto, estoloníferas o no estoloníferas, con raíces adventicias filiformes. Hojas en roseta generalmente dimorfas, diferenciadas en rosetas de “invierno” y de “verano”, sésiles o pecioladas, margen entero, involuto o revoluto, membranáceas o carnosas, glabras o cubiertas densamente con tricomas glandulares sésiles o estipitados, víscido-pegajosos. Flores solitarias, en escapos erectos, teretes, glabros o glandular-pubescentes, las flores con glándulas estipitadas esparcidas abaxialmente; cáliz bilabiado, labio superior 3-lobado, labio inferior 2-lobado o emarginado; corola bilabiada o subisoloba, tubo terete o infundibuliforme, piloso adaxialmente, formando un espolón sacciforme en la base; lóbulos enteros, labio superior 2-lobado, inferior 3-lobado, garganta abierta, con o sin paladar, estambres adnatos en la base de la corola, filamentos comprimidos y curvos, anteras subglobosas, confluentes; ovario ovoide globoso, piloso-glandular, estilo corto y craso, estigma sésil, 2-lobado, lóbulo superior reducido, el inferior mayor, crestado o lameliforme, frecuentemente fimbriado, reflexo, cubriendo las anteras. Cápsulas

ovoide-globosas, dehiscentes por 2-4 valvas; semillas numerosas, elipsoides o fusiformes, reticuladas o rugosas (Zamudio, 2006). Las especies del género *Pinguicula* se pueden clasificar en dos categorías principales, dependiendo sus ciclos anuales de crecimiento, en *Pinguiculas* tropicales y templadas que sólo difieren por la presencia o ausencia de un capullo de invierno llamado hibernáculo, (Figura 3 A y B) (Steiger, 1975). Para ambos tipos de crecimiento, se pueden diferenciar si las hojas de las rosetas generativas y vegetativas son similares (tipo homófilo) (Figura 3 C) o diferentes (tipo heterófilo) (Figura 3 D) (Legendre, 2000).

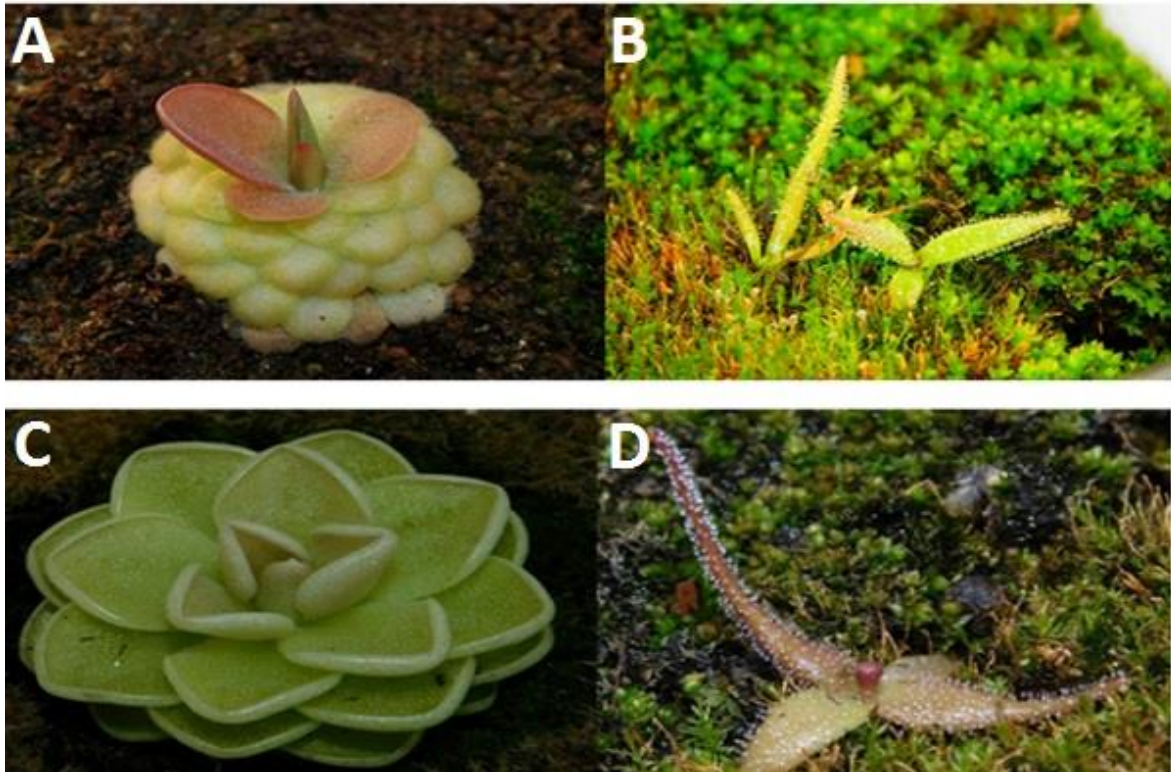


Figura 3. Roseta de invierno (A), Hibernáculo despertando (B), *Pinguicula elhersie* con crecimiento homófilo (C) y *Pinguicula medusina* con crecimiento heterófilo (D).

Fotografías: Javier Jiménez Zamudio.

Tabla 1. Especies de Pinguiculas que se encuentran en territorio nacional. (Zamudio y Rzedowski, 1986, Zamudio y Ortega 1994, Zamudio y Van 2003, Zamudio 1992, 1995, 2005, 2006, Rivadavia *et al.*, 2017).

Pinguiculas y sus descriptores	
<i>P. acuminata</i> Benth	<i>P. kondoi</i> Casper
<i>P. agnata</i> Casper	<i>P. launeana</i> Speta & Fuchs
<i>P. barbata</i> Zamudio et Rzedowski	<i>P. laxifolia</i> Luhrs
<i>P. calderoniae</i> Zamudio	<i>P. lilacina</i> Schecht & Cham
<i>P. colimensis</i> Mcvaugh & Michael	<i>P. macrophylla</i> Kunth
<i>P. konzattii</i> Zamudio et van Marm	<i>P. martinezii</i> Zamudio
<i>P. crassifolia</i> Zamudio	<i>P. medusina</i> Zamudio et Studnicka
<i>P. crenatiloba</i> D.C.	<i>P. mirandae</i> Zamudio et A. Salinas
<i>P. cyclosecta</i> Casper	<i>P. moctezumae</i> Zamudio et R. Z. Ortega
<i>P. debbertiana</i> Speta & Fuchs	<i>P. moranensis</i> Kunth
<i>P. ehlersae</i> Speta & Fuchs	<i>P. orchidioides</i> D.C.
<i>P. elizabethiae</i> Zamudio	<i>P. oblongiloba</i> D.C.
<i>P. emarginata</i> Zamudio et Rzedowski	<i>P. parvifolia</i> Robinson
<i>P. esseriana</i> Kirchner	<i>P. pygmaea</i> Rivadavia, E.L. Read & A. Fleischm.
<i>P. gigantea</i> Luhrs	<i>P. pilosa</i> Luhrs
<i>P. gracilis</i> Zamudio	<i>P. potosiensis</i> Speta & Fuchs
<i>P. gypsicola</i> Brandege	<i>P. rectifolia</i> Speta & Fuchs
<i>P. hemiepiphytica</i> Zamudio & Rzedowski	<i>P. reticulata</i> Schlauer
<i>P. heterophylla</i> Benth	<i>P. rotundiflora</i> Studnicka
<i>P. ibarrae</i> Zamudio	<i>P. sharpii</i> Casper & Kondo
<i>P. iminatrix</i> Casper	<i>P. takakii</i> Zamudio et Rzedowski
<i>P. immaculata</i> Zamudio & Lux	<i>P. utricularioides</i> Zamudio et Rzedowski
<i>P. jaumavensis</i> Debbert	<i>P. zecheri</i> Speta & Fuchs

El hábito carnívoro que desarrollaron las Pinguiculas es atribuido a que su evolución se dio en un medio, donde la cantidad de nutrientes es muy baja principalmente, en nitrógeno y fósforo. El método de captura que utilizan las Pinguiculas, es único del género, ya que mediante dos tipos de glándulas, las glándulas sésiles y pedunculadas atraen, atrapan y digieren a sus presas. El número relativo de estas glándulas varía de una especie a otra. En la mayoría de las especies, solo están presentes en la superficie superior (haz) de las hojas. Las glándulas pedunculadas segregan un mucilago pegajoso que es responsable de la captura de las presas. Solo desempeñan un papel menor en la digestión que es mayormente llevada a cabo por las glándulas sésiles (Legendre, 2000). La estructura de las glándulas pedunculadas, está básicamente conformada por una célula de reserva que se encuentra debajo de otra llamada célula del tallo (pedúnculo), y a su vez esta tiene una célula endodermal que contiene de 8 a 32 células. Las cuales son las responsables de la formación de una gota relativamente grande de mucílago que fluye desde las células apoplásticas a través de regiones de pared libres de cutina (Figura 4).

Las glándulas sésiles difieren únicamente de las pedunculadas, en el número de células; esta tiene entre 4 y 8, además de que el tamaño de su tallo permite que la glándula se acople al ras de la superficie de la epidermis. La glándula sésil está conectada al sistema vascular a diferencia de la pedunculada (Figura 4). El retículo endoplásmico es extremadamente activo en ambas glándulas, probablemente debido a la necesidad de producir mucílago o enzimas (Legendre, 2000).

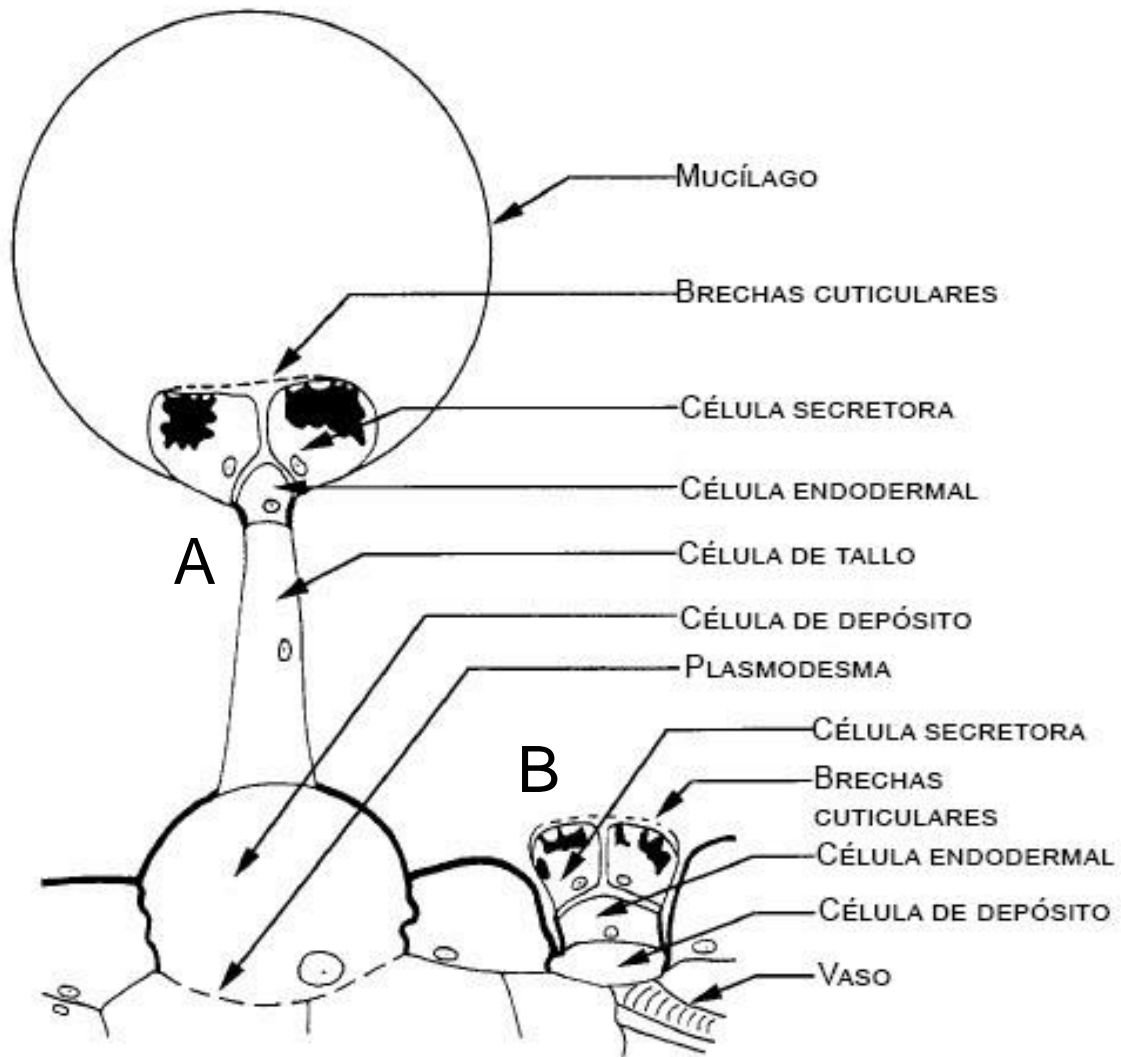


Figura 4. Glándulas pedunculada (A) y sésil (B), se muestran las diferencias entre ambas, (Tomado de Legendre, 2000).

Su mecanismo de atracción no está del todo claro sin embargo algunos autores (Juniper *et al.*, 1989) mencionan que las gotas de mucílago posiblemente tengan la función de atraer mediante el reflejo de la luz a las presas, además cabe mencionar

que estas no reciben recompensa como en el caso de otras plantas carnívoras (*Sarracenia*, *Nepenthes*, *Darlingtonia*) (Legendre, 2000).

La digestión de la presa por parte del género *Pinguicula* se basa principalmente en la liberación de una mezcla de enzimas que varían dependiendo la especie, envolviendo a la presa y de esta forma descomponiéndola. Cuando un insecto toca la superficie de las glándulas pedunculadas estas pierden turgencia, y hacen que se coloque más cerca de la epidermis donde se encuentran las glándulas sésiles, encargadas de la liberación de dichas enzimas (Legendre, 2000).

Existen muchas poblaciones de *Pinguiculas* en México, sin embargo el estudio de las mismas no ha sido a fondo por lo tanto no se tienen datos concretos en los que se demuestre si se encuentran o no en alguna situación de riesgo. Pero se sabe que existen algunas especies que son microendémicas (Figura 5), es decir, que se encuentran en algún lugar muy particular de la República Mexicana, por ello son más propensas a la extinción un ejemplo de ello es *Pinguicula moctezumae* (Zamudio y Ortega, 1994).



Figura 5. Ubicación de algunas poblaciones de *Pinguicula* micro endémicas, de México (Zamudio 1992, 2005).

1.4 *Pinguicula moctezumae*

Una *Pinguicula* que es muy escasa y endémica de México es la *Pinguicula moctezumae*, aunque es abundante localmente, es muy rara y los sitios en donde se conoce son escasos, por lo cual se considera vulnerable a la extinción, (Zamudio y Ortega, 1994, Zamudio, 2005) a pesar de no encontrarse en la NOM- 059, (SEMARNAT, 2010).

Es una planta herbácea perenne; hojas dimórficas, roseta de “invierno” compacta, subhipógea, con 20 a 30 hojas crasas, elípticas u oblongo-elípticas, apiculadas, base atenuada, de 5 a 30 mm de largo, por 3 a 7 mm de ancho, cóncavas en el haz, obtuso- carinadas en el envés, roseta de “verano” laxa, con 8 a 15(20) hojas erectas, lineares a linear-lanceoladas, de (50)60 a 100(130) mm de largo, por (3)5 a 8(10) mm de ancho, margen fuertemente revoluto, escasamente ciliado en la base; pedúnculos de (60)70 a 140 mm de largo, glandular-puberulentos en el ápice, glabrescentes hacia la base; flores de (35)45 a 55(65) mm de largo (incluyendo el espolón), cáliz bilabiado, glandular-puberulento por fuera, lóbulos triangular-lanceolados u oblongo-lanceolados, de 2 a 4.5 mm de largo, por 1 a 2 mm de ancho; corola bilabiada, el labio inferior un poco mayor, rosada o violáceo-purpúrea con la garganta blanca, lóbulos del labio superior circulares, oblatos a ampliamente cuneados con el ápice redondeado, de (8)10 a 13 mm de largo, por (9)10 a 16 mm de ancho, lóbulos del labio inferior circulares, de (9)10 a 15 mm de largo, por (8)10 a 15 mm de ancho, con frecuencia cubriéndose entre sí, tubo cortamente infundibuliforme, blanco-verdoso, de 5 a 8 mm de largo, sin paladar, piloso en su interior, con pelos cilíndrico-subulados, espolón cilíndrico-subulado, de 25 a 38 mm

de largo, violáceo-purpúreo, verde en el ápice, con pelos subulados en su interior; cápsula subglobosa, de 4 a 6 mm de largo, por 4 a 4.5 mm de ancho, glandular-pubescente; semillas fusiformes, de 1 a 1.3 mm de largo, por 0.15 a 0.20 mm de ancho, superficie reticulada, verrugosa (Figura 6) (Zamudio y Ortega, 1994, Zamudio, 2005).

Se distribuye en México exclusivamente en el cañón del río Moctezuma, (Querétaro), de donde es endémica. (Zamudio y Ortega, 1994, Zamudio, 2005).

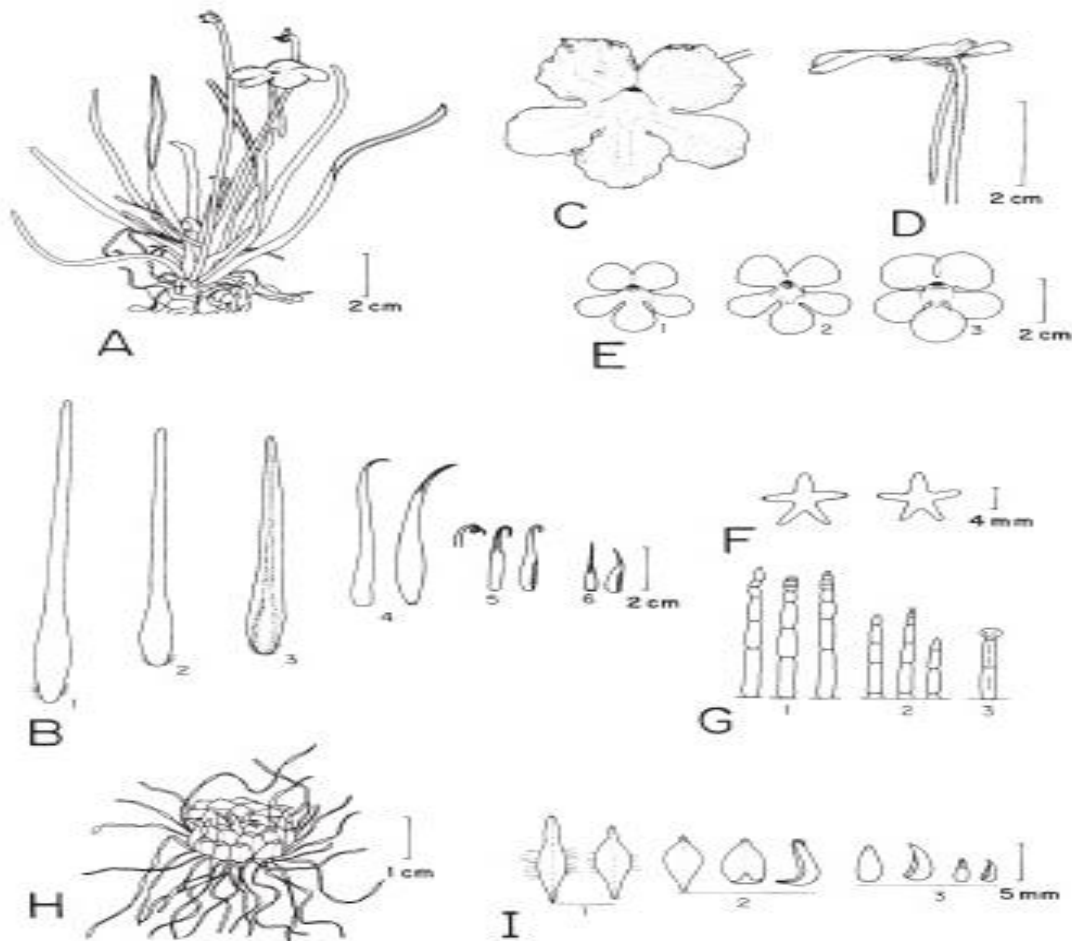


Figura 6. *Pinguicula moctezumae* Zamudio y R. Z. Ortega. A. Hábito de la planta en floración con la roseta de “verano”; B. Hojas de “verano”: (1 y 2) hojas adultas

vistas por el haz con el margen revoluto y la base escasamente ciliada, (3) hoja adulta con la lámina extendida vista por el envés, (4 a 6) hojas jóvenes en vista ventral y lateral con el ápice agudo, curvo o espiralado y el margen involuto; C. Vista frontal de la flor, D. Vista lateral de la flor, E. Variación lateral de la flor, E. Variación de los lobulos del labio superior de la corola: (1) circulares, (2) ampliamente cuneados, (3) oblatos; F. Cáliz; G. Pelos glandulares de la corola: (1) del interior del tubo, (2) del interior del espolón, (3) del exterior de la corola; H. Roseta de “invierno”; I. Hojas de la roseta de “invierno”. (1) hojas de transición entre las rosetas de “verano” e “invierno”, (2) hojas de “invierno” maduras, extendidas, en vista ventral y en vista lateral; (3) hojas jóvenes en vista ventral y lateral (Zamudio y Ortega, 1994)

Habita sobre concreciones de carbonato de calcio, (Figura 7 y 8) en el lecho de arroyos o en paredes con escurrimientos de agua, en laderas de rocas calizas, a una altitud de 900 a 1100 msnm (Zamudio y Ortega, 1994).



Figura 7. Población de *Pinguicula moctezumae* en plena floración creciendo en una roca vertical de carbonato de calcio con escurrimiento de agua. Fotografía tomada por: Fernando Rivadavia, Noviembre 8, 2008.

Se ha observado en floración durante todo el año y al parecer permanece con las hojas estivales mientras existe suficiente humedad en el medio; cuando el agua falta y los sitios en que habita se secan, forma una roseta de resistencia compacta que le permite sobrevivir a lo largo de la temporada seca. En cuanto se restablece la humedad reaparecen las hojas estivales. *P. moctezumae* pertenece a la sección Orcheosanthus por su corola claramente bilabiada, el tubo cortamente infundibuliforme y el espolón muy largo; dentro de ésta se ubica en la subsección Violiformis, por las hojas de verano lanceolado-lineares. (Zamudio y Ortega, 1994).



Figura 8. Población de *Pinguicula moctezumae* creciendo en un terreno vertical, con algunos organismos en floración. Fotografía tomada por: Fernando Rivadavia, Noviembre 8, 2008.

Es una planta de gran importancia para la biodiversidad mexicana, por su endemismo y escasas, además de que es colectada indiscriminadamente y sin ninguna autorización por la gente local y turistas, actualmente, los aficionados logran reproducirla con dificultades, por lo que se requiere de metodologías más eficientes en su propagación, y de esta manera evitar la depredación, las técnicas de micropropagación *in vitro* son una gran herramienta para lograr una mayor

cantidad de organismos a partir de uno solo, por lo que son una buena opción para la reproducción de esta especie.

1.5 Cultivo in vitro

La micropropagación o la propagación *in vitro* es una técnica utilizada para la formación de nuevos organismos a partir de explantes de diversas fuentes, esto se basa principalmente en la totipotencialidad de las células vegetales e incluye la división celular, la formación de un tejido calloso, la proliferación de la diferenciación del callo y regeneración por eventos que conducen a la organogénesis (formación de órganos, como brotes y / o raíces) o la embriogénesis somática (formación de embriones similares a semillas a partir de células somáticas) (Beth, 2010).

El cultivo *in vitro* se realiza de manera aséptica es decir libre de patógenos, hongos y bacterias, para ello previamente se realiza una esterilización del medio de cultivo, por métodos de presión y calor, el tejido también se desinfecta con el uso de alcohol e hipoclorito de sodio, por medio de agitación para posteriormente enjuagar con agua destilada estéril.

En la micropropagación se tiene una HR de 85-95% y se pueden controlar ciertas características, como por ejemplo cantidad de luz, fotoperiodo, cantidad de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas (Álvarez *et al.*, 2011).

Comúnmente el cultivo *in vitro* se utiliza cuando la propagación vegetativa no es posible ni práctica, o donde la propagación vegetativa tradicional tiene un bajo índice de éxito.

El cultivo *in vitro*, permite la reproducción masiva de plantas (Pérez *et al.*, 2017), además de que tiene ciertas ventajas a comparación del cultivo tradicional. Por lo que el uso de esta técnica es algo imprescindible para la propagación no solamente de *Pinguicula moctezumea* sino también de cientos de especies que se encuentran en riesgo.

1.6 Propagación del género *Pinguicula*

Algunas especies de *Pinguicula*, han sido reproducidas *in vitro*, exitosamente sin embargo se sabe que los reguladores de crecimiento y la concentración de los mismos varían dependiendo la especie, usualmente se ha utilizado BAP en combinación con ANA, arrojando buenos resultados.

Pinguicula lusitánica fue propagada con éxito por Goncalves en el 2008 utilizando medio MS a $\frac{1}{2}$ adicionado con 0.5 mg L^{-1} de BA o KIN, obteniendo una cantidad de 30 brotes.

Clapa (2010) realizó la propagación *in vitro* de *Pinguicula vulgaris*, generó un protocolo eficiente para esta especie utilizando medio MS+ 0.1 mg L^{-1} de BAP, con una cantidad reportada de multiplicación total de 57.6-97.44 brotes, utilizando hojas como explantes.

Por otro lado *Pinguicula gigantea* fue propagada con éxito por Kanjana *et al.* (2011) utilizando distintas concentraciones de ANA y BA. Se encontró que el número máximo de brotes (21,75) se obtuvieron del medio que contenía 2.0 mg L^{-1} de BA y 0.1 mg L^{-1} de ANA cuando se cultivaron en medio durante 8 semanas.

Pérez *et al.* (2017) desarrollaron un protocolo de regeneración a partir de callo para *Pinguicula moranensis* usando medio MS a $\frac{1}{4}$ + BA (0.5 mg L^{-1}) y ANA (0.5 mg L^{-1})

para la obtención de callo y posteriormente MS a $\frac{1}{4}$ + BAP (2mg L^{-1}) y ANA (0.1 mg L^{-1}) para la formación de brotes, reportando una cantidad máxima de $1,957 \pm 125$ brotes.

1.7 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES) se puede definir como la obtención de pequeños embriones a partir de células somáticas, sin la necesidad de que exista la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979), esto es posible debido a la totipotencialidad de las células vegetales ya que todas las células vegetales contienen toda la información genética necesaria para crear un organismo independiente y totalmente funcional.

La embriogénesis somática difiere de la organogénesis ya que en esta se forma un organismo bipolar, es decir una célula se divide de tal manera que forma al mismo tiempo un brote y un meristemo de raíz que dan lugar a una masa de células conocidas como masas pro embrionarias (Freire, 2003). Además de que cuando se utiliza la reproducción por medio de embriogénesis somática a diferencia de un embrión cigótico los genes se mantienen intactos ya que no existe recombinación genética, por meiosis es por ello que la ES se utiliza para mantener genotipos específicos (Beth, 2010).

Este método es el más eficiente para la producción de plantas *in vitro* por la cantidad de plantas que se pueden producir y la capacidad de generar miles de organismos a partir de uno a comparación del cultivo *in vitro* convencional (Celestino, 2005).

La mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de embriones somáticos auxinas generalmente, 2,4-D, sin embargo se ha utilizado otra auxina (Ácido Naftalenacético) (Evans *et al.*, 1981). Los embriones somáticos se pueden desarrollar a partir de callos pro embrionarios o suspensiones celulares, lo que se conoce como embriogénesis indirecta o bien pueden formarse sin la necesidad de pasar por este proceso de desdiferenciación, esto se denomina embriogénesis somática directa (Beth, 2010).

Los factores que pueden afectar al proceso proembrionario y que pueden llegar a ser un impedimento para el desarrollo de embriones somáticos son: El genotipo, el tipo y estado fisiológico del explante, el medio de cultivo y los tipos y concentración de reguladores de crecimiento (Viñas, 2011).

1.8 Hormonas

Las hormonas en plantas o fitohormonas, son compuestos de estructura química relativamente simple; que no cuentan con grupos proteicos asociados. No se caracterizan por generar un efecto específico, es decir, su acción puede derivar en varios efectos diferentes a corto y/o a largo plazo. En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfológica de acuerdo a los niveles relativos entre sí. Existen además compuestos denominados “reguladores de crecimiento” que pueden ser de naturaleza química diferente a algunas hormonas y/o “desconocidas o nunca codificadas” por el metabolismo celular, que pueden

igualmente desarrollar efectos semejantes a hormonas endógenas naturales (Jordan y Casaretto, 2006).

1.9 Citocininas

Las citocininas son hormonas que se localizan en ambos sistemas conductores, floema y xilema y su presencia se considera como una posible señal vinculada con un déficit de nutrientes en el suelo. Se sintetizan básicamente en la raíz.

Las características más importantes de las citocininas es que estimulan las divisiones celulares en plantas y retrasan el envejecimiento del tejido. Influyen en múltiples procesos bioquímicos, como la estimulación de la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de diferentes proteínas.

Se utilizan en cultivo *in vitro*, principalmente para dirigir el desarrollo del material vegetal hacia la regulación del número de divisiones celulares, la formación de yemas y el crecimiento de brotes. Dichos cambios morfológicos son el resultado de la estimulación mitótica (Bouza *et al.*, 1993).

1.10 Auxinas

Las auxinas se generan principalmente en las partes jóvenes de la planta: ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo. Estimulan el crecimiento por alargamiento de los tallos y participan en la formación de las curvaturas fototrópicas (hacia la fuente de luz), gravitrópicas (de acuerdo al vector de gravedad en la raíz, o al contrario en el tallo) (Roberts, 1992).

Se utilizan básicamente en cultivo *in vitro* para enraizar. Los cultivos aislados de plantas y las callosidades en subcultivos, requieren de auxinas. Además se sabe que la proporción adecuada entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación (Krikorian, 1995). Algunos estudios indican que la adición al medio de cultivo de la combinación de la auxina Ácido Naftalenacético (ANA) con la citocinina Bencil aminopurina (BAP) a concentraciones 1:1 permite que las células vegetales pasen a un estado indiferenciado, y formen una masa amorfa de tejido llamado callo (Krikorian 1995, Kobelak *et al.*, 2004, Marin *et al.*, 2009, Pérez *et al.*, 2017). Sin embargo para la inducción de masas proembrionarios se usa habitualmente 2-4 D y otras hormonas tipo auxinas, principalmente ANA.

Con la obtención de callo se pueden realizar, una propagación clonal masiva, por embriogénesis somática según Copeland y McDonald (1995) obteniendo de esta formar miles de organismos a partir de uno (Pérez *et al.*, 2017). Sin embargo se ha demostrado que especialmente las auxinas causan clorosis en los cultivos *in vitro* (Tapia, 1998).

1.11 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos primarios en las plantas son los encargados de captar la energía lumínica, existen dos tipos principales según se trate de organismos fotosintéticos procariotas o eucariotas (bacterioclorofila a y clorofila a respectivamente) y además están acompañados de los pigmentos accesorios, cuya función es por una parte ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y por otra servirles como sistemas de protección frente a la luz excesiva (Manrique, 2003).

Uno de los pigmentos accesorios más importantes es el b-caroteno el cual se encarga de proteger a los componentes fotosintéticos contra el daño oxidativo, existen estudios que demuestran que una mayor cantidad de clorofila a y b (Wingler *et al.*, 2004, Vlèková *et al.*, 2006), los carotenos de igual manera están presentes en mayor cantidad, para la protección de los centros de reacción de la luz y el oxígeno.

Además se sabe que el uso de reguladores de crecimiento puede ayudar a mantener buenos niveles de pigmentos fotosintéticos en distintas especies de plantas. Esto es favorable ya que muchas veces en cultivo *in vitro* se presenta clorosis y etiolamente de las hojas (Tapia, 1998).

2. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta la totipotencialidad de las células vegetales y la capacidad de los reguladores de crecimiento para lograr cambios morfológicos en muchas especies vegetales, es posible realizar un protocolo de cultivo *in vitro* para *Pinguicula moctezumae*, y de esta manera propagar con éxito esta especie.

Por lo anterior el presente trabajo se desarrolló en su totalidad enfocándose en los siguientes objetivos:

3. OBJETIVOS

3.1 General

Establecer un protocolo de propagación *in vitro* para *Pinguicula moctezumae* mediante el uso de los reguladores de crecimiento ANA y BAP.

3.2 Particulares

Obtener plántulas de *Pinguicula moctezumae* a partir de semillas germinadas, y lograr su reproducción *in vitro*.

Medir peso fresco del tejido formado y número de organismos formados para determinar cuál es el tratamiento ideal para la reproducción de *Pinguicula moctezumae*.

Determinar la concentración de clorofila a, b y carotenos totales para determinar la acción de las citocininas y auxinas en la cantidad de estos pigmentos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Establecimiento in vitro

El cultivo *in vitro* se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Morfología y Función, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo las siguientes condiciones.

Se inició el cultivo mediante la germinación *in vitro* de semillas obtenidas comercialmente, estas se lavaron en un microtubo de 1.5 mL, colocando en él, agua corriente con detergente y se enjuagaron precipitando en cada caso las semillas por centrifugación a 13000 G, por 3 min., de la misma forma se desinfestaron con etanol al 70 % y posteriormente con hipoclorito de sodio al 20 % a partir de cloro comercial por un minuto respectivamente, inmediatamente se enjuagaron con agua destilada estéril por tres ocasiones centrifugando a 13000 G por 3 min en cada caso. Se sembraron en un frasco con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a ½ de su concentración adicionado con 100 mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, pH 5.7 y 8 g L⁻¹ de agar, previamente esterilizado en autoclave a una presión de 1.05 kg cm⁻² durante 15 min.

4.2 Tratamientos

Se tomaron plantas al azar completas de distintos tamaños teniendo en cuenta que la cantidad de tejido fuera la misma para cada resiembra, se realizaron seis repeticiones de cada tratamiento, se colocaron en fotoperiodo largo 16/8 (luz/oscuridad), durante tres meses se monitorearon y posteriormente se evaluó la respuesta morfogénica del tejido vegetal, a tres repeticiones se les cuantificó la

cantidad de clorofila a, b y carotenos, y a tres repeticiones se les tomo el peso del tejido y el número de brotes en caso de presencia de los mismos.

La resiembra se llevó a cabo en medios adicionados con ANA y BAP, de acuerdo a las combinaciones y concentraciones mostradas en la tabla 2.

Tabla 2. Combinaciones y concentraciones de ANA y BAP

Tratamiento	Ácido Naftalen Acético (mg L⁻¹)	Bencilaminopurina (mg L⁻¹)
1	0	0
2	0	0.4
3	0	0.5
4	0	0.6
5	0.4	0
6	0.4	0.4
7	0.4	0.5
8	0.4	0.6
9	0.5	0
10	0.5	0.4
11	0.5	0.5
12	0.5	0.6
13	0.6	0
14	0.6	0.4
15	0.6	0.5
16	0.6	0.6

4.3 Medición de clorofila a, b y carotenos

Se tomó una planta completa tomando en cuenta el peso del tejido, se maceró con 5 ml de acetona al 80 % y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y aforo en una probeta a 10 mL, con acetona al 80 %, según lo descrito por Wellburn (1994).

Se midió la muestra en el espectrofotómetro a 663 nm, 646 nm y 470 nm.

Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular la cantidad de clorofila a, clorofila b y carotenos.

Clorofila a (Cl a= $12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$)

Clorofila b (Cl b= $20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$)

Carotenos totales C= $(1000 A_{470} - 3.27 (Cl a) - 104 (Cl b))/198$

Los valores arrojados en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de solución. Se multiplicaron por el volumen de dilución y se ajustaron al peso fresco registrado. Posteriormente se realizó el cálculo para un gramo de tejido fresco.

4.4 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza de un factor y una comparación de medias (prueba de Tukey) entre tratamientos. Se comparó el número de brotes producidos, la cantidad de tejido, así también como la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y b) y pigmentos accesorios (carotenos). Se utilizó el programa Sigma Plot, para Windows, V.11 (Systat Software, Inc).

5. RESULTADOS

5.1 Propagación de *Pinguicula moctezumae*

El tejido que se sembró presentó una respuesta más favorable hacia la formación de plántulas mostrando una mayor cantidad de organismos en el T8 (Tabla 3) con un total de 125 (n=3), el cual contenía (0.4 mg L⁻¹, 0.6 mg L⁻¹) de ANA y BAP respectivamente. Además de que también las plántulas eran bastante vigorosas y no presentaban ninguna deformación morfológica.

Los tratamientos que no presentaron una respuesta favorable hacia la formación de nuevos organismos fueron el T1 y T5, sin embargo existió un mayor crecimiento y elongación (Figura 9 y 10).

Los tratamientos que contenían únicamente BAP T2, T3 y T4 desarrollaron brotes, de manera proporcional a la cantidad de BAP es decir a mayor concentración, mayor número de brotes (Figura 11), sin embargo el número de nuevos organismos no se comparó con los tratamientos que contenían ANA (T8 y T12).

La prueba estadística de tukey arroja diferencias estadísticamente significativas (P = <0.001) entre T8-T1 y T8-T5.

A pesar de que existió desarrollo de brotes en T9 y T13, únicamente con ANA presentaron clorosis y bajo vigor, además de que no demostraron un buen desarrollo, (Figura 12).

Tabla 3. Respuesta morfogénica del tejido de *Pinguicula moctezumae* a los distintos tratamientos.

Tratamiento	Ácido Naftalen Acético (mg L⁻¹)	Bencilaminopurina (mg L⁻¹)	Respuesta morfogénica del tejido	Número de brotes
1	0	0	E,R	0
2	0	0.4	B,R	5
3	0	0.5	B	8
4	0	0.6	B	55
5	0.4	0	E	0
6	0.4	0.4	B	11
7	0.4	0.5	B	9
8	0.4	0.6	B,R	125
9	0.5	0	B,R	18
10	0.5	0.4	B,	42
11	0.5	0.5	B	43
12	0.5	0.6	B	53
13	0.6	0	B	10
14	0.6	0.4	B	28
15	0.6	0.5	B	31
16	0.6	0.6	B	7

B: Brotes E: Elongación R: Formación de raíz

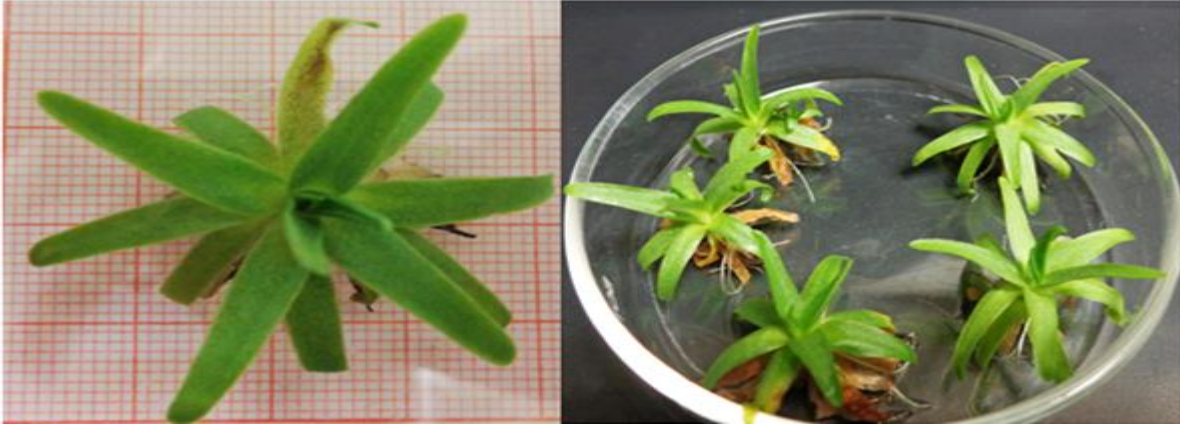


Figura 9. *Pinguicula moctezumae* sin reguladores de crecimiento, se observa un mayor crecimiento a diferencia de los medios que contenían BAP y ANA, sin embargo no existe la formación de brotes.



Figura 10. Plantas *in vitro* de *Pinguicula moctezumae*, se muestran los medios que no contenían reguladores de crecimiento.

Los organismos obtenidos en T8 presentaban un desarrollo bipolar es decir, tenían un desarrollo de raíz y de brote al mismo tiempo (Figura 13 y 14), del mismo modo eran organismos independientes y fácilmente separables del tejido generador.

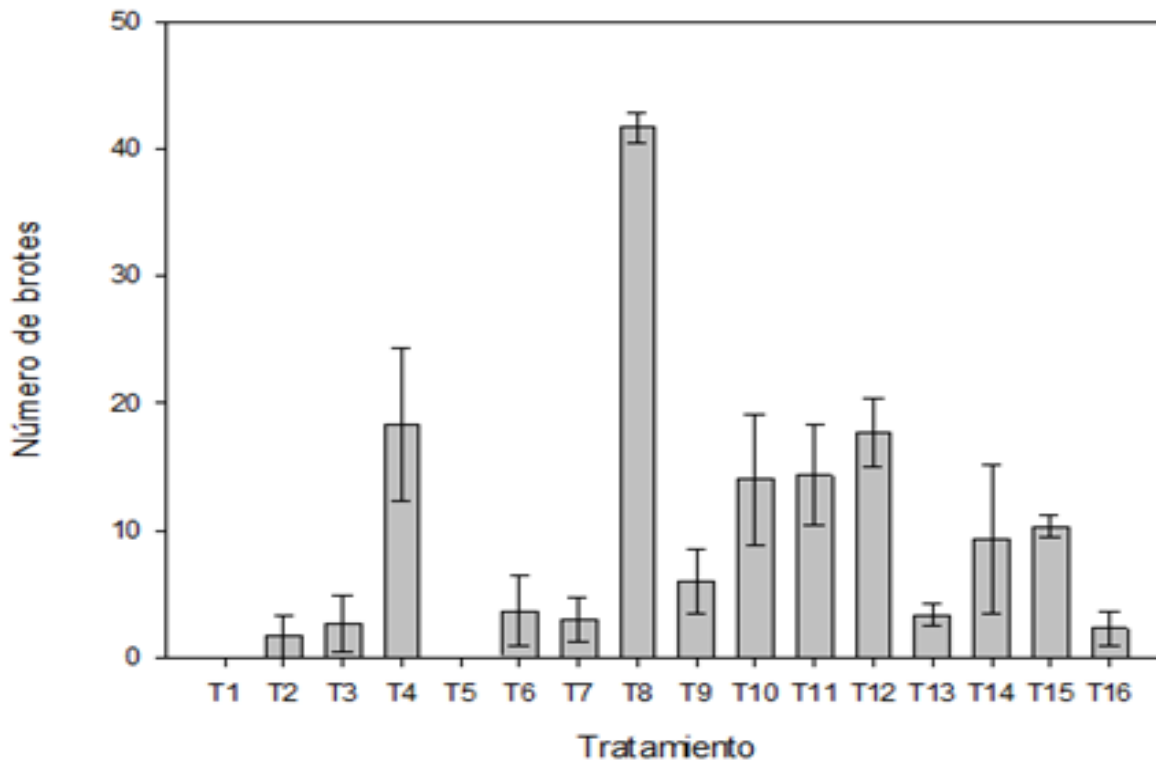


Figura 11. Número de brotes desarrollados en los distintos tratamientos. Se muestra la media (n=3), \pm error estándar.



Figura 12. Plantas en presencia únicamente de ANA, presentan clorosis y deformidades morfológicas.

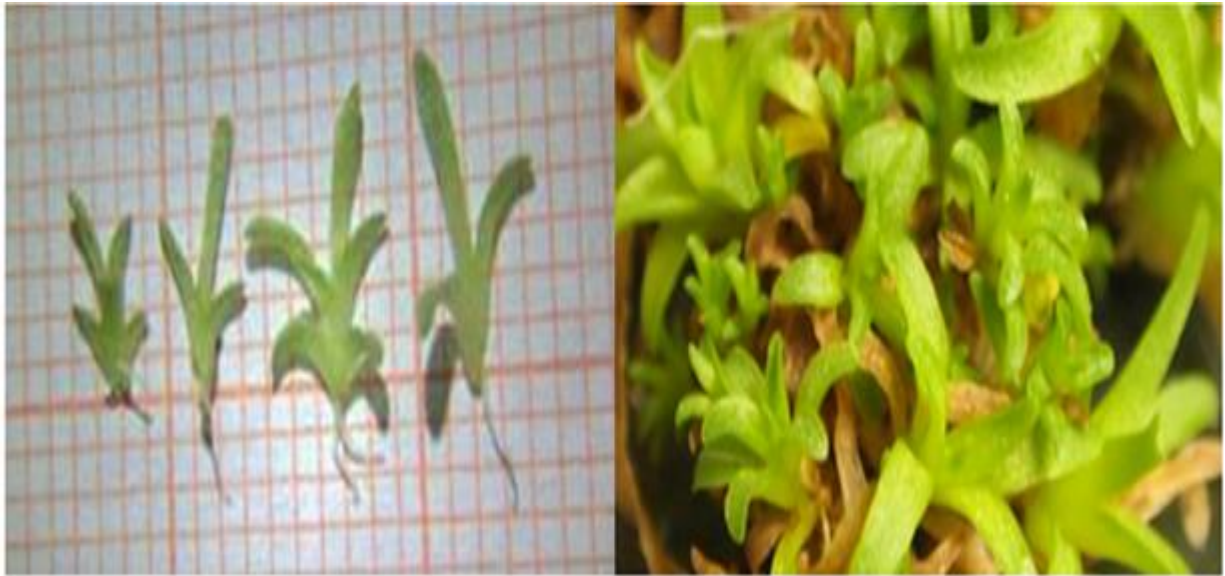


Figura 13. Plántulas de *Pinguicula moctezumae* desarrolladas, se observan independientes al tejido generador y fácilmente separables.



Figura 14. Desarrollo de nuevos organismos, el T8 (0.4 mg L^{-1} , 0.6 mg L^{-1}) ANA y BAP respectivamente, fue el que desarrollo un número mayor de organismos.

5.2 Cantidad de tejido desarrollado

La cantidad de tejido desarrollado al igual que la cantidad de nuevos organismos fue superior en el T8 que contenía (0.4 mg L^{-1} , 0.6 mg L^{-1}) de ANA y BAP. (Figura 15).

La prueba estadística de tukey arroja diferencias estadísticamente significativas ($P = <0.001$) entre T8 con todos los demás tratamientos excepto con T10 y T14. Se muestra que T6 fue el que desarrollo menos tejidos al igual que T13.

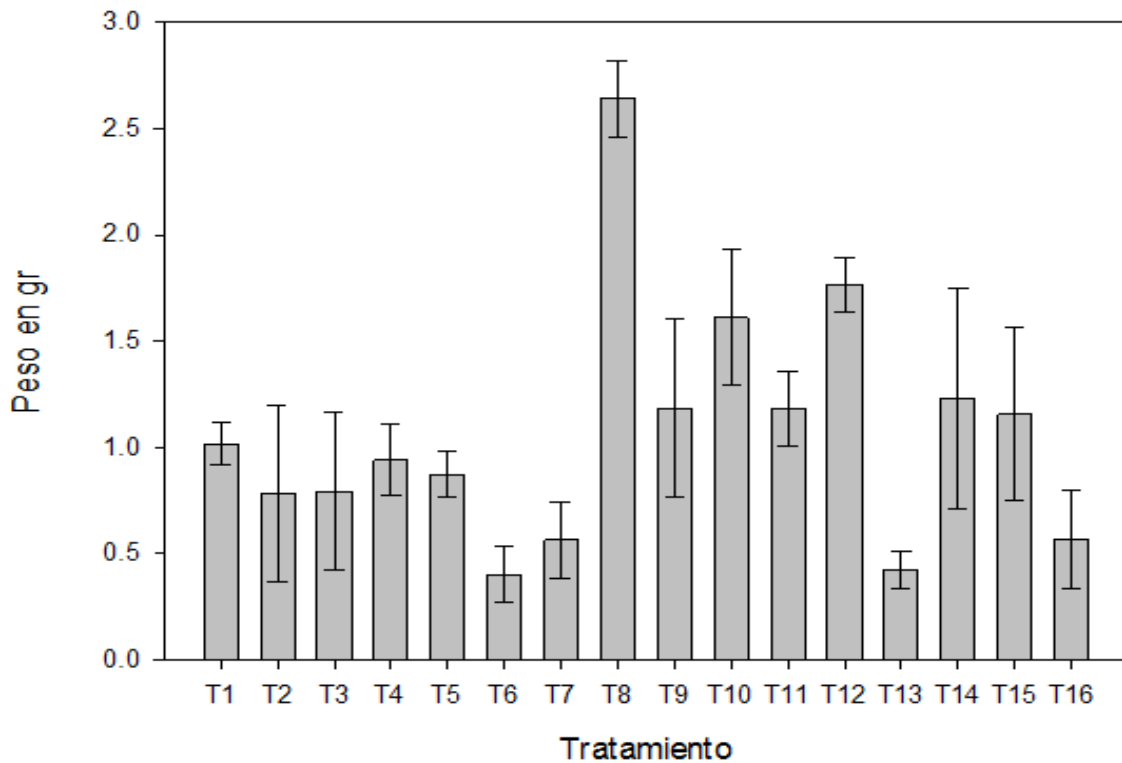


Figura 15. Peso en gramos del tejido desarrollado en los distintos tratamientos, se muestran, los promedios ($n=3$), \pm error estándar.

5.3 Clorofila a y b

La cantidad de Cl a y Cl b se vio favorecida en presencia de BAP contrariamente, con el uso de ANA en T5, T9 y T13, existió una menor cantidad de clorofilas sin embargo la relación Cl a/ Cl b (Figura 16 y 17) se mantiene en la mayoría de los tratamientos.

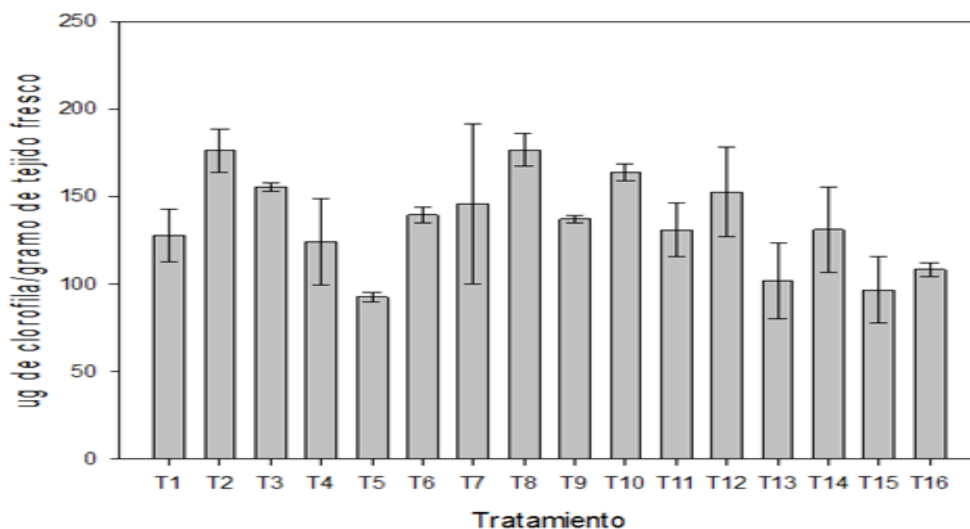


Figura 16. Cantidad de clorofila a en μg en los distintos tratamientos, se muestran, los promedios ($n=3$), \pm error estándar.

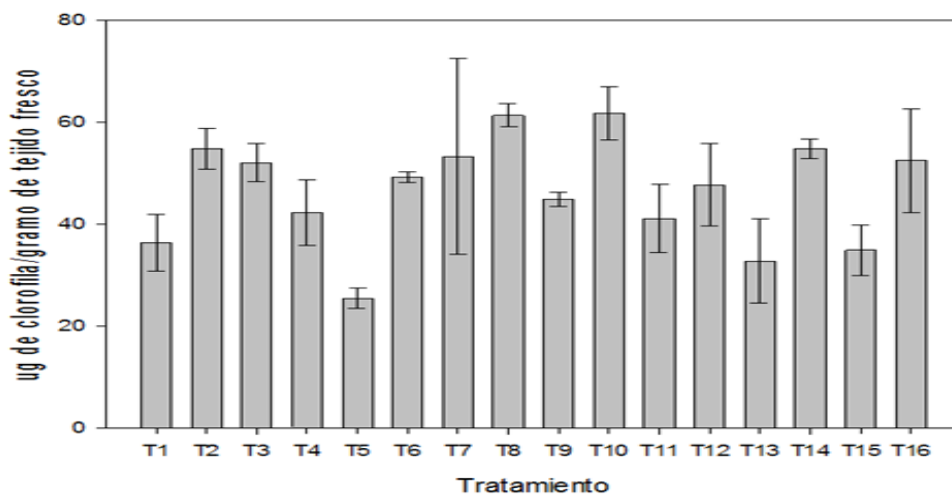


Figura 17. Cantidad de clorofila b en μg mostrada en los distintos tratamientos, se muestran, los promedios ($n=3$), \pm error estándar.

5.4 Carotenos

La cantidad de carotenos estuvo relacionada directamente con la cantidad de clorofila a y b. En T8 se mostró una cantidad mayor sin embargo solamente se presentan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) en los tratamientos T8-T7, T2-T7, T10-T7 y T3-T7 (Figura 18).

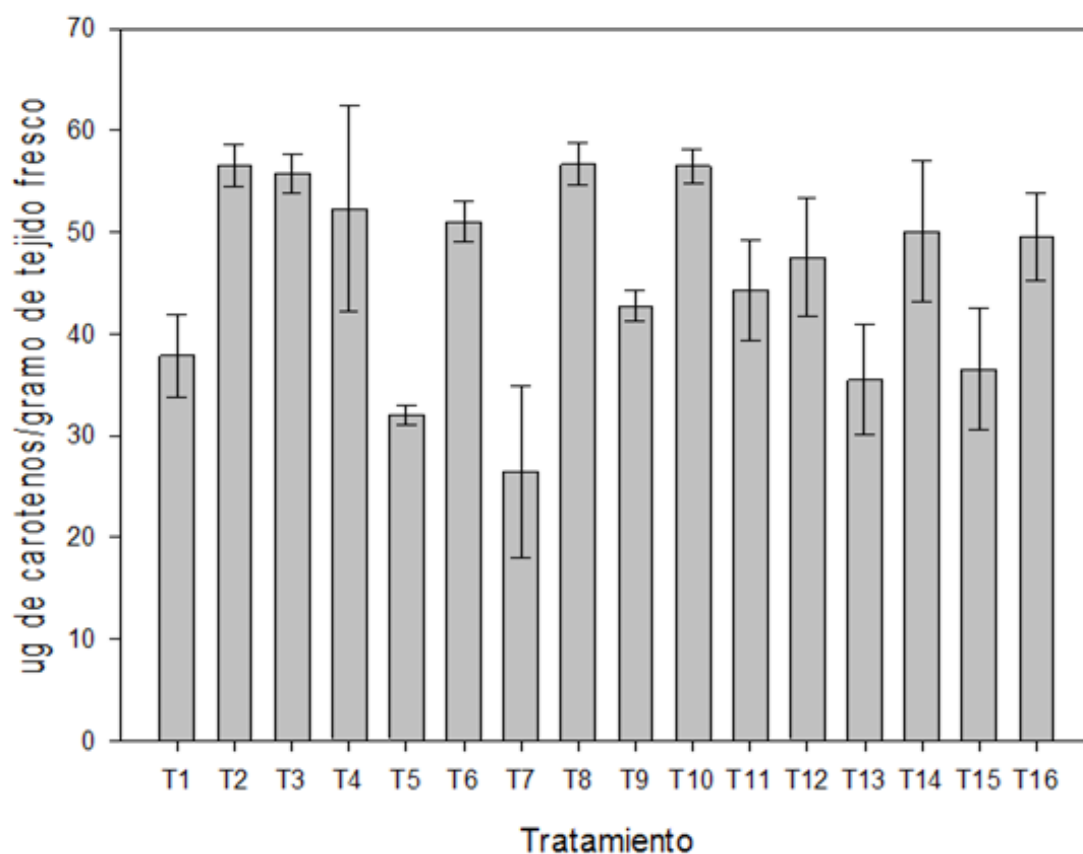


Figura 18. Cantidad de carotenos en μg arrojados por los distintos tratamientos, se muestra el promedio ($n=3$), \pm error estándar.

6. DISCUSIÓN

6.1 Propagación de *Pinguicula moctezumae*

A diferencia de lo reportado para *Pinguicula moranensis*, por Pérez *et al.* (2017) el tejido no presentó la formación de callo sin embargo concordando con lo reportado por otros autores para otras especies del mismo género (Clapa, 2010, Kanjana, 2011, Goncalves, 2008), la mayoría de los tratamientos mostró desarrollo de plántulas, a excepción del T1 y el T5, por lo que se corrobora la acción favorable de los reguladores de crecimiento ANA y BAP, en el cultivo *in vitro* particularmente de las citocininas, “su uso es esencial para el favorecimiento y la regulación del número de divisiones celulares, la formación de yemas y la estimulación del crecimiento de los brotes” (Bouza *et al.*, 1993, Smith y Atkins, 2002)

Sin embargo a pesar de que las citocininas son fundamentales para la estimulación mitótica se observó que los tratamientos que contenían adicionalmente ANA, tuvieron un mayor desarrollo de plántulas lo que demuestra la acción sinérgica de ambos reguladores de crecimiento.

La acción de las citocininas y las auxinas en el ciclo celular es fundamental para que pueda ocurrir la división celular. Las citocininas estimulan la producción de ciclina D que es vital para que inicie el ciclo G_1 , durante la interfase. Por otro lado la auxina estimula la producción de A-CDK, proteína esencial para que avance el ciclo. Además de que durante la fase S también es posible la intervención de las citocininas, actuando como un factor que promueve el avance del ciclo el complejo CDK tipo A. En las fases G_2 y M actúan A-CDK y B-CDK. Entrando a la G_2 , la

quinasa A-CDK es inhibida por la fosforilación de su resto de tirosina. La entrada a la mitosis al terminar G₂, depende de la desaparición de esta fosforilación. Esto puede hacerlo la fosfatasa de tirosina dependiente de citocinina, sin citocinina la célula no puede entrar a mitosis (Haré y Staden 1997, Mirolov *et al.*, 1999, Frank y Schmülling 1999).

La cantidad de organismos reportados fue inferior a lo reportado por Clapa, (2010) para *Pinguicula vulgaris*, quien obtuvo una cantidad de 57.6-97.44 al igual que lo reportado por Pérez *et al.*, (2017), para *Pinguicula moranensis var. neovolcanica*. Sin embargo es superior a lo descrito por Kanjana (2011) para *Pinguicula gigantea*, por otro lado lo reportado por ellos fueron básicamente brotes, a diferencia de las plántulas que se obtuvieron en el presente estudio, difiriendo con ellos existió el desarrollo de raíces, lo que sugiere que probablemente esté en proceso una embriogénesis somática directa ya que según Sannasgala (1989) la característica principal de los embriones somáticos es su estructura bipolar (raíz y brote) además de que tiene autonomía frente al tejido generador, histológicamente no tienen conexión vascular con el tejido que dio origen, y presentan bandas procambiales entre los ápices.

6.2 Cantidad de tejido desarrollado

La cantidad de tejido desarrollado en peso fresco a partir del explante, fue superior en el T8, esto se le atribuye de igual manera a la acción de la citocinina BAP en combinación con la auxina ANA, directamente en el ciclo celular. La acción sinérgica de ambos reguladores de crecimiento es fundamental, se sabe que BAP promueve dentro del ciclo celular, una nueva división por mitosis después de G₂ (Haré y Staden 1997, Mirolov *et al.*, 1999, Frank y Schmölling 1999).

6.3 Clorofila a y b

La cantidad de clorofila a y b se vio modificada en los tratamientos que contenían una mayor cantidad de BAP, esto es similar a lo reportado por Gonzales *et al.* (2009) para trigo, lo que demuestra que el uso del regulador de crecimiento BAP tiene una acción similar en *Pinguicula moctezumae*, mantiene la cantidad de clorofila gracias a que tiene un efecto favorable induciendo la expresión de genes fotosintéticos (Ookawa *et al.*, 2004).

Exceptuando el tratamiento 16 que tenía la misma cantidad de ANA, todos los tratamientos que contenían 0.6 mg L⁻¹ de BAP, conservaron un valor óptimo de clorofila a y b (T 4, T 8, T 12) sin embargo a mayor cantidad de ANA se modifica la cantidad de Cl a y Cl b probablemente la auxina este mermando la capacidad y la disponibilidad de la citocinina para la planta (Zazímalová, 1996).

6.4 Carotenos

La cantidad de carotenos mostrada por los distintos tratamientos se encontró íntimamente ligada a la cantidad de clorofila a y b presente en las hojas, se muestra que en los tratamientos que tienen una cantidad de clorofila superior (T2, T8 y T10), la cantidad de carotenos, del mismo modo esta elevada, esto probablemente porque las citocininas incrementan la síntesis de pigmentos accesorios para proteger a los centros de reacción, de la luz y el oxígeno (Wingler *et al.*, 2004, Vlèková *et al.*, 2006). Pero al igual que en el caso de Cl a y Cl b no hay estudios en ninguna especie de *Pinguicula*, con los cuales comparar.

7. CONCLUSIONES

El uso de los reguladores de crecimiento, ANA y BAP para la propagación de *Pinguicula moctezumae* es esencial en el cultivo *in vitro*, por su acción sinérgica, su acción en el ciclo celular y la estimulación del avance del mismo.

El protocolo aquí descrito puede ser usado para la propagación *in vitro* de *Pinguicula moctezumae*, utilizando 0.4 mg/ 0.6 mg de ANA/BAP L⁻¹ respectivamente, ya que arroja buenos resultados respecto a la cantidad de organismos nuevos.

La cantidad de clorofila a y b se mantienen, debido a los niveles elevados de citocininas en el medio, por lo que pueden ser usadas para evitar clorosis en cultivo *in vitro* de *Pinguicula moctezumae*.

Literatura citada:

- Álvarez M., P. Beltran, M. Diana y L.M. Mesa. 2011. Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea roxb.* Tumba. 6:107-124.
- Beth L. y A. Arie. 2010. Micropropagation of plants Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, 17 pp.
- Bouza L., M. Jacques, B. Sotta y E. Miginiac. 1993. The differential effect of N6-benzyl-adenine and N6-(delta2-izopentyl)-adenine on in vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. is correlated with different hormone contents. *Plant Cell Rep.*, 12:593-596.
- Celestino C. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario. *Invest Agrar: Sist Recur* 14 (3): 345-357.
- Clapa D., A. Fira y I. Pacurar. 2010. *In vitro* propagation of *Pinguicula vulgaris*. *Bulletin UASVM Hort.* 67 (1): 330-335.
- Copeland L. y M. McDonald. 1995. Principles of Seed Science and Technology. 3ª edición Chapman & Hall. New York. pp. 400-09.
- Espinosa F.A., M. J. M. Mejía, L. M. T. Colinas, E. M. A. Rodríguez, P.A.E Urbaczyk. y B. M. A. Beltrán. 2009. Catálogo nacional de especies y variedades comerciales de plantas y flores producidas en México y Universidad Autónoma Chapingo. México: Chapingo. 350 pp.
- Evans D., W. Sharp y C. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: *Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture.* Thorpe, T (Ed) pp. 45-113. Academic Press. New York.

- Frank M., T. Schumling. 1999. Cytokinin cycles cells. Trends Plant Sci. 4:243-244.
- Freire, S. M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Bio. Veg. 3(4): 195-209.
- Goncalves, S., A. Escalpa, T. Grevenstuk y A. Romano. 2008. An efficient in vitro propagation protocol for *Pinguicula lusitanica*, a rare insectivorous plant. Plant Cell Tiss Organ Cult. 95: 239-243.
- González S. R., A. A. Delgado, M. A. Zavaleta y C. E. Herrera. 2009. La citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxinasa durante el retraso de la senescencia foliar de trigo. Revista Agro. 43:379-391.
- Haré P.D. y J. V. Staden. 1997. The molecular basis of cytokinin action. Plant Growth Regul. 23:41-78.
- Jordán M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento, Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiología Vegetal. (F. A. Squea y L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 15: 1-28.
- Juniper B. E., R. J. Robins y D. M. Joel. 1989. The carnivorous plants. Academic Press, London. 353 p.
- Kanjana S., S. Vasan y A. Sumay. 2011. The effects of BA and NAA on Multiplication of Butterwort (*Pinguicula gigantea*) *in vitro*. Journal of Agricultural Technology 7(5): 1349-1354.
- Kobelak A., R. Hebe y A. Mrogisnski. 2004. Efecto del ANA en combinación con BAP y CIN en la organogénesis *in vitro* de *Arachis burkartii* (leguminosae). Comunicaciones científicas y tecnológicas.

- Krikorian A.D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. (Ed. P.J. Davies). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 774
- Legendre L. 2000. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview, *Acta Botanica Gallica*. 147:1 77-95
- Manrique E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. *Ecosistemas*. 2:1-11.
- Marin A. 2009. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la generación in vitro de cinco cultivares elites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *UDO Agrícola*. 9:556-562.
- Mironov V., L. D. Veylder y M. V. Montagu. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants the nexus. *Plant Cell*. 11:509-521.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Olvera M. 1996. El género *Utricularia* (Lentibularceae) en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 67(2): 347-384.
- Ookawa T., Y. Naruoka, A. Sayama y T. Hirasawa. 2004. Cytokinin effects on ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/ oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Sci*. 44: 2107-2115.
- Pérez S. J., R. Reyero, Y. Pozos, M. V. Verastegui y J. G. O. Montiel. 2017. In vitro propagation of *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcánica Z. *Revista Bio Ciencias* 4(3): 179-188.

- Plascencia R. L., A. B. Castañón, A. R. Guzmán. 2011. La biodiversidad en México su conservación y las colecciones biológicas, Ciencias, núm. 101, pp. 36-43.
- Roberts J. A. y L. Gilbert. 1992. Gravitropism research-will mutants prevent us from going around the bend? In: Karssen et al. (see Bandurski et al.pp.) 913-920.
- Rivadavia F., L. Edward y F. Andreas. 2017. *Pinguicula pygmea* (Lentibulariaceae), a new annual gypsicolous species from Oaxaca State, Mexico. Phytotaxa 292 (3): 279–286
- Sannasgala K. 1989. In vitro somatic embryogenesis in Musa. PhD. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholieke Universiteit Leuven. 133 pp.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de Diciembre de 2010.
- Smith P.M. y C.A. Atkins. 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. Plant Physiology. 128: 793-802.
- Steiger J. 1975. The *Pinguicula* species of the temperate growth type and their cultivation. *Carnivorous Plant Newsletter*. 4, 8-18.
- Tapia V. M., P. E. Read. 1998. Propagacion de hibridos de vid a traves del cultivo in vitro de yemas axilares [BA, ANA]. Agro-Ciencia. 14(1) p. 35-41.
- Tisserat B., E. Esan y T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Horticulture. Rev. 1: 1-78

- Villaseñor J.L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75:105-135.
- Villaseñor J.L. y E. Ortiz. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (Division Magnoliophyta) en México. *Revista de Biodiversidad*, Sup. 85: 134-142.
- Viñas M. y V. Jimenez. 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Biotechnol*, 2: 229-242.
- Vlèková A., M. Špundová, E. Kotabová, R. Novotný, K. Dole y J. Nauš. 2006. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiol. Plantarum* 126: 257-267.
- Wellburn A. R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents whit Spectrophotometers al Different Resolucion. *J Plant Physiol*; 144:307-13.
- Wingler A., M. Marès y N. Pourtau. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 57: 391-399.
- Zamudio Ruiz S. y J. Rzedowski. 1986. Tres especies nuevas de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de Mexico. *Phytologia* 60: 255–265.
- Zamudio S. y A. Lux. 1992. Una nueva especie gipsicola de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de Nuevo León México. *Acta Botánica Mexicana*. 20:39-44.

- Zamudio S. 1994. Una nueva especie de pinguicula (Lentibulariaceae) de los estados de Querétaro e Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*. 28:59.
- Zamudio S. 1995. Las plantas mexicanas del genero Pinguicula un grupo de interés hortícola. *Revista Chapingo. Horticultura* 3:63-69.
- Zamudio S. y V. Marm., 2003. Pinguicula conzatii (Lentibulariaceae), una especie nueva del estado de Oaxaca, México. *Acta Botanica Mexicana*, 62:15-20.
- Zamudio S. 2005. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología. A. C. Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo. 136. 61pp.
- Zamudio S. 2006. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Ecología. A. C. Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo. 45. 19pp.
- Zazímalová E., A. Brezinova., J. Holik , y Z. Opatrny. 1996. Partial auxin deprivation affects endogenous cytokinins in an auxin-dependent, cytokinin-independent tobacco cell strain. *Plant Cell Reproduction*. 16: 76-79.

ANEXOS:

Preparación del Medio de Cultivo Murashige Skoog (1962)

Solución A (elementos mayores)	
Compuesto	Pesar en gramos
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
KH ₂ PO ₄	17
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4
KNO ₃	19
NH ₄ NO ₃	16.5

Colocar en orden los compuestos, agregando inicialmente un poco de agua a un vaso de un litro agitando constantemente, finalmente afore a 1 litro de solución y guarde en frío.

Solución B (elementos menores)	
Compuesto	Pesar en miligramos
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .4H ₂ O	2000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	830
KI	83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5

Colocar en orden los compuestos, agregando inicialmente un poco de agua a un vaso de un litro agitando constantemente, finalmente afore a 1 litro de solución y guarde en frío.

Solución C		
NaEDTA	373 mg	100 ml agua destilada
FeSO ₄ .7H ₂ O	278 mg	

Colocar en orden los compuestos, agregando inicialmente un poco de agua a un vaso de un litro agitando constantemente, finalmente afore a 1 litro de solución y guarde en frío.

Pinguiculas en cultivo



Figura 19. Cultivo del Género *Pinguicula* Fotografía: Javier Jiménez Zamudio.