



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**GERMINACIÓN *in vitro* Y  
MICROPROPAGACIÓN DE *Pinguicula  
moctezumae* ZAMUDIO & R.Z. ORTEGA  
(LENTIBULARIACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**CLAUDIO AUGUSTO CASTAÑÓN SUÁREZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA**

México, D.F.

2015



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Castañón  
Suárez  
Claudio Augusto  
58 44 00 84  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de ciencias  
Biología  
307043333

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Ana Laura  
López  
Escamilla

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Sergio  
Zamudio  
Ruiz

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Sonia  
Vázquez  
Santana

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Silvia  
Espinosa  
Matías

### 7. Datos del trabajo escrito

Germinación *in vitro* y micropropagación de *Pinguicula moctezumae* Zamudio & R.Z.  
Ortega (Lentibulariaceae).  
78p.  
2015

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla en el laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del taller titulado “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes”.

## AGRADECIMIENTOS

### Institucionales:

A la máxima casa de estudios, a la UNAM, por abrirme las puertas y llenarme de conocimiento y crecimiento personal desde la preparatoria.

A la Facultad de Ciencias, lugar en el que me sentí como en casa y en donde adquirí muchos de los conocimientos que siempre quise saber: lo asombrosa que es la vida; y mi gran pasión: las plantas.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla por aceptarme como su alumno y dejarme desarrollar este proyecto que tanto entusiasmo me causó, por su amistad, paciencia, consejos, ideas e interés en el tema, sin mencionar todo su apoyo y las innumerables correcciones que me brindó. Gracias por hacer esto posible.

A la M en C. Laura Patricia Olguín Santos, Técnico Académico de la Unidad de Ambientes Controlados e Invernadero de la Facultad de Ciencias por el mantenimiento de las plantas *in vitro* y *ex vitro* de las plantas obtenidas en este trabajo, además de su gran carisma y calidez como persona.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por su inmensa amabilidad y todo su apoyo en lo académico y personal. Además de la admiración que le tengo por su trayectoria académica, para mí ha sido un placer convivir con personas tan agradables como ella.

Al Dr. Sergio Zamudio Ruiz, a quien he admirado desde hace años por su trabajo en la investigación en el género *Pinguicula*, por aceptar ser parte de mi jurado y hacer correcciones en este manuscrito que sólo él podría hacer.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por ser todo un ejemplo a seguir, sin duda una de las personas más admiradas por todos, su presencia en el laboratorio es inigualable, gracias por ser parte de mi jurado.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías, por sus valiosas correcciones que enriquecieron mucho este trabajo.

A las demás profesoras del taller: la Dra. Margarita Collazo Ortega y la Dra. Karina Jiménez Durán, por sus valiosas enseñanzas que estoy seguro que me ayudarán a defenderme en un futuro no muy lejano en el mundo de la biología.

A los profesores de la Facultad de Ciencias que durante mi estancia me hicieron reafirmar o incluso incrementaron mi pasión por las plantas: M. en C. Rosa María Fonseca Juárez, Dra. Martha Juana Martínez Gordillo, M en C. Octavio González

Caballero y Biól. Gabriel Olalde Parra, sin duda sus clases cambiaron mi vida, gracias a todos.

### **Personales:**

A Erika Bautista, Cristina Mendoza y Kevin Carbajal, no sólo fuimos compañeros de laboratorio, en verdad encontré amigos verdaderos en ustedes, gracias por todas las aventuras, sustos, risas y todo lo que aprendimos juntos.

A mis mejores amigas de la Facultad: Mayra Cruz, Hanen Schabib y Natzalia Díaz, gracias por preocuparse por mí y su apoyo incondicional en los momentos que más las necesité, de verdad gracias, saben que siempre estaré allí cuando me necesiten.

A mis mejores amigas de la preparatoria: Diana A. Lomelín y Lisandra Llanos, saben que tienen un lugar muy especial en mi corazón, gracias por su compañía durante todos estos años.

A mi bolita de amigos de la Facultad: Citlalli, Ilse, Rocío, Carolina, Gaby, Ramón, Joel y Liz, me divertí mucho con ustedes año tras año, nunca cambien.

A las demás personas del Laboratorio Desarrollo en Plantas con quienes conviví y me hicieron sentir como en una gran familia: Valeria, Nadia, Sandra, Enya, Aldebarán, Javier Andrés, María y Ricardo.

A mis amigos cultivadores de plantas insectívoras: Rodrigo Patrón, Rubén Reséndiz, Alejandro Montoya, Eduardo García e Iván Zepeda, gracias por llenar mi casa de plantas raras que con mucho gusto cultivo.

A la Asociación Mexicana de Plantas Carnívoras A. C. por dejarme ser parte de ustedes y permitirme dar conferencias sobre los temas que mejor domino.

Y a todos ustedes que me han hecho la persona que soy, en verdad gracias.

Atte. Claudio

## *Dedicatoria*

*A mi madre: M. en E. I. Claudia Guadalupe Suárez Aguilar, quien siempre buscó darme lo mejor a mis hermanas y a mí, por ser una excelente madre y persona le dedico cada una de las páginas de esta tesis. Gracias por todo mamá.*

*† A la memoria de mi padre M en C. P. Miguel Ángel Castañón Camacho, por su apoyo durante 22 años de mi vida.*

*A mis hermanas M. en A. Mijaely Antonieta Castañón Suárez y Q.F.B. Yoana Angélica Castañón Suárez por todo su apoyo desde que tengo memoria y por seguir allí cuando las necesito, saben que las quiero, las admiro mucho por todos sus logros y las apoyo incondicionalmente.*

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	9
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	10
<b>2. ANTECEDENTES</b>	11
2.1. Plantas insectívoras	11
2.2. Familia Lentibulariaceae	13
2.3. Características del género <i>Pinguicula</i>	13
2.4. Mecanismo de insectivoría en <i>Pinguicula</i>	19
2.5. Fenología, hábitat y distribución de <i>P. moctezumae</i>	20
2.6. El cultivo de tejidos vegetales como estrategia de conservación	22
2.7. Micropropagación	27
2.8. Reguladores de crecimiento vegetal	28
2.8.1. Auxinas	29
2.8.2. Citocininas	30
2.9. Micropropagación de plantas insectívoras	31
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	35
<b>4. OBJETIVOS</b>	35
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos particulares	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
5.1. Material biológico	36
5.2. Establecimiento y germinación <i>in vitro</i>	36
5.3. Elongación de plantas y micropropagación	37
5.4. Aclimatización	39
5.5. Análisis estadísticos	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	41
6.1. Desinfección de las semillas y establecimiento <i>in vitro</i>	41
6.2. Descripción de la germinación	41
6.3. Evaluación de la germinación en diferentes concentraciones de medio	44
6.4. Crecimiento <i>in vitro</i> y oxidación	47
6.5. Organogénesis	50
6.6. Análisis de datos	54
6.7. Crecimiento <i>in vitro</i>	57
6.8. Aclimatización	59
<b>7. CONCLUSIONES</b>	64
<b>8. ANEXOS</b>	66
<b>9. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA</b>	70



## ABREVIATURAS

<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
<b>AIA</b>	Ácido Indol-3-acético
<b>AIB</b>	Ácido Indol-3-butírico
<b>ANA</b>	Ácido $\alpha$ Naftalenacético
<b>BA</b>	Benciladenina
<b>CTV</b>	Cultivo de Tejidos Vegetales
<b>DKW</b>	Medio Driver y Kuniyuki (1984)
<b>K</b>	Kinetina
<b>MS 25%</b>	Medio Murashige y Skoog al 25% de sus componentes, sacarosa 30 g·L <sup>-1</sup>
<b>MS 33%</b>	Medio Murashige y Skoog al 33.33% de sus componentes, sacarosa 30 g·L <sup>-1</sup>
<b>MS 50%</b>	Medio Murashige y Skoog al 50% de sus componentes, sacarosa 30 g·L <sup>-1</sup>
<b>MS 75%</b>	Medio Murashige y Skoog al 75% de sus componentes, sacarosa 30 g·L <sup>-1</sup>
<b>MS 100%</b>	Medio Murashige y Skoog (1962) al 100% de sus componentes, sacarosa 30 g·L <sup>-1</sup>

## RESUMEN

*Pinguicula moctezumae* Zamudio & R.Z. Ortega (Lentibulariaceae) es una especie de plantas insectívoras endémicas de México. Al igual que otras especies de este género, se ha visto afectada por la alteración de su hábitat y al saqueo de las poblaciones silvestres por su valor ornamental.

Se estableció un protocolo para la germinación de semillas *in vitro* de *P. moctezumae* evaluando el efecto del medio Murashige y Skoog (MS) a diferentes concentraciones de todas sus sales (25%, 33%, 50%, 75% y 100%), sacarosa  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y durante 30 días se registró el desarrollo ontogénico de las plántulas. El máximo porcentaje de germinación fue de 76.66% en el medio Murashige y Skoog al 50%.

Para promover la micropropagación se utilizaron como fuente de explante hojas aisladas de diferentes tamaños, se seleccionaron hojas de 0.5 a 2 cm de largo (hojas chicas), y de 2.5 a 3.5 cm (hojas grandes) procedentes de las plantas obtenidas en la germinación *in vitro*. Las hojas fueron sembradas en medio MS 50%, adicionado con Benciladenina (BA) (0, 0.1, 1 y  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en combinación con ácido naftalenacético (ANA) (0, 0.1 y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (12 tratamientos). Después de dos meses de incubación se observó la formación de brotes. Se obtuvieron brotes en todos los tratamientos empleados. La combinación que promovió el mayor número de brotes, para ambos tamaños de hoja, fue  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA, con este tratamiento se registró un promedio de 7.75 brotes por hoja chica y 7.37 brotes por hoja grande.

Se obtuvo un total de 234 plantas de la germinación de semillas *in vitro* y 629 plantas a partir de la micropropagación de esta especie. Algunas plantas presentaron problemas de oxidación durante su cultivo *in vitro* por lo que se determinó que las plantas necesitan cambiarse a un medio de cultivo nuevo en un periodo no mayor a cuatro meses para su conservación a largo plazo. Se estableció exitosamente la aclimatización a condiciones *ex vitro* con 94.4% de supervivencia cultivadas en una mezcla de peat moss/agrolita en proporción (2:1).

Las plantas aclimatizadas formaron flores, frutos y semillas, las cuales fueron sembradas nuevamente en medio MS al 50% para determinar su viabilidad, y se observó que tanto las semillas producidas por plantas obtenidas de germinación *in vitro*, como aquellas obtenidas por micropropagación produjeron semillas viables.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Pinguicula* (Lentibulariaceae) está conformado aproximadamente por 85 especies ampliamente distribuidas en el mundo, de las cuales 44 habitan en México. A pesar de que este país alberga aproximadamente el 50% de las especies registradas del género y más del 90% se consideran endémicas, son muy pocas las especies que son propagadas con fines comerciales. La gran mayoría de ellas son muy escasas en cultivo y sólo se tienen registros en herbarios o jardines botánicos, mientras que algunas otras han sido descritas recientemente (Zamudio y Ludlow-Weichers, 1993; Zamudio, 2001a; Espinosa-Matías *et al.*, 2005).

No se conoce el estado de conservación de este género debido a la falta de estudios. Si bien algunas especies como *Pinguicula moranensis* están ampliamente distribuidas a lo largo del país (Zamudio, 1999), otras, como *Pinguicula moctezumae*, tienen una distribución muy restringida y los sitios en los que ha sido reportadas son escasos (Zamudio, 1994; Zamudio, 2005).

Ninguna de las especies mexicanas y centroamericanas del género *Pinguicula* están protegidas por leyes de comercio o tráfico de especies en estas regiones, ni hay programas o acciones específicas para la protección de estas plantas. El incremento en el interés por el cultivo de estas especies con fines de ornato y como plantas cultivadas por coleccionistas representa un riesgo inminente para la supervivencia de especies microendémicas, principalmente por saqueos intensivos con fines comerciales (Zamudio, 2003).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta con alto potencial para lograr la propagación masiva de especies de interés comercial y/o económico, la regeneración de nuevos individuos puede llevarse a cabo vía organogénesis o embriogénesis somática (Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

El objetivo de la presente investigación fue establecer la técnica de micropropagación de *Pinguicula moctezumae* a partir de explantes de hojas de plantas obtenidas por semillas *in vitro*. Los resultados obtenidos servirán de base para el futuro establecimiento y micropropagación de otras especies de este género.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Plantas insectívoras**

La insectivoría es un rasgo que ha evolucionado de forma independiente varias veces dentro de las angiospermas, y generalmente está asociada a hábitats húmedos o inundados y con suelos pobres en nutrientes como nitrógeno y fósforo. Estas limitaciones de bajos recursos en el suelo promovieron la aparición de plantas con sofisticadas adaptaciones que les permiten capturar insectos, los cuales les proveen de una fuente alternativa de nutrientes (Stewart Jr. y Nilsen, 1993; Brewer *et al.*, 2011). Son capaces de atrapar diversos artrópodos y otros tipos de invertebrados para absorber sus nutrientes y utilizarlos para su crecimiento y desarrollo (Brewer *et al.*, 2011).

Las características morfológicas que definen a la mayoría de las plantas insectívoras son: un sistema radicular pequeño, menor capacidad fotosintética,

menos eficiencia en el uso del nitrógeno fotosintético y menos competitividad en comparación con las plantas no insectívoras (Brewer *et al.*, 2011).

Las plantas en general secretan néctar (a través de nectarios florales y extraflorales) y olores dulces (en estructuras conocidas como osmóforos), o bien exhiben colores brillantes, en especial en las flores para atraer a los insectos polinizadores. Algunos géneros de plantas insectívoras (*Cephalotus*, *Darlingtonia*, *Heliophora*, *Sarracenia* y *Nepenthes*) retoman estos mecanismos al poseer nectarios extraflorales (Juniper *et al.* 1989; Vogel 1998), pero en hojas altamente especializadas que funcionan a manera de trampas. Debido a la alta especialización de las hojas, los insectos atrapados, en la mayoría de los casos, son incapaces de escapar (Millett *et al.*, 2003).

Existen diferentes formas en las que las plantas insectívoras capturan a los insectos; se describen cinco tipos de trampas propuestas por Slack y Gate (1980):

- Trampas adhesivas en los géneros *Byblis*, *Drosera*, *Drosophyllum*, *Pinguicula* y *Triphyophyllum*, las cuales producen un mucílago pegajoso.
- Trampas en forma de bisagra en *Aldrovanda* y *Dionaea*, con rápidos movimientos en sus hojas que encierran a sus presas.
- Trampas en forma de jarro en *Cephalotus*, *Darlingtonia*, *Heliophora*, *Nepenthes* y *Sarracenia*, que ahogan a los insectos en un líquido con enzimas digestivas y bacterias que los degradan.
- Trampas de nasa en *Genlisea* y *Sarracenia psittacina*, que consisten en tubos en donde los insectos entran y por medio de tricomas son dirigidos

hacia los órganos digestivos de la planta, de modo que el insecto no puede regresar.

- Trampas de succión en *Utricularia*, las cuales consisten en utrículos que atrapan al insecto por medio de un vacío interno.

## **2.2 Familia Lentibulariaceae**

La familia Lentibulariaceae, perteneciente al orden de las Lamiales, comprende aproximadamente 326 especies, distribuidas en tres géneros: *Utricularia* (220 especies), *Pinguicula* (85 especies) y *Genlisea* (21 especies). Son plantas herbáceas, anuales o perennes, que pueden ser terrestres, acuáticas o epífitas. Todas ellas son insectívoras, y comprenden la familia con más especies de plantas insectívoras (Müller *et al.*, 2006).

En México se encuentran representados los tres géneros: *Pinguicula* con 44 especies (Zamudio y Ludlow-Weichers, 1993), *Utricularia* con 20 especies (Zamudio y Olvera, 2009), y *Genlisea* con una especie (Olvera y Martínez, 2002).

## **2.3 Características del género *Pinguicula***

Todas las especies de *Pinguicula* presentan un tallo vertical corto que da lugar a una roseta basal de hojas compactas más o menos ovaladas y pueden crecer al nivel del suelo o levantarse oblicuamente. Las hojas de las rosetas varían de tamaño, desde un par de centímetros de diámetro como en *P. crenatiloba*, hasta 30 cm de diámetro como en *P. gigantea*. Hay algunas especies anuales, sin embargo la mayoría son perennes, y todas tienen raíces adventicias fibrosas. Son

plantas con amplia distribución en el mundo, algunas viven en regiones árticas, alpinas o templadas del hemisferio Norte y América central, así como en la región del Caribe, cruzando el Ecuador, hasta algunas regiones de los Andes Sudamericanos. También están presentes en prácticamente toda Europa, el norte de Rusia y algunas regiones de Asia oriental (Legendre, 2000).

Crece en suelos húmedos, generalmente con pH ácido, como los encontrados en pantanos; o bien en suelos alcalinos cercanos a cuerpos de agua, protegidas de la luz directa del sol. Pueden encontrarse también como plantas epífitas sobre troncos de árboles colonizados por musgo, al igual que sobre laderas totalmente verticales de roca con musgo al cual se aferran. Se han encontrado plantas desde el nivel del mar, hasta 4100 msnm, como *P. alpina* en los Himalayas (Hajra y Rao, 1990). Las diferentes especies de *Pinguicula* se encuentran adaptadas a un amplio rango de temperaturas (Legendre, 2000).

De acuerdo a Casper (1966) y Steiger (1975), las especies de este género se pueden agrupar en dos categorías principales, según su ciclo de crecimiento anual: tropicales y de clima templado (estas últimas llamadas nórdicas o alpinas), las cuales difieren de las tropicales por la presencia o ausencia de la roseta de invierno, denominada hibernáculo. Para ambos tipos de crecimiento, las hojas de verano e invierno pueden ser similares (homófilas) o diferentes (heterófilas) (Fig. 1), de modo que se distinguen cuatro grupos de especies (Legendre, 2000):

- Tropicales homófilas (*P. chilensis*, *P. emarginata*, *P. filifolia*)

- Tropicales heterófilas (*P. acuminata*, *P. gypsicola*, *P. moctezumae*)
- Templadas homófilas (*P. alpina*, *P. leptoceras*, *P. villosa*)
- Templadas heterófilas (*P. balcanica*, *P. longifolia*, *P. mundi*)

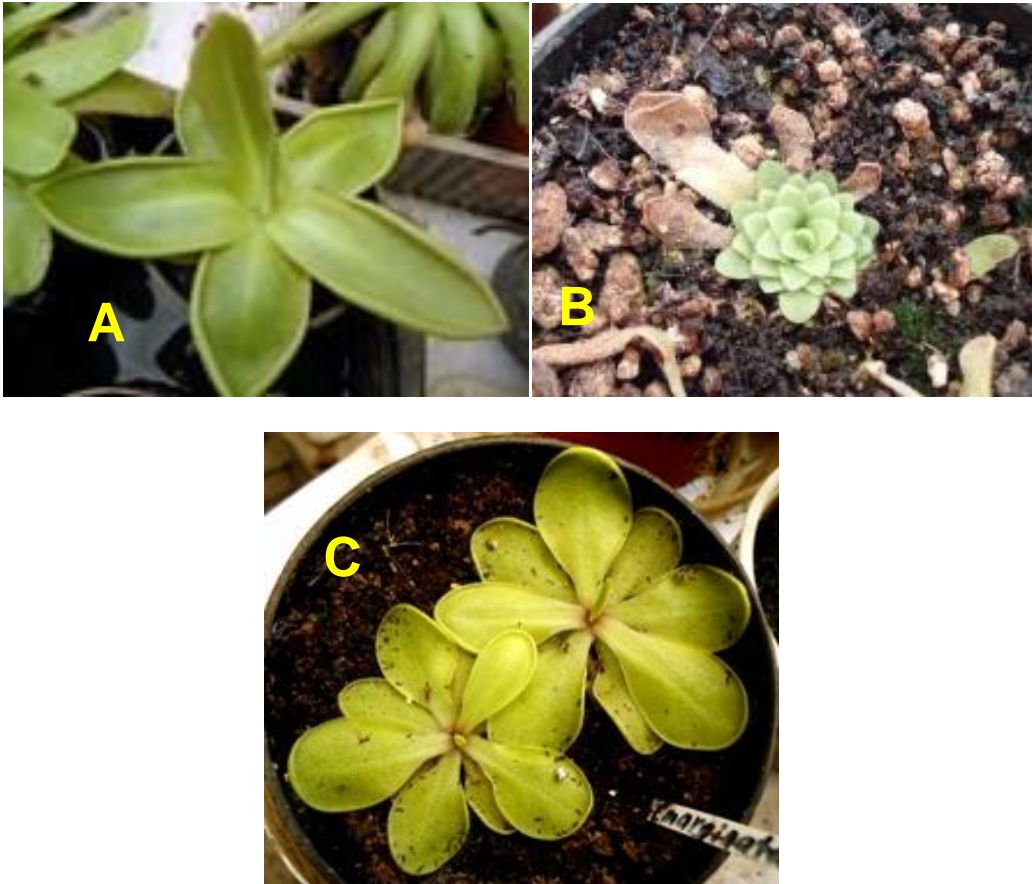


Fig. 1. Tipos de rosetas. (A) Rosetas de verano y (B) Rosetas de invierno de *Pinguicula moranensis*, una especie heterófila, (C) *Pinguicula emarginata*, una especie homófila, cuya roseta no difiere a lo largo del año. Fotografías: Claudio A. Castañón Suárez.

Los hibernáculos de las especies templadas no son insectívoros, es decir no son capaces de atraer, atrapar y digerir organismos en esta fase, están formados por hojas muy estrechas, y en algunos casos están enterrados ligeramente en el sustrato para sobrevivir a periodos de congelación (Fig. 2). Durante la época invernal este tipo de plantas pueden formar propágulos en la base del hibernáculo,



que son pequeñas plantas latentes que se desprenden con facilidad y funcionan como un método de reproducción vegetativa (Studnicka, 1991).

Por otra parte, en la mayoría de los casos, las rosetas de invierno de las especies mexicanas tienen hojas suculentas (hojas que tienen la capacidad de retener agua) que les permiten sobrevivir a los inviernos secos típicos de su hábitat. Esta característica es única y contrasta con otras especies del género y con las plantas insectívoras en general, las cuales viven en ambientes húmedos durante todo el año. Poseen un hibernáculo fotosintético formado por hojas suculentas que se desprenden fácilmente y son capaces de regenerar plantas nuevas, de modo que funcionan como reservorios de agua y como medio de propagación y dispersión vegetativa (Studnicka, 1991; Legendre, 2000).



Fig. 2. Comparación morfológica entre roseta de verano (A) y de invierno (B) de *Pinguicula grandiflora*, una especie de clima templado. (C y D), *Pinguicula cyclosecta*, una especie tropical mostrando las diferencias morfológicas entre las hojas de verano (C) y las de invierno (D). Fotos: Tomadas de página en red: ICPS, 2012.

Todas las especies producen flores solitarias muy atractivas. Están compuestas por una corola tubular con cinco lóbulos, los cuales varían en tamaño y forma según la especie, y de la base del tubo se proyecta o se forma un espolón (o nectario) más o menos largo cerca del punto de unión de la corola al receptáculo. La corola puede ser blanca, rosa, morada, lavanda, violeta, púrpura, amarilla o una combinación de estos colores, y con venas más o menos pronunciadas. Las semillas se producen en cápsulas normalmente suborbiculares. Los frutos rara vez sobrepasan el tamaño de los sépalos y albergan entre 20 y 100 semillas (Legendre, 2000).

Específicamente, las especies mexicanas poseen una enorme diversidad de formas, desde plantas con hojas redondeadas y pequeñas, que no superan los 5 cm de diámetro, como *P. esseriana*, otras alcanzan un tamaño de hasta 20 cm de diámetro, como *P. moranensis* (Zamudio, 1999), y también algunas de hojas lanceolado-lineares como en el caso de *P. calderoniae*, *P. gypsicola* y *P. moctezumae* (Fig. 3) (Zamudio y Ortega, 1994; Legendre 2000; Zamudio, 2001b).

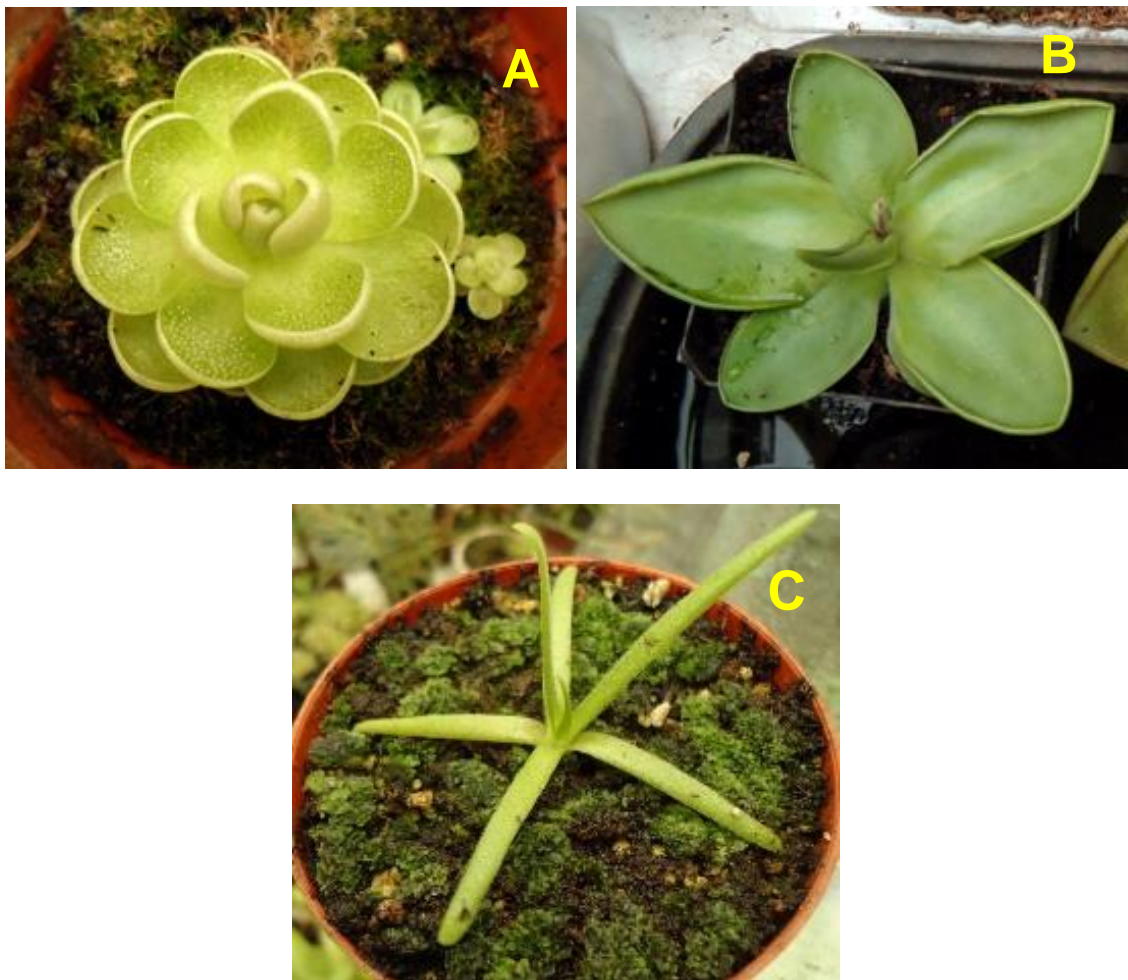


Fig. 3. Diversidad de formas de rosetas de verano del género *Pinguicula* (A) *P. esseriana*, (B) *P. moranensis* y (C) *P. moctezumae*. Fotografías: Claudio A. Castañón Suárez

## 2.4 Mecanismo de insectivoría en *Pinguicula*

No es clara la manera en que las hojas de *Pinguicula* atraen a los insectos, pero se sugiere que el brillo que provocan las gotas de mucílago participan en el proceso de atracción de las presas (Legendre, 2000). Darwin (1875) demostró que las hojas tienen la capacidad de moverse en respuesta a la presencia de los insectos atrapados. Estos movimientos son lentos, de manera que les toma horas o incluso días el completar el doblamiento de la hoja. Si bien este movimiento no participa en la captura, ayuda a incrementar el área de contacto de las glándulas digestivas con la presa y a que el animal cambie de posición sobre la hoja, para una mejor digestión y absorción de los nutrientes.

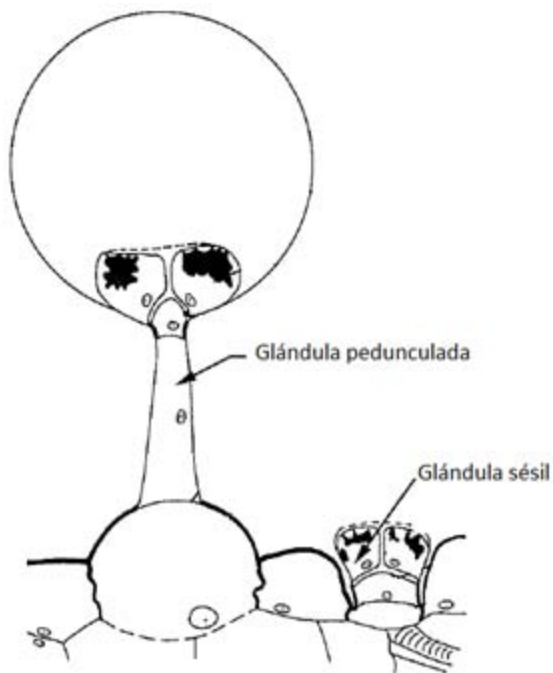


Fig. 4. Glándula pedunculada (izquierda) y glándula sésil (derecha). Tomado de Legendre (2000).

En la superficie adaxial de las hojas, pedicelos y sépalos de *Pinguicula*, se presentan dos tipos de glándulas: las glándulas pedunculadas y las glándulas sésiles (Fig. 4), que son las que les permiten atrapar y digerir a sus presas. Las glándulas pedunculadas secretan un mucílago espeso, que es el encargado de atrapar a las presas hasta dejarlas inmóviles para posteriormente ahogarlas en el líquido y tienen un

papel mínimo en la digestión, que es llevada a cabo por las glándulas sésiles.



Estos dos tipos de glándulas son derivados epidérmicos y difieren una de la otra en cuanto al tamaño y número de células que las conforman, las glándulas pedunculadas presentan de 8 a 32 células, mientras que las sésiles presentan de 4 a 8 células (Legendre, 2000).



Fig. 5 Insectos atrapados e inmovilizados en las hojas de *Pinguicula ibarrae*. Fotografía Claudio A. Castañón Suárez

Una vez que un insecto es atrapado e inmovilizado, éste es bañado en un pequeño exudado de enzimas digestivas que producen las glándulas sésiles (Fig. 5). Este mecanismo no ocurre en toda la hoja, solamente en el lugar en donde el insecto fue capturado. La hoja además es selectiva y sólo secreta enzimas digestivas ante una presa verdadera, y

no lo hace si llegase a atrapar algún material inerte como por ejemplo, un grano de arena. Esto debido a que reacciona ante sustancias nitrogenadas (iones amonio o grupos amino) provenientes de la presa. Este reconocimiento también le permite digerir restos de plantas tales como polen y hojarasca. Se ha postulado que la secreción también puede ser activada por el movimiento de los insectos vivos en un intento por escapar (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1981).

## 2.5 Fenología, hábitat y distribución de *Pinguicula moctezumae*

*Pinguicula moctezumae* (Descripción botánica: Anexo I) crece sobre concreciones de carbonato de calcio, en laderas calizas, en el lecho de arroyos o en paredes con escurrimiento de agua, a una altitud de entre 900 y 1100 msnm. Presenta

floración durante todo el año y al parecer permanece con las hojas de verano mientras exista 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 (Zamudio, 2001a).

*Pinguicula moctezumae* es una especie que sólo se ha encontrado en el cañón del Río Moctezuma, en el tramo entre la cortina de la Presa Hidroeléctrica Zimapán y el Poblado La Mora (Fig. 6), por lo cual es una especie microendémica. Aunque la planta es abundante localmente, es muy rara y los sitios en que se conoce son escasos, por lo que se considera vulnerable a la extinción (Zamudio, 2001a; Zamudio, 2005).



Fig. 6. Distribución conocida de *Pinguicula moctezumae* (tomado de Zamudio 2001a). Se observa que esta especie se distribuye únicamente entre los estados de Hidalgo y Querétaro.

## **2.6 El cultivo de tejidos vegetales como estrategia de conservación**

Inicialmente las técnicas del cultivo de tejidos vegetales (CTV) se desarrollaron como un medio rápido y exitoso para propagar vegetativamente especies de interés hortícola, agrícola, forestal (Collin y Edwards, 1998) o especies con fines ornamentales como las orquídeas (Mauseth, 1977), sin embargo, en la actualidad se emplea para una gran cantidad de especies ya sea para su comercio, conservación o investigación.

El CTV permite el establecimiento, regeneración y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula, hasta un órgano completo (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999), ya sea de ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen, en condiciones asépticas, controladas y en medios nutritivos adecuados (Evans, 1990; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

En el siglo XIX, Haberlandt (1902) cultivó células aisladas de plantas y postuló el principio de la "Totipotencialidad celular", el cual establece que a cualquier célula, si se le provee de las condiciones nutricionales adecuadas, será capaz de regenerar una planta completa (Brown y Charlwood, 1990; Doods y Roberts, 1995); siendo este postulado la base teórica de los métodos y técnicas de cultivo *in vitro* actuales (Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). En el proceso de regeneración vegetal se ven implicados factores genéticos, fisiológicos y bioquímicos; además de requerimientos nutritivos como sales orgánicas ya sean macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas. En las técnicas de cultivo de tejidos se han

empleado diversos medios de cultivo nutritivos para la propagación de muchas especies, siendo algunos de ellos el medio Knudson C (1946), White, Vacin y Went, Murashige y Skoog, entre otros. Este último, fue formulado por Murashige y Skoog (1962) y con él fue posible establecer el cultivo y obtener un rápido crecimiento de células de tabaco (*Nicotina tabacum*). Este medio es conocido como "MS" (por las iniciales de los investigadores) y consiste en una solución de nutrientes minerales (alta concentración de nitrógeno), vitaminas, fuente de carbono (Ver anexo II) (Murashige y Skoog, 1962; Starling y Dodds, 1983; Merino, 1991; Debergh *et al.*, 1994). Los nutrientes minerales son esenciales y permiten el crecimiento y desarrollo de una planta *in vivo* y por lo tanto cumple con las características apropiadas para que se germinen y cultiven una gran cantidad de tejidos de diferente especies (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). En la actualidad este medio es el más usado y se le atribuye un gran potencial para soportar todas las fases de la organogénesis (Mauseth, 1977).

Es importante la fuente de material vegetal o explante a utilizar (Collin y Edwards, 1998). Un explante es todo aquel órgano, tejido o segmento (semilla, embrión, hoja, tallo, cotiledón, raíz u órgano reproductor), que es utilizado para el inicio del CTV (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

El CTV permite la obtención de miles de plantas en un tiempo relativamente corto. Esta característica es de suma importancia para fines de producción, investigación, horticultura, entre otras, ya que la producción masiva de plantas ayuda a evitar la colecta de aquellas que están en alguna categoría de amenaza o riesgo en sus ambientes naturales, y ayuda a que las poblaciones que estén perturbadas se



repongan si las plantas propagadas por estas técnicas son reintroducidas a su hábitat natural.

El CTV es utilizado como herramienta fundamental en un número importante de áreas y técnicas de la investigación y la producción vegetal, todas ellas relacionadas con lo que actualmente se conoce como biotecnología vegetal.

Algunas de las aplicaciones más importantes son (Chawla, 2009):

- Estudios básicos de anatomía, desarrollo y nutrición vegetal.
- Variación somaclonal y gametoclona a través de selección celular.
- Aislamiento de protoplastos, utilizado para realizar fusión celular (hibridación somática) e ingeniería genética.
- Producción de plantas haploides a través de cultivo de anteras, polen, ovarios u óvulos aislados.
- Rescate de óvulos fecundados y embriones de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos.
- Ingeniería Genética: incluye todas las técnicas que utilizan organismos vivos o sus componentes para producir o modificar sus productos (producción de líneas transgénicas).
- Micropropagación vegetal o propagación *in vitro*.
- Embriogénesis somática.
- Cultivo de meristemas para la eliminación de virus y enfermedades presentes en las plantas.
- Producción de fitoquímicos o producción de sustancias de metabolismo secundario.

Otras ventajas de la micropropagación son: la obtención de plantas libres de patógenos, la posibilidad de propagar plantas imposibles de reproducir vegetativamente en cultivo convencional y el uso de un espacio reducido de almacenamiento (Hartmann *et al.*, 1990; Debergh y Zimmerman, 1991).

## **2.7 Micropropagación**

Se han desarrollado diversas técnicas de propagación vegetativa debido a la necesidad de producir plantas genéticamente iguales, con el fin de retener características a la especie vegetal en cuestión.

La micropropagación puede definirse como la propagación *in vitro* de plantas a partir de células o tejidos en un ambiente controlado, por medio de técnicas asépticas, el uso de recipientes apropiados y un medio definido (Debergh y Zimmerman, 1991):

Un protocolo de micropropagación se divide en cinco etapas

- Etapa 0 - Selección del material vegetal
- Etapa 1.- Establecimiento *in vitro*
- Etapa 2.- Inducción y proliferación de brotes (multiplicación)
- Etapa 3.- Elongación y enraizamiento de los brotes
- Etapa 4.- Aclimatización

Etapa 0: Consiste en la selección y preparación del material vegetal que se va a propagar. La planta madre debe estar sana y debe ser competente, es decir, capaz de generar nuevos individuos. Se recomienda cultivar las plantas madre en

invernaderos controlados para evitar plagas o contaminaciones antes de iniciar el cultivo *in vitro*, aunque también el explante inicial puede provenir de plantas previamente establecidas *in vitro* (Debergh y Zimmerman, 1991).

Etapa 1: Consiste en el establecimiento del cultivo en condiciones asépticas (sin contaminaciones) y la producción de una cantidad considerable de explantes con una alta capacidad de proliferación. La edad fisiológica del explante y su tamaño son factores de suma importancia en esta etapa (Debergh y Zimmerman, 1991).

Para evitar la contaminación del medio de cultivo y de los explantes seleccionados antes de la inoculación a un medio estéril, el material vegetal o explante se somete a un lavado con detergente y a un proceso de desinfección en soluciones como etanol, hipoclorito de sodio, agua oxigenada, cloruro de mercurio, nitrato de plata, fungicidas, antibióticos, entre otros. Las concentraciones y tiempos de exposición varían dependiendo del tipo de material vegetal. También es común el uso de soluciones surfactantes como el Tween80® para romper la tensión superficial del agua y permitir a las soluciones estar en contacto directo con el material vegetal (Debergh y Zimmerman, 1991). El medio de cultivo consiste de un material de soporte (gelificantes como agar, papel filtro), una mezcla de sales con los elementos esenciales (macronutrientes) y los elementos traza (micronutrientes), una fuente de carbono (generalmente sacarosa) y suplementos vitamínicos. Es recomendable usar como explantes fragmentos de plantas jóvenes o de plántulas obtenidas por semillas germinadas *in vitro*, debido a que su potencial morfogenético es mayor y se reduce considerablemente la incidencia de contaminación tanto bacteriana como fúngica. Después de varias semanas en

cultivo y dependiendo del crecimiento de la planta, la masa vegetal es dividida y subcultivada en medio de cultivo fresco. Ese proceso se repite hasta que un cultivo uniforme y de crecimiento regular se produce. En este momento los explantes están listos para la siguiente etapa (Hartmann *et al.*, 1990).

Etapa 2: En esta etapa se induce la formación y proliferación de brotes adicionando hormonas al medio de cultivo. Las hormonas más empleadas en la micropropagación son las auxinas y las citocininas. Las auxinas generalmente se utilizan para promover la formación de callo (masa amorfa de células indiferenciadas) e inducen la formación de raíces; entre las empleadas con mayor frecuencia se encuentran el Ácido Naftalenacético (ANA), el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y el Ácido Indolacético (AIA). Las citocininas son utilizadas para romper la latencia de las yemas axilares, y en general en la proliferación de brotes; algunas de las más utilizadas son la Benciladenina (BA) y la Kinetina (K). En la inducción y proliferación de brotes generalmente se emplea una mayor concentración de citocininas respecto de las auxinas, sin embargo, es necesario determinar el balance hormonal más adecuado para cada especie (Hartmann *et al.*, 1990; Debergh y Zimmerman, 1991).

Etapa 3: La tercera etapa consiste en la elongación y el enraizamiento de los brotes producidos. Comúnmente la elongación puede obtenerse al transferir los brotes de un medio de multiplicación a un medio adecuado para su elongación. El enraizamiento puede llevarse a cabo *in vitro* a la par de la elongación o puede ser *ex vitro*. Generalmente para el enraizamiento *in vitro* se necesita un medio con altos niveles de auxinas y con bajos o nulos niveles de citocininas.

Etapa 4: La última etapa consiste en la aclimatización de las plantas obtenidas a un ambiente *ex vitro*, mediante este proceso se pretende maximizar su sobrevivencia. Las plántulas en condiciones *in vitro* son en gran parte heterótrofas, debido a la fuente de carbono provista en el medio de cultivo, y por tanto, su actividad fotosintética es muy baja. Además, las condiciones propias del cultivo *in vitro* pueden inducir alteraciones morfofisiológicas en las plantas como lo es la baja funcionalidad de los estomas, la escasa producción de ceras epicuticulares, e hiperhidratación, debido a que están expuestas a una alta humedad relativa. Bajo esta situación, las plantas *in vitro* son extremadamente sensibles al cambio a condiciones *ex vitro*. Es por eso que en esta última etapa, las plantas deben mantenerse en un ambiente con una alta humedad relativa y gradualmente exponerse a un ambiente más aproximado al natural (Hartmann *et al.*, 1990; Debergh y Zimmerman, 1991).

## **2.8 Reguladores de crecimiento vegetal**

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos orgánicos que influyen en el crecimiento y desarrollo. Por lo general actúan en un lugar diferente en el que son producidos. Están presentes en múltiples tejidos vegetales y son activos en muy pequeñas cantidades. Se les conoce como hormonas vegetales a los sintetizados de forma natural por las plantas, aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético que pueden tener una actividad semejante a los primeros. Al conjunto de hormonas vegetales naturales y sintéticas se les denomina reguladores de crecimiento vegetal y son los

responsables de la diferenciación, crecimiento y funcionamiento de todos los órganos de la planta (Pierik, 1990).

Existen varias clases de reguladores de crecimiento, algunos muy bien conocidos y denominados "clásicos " como son: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (George *et al.*, 2008). También existen otros reguladores de crecimiento cuyos efectos han sido recientemente descritos entre los cuales se encuentran: los brasinoesteroides, jasmonatos y el ácido salicílico (Symons *et al.*, 2007; Chawla, 2009).

En el CTV se agregan reguladores de crecimiento a los medios para obtener una mayor respuesta en el tejido o incluso manipular el desarrollo de una planta. Los más usados son las auxinas y las citocininas. El crecimiento de las plantas *in vitro* y su morfogénesis, son el resultado de la interacción de los reguladores adicionados al medio de cultivo (exógenos) y los producidos por la planta de manera endógena. (Gaspar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2003; Razdan, 2003)

### **2.8.1 Auxinas**

Las auxinas son sintetizadas en las yemas, hojas jóvenes, frutos y embriones. En el CTV tienen diversas aplicaciones dependiendo de su concentración y el tipo de explante empleado. Tienen la capacidad de inducir la producción de callo y raíces, así como el crecimiento de tallos. Están relacionadas con la dominancia apical, elongación y división celular en el cambium vascular, promueven la síntesis de la pared celular. Junto con las citocininas, las auxinas estimulan la diferenciación del

xilema y floema. En altas concentraciones exógenas pueden inducir la embriogénesis somática (Evans *et al.*, 2003).

En condiciones *in vitro*, altas concentraciones de estos reguladores pueden resultar tóxicas, en gran parte porque éstas estimulan la producción de etileno, el cual provoca la inhibición del crecimiento. Las auxinas más empleadas son: Ácido Naftalenacético (ANA), ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido Indolacético (AIA) y ácido Indolbutírico (AIB) (Gaspar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2003; Trigiano y Gray, 2004).

### **2.8.2 Citocininas**

Las citocininas se sintetizan de manera natural en zonas meristemáticas de raíces y embriones. Promueven la división y expansión celular. Rompen la dominancia apical y contrarrestan la latencia de la semilla. En condiciones *in vitro* promueven la diferenciación en el callo. Altas concentraciones de citocininas *in vitro* pueden inhibir el desarrollo de raíces y la formación de brotes muy pequeños los cuales no logran desarrollarse y alcanzar la madurez. Las citocininas más utilizadas son Benciladenina (BA), Kinetina (Kin), Dimetilaminopurina (2iP) y Zeatina (Z) (Gaspar *et al.*, 1996; Haberer y Keiber, 2002; Trigiano y Gray, 2004).

La principal función de las auxinas y citocininas es reprogramar a las células que se han diferenciado. La reprogramación celular consiste en una desdiferenciación de las células para después rediferenciarse a una nueva ruta de desarrollo de la planta.

El crecimiento y la organogénesis *in vitro* están altamente relacionadas con los reguladores endógenos y exógenos. A menudo es necesario llevar a cabo barridos hormonales que consisten en formar gradientes de diferentes concentraciones con uno o varios reguladores de crecimiento para determinar la combinación y concentración de reguladores que promueva la respuesta deseada. Las interacciones suelen ser complejas y más de una combinación de ambos reguladores de crecimiento puede producir los mejores resultados (Pollard y Walker, 1990).

## **2.9 Micropropagación de plantas insectívoras**

El cultivo *in vitro* de plantas insectívoras cobra importancia cuando se necesita material vegetal en grandes cantidades con fines de investigación o extracción de metabolitos secundarios, en especial cuando sus poblaciones son escasas (Perica y Berljak, 1996). Se ha establecido el cultivo *in vitro* en varias especies de plantas insectívoras en especies del género *Drosera*, debido a que producen plumbagina, un fitoquímico extraído con fines farmacéuticos por sus actividades antiespasmódicas y antibióticas (Bonnet *et al.*, 1984b; Crouch *et al.*, 1990; Gupta *et al.*, 1993).

Las especies del género *Drosera* que se han cultivado *in vitro* exitosamente son: *D. binata* La Billardiere (Caniato *et al.*, 1989; Anthony, 1992), *D. capensis* L. (Caniato *et al.*, 1989; Crouch *et al.*, 1990; Anthony, 1992), *D. natalensis* Diels (Crouch y Van Staden, 1988; Crouch *et al.*, 1990; Finnie y Van Staden, 1993), *Drosera regia*



Stephens (Janssens, 1986), *D. rotundifolia* L. (Simola, 1978; Bonnet *et al.*, 1984a; Kukulczanka y Czastka, 1987; Anthony, 1992; Bobák *et al.*, 1995), y *D. spatulata* Labill. (Blehová *et al.*, 1990, 1992).

Las naftoquinonas son otro tipo de compuestos secundarios, empleados en remedios tradicionales para ciertos tipos de tos. Son producidas por *Dionaea muscipula* J. Ellis (también conocida como Venus atrapamoscas), las cuales se pueden extraer a partir de células en suspensión y cultivo *in vitro* de esta especie (Hook, 2001; Marczak *et al.*, 2005). El establecimiento *in vitro* de esta planta se ha logrado exitosamente usando tallos florales como explantes (Teng, 1999) y un método de micropropagación se ha establecido a partir del cultivo de ápices (Jang *et al.*, 2003).

*Nepenthes khasiana* Hooker es la única una planta insectívora de este género en la India, la cual posee propiedades medicinales y se encuentra en peligro de extinción. Se ha propagado *in vitro* empleando yemas axilares (Latha y Seeni, 1994). Otra especie del mismo género propagada *in vitro* a partir de semillas es *N. albomarginata*, cuyas plantas fueron posteriormente cortadas y tratadas con reguladores de crecimiento como ANA y BA (Sukamto *et al.*, 2011).

Ko *et al.* (2010) describieron un método para la micropropagación de *Cephalotus follicularis* Labill a partir de cultivo de raíces e incrementaron la producción masiva de esta especie usando medio Murashige y Skoog (MS) con distintas concentraciones de macronutrientes. Posteriormente Tuleja *et al.* (2014) establecieron protocolos para mejorar las condiciones *in vitro* en las que esta

planta crece debido a que no se desarrolla de forma normal en presencia de altas concentraciones de nitrógeno provenientes del medio MS. Se ha observado que las plantas cultivadas *in vitro* producen trampas muy pequeñas y se encuentran formando brotes constantemente. Los autores redujeron la concentración del medio MS al 25% y las plantas se desarrollaron con una apariencia similar a las plantas *ex vitro*, aunque aún presentaron una apariencia débil.

Los trabajos sobre cultivo *in vitro* en el género *Pinguicula* son escasos (Tabla. 1). El primer reporte fue el de Adams *et al.* (1979) quienes trabajaron con *P. moranensis* Kunth usando hojas como explante. Por su parte Davies (1993), reportó el establecimiento *in vitro* de diversas especies de *Pinguicula*, empleando medio MS sin la adición de reguladores de crecimiento, y logró obtener hasta 100 plantas de *P. esseriana* B. Kirchn a partir de sólo dos hojas como explante inicial. Posteriormente Gonçalves *et al.* (2008) consiguió la propagación *in vitro* de *P. lusitanica*, una especie medicinal de la Península Ibérica, de gran valor farmacéutico y con capacidad de propagación vegetativa muy limitada. Coelho (2009) repitió la micropropagación de *P. lusitanica* L. e hizo ensayos con *P. vulgaris* L., además de otras especies insectívoras como *Drosera intermedia* Hayne y *D. rotundifolia* L. a partir de semillas germinadas *in vitro*, con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos producidos por el material vegetal. Debido a la escasez de material vegetal de *P. vulgaris*, esta especie se descartó y sólo se evaluó a *P. lusitanica*, la cual mostró una mayor actividad antioxidante, comparada con *D. intermedia* y *D. rotundifolia*, lo cual abrió nuevas

posibilidades de considerar al género *Pinguicula* como una fuente potencial de antioxidantes.

Clapa *et al.* (2010) lograron la inducción de brotes a partir de hojas y ápices de *P. vulgaris*, una especie europea, empleando los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) a distintas concentraciones de Kinetina y BAP, utilizando diferentes agentes gelificantes (Agar vegetal e Isubgol). Los mejores resultados se obtuvieron del cultivo de hojas de verano en medio MS 100% gelificado con agar y únicamente con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP (97.4 brotes por explante).

Saetiew *et al.* (2011) estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de Bencil Adenina (BA) y Ácido Naftalenacético (ANA) en la inducción de brotes a partir de hojas de *Pinguicula gigantea*, una especie mexicana. Obtuvieron un máximo de 27.75 brotes por explante de hoja en medio MS 100% adicionado con  $2/0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA/ANA.

Grevenstuk y Romano (2012) establecieron *P. vulgaris* a partir de la germinación de semillas en medio MS al 25% y posteriormente evaluaron el efecto de BA y Zeatina. Reportan que esta especie se desarrolla mejor sin la adición de reguladores de crecimiento en medio MS 25%.

Tabla 1: Trabajos de propagación *in vitro* de diferentes especies del género *Pinguicula*.

Especie	Lugar de origen	Explante	Medio de cultivo	Fuente de carbono (g/L-1)	Gelificante (g/L-1)	Respuesta	Referencia
<i>P. moranensis</i>	México	Hojas	MS 20%	Sacarosa (30)	Agar (8)	Organogénesis directa	Adams <i>et al.</i> (1979)
<i>P. esseriana</i>	México	Hojas	MS 33%	Sacarosa (15)	Agar (8)	Organogénesis directa	Davies (1993)
<i>P. lusitanica</i>	Europa	Semillas	MS 25% y MS 50%	Sacarosa (20)	Agar (7)	Germinación	Gonçalves <i>et al.</i> (2008)
<i>P. vulgaris</i>	Europa	Semillas	MS 25% y MS 50%	Sacarosa (20)	Agar (7)	Germinación	Coelho (2009)
<i>P. vulgaris</i>	Europa	Hojas	MS 100%, DKW 100%	Azúcar (30)	Agar (6), Isubgol (15)	Organogénesis directa	Clapa <i>et al.</i> (2010)
<i>P. gigantea</i>	México	Hojas	MS 100%	Sacarosa (30)	Agar (8)	Organogénesis directa	Saetiew <i>et al.</i> (2011)
<i>P. vulgaris</i>	Europa	Semillas	MS 25%	Sacarosa (20)	Agar (10)	Germinación y organogénesis directa	Grevenstuk y Romano (2012)

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que son nulos los estudios sobre la germinación de semillas y cultivo *in vitro* de *Pinguicula moctezumae* Zamudio & R.Z. Ortega (Lentibulariaceae), especie de distribución restringida, y por lo tanto vulnerable a la extinción, se empleará el cultivo de tejidos vegetales como una estrategia para su propagación y conservación.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la propagación *in vitro* de *Pinguicula moctezumae* Zamudio & R.Z. Ortega (Lentibulariaceae).

#### 4.2 Objetivos particulares

- Establecer la técnica de desinfección para las semillas y definir el medio de cultivo más apropiado para la germinación de éstas.

- Evaluar a través de un barrido hormonal, la combinación de bencilaminopurina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) que promueva la mayor formación de brotes.
- Evaluar la respuesta de explantes de hoja de dos tamaños diferentes.
- Realizar el establecimiento *ex vitro* de las plantas obtenidas por germinación *in vitro* y micropropagación.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico

Se obtuvieron semillas de *Pinguicula moctezumae* obtenidas a partir de polinizaciones controladas (Autopolinización manual de *P. moctezumae*: Véase Anexo III) de plantas cultivadas en condiciones de invernadero. Dichas semillas se colectaron entre los meses de agosto y octubre de 2013 y se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel hasta su siembra.

### 5.2 Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

Para las pruebas de germinación se utilizó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) (Composición del medio MS: Véase Anexo II) en las siguientes concentraciones: 25%, 33%, 50%, 75% y 100% de sus sales a todos los medios se les agregó  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, se ajustó el pH entre 5.7-5.8 y se adicionó con  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar bacteriológico Bioxón®. Los medios se esterilizaron durante 18 minutos en autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  y con bajo una presión de  $1.5 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Para evitar que se perdieran las semillas durante el proceso de desinfección, se colocaron 30 semillas de *P. moctezumae* en sobres de papel filtro de 2 x 2 cm, que a su vez se introdujeron en otros sobres de papel filtro de mayor tamaño que se cerraron con grapas. La técnica de desinfección consistió en sumergir los sobres en una solución de etanol 70% (v/v) durante 30 segundos, seguido de cloro comercial al 10% (v/v) (6% de cloro activo) adicionado con tres gotas de Tween-80 durante 15 minutos, todo el proceso en constante agitación. Posteriormente en condiciones asépticas se realizaron cuatro enjuagues de un minuto cada uno con agua destilada esterilizada. Se sembraron 30 semillas por caja petri con 30 ml de medio con las diferentes concentraciones de sales (MS 25%, MS 33.33%, MS 50%, MS 75% y MS 100%), se sembraron tres cajas por tratamiento, constituyendo un total de 15 cajas,

Se registró el número de semillas germinadas por tratamiento a lo largo de siete semanas y se consideró como criterio de germinación cuando emergió la radícula. Se llevó a cabo el registro fotográfico de este proceso cada ocho días con ayuda de una cámara digital instalada en un microscopio estereoscópico Leica LAS EZ 4HD.

### **5.3 Elongación de plantas y micropropagación**

Para promover el crecimiento de las plántulas obtenidas de la germinación, después de permanecer entre tres y seis meses en el medio de germinación (en cajas Petri), se transfirieron a medio MS 50% sin reguladores de crecimiento

(medio de elongación, en frascos Gerber®), donde permanecieron durante dos meses.

Aquellas que alcanzaron una roseta de 2 a 5 cm de diámetro (Fig. 7A y B) se seleccionaron para obtener dos tipos de explantes: hojas chicas (de 0.5 a 2 cm de largo) y hojas grandes (de 2.5 a 3.5 cm de largo) (Fig. 7C). Las hojas se individualizaron con ayuda de pinzas, tirando de arriba hacia abajo las hojas para desprenderlas completamente sin romperlas. Se sembraron tres hojas chicas por frasco (Fig. 7D) y dos hojas grandes por frasco (Fig. 7E) en medio MS 50% adicionado con BA (0, 0.1, 1, 2 mg·L<sup>-1</sup>) en combinación con ANA (0, 0.1, 0.5 mg·L<sup>-1</sup>) conformando un total de 12 tratamientos, cada uno con 8 frascos y 20 explantes (12 hojas chicas y 8 hojas grandes), dando lugar a 96 frascos con 240 explantes (Clapa *et al.*, 2010; Saetiew *et al.*, 2011). Una vez al mes, durante 3 meses se realizó el conteo de brotes generados.

Después de tres meses de incubación, los brotes obtenidos se individualizaron y se subcultivaron en medio MS al 50% sin reguladores de crecimiento para promover su crecimiento, desarrollo y posterior aclimatización.

Todos los cultivos se incubaron a 25°C, fotoperiodo 12/12 e intensidad luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

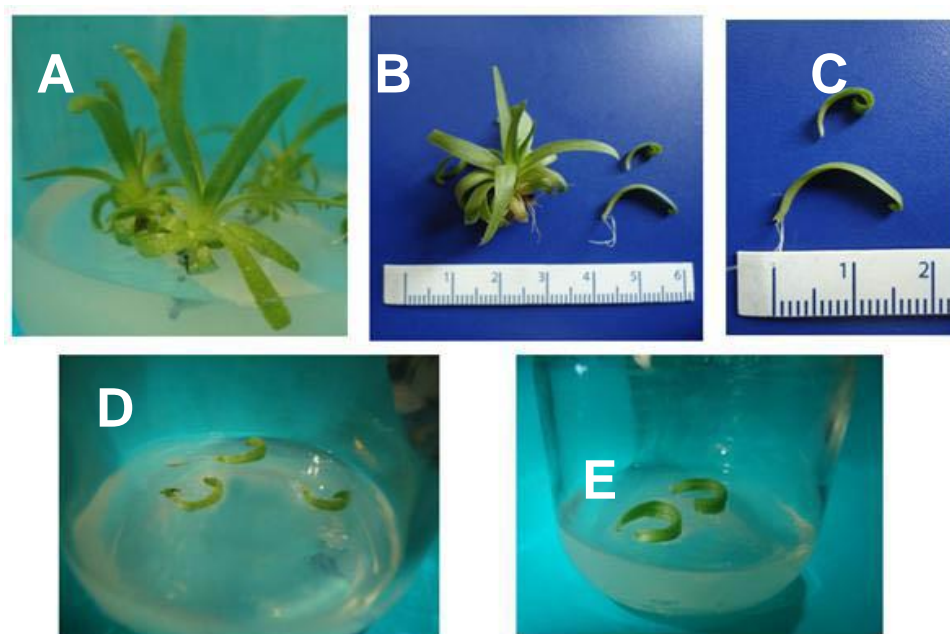


Fig. 7. Obtención de los explantes de hoja de *Pinguicula moctezumae*. (A) Plantas provenientes de la germinación en el medio de elongación; (B y C) Planta madre mostrando hojas chicas y grandes como explantes; (D y E) Siembra de explantes en el medio de inducción.

#### 5.4 Aclimatización

La aclimatización de plantas obtenidas por germinación *in vitro*, así como las obtenidas por la micropropagación a partir de hojas, se realizó de la siguiente forma: se lavaron las raíces con abundante agua destilada para eliminar los restos del medio. Posteriormente fueron transferidas a charolas de plástico con tapa transparente con sustrato esterilizado compuesto de peat moss/vermiculita en proporción (2:1) o peat moss/agrolita también en proporción (2:1). El sustrato se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a temperatura de 120°C y presión 1.5 Kg·cm<sup>-2</sup>. Las charolas se mantuvieron en las mismas condiciones controladas donde se incubaron los frascos. Una vez que se observó que las plantas continuaron con su crecimiento, las tapas de plástico se abrieron ligeramente para



reducir la humedad relativa y permitir que las plantas se aclimatizaran. Después de dos semanas, las tapas se retiraron definitivamente.

### **5.5 Análisis estadísticos**

Para evaluar la germinación en los diferentes medios empleados, se realizó el registro semanal de las semillas germinadas, considerando como criterio de germinación la emergencia de la radícula. Se obtuvieron las medidas de tendencia central (promedio), de dispersión (error estándar), cada semana de los diferentes tratamientos. Se realizó el conteo del número de brotes por explante y se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para hojas chicas y hojas grandes, posteriormente se realizaron la prueba de ANOVA y de Tukey para separar las medias en grupos con diferencias significativas. Se utilizó el programa SPSS Statistics 17.0 (2011) para hacer dichos análisis estadísticos y la hoja de cálculo de Excel para elaborar las gráficas correspondientes.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Desinfección de las semillas y establecimiento *in vitro*

Coelho (2009) empleó una concentración del 20% de hipoclorito de sodio (NaOCl comercial 6%) durante el proceso de desinfección de semillas de *P. vulgaris* y *P. lusitanica*. En contraste, en el presente trabajo se utilizó el mismo compuesto al 10% siendo igual de eficiente, aunque este resultado puede ser no significativo ya que este autor utilizó una proporción de cloro activo del 5% y eso compense la concentración final. A diferencia de Coelho (2009), en la metodología propuesta se incluyó alcohol 70% para garantizar la asepsia y se observó que no inhibió la germinación. Con la técnica de desinfección empleada no se presentó contaminación en los cultivos y la mayoría de las semillas iniciaron la germinación entre los 5 y 7 días después de la siembra. Por lo tanto los reactivos y concentraciones de las sustancias empleadas en la presente investigación son las indicadas, al menos para *P. moctezumae*.

### 6.2. Descripción de la germinación

Las semillas colectadas y deshidratadas presentan un color marrón oscuro (Fig. 8A). Después de la desinfección, el hipoclorito de sodio provocó que la cubierta seminal se tornara transparente, y se evidenciara el embrión que es de color marrón claro (Fig. 8B). A los cuatro días de la siembra, el embrión se tornó de color verde pálido, posiblemente debido a la activación del metabolismo de éste y se observan pelos radiculares en el hipocótilo (Fig. 8C). A partir del quinto día se produjo la rotura de la cubierta seminal causada por la emergencia de la radícula con evidentes pelos radiculares y el crecimiento de los cotiledones (Fig. 8D).

Después del sexto día continuó la elongación del hipocótilo junto con la elongación de los pelos radiculares (Fig. 8E). Al octavo día, los cotiledones se liberan de la cubierta seminal y se hicieron evidentes (Fig. 8F-8H). Las primeras hojas verdaderas se observaron a los trece días y a los quince días se detuvo el crecimiento de la raíz primaria y empezaron a emerger raíces adventicias de las bases de las primeras hojas verdaderas (Fig. 8I-8K), y las glándulas pedunculadas, encargadas de la producción de mucílago, se hicieron cada vez más notorias (Fig. 8L).

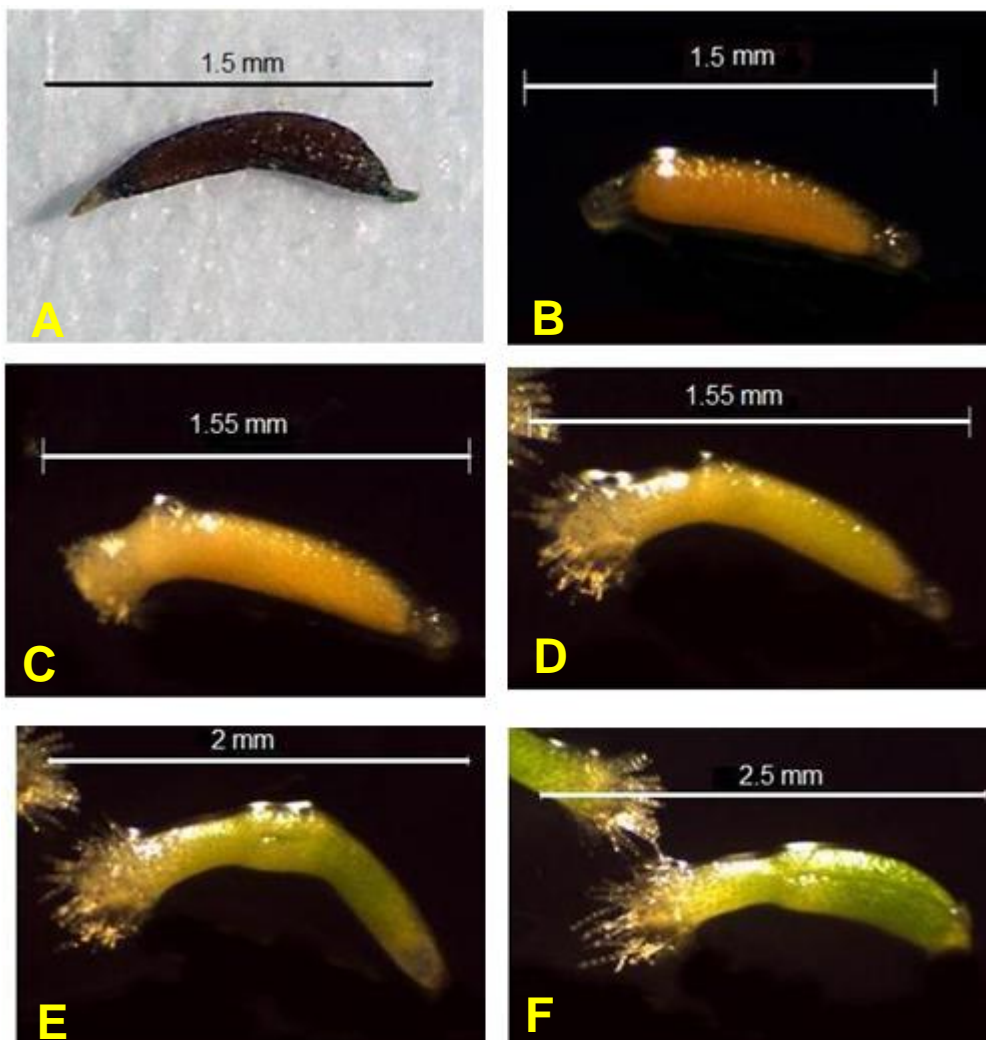


Fig. 8. Distintas fases del desarrollo de las plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de *P. moctezumae*. A: Semilla colectada. B: Semilla después de la desinfección. C-D: Emergencia de la radícula. E: Elongación del hipocótilo. F: Desprendimiento de la cubierta seminal

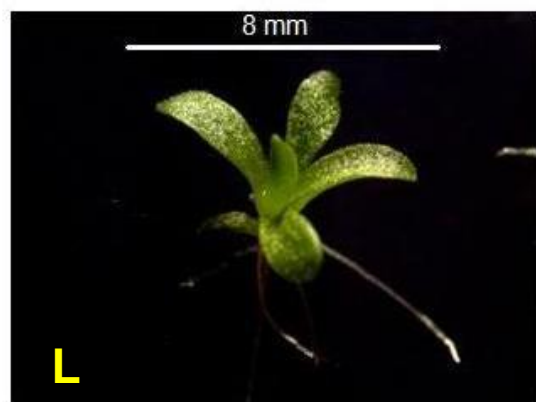
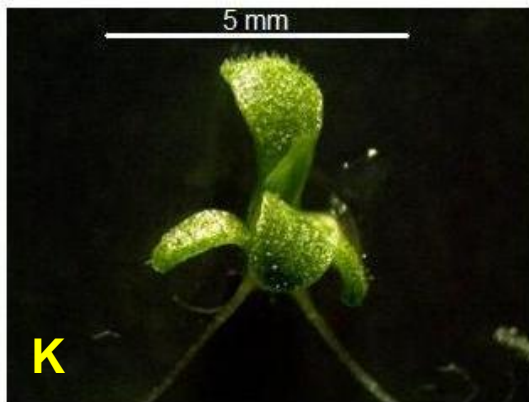
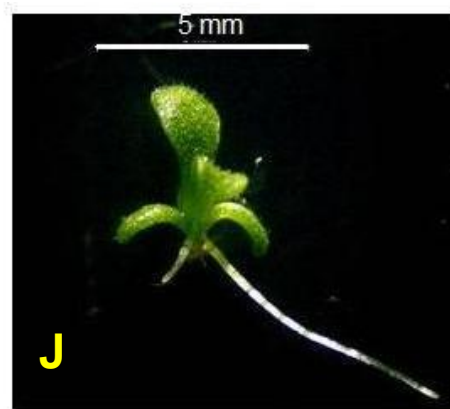
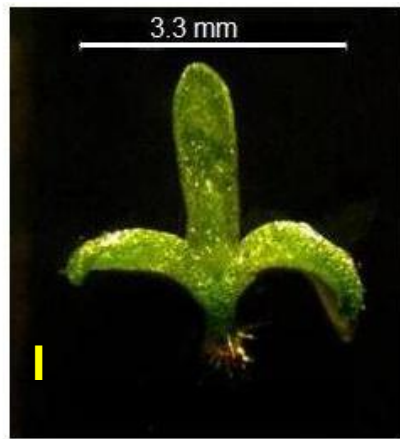
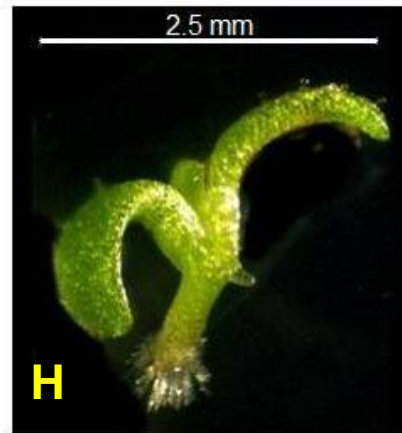
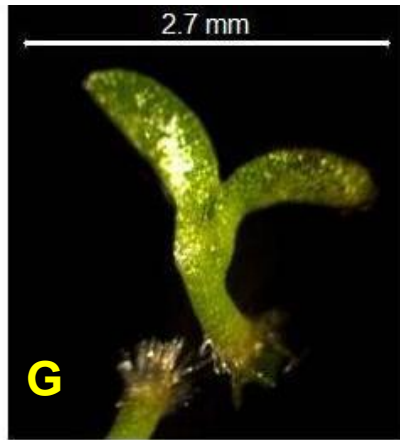


Fig. 8 (Continuación) G: crecimiento de los cotiledones. H: Atrofia de la raíz primaria. I-L: Crecimiento de raíces adventicias y desarrollo de hojas verdaderas con glándulas que secretan mucílago.

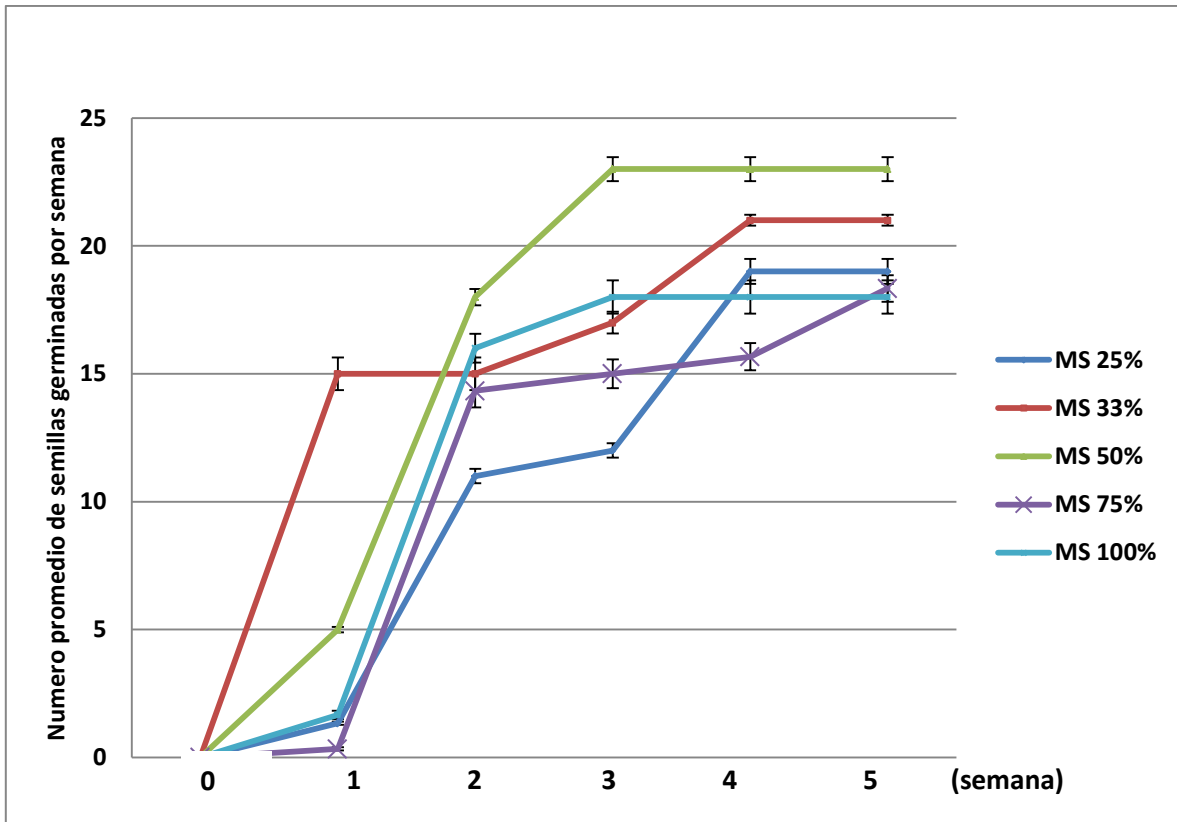
### **6.3. Evaluación de la germinación con diferentes concentraciones de sales en el medio**

Después de evaluar la germinación durante cinco semanas, se observaron diferencias en el porcentaje y tiempo en que se lleva a cabo este proceso. De manera general el inicio de la germinación se presentó entre los cinco y siete días, siendo más notorio en la concentración de MS 33%, ya que en una semana el 50% de las semillas ya habían germinado. En el resto de los tratamientos la germinación registrada en la primera semana fue de entre 2 y 15%. El 50% de germinación en el resto de los tratamientos se registró entre la segunda y cuarta semana (Gráfica 1).

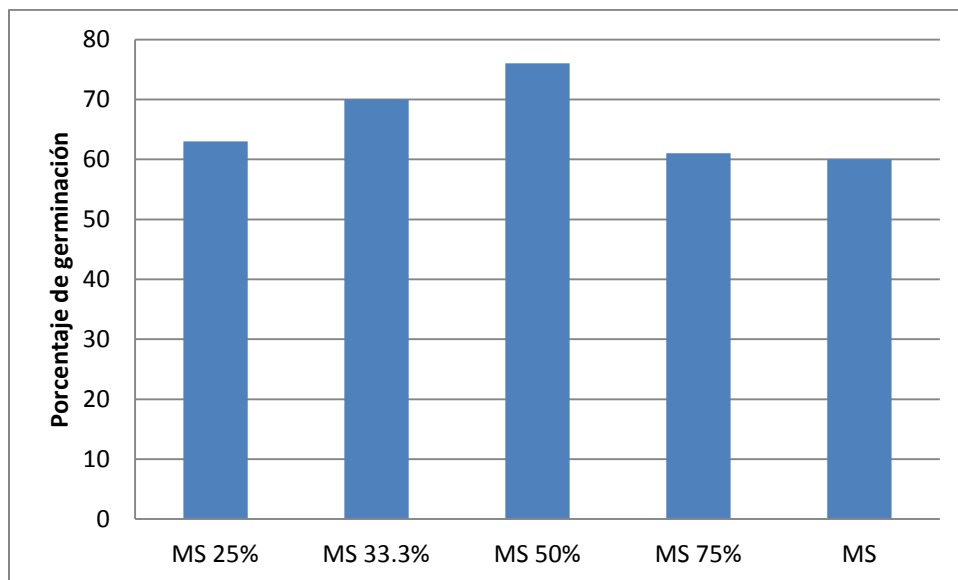
En la primera semana se hizo evidente el incremento paulatino de la germinación, alcanzando el 16% en el medio MS 50%, seguido de MS 100% y MS 25% (5.5 y 4.4% respectivamente) y MS 75% (1%), mientras que en el MS 33%, la germinación se estabilizó en 50%.

Se incrementaron los porcentajes de germinación en la segunda semana de incubación, registrando en los medios MS 25% (38%), MS 33% (50%), MS 50% (60%), MS 75% (48%) y MS 100% (55%) hasta que finalmente alcanzaron el máximo porcentaje de germinación en la quinta semana. Los porcentajes de germinación finales fueron: el 63% en MS 25%; el 70% en MS 33%; el 76% en MS 50%; el 61% en MS 75% y el 60% en MS 100% (Gráfica 1 y 2).

Se observa que en los medios que contienen una proporción de sales del 50% o menor, los porcentajes de germinación son muy similares, y que al incrementarse la cantidad de sales, estos porcentajes disminuyen.



Gráfica. 1. Curvas de germinación *in vitro* de semillas de *Pinguicula moctezumae* sembradas en diferentes concentraciones de sales de medio Murashige y Skoog (1962).



Gráfica. 2. Porcentajes finales de germinación *in vitro* de *Pinguicula moctezumae* después de su siembra en las diferentes concentraciones de sales de medio MS . A la quinta semana se registró el 63, 70, 76, 61 y 60%, respectivamente.

Coelho (2009), reporta que semillas de *Drosera intermedia* germinaron a la segunda semana de haber sido sembradas en medio MS 25%, en *P. moctezumae* este resultado es muy parecido en las semillas que fueron inoculadas en medio MS 50%, aunque el porcentaje de germinación en *D. intermedia* fue del 80% en relación a *P. moctezumae* que mostró sólo el 76% de germinación. Las diferencias pueden deberse a que son especies que habitan en diferentes ambientes, pero también debido a una inhibición de la germinación causada por la presencia de sales relacionadas con efectos osmóticos y tóxicos. La presencia de sales en el medio disminuye el potencial hídrico, provocando una menor disponibilidad de agua para las semillas, de manera que éstas deben generar suficiente potencial osmótico para mejorar el estatus hídrico de los embriones y permitir su crecimiento (Goycokic y Saavedra 2007). El estrés osmótico también podría potenciar la síntesis de ABA que es uno de los principales causantes de la latencia en semillas (Raghavendra *et al.*, 2010). Yoshida *et al.* (1973 citado por Cárdenas-Villegas, 2002), señala que el medio de cultivo Murashige y Skoog, presenta un potencial osmótico de  $-0.23$  MPa de los macronutrientes y de  $-0.22$  MPa de la sacarosa, por lo que el potencial osmótico del medio combinado es de  $-0.45$  MPa, que es uno de los más negativos comparado con el de White (1943) que es de  $-0.19$  MPa siendo el MS un medio con el potencial hídrico más negativo, lo que dificulta la entrada de agua a la semilla. Otros investigadores han relacionado las altas concentraciones de sales con efectos tóxicos debido a la captación y acumulación de iones (Turkan y Demiral, 2009), a lo anterior se suma el estrés oxidativo induciendo la presencia de enzimas que provocan la oxidación de lípidos,

proteínas y ácidos nucleicos alterando el metabolismo de las células (Rai *et al.*, 2011).

Es probable que las altas concentraciones de sales presentes en el medio hayan disminuido el porcentaje de germinación de las semillas de *P. moctezumae*, y aunque el medio haya tenido bajas concentraciones de sales la concentración de sacarosa fue alta ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en todas ellas, lo que pudo influir en los porcentajes obtenidos, por lo cual probablemente al disminuir la concentración de sacarosa de forma proporcional a la cantidad de sales, se incremente la germinación.

#### **6.4 Crecimiento *in vitro* y oxidación**

Las plantas obtenidas de los diferentes tratamientos de germinación *in vitro* presentaron un tamaño de 0.7 a 1 cm de diámetro entre las 5 y 8 semanas mientras crecían en cajas Petri. Después de que fueron subcultivadas en frascos Gerber ® con MS 50% (medio de elongación) y que permanecieron allí durante dos meses, alcanzaron un diámetro entre 3 a 5 cm, mostraron apariencia vigorosa (Fig. 9) y fueron seleccionadas como fuente de explante para el barrido hormonal.



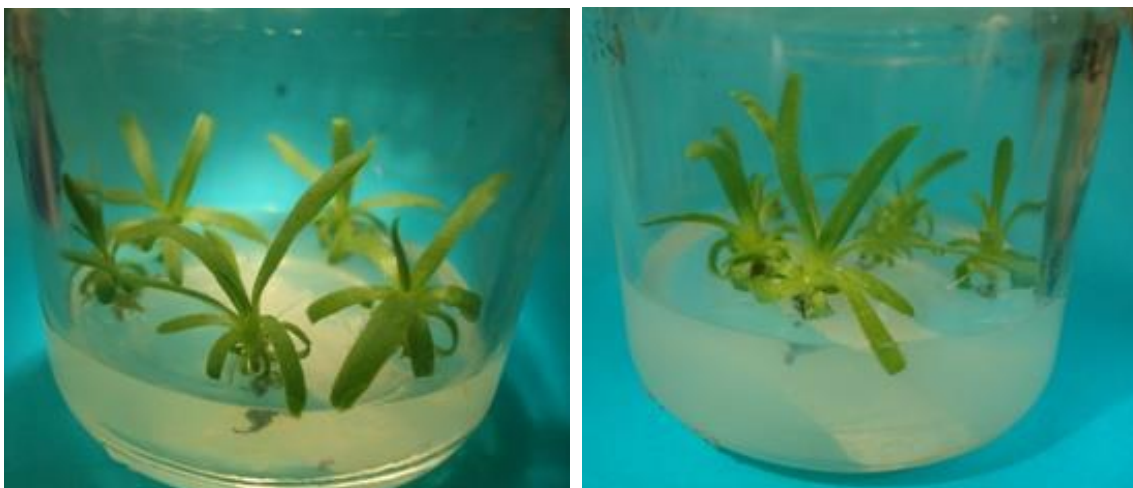


Fig.9. Plantas de *P. moctezumae* subcultivadas a medio de elongación (MS 50%) e incubadas durante dos meses. Se observan morfológicamente bien diferenciadas y vigorosas.

Se presentó el 70% de oxidación severa y la consecutiva muerte de plantas que permanecieron por más de cuatro meses en el medio de elongación sin ser subcultivadas a un medio fresco. La oxidación inició en los bordes de las hojas, las cuales empezaron a tornarse de color amarillo pálido, avanzó hasta la base de las hojas que posteriormente adquirieron un color café oscuro, aunque el ápice aún presentaba crecimiento de hojas nuevas sin oxidación (Fig. 10A). En esta etapa las plantas aún podían ser subcultivadas a medio fresco y se observó una pronta recuperación. Sin embargo, en aquellas que no fueron subcultivadas, la oxidación avanzó hasta el ápice y las plantas se necrosaron totalmente. (Fig. 10B). Las principales causas de oxidación en explantes cultivados *in vitro* son: producción de radicales libres, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden reaccionar con óxido nítrico y formar especies reactivas de nitrógeno (RNS). La célula vegetal sometida a un estrés produce ROS y RNS, los cuales provocan la producción de enzimas polifenol oxidasas (PPOs), las cuales están directamente relacionadas con la senescencia y muerte

del explante. (Bhat y Chandel 1991; George, 1996; Vatanpour-Azghandi *et al.*, 2002; Tang y Newton, 2004; Gratão *et al.*, 2005; Pompeu *et al.*, 2008).

Se pueden usar diversas estrategias para disminuir o evitar la oxidación, por ejemplo: el uso de explantes en estado juvenil, el uso de explantes etiolados por haber crecido en condiciones de baja luminosidad o incluso oscuridad, subcultivos frecuentes, el uso de materiales adsorbentes como el carbón activado, uso de agentes antioxidantes como el ácido cítrico, disminución del pH del medio, el uso de reguladores de crecimiento, el crecimiento de las plántulas a temperaturas más bajas, entre otros (George, 1996; Cassells y Curry 2001; Van Staden *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2008). En este caso, las plantas que presentaron oxidación se recuperaron con éxito al ser subcultivadas a medio MS 50% fresco, y se determinó que los subcultivos periódicos (cada 2-3 meses) son necesarios para el mantenimiento *in vitro* de esta especie.

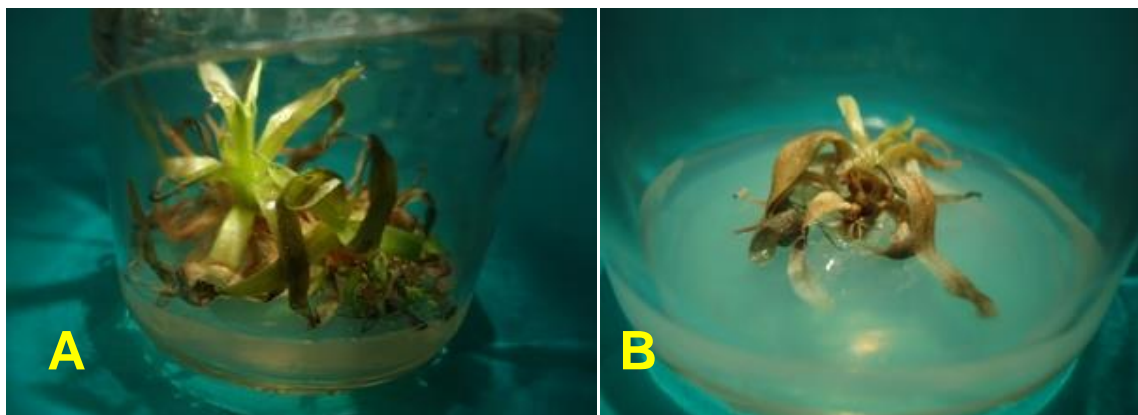


Fig. 10. Plantas oxidadas de *Pinguicula moctezumae*. (A) Planta con hojas oxidadas en las puntas pero con el ápice vivo. (B) Planta completamente oxidada.

## 6.5 Organogénesis

### a) Activación de yemas axilares

Se observó la activación de las yemas axilares tanto en hojas grandes como en hojas chicas, con la formación de uno a tres brotes en la base de la hoja (Fig.11) principalmente en aquellos tratamientos que no presentaban auxina, en el grupo control (sin reguladores de crecimiento) y en las combinaciones BA/ANA 0/0.1 y 0.1/0.1 mg·L<sup>-1</sup>.

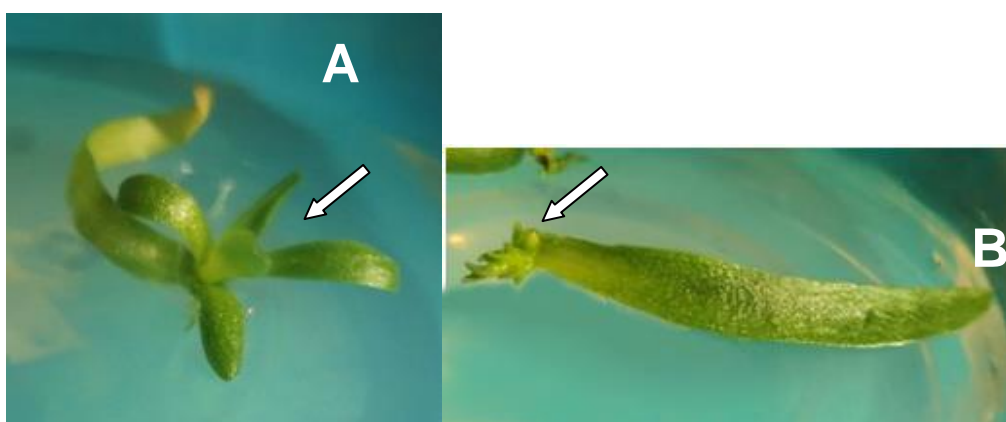


Fig. 11. Explantes de hojas grandes con escasos brotes formándose en la base (flecha). (A) Tratamiento control y (B) Tratamiento BA/ANA 2/0 mgL<sup>-1</sup>. Ambos a los 31 días después de la siembra

Los brotes que se originaron en la parte basal de la hoja, muy probablemente se desarrollaron a partir de la yema axilar. En un inicio, la base de la hoja al ser desprendida de la planta madre, no mostraba yemas aparentes (Fig. 12A), después de 7 días fue evidente el crecimiento de una yema en desarrollo de apariencia globular y de color café-verdoso (Fig.12B), la cual a los 15 días de la siembra, dio lugar al desarrollo de hojas (Fig. 12C) y posteriormente a los 21 días a la diferenciación de las raíces adventicias (Fig. 12D).

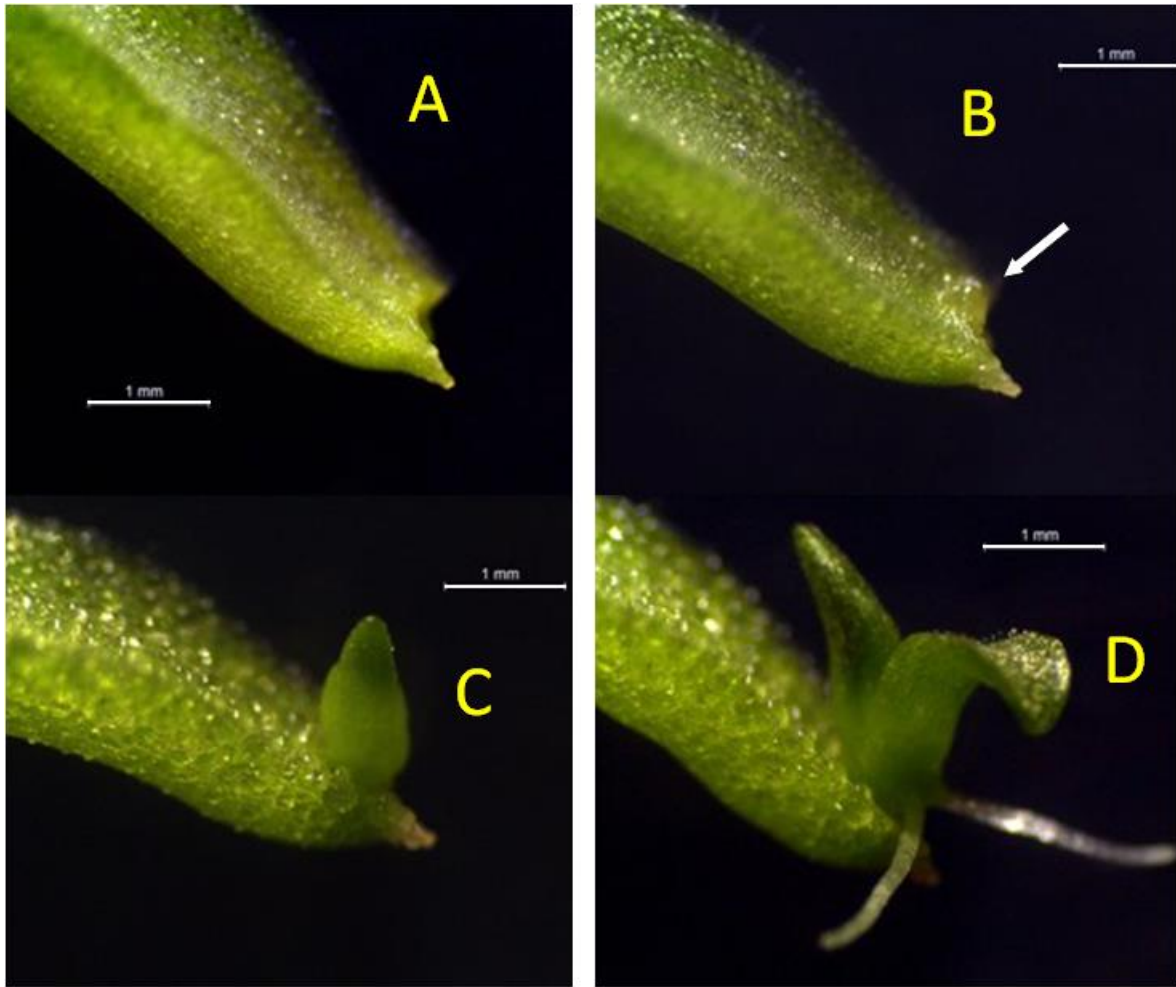


Fig. 12. Desarrollo de brotes a partir de explante de hoja grande (tratamiento control): (A) Explante recién sembrado en el medio, posteriormente se observó el desarrollo de: (B) la yema axilar (flecha) a los 7 días, (C) de hojas incipientes a los 15 días y (D) de raíces a 21 días de su siembra. Barra = 1 mm

El desarrollo de brotes en la base de las hojas es común, no sólo en hojas cultivadas *in vitro*, sino que forma parte de la reproducción asexual propia del género (Legendre, 2000). Algunas especies mexicanas producen hojas suculentas durante los meses de invierno, que se pueden desprender fácilmente de la planta y formar nuevos individuos (Studnicka, 1991; Legendre, 2000). Esta forma de propagación es muy conocida por cultivadores y aficionados a las plantas

insectívoras, y es una de las principales vías de reproducir especies cultivadas de este género (The International Carnivorous Plant Society, 2012).

#### **b) Brotes adventicios por organogénesis directa**

Se observó el desarrollo de brotes adventicios en los dos tipos de explante, la morfogénesis se presentó a lo largo del borde de la lámina foliar (Fig. 13). El mayor número de brotes por explante se registró en el tratamiento BA/ANA 2/0.5 mgL<sup>-1</sup> con 7.75±1.66 brotes por hoja chica y 7.37±2.44 brotes por hoja grande (Tabla 1 y 2).

La formación de brotes adventicios se presentó principalmente en los tratamientos BA/ANA 2/0.1, 0/0.5, 1/0.5, 2/0.5 para los dos tipos de explantes (Fig. 13) (Tabla 1 y 2), aunque en menor proporción se presentó de forma esporádica en otros tratamientos. Al parecer la presencia de la auxina juega un papel importante en la formación de brotes adventicios, ya que en los tratamientos donde está ausente o en concentraciones bajas (0.1 mgL<sup>-1</sup>), la respuesta es la de activación de las yemas axilares, ya que es posible considerar que en estas zonas la presencia de auxinas endógenas será importante y en conjunción con el regulador de crecimiento adicionado al medio de cultivo promueve su proliferación.

Los brotes en el margen de la hoja son comunes en algunas especies europeas y norteamericanas de *Pinguicula* (*P. vulgaris*, *P. primuliflora*), las cuales los producen de manera natural como forma de reproducción vegetativa. Sin embargo la formación natural de estos brotes es extremadamente rara en especies mexicanas, cuya formación se restringe casi exclusivamente a la base de la hoja en plantas cultivadas (Casper, 1966; Legendre, 2000; The International

Carnivorous Plant Society, 2012), de modo que la presencia de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo es un factor determinante para la aparición de brotes en el margen de las hojas.



Fig. 13. Explantes con brotes adventicios. (A) Tratamiento BA/ANA 2/0.5 mgL<sup>-1</sup>. (B) Tratamiento BA/ANA 2/0.1 mgL<sup>-1</sup> Ambos a los 31 días después de la siembra.

No se observó diferencia alguna en la formación de brotes en el tratamiento control y en los tratamientos sin auxinas, en ambos tipos de explantes (hojas grandes y chicas), ninguno parece haber formado brotes adventicios sin la adición de la auxina ANA (ver Tabla 2 y 3). Esto podría deberse a que las auxinas están relacionadas con la desdiferenciación de los tejidos y el desarrollo de callo (Evans *et al.*, 2003). También es relevante el área de contacto que tiene el explante con el medio y la curvatura que presenten las hojas, ya que se observó que la aparición de brotes adventicios incrementa a mayor superficie de contacto con el medio. Si un explante está curvado y solamente está en contacto con el medio un lado de la hoja o en los extremos de esta, los brotes sólo se desarrollarán en la zona en donde hoja y el medio hacen contacto, (Fig. 13A y 13B). Una opción para

incrementar el número de brotes puede ser seccionando las hojas para que éstas tengan una mayor superficie de contacto con el medio de inducción.

## 6.6 Análisis de datos

La mayor cantidad de brotes generados por tratamiento se presentó para los dos tipos de explantes en la concentración 2/0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA/ANA (7.75 brotes por hoja chica y 7.37 brotes por hoja grande), seguido de 2/0.1 mg·L<sup>-1</sup> BA/ANA (3.66 y 3.87 brotes por hoja chica y grande respectivamente). En las hojas chicas la presencia de 0.5 mgL<sup>-1</sup> de la auxina sola o en combinación con la citocinina fue la que formó mayor cantidad de brotes por tratamiento. Se observó una relación proporcional entre el número de brotes regenerados y la concentración empleada de reguladores de crecimiento, ya que al incrementar la concentración de éstos, aumentó el número de brotes por explante, tanto en hojas chicas como en hojas grandes (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Número de brotes obtenidos a partir de hojas chicas como explantes de *P. moctezumae* después de tres meses. AYA= Activación de yemas axilares; B. Adv= Brotes adventicios

Tratamiento	Concentración BA/ANA (mg·L <sup>-1</sup> )	Respuesta	Número de explantes	Brotos por tratamiento	Promedio de brotes por explante ± error estándar
1	0/0	AYA	12	24	2±0.32
2	0.1/0	AYA	12	20	1.66±0.37
3	1/0	AYA	12	26	2.16±0.44
4	2/0	AYA	12	22	1.83±0.49
5	0/0.1	AYA	12	25	2.08±0.41
6	0.1/0.1	AYA	12	14	1.16±0.36
7	1/0.1	AYA	12	20	1.66±0.31
8	2/0.1	B.Adv	12	44	3.66±0.86
9	0/0.5	B.Adv	12	40	3.33±1.38
10	0.1/0.5	AYA	12	28	2.33±0.25
11	1/0.5	B.Adv	12	33	2.75±0.69
12	2/0.5	B.Adv	12	93	7.75±1.66

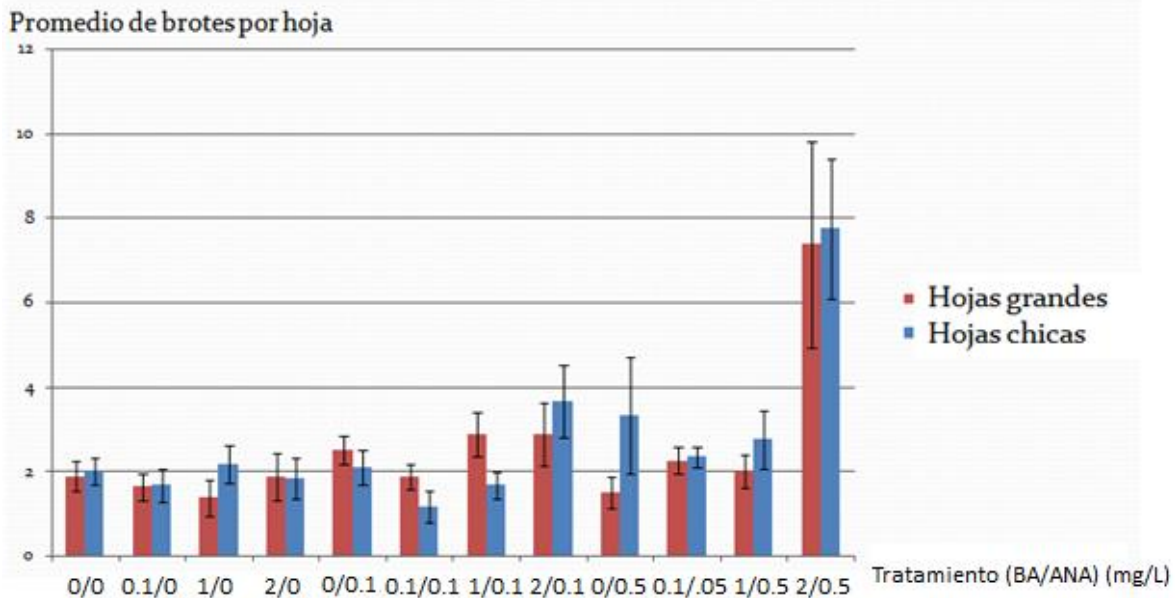


Tabla 3. Número de brotes obtenidos a partir de hojas grandes como explantes de *P. moctezumae* después de tres meses. AYA= Activación de yemas axilares; B. Adv= Brotes adventicios

Tratamiento	Concentración BA/ANA (mg·L <sup>-1</sup> )	Respuesta	Número de explantes	Brotes por tratamiento	Promedio de brotes por explante ± error estándar
1	0/0	AYA	8	15	1.87±0.35
2	0.1/0	AYA	8	13	1.62±0.32
3	1/0	AYA	8	11	1.37±0.42
4	2/0	AYA	8	15	1.87±0.55
5	0/0.1	B.Adv	8	20	2.5±0.32
6	0.1/0.1	AYA	8	15	1.87±0.29
7	1/0.1	AYA	8	23	2.87±0.51
8	2/0.1	B.Adv	8	23	2.87±0.74
9	0/0.5	B.Adv	8	12	1.5±0.37
10	0.1/0.5	AYA	8	18	2.25±0.31
11	1/0.5	B.Adv	8	16	2±0.37
12	2/0.5	B.Adv	8	59	7.37±2.44

El análisis estadístico muestra diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en cuanto a producción de brotes, tanto en las hojas chicas (F=5.157, P = 0.00) como en hojas grandes (F=3.865, P = 0.00), distinguiéndose BA/ANA 2/0.5 mg·L<sup>-1</sup> como la mejor concentración que produce el mayor número de brotes, en ambos tipos de explante con un promedio de 7.75 brotes por hoja chica y 7.37 brotes por hoja grande, En la Gráfica 3 se muestran los promedios de brotes por hoja para cada tratamiento.





Gráfica 3. Promedio de brotes por hoja de *Pinguicula moctezumae* para cada tratamiento. Se observa que en el tratamiento 2/0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA/ANA hay diferencias significativas en comparación con los 11 tratamientos restantes, para ambos tamaños de hoja.

Estos resultados se asemejan a los de Saetiew *et al.* (2011), quienes obtuvieron el mayor número de brotes en hojas de *P. gigantea* con 2/1 mg·L<sup>-1</sup> BA/ANA (21.75 brotes por explante). Si bien éste número de brotes por explante es el triple del obtenido en este trabajo para *P. moctezumae* (7.37 y 7.75), esto podría deberse a que las hojas de *P. gigantea* son de forma redondeada, con una lámina bastante más amplia y con más superficie de contacto en comparación con *P. moctezumae*, cuyas hojas lanceolado-lineares apenas alcanzan 0.5 cm de ancho, por lo cual el área en la que pueden surgir los brotes adventicios en *P. gigantea* es mucho mayor con hojas de hasta 5 cm de ancho.

Coelho (2009) evaluó únicamente el efecto de las citocininas Zeatina y Kinetina en *P. vulgaris* a una concentración de 0.5 mg·L<sup>-1</sup> cada una, y obtuvo 3.87 y 3.05 brotes por explante de hoja respectivamente. Por otro lado Clapa *et al.* (2010) reportan que el mayor número de brotes producidos por hoja en *P. vulgaris* fue de

97.4 únicamente adicionando  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA. Por otro lado, Grevenstuk y Romano (2012) obtuvieron el mayor número de brotes (7.62) por explante de hoja en el medio sin reguladores de crecimiento (MS al 25%), en comparación con los medios suplementados con BA y Zeatina. Los resultados obtenidos por Coelho (2009) y Grevenstuk y Romano (2012) con *Pinguicula vulgaris* indican que las altas concentraciones de reguladores de crecimiento inhiben la formación de brotes, mientras que con bajas concentraciones o sin reguladores de crecimiento se obtiene una alta tasa de multiplicación para esta especie. Esto contrasta con lo obtenido para *P. gigantea* y *P. moctezumae*, en las cuales se incrementa el número de brotes por explante según se aumente la concentración de reguladores de crecimiento. Esto sugiere que a pesar de pertenecer al mismo género, las especies europeas como *P. vulgaris*, tienen un comportamiento muy diferente en cultivo *in vitro* comparado con el de *P. gigantea* y *P. moctezumae*, especies mexicanas.

### **6.7. Crecimiento *in vitro***

Se observó que entre los 50 y 60 días posteriores a la siembra, los brotes alcanzaron una mayor talla (entre 1.5 cm y 3 cm) en el tratamiento control y en los que se emplearon bajas concentraciones de BA/ANA (0/0.1, 0.1/0, 0.1/0.1  $1/0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Fig. 14), en comparación con los tratamientos cuyas concentraciones de BA/ANA fueron más altas (2/0.1, 0/0.5 y 2/0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), en los cuales el crecimiento fue escaso (entre 3 y 7 mm) en el mismo periodo de tiempo (Fig. 15). Después del barrido hormonal, las plantas se desarrollaron de forma normal cuando fueron transferidas a medio de elongación (MS 50% sin reguladores de crecimiento).

Para fines comerciales o de investigación, si se requiere un gran número de plantas, independientemente de su tamaño, se recomienda cultivar hojas grandes o chicas en el tratamiento BA/ANA 2/0.5 mg·L<sup>-1</sup>, por otro lado, si lo que se necesita son plantas grandes, vigorosas y en poco tiempo, se recomienda establecer cultivos con alguna de las siguientes combinaciones de BA/ANA: 0/0.1, 0.1/0, 0.1/0.1 1/0 mg·L<sup>-1</sup>.

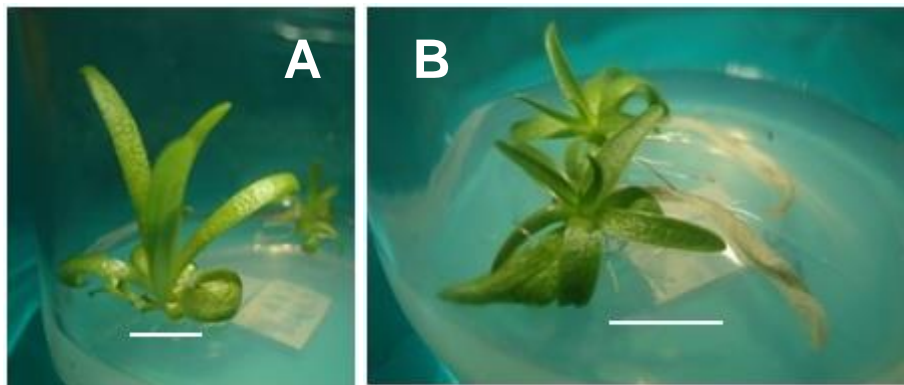


Fig. 14. Desarrollo de brotes en la base de la hoja de *Pinguicula moctezumae* (A) Tratamiento BA/ANA 0/0.5 mgL<sup>-1</sup> a los 48 días. (B) Tratamiento BA/ANA 0.1/0 mgL<sup>-1</sup> a los 62 días. Se observa de uno a tres brotes por hoja con un acelerado crecimiento. Barra= 1 cm.

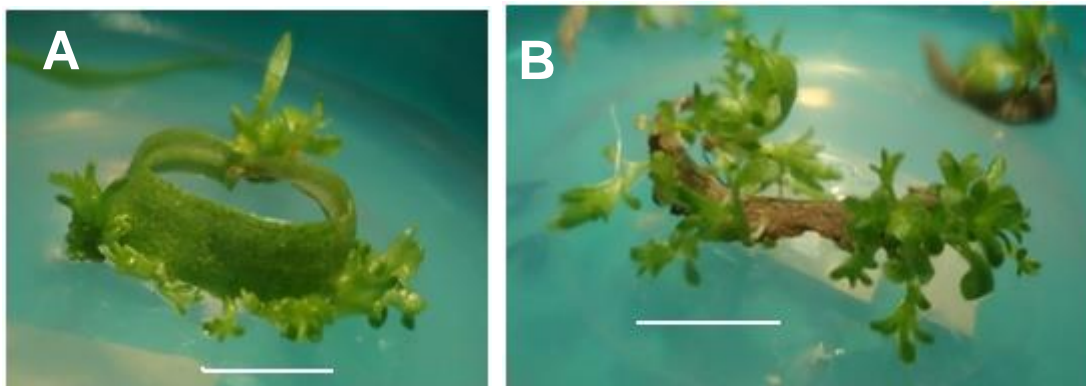


Fig. 15. Desarrollo de brotes en el margen de la hoja de *Pinguicula moctezumae* (A) Tratamiento BA/ANA 2/0.5 mgL<sup>-1</sup> a los 48 días (B) Tratamiento BA/ANA 0/0.5 mgL<sup>-1</sup> a los 62 días. Se observan numerosos brotes con un escaso crecimiento. Barra= 1 cm.

## 6.8 Aclimatización

Cuando las plantas obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro* alcanzaron una longitud de entre 2 y 4 cm de diámetro, se aclimatizó un total de 234 plantas en una mezcla de peat moss/vermiculita (2:1). Después de tres meses se registró el 94.4% de supervivencia (221 plantas vivas), el 5.5% restante no sobrevivió debido a eventos esporádicos de contaminación por hongos y problemas de deshidratación por falta de riego constante.

A los 12 meses posteriores a su germinación *in vitro*, todas las plantas alcanzaron su talla adulta (entre 6 y 10 cm de diámetro) y se observó una floración constante una vez alcanzado este tamaño (Fig. 16).



Fig. 16. Plantas adultas de *P. moctezumae* después de 12 meses de su germinación *in vitro* en sustrato peat moss/vermiculita (pura) 1:2.

Un segundo lote de plantas, éstas provenientes de la micropropagación, se aclimatizó siguiendo el protocolo establecido anteriormente, pero utilizando vermiculita proveniente de una fuente distinta, la cual tenía un color marrón, a diferencia de la usada anteriormente con color azul metálico. Las plantas que

permanecieron en este sustrato presentaron necrosis y finalmente murieron en un periodo de 2 a 3 meses (0% de supervivencia) (Fig. 17). Las plantas que presentaban menos signos de necrosis en las hojas fueron transferidas a un nuevo sustrato compuesto de peat moss/perlita (también llamada agrolita) 2:1, de las cuales sólo sobrevivió el 20%.

Para dar una breve explicación, a una muestra de suelo con vermiculita de color marrón, se le realizó un análisis químico (análisis elemental y de absorción atómica, realizado en el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM) el cual reveló que el sustrato empleado en el segundo lote de aclimatación estaba realmente en una proporción 1:1 peat moss/vermiculita, y además este segundo componente presentaba contaminación por arcilla, la cual le dio el color marrón.



Fig. 17. Plantas provenientes de micropropagación muriendo tras 2 meses de aclimatación en sustrato peat moss/vermiculita 1:1 contaminado con arcilla.



Un tercer lote de plantas, también provenientes de micropropagación, fue aclimatizado en una mezcla compuesta de peat moss/perlita (también llamada agrolita) en proporción 2:1. Las plantas presentaron un 95% de supervivencia a los tres meses y mostraron un aspecto vigoroso (Fig. 18).



Fig. 18. Plantas obtenidas de micropropagación creciendo en peat moss/perlita 2:1, a los 4 meses de su aclimatización.

La arcilla se compone principalmente de silicato de aluminio hidratado, sin embargo, aún pueden encontrarse en diferentes arcillas oligoelementos tales como titanio, magnesio, cobre, zinc, aluminio, calcio, potasio, níquel, manganeso, litio, sodio y hierro. Tanaka *et al.* (1966) describen los efectos de toxicidad del hierro. De manera general las plantas presentan manchas dispersas de color marrón rojizo en las hojas inferiores, puntos repartidos en las hojas, la hoja entera se vuelve marrón y las hojas inferiores comienzan a tornarse de color gris oscuro y

mueren. Estos síntomas son similares a los que presentaron las plantas micropropagadas de *P. moctezumae* que crecieron en el sustrato contaminado por arcilla (Fig. 17).

Las plantas aclimatizadas exitosamente en los sustratos peat moss/vermiculita pura (2:1) y peat moss/perlita (2:1) no sólo alcanzaron su tamaño adulto, sino que también produjeron flores, mismas que fueron polinizadas manualmente (véase Anexo III), dando lugar a frutos y semillas (Fig. 19).



Fig. 19. (A) Flor, (B) fruto y (C) semillas de plantas aclimatizadas de *P. moctezumae* obtenidas de germinación *in vitro* y micropropagación.

Las semillas producidas por plantas germinadas *in vitro* (87 semillas), como aquellas de plantas provenientes de micropropagación (84 semillas), fueron sembradas asépticamente en medio MS al 50% para determinar su viabilidad, fue posible observar que germinaron entre los 5 y 8 días posteriores a su siembra (Fig. 21) y no se observaron plántulas con anomalías. Se registró 65.5% de

germinación de la semillas producidas por plantas germinadas *in vitro* (57 plantas vivas), y un 83.3% de las semillas producidas por plantas micropropagadas (70 plantas vivas). Lo que demuestra que las plantas sometidas al proceso *in vitro* no han reducido su capacidad regenerativa.



Fig. 21. Germinación de semillas y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Pinguicula moctezumae* procedentes de plantas aclimatizadas previamente germinadas *in vitro* y micropropagadas.



## 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró establecer la técnica de desinfección que permitió el establecimiento *in vitro* de *Pinguicula moctezumae*. Se determinó que la concentración de sales de medio Murashige y Skoog (1962) más favorable para la germinación de semillas fue MS 50%, obteniendo el 76% debido a concentraciones menores o mayores de sales reducen el porcentaje de germinación.

Se realizó la descripción y documentación detallada de la germinación de semillas *in vitro*, permitiendo documentar este proceso que pocas veces se ha reportado.

Se obtuvo la micropropagación de *P. moctezumae* por organogénesis directa a través de la activación de yemas axilares y por brotes adventicios en todas las combinaciones ensayadas, siendo más significativo en BA/ANA 2/0.5 mg·L<sup>-1</sup> generando 7.75 brotes por explante en hojas chicas y 7.37 brotes por explante en hojas grandes, así mismo fue posible observar que los dos tipos de explantes ensayados (hojas chicas y hojas grandes) tienen la misma capacidad de regeneración y que una posible estrategia para potenciar esta capacidad es utilizar fragmentos de hoja para tener una mayor superficie de contacto con el medio de cultivo que es la zona donde se desarrollan los brotes adventicios.

Durante el cultivo *in vitro* de esta especie, se presentaron fenómenos de oxidación y necrosis, los cuales pueden ser solventados con el subcultivo periódico y frecuente del material biológico en medio fresco, para evitar que presenten signos de necrosis si permaneces por más de cuatro meses en el mismo medio de cultivo. Se logró la aclimatización *ex vitro* de plantas provenientes de la germinación de semillas *in vitro* como de las plantas micropropagadas. Fue posible observar su

desarrollo hasta la formación de flores, que fueron polinizadas manualmente, dando lugar a los frutos con semillas que se sembraron en medio Murashige y Skoog y fueron capaces de germinar, lo que nos indica que las plantas de *P. moctezumae* provenientes de estas técnicas conservan su potencial regenerativo por la vía sexual, no presentaron malformaciones y son fértiles colocando, a esta técnica de propagación como una estrategia viable para ser utilizada con fines comerciales, de conservación, investigación, de esta forma minimizando la necesidad de extraer plantas del hábitat natural.

## 8. ANEXOS

### **Anexo I Clasificación taxonómica y descripción botánica de *Pinguicula moctezumae* Zamudio et R.Z. Ortega.**

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsidae

ORDEN: Lamiales

FAMILIA: Lentibulariaceae

GÉNERO: *Pinguicula* L.

ESPECIE: *P. moctezumae* Zamudio et R. Z. Ortega

Planta herbácea perenne. Hojas basales arrosetadas, dimórficas, en dos series; las de "invierno" 20 a 30, 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, las de "verano" 8-15(20), erectas, lineares a lanceolado-lineares, de (50)60-100(130) mm de largo por (3)5-8 mm de ancho en la base, densamente cubiertas en el haz por glándulas sésiles y glándulas estipitadas menores de 0.5 mm, margen revoluto, escasamente ciliado en la base, de color verde claro, cuando jóvenes el ápice es incurvado o espiralado, el margen involuto, ciliado en la base. Hibernáculos ausentes. Pedúnculos 1-5 por planta, erectos, filiformes, glandular-puberulentos, glabrescentes hacia la base, de (60)70-140 mm de alto, unifloros. Flores de (35)45-55(65) mm de largo (incluyendo el espolón), cáliz bilabiado, glandular-puberulento por fuera, el labio superior profundamente tripartido, lóbulos triangular-lanceolados, labio inferior bilobado

hasta 3/4 de su longitud, lóbulos oblongo-lanceolados, de 2-4.5 mm de largo por 1-2 mm de ancho; corola bilabiada, rosa o violáceo-purpúrea con la garganta blanca; labio superior bilobado, lóbulos circulares, oblatos a ampliamente cuneados con el ápice redondeado, de (8)10-13 mm de largo, por (9)10-16 mm de ancho, cubriéndose entre sí, labio inferior un poco mayor, trilobado, los lóbulos circulares, de (9)10-15 mm de largo, por (8)10-15 mm de ancho; con frecuencia cubriéndose entre sí. Tubo cortamente infundibuliforme, blanco-verdoso, de 5-8 mm de largo, paladar ausente, glandular-puberulento por fuera, piloso en su interior, con pelos cilíndrico-subulados irregularmente agrupados. Espolón cilíndrico-subulado, de (25)28-35(38) mm de largo, violáceo-purpúreo, verde en el ápice, con pelos subulados en su interior. Ovario subgloboso, glandular-estipitado. Estigma bilabiado, violáceo, el lóbulo inferior mayor que el superior, suborbicular, fimbriado. Cápsula subglobosa, de 4-6 mm de largo, por 4-4.5 mm de ancho, glandular-pubescente. Semillas numerosas, fusiformes, de  $\pm 1$  mm de largo por 0.2-0.25 mm de ancho.

**Anexo II Formulación y proporción de sales y componentes orgánicos presentes en el medio Murashige y Skoog.**

A partir de las soluciones madre se hicieron los cálculos correspondientes para elaborar los medios correspondientes.

<b>Macronutrientes (g·L<sup>-1</sup>)</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65
KNO <sub>3</sub>	1.9
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17
CaCl <sub>2</sub> ·2·H <sub>2</sub> O	0.44
<b>Micronutrientes (g·L<sup>-1</sup>)</b>	
KI	0.00083
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.01689
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0086
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.000025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.000025
<b>Solución Hierro-EDTA (g·L<sup>-1</sup>)</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0278
<b>Vitaminas</b>	
Ácido nicotínico	0.0005
Piridoxina-HCl (B6)	0.0005
Tiamina-HCl (B1)	0.0001
<b>Aminoácidos (g·L<sup>-1</sup>)</b>	
Inositol	0.1
Glicina	0.002
Sacarosa	30
Agar	8
<b>pH</b>	<b>5.7~5.8</b>

### Anexo III Autopolinización manual de *P. moctezumae*

La autopolinización manual consistió en introducir un palillo en el tubo de la corola formado por la fusión de los pétalos, a manera de simular la probóscide del lepidóptero que poliniza a estas flores en la naturaleza. El polen se adhiere al palillo y posteriormente se coloca en el estigma de la flor (Fig. 22). Las flores no polinizadas manualmente entran en senescencia y se secan sin producir frutos, mientras que las polinizadas presentaron el crecimiento de la cápsula que contiene las semillas (Fig. 23). Las semillas obtenidas de las pruebas de polinización se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel.



Fig. 22. Polinización manual de *P. moctezumae*: Flor abierta (A), introducción de un palillo (B) y polen adherido al palillo (C).



Fig. 23. Pruebas de autopolinización. (A) muestra control, que no recibió autopolinización manual, presenta senescencia y no produjo semillas; (B) cápsula que presentó crecimiento después de dos semanas de la autopolinización manual; (C) 69 semillas fértiles obtenidas de autopolinización (cuadrícula de 5 mm).

## 9. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Adamec, L. 1997. Mineral nutrition of carnivorous plants: a review. *The Botanical Review*, 63:273-299.
- Adams R. M., S. S. Koenigsberg y R. W. Langhans. 1979. *In vitro* propagation of the butterwort *Pinguicula moranensis* HBK. *HortScience* 14:701-712.
- Ahmad K. M., S. Saima y J. I. Mirza. 2009. *In vitro* regeneration of venus fly trap (*Dionaea muscipula* Ellis) from leaf explant. *Hortscience* 44:1042.
- Anthony J.L. 1992. *In vitro* propagation of *Drosera* spp. *HortScience* 27:850.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20:153-175. 2009
- Bhat S. y K. Chandel. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports* 10:358-361
- Blehová A., V. Somsakovay y M. Bobak. 1990. Anatomical studies of the development of new plants from the leaves of the sundew (*Drosera spatulata* L.) *in vitro* conditions. *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitas Comenianae Physiol. Plant.* 24:33–42.
- Blehová, A., K. Erdelsky, y M. Bobak. 1992. Cultivation of organ and callus culture of *Drosera spatulata* Labill. in *in vitro* conditions. *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitas Comenianae. Physiol. Plant.* 28:93–102.
- Bobák M., A. Blehová, J. Kriřtín, M. Ovečka y J. Namaj. 1995. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 43:43-49
- Bonnet M., M. Coumans, J.L. Ramaut y T. Gaspar. 1984a. Vegetative multiplication *in vitro* of the sundew *Drosera rotundifolia*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie Physiol. Biochim.* 92:16–17.
- Bonnet M., M. Coumans, M. Hofinger, J.L. Ramaut y T. Gaspar. 1984b. High performance gas chromatography of 1,4-naphtoquinones from Droseraceae. *Chromatographia* 18:621–622.

- Brewer J. S., D. J. Baker, A. S. Nero, A. L. Patterson, R. S. Roberts, L. M. Turner. 2011. Carnivory in plants as a beneficial trait in wetlands. *Aquatic Botany* 94:62–70.
- Brown J. T. y B. V. Charlwood. 1990. Organogenesis in Callus Culture. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (Eds.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, *Plant Cell and Tissue Culture*. Human press. New Jersey. 65-70.
- Caniato R., R. Filippini y E.M. Cappelletti. 1989. Naphtoquinone contents of cultivated *Drosera species Drosera binata, Drosera binata var. dichotoma* and *Drosera capensis*. *Pharmaceutical Biology*, 27:129-136.
- Cárdenas M. y A. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 213-217.
- Casper S. J. 1966. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. *Bibliotheca Botanica*, 127/128, 209 pp.
- Casells, A y R. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 64:145–167
- Chawla H.S. 2009. Introduction to plant Biotechnology. Third Edition. New Hampshire, Science Publishers.
- Clapa D., A Fira e I. Pacurar. 2010. *In vitro* propagation of *Pinguicula vulgaris*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Horticulture*, 67:330-335.
- Coelho N. 2009. *In vitro* propagation of insectivorous plants for phytochemical purposes. Tesis de Maestría. Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais. Universidade do Algarve. 54 pp.
- Collin H. A. y G. S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers. Inglaterra. 157 pp.
- Crouch I.J. y J. Van Staden. 1988. *In vitro* propagation of *Drosera natalensis*. *S. Afr. J. Bot.* 54:94–96.



- Crouch I.J., J.F. Finnie y J. Van Staden. 1990. Studies on the isolation of plumbagin from *in vitro* and *in vivo* grown *Drosera* species. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 21:79–82.
- Darwin C. 1875. Plantas insectívoras. Libros de la Catarata. 2008. Madrid. 371 pp.
- Davies, G. 1993. Pinguiculas in tissue culture. The International *Pinguicula* Study Group 3:5-6.
- Debergh P. y R Zimmerman. 1991. Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. London. 1-13.
- Debergh P., J. De Riek y D. Mathys. 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. En: Lumsden, P. J., J. R. Nicholas y W. J. Davies (Eds.). *Physiology, Growth and Development of Plants in culture*, Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp. 58-68.
- Doods J. H. y L. W. Roberts. 1995. Culture of plant cells, tissues, and organs. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press, USA. 3-15.
- Driver, J., y A. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of *Paradox walnut* rootstock. *HortScience* 19(4):507-509.
- Espinosa-Matías S., S. Zamudio y J. Márquez-Guzmán. 2005. Embriología de las estructuras reproductoras masculinas del género *Pinguicula* L.(Lentibulariaceae). *Bol.Soc.Bot.Méx.* 76: 43-52.
- Evans D. E., J. O. Coleman y A. Kears. 2003. *Plant cell culture*. Scientific Publishers. USA. 194 pp.
- Evans N. E. 1990. Micropropagation, axillary bud multiplication. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (Eds.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, *Plant Cell and Tissue Culture*. Human press. New Jersey. Pp. 93-103.
- Finnie J.F. y J. Van Staden. 1993. *Drosera spp.* (Sundew): Micropropagation and *in vitro* production of plumbagin. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 24. Medicinal and aromatic plants V. Springer-Verlag, Berlin.pp. 164–177.

- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Grepin, D. Reid y T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 32:272-289.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- George E., M. Hall y G. Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The background. 3rd edition. Springer. Netherlands. p. 34-36.
- Gonçalves S., A.L. Escapa, T. Grevenstuky A. Romano. 2008. An efficient *in vitro* propagation protocol for *Pinguicula lusitanica*, a rare insectivorous plant. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 95:239–243.
- Goycokic V. y G. Saavedra. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA* 25:47-58.
- Gratão, PL; Polle, A; Lea, PJ; Azevedo, RA. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481-494.
- Grevenstuk T., Romano, A. 2012. *In vitro* plantlet production of the endangered *Pinguicula vulgaris*. *Central European Journal of Biology*. 7:48-53.
- Gupta M.M., R.K. Verma, G.C. Uniyal y S.P. Jain. 1993. Determination of plumbagin by normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*. 637:209–212.
- Haberer G. y J. Kieber. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*. 128:354-362
- Hajra P. K. y R.R. Rao. 1990. Distribution of vegetation types in northwest Himalaya with brief remarks on phytogeography and floral resource conservation. *Proceedings: Plant Sciences*, 100(4), 263-277.
- Hartmann H.T., D.E. Kester, F.T. Jr. Davies. 1990. Plant Propagation. Principles and Practices. Prentice-Hall. California. 770 pp.
- Heslop-Harrison Y. y J. Heslop-Harrison. 1981. The digestive glands of *Pinguicula*: structure and cytochemistry. *Annals of Botany*. 47:293-319.

- Hook, I.L.I. 2001. Naphthoquinone contents of *in vitro* cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and *Drosera* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 67:281–285.
- Jang G.W., K.S. Kim y R.D. Park. 2003. Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 72:95–98.
- Janssens J. 1986. *In vitro* propagation of sundew *Drosera regia* Stephens. Meded Fac Landbouwwet. Rijksuniv. Gent 51:61–66.
- Jiménez G. E. A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez P., J. (Ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-24.
- Juniper B. E., Robins R. J., Joel D. M. 1989 The carnivorous plants. New York, NY: Academic Press.
- Ko C. Y., T. Y. Lin, C. W. Ho y J. F. Shaw. 2010. *In vitro* Regeneration of *Cephalotus follicularis*. *HortScience*, 45:260-264.
- Kukulczanka K. y B. Czastka. 1987. Propagation of *Drosera* L. *in vitro*. *Wiad Bot.* 31:61–64.
- Latha P.G. and S. Seeni. 1994. Multiplication of the endangered Indian pitcher plant (*Nepenthes khasiana*) through enhanced axillary branching *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 38:69–71.
- Legendre, L. 2000. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. *Acta Bot. Gallica*. 147:77-95.
- Marczak Ł., A. Kawiak, E. Łojkowska y M. Stobiecki. 2005. Secondary metabolites in *in vitro* cultured plants of the genus *Drosera*. *Phytochemical Analysis*. 16:143–149
- Merino, M. M. E. 1991. Medio de cultivo. En: Hurtado, M. D. V. y M. M. E. Merino (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México. Pp. 67-85.
- Mauseth J. D. 1977. Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal* (U.S.) 69: 80-81.

- Millett J., R. Jones y S. Waldron. 2003. The contribution of insect prey to the total nitrogen content of sundews (*Drosera spp.*) determined *in situ* by stable isotope analysis. *New Phytologist* 158:527-534.
- Müller K. F., T. Borsch. L. Legendre, S. Porembski y W. Barthlott. 2006. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). *Plant Biology*. 8:748-757.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Olvera M. 1996. El Género *Utricularia* en México. Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, *Serie Botánica* 67:347-384.
- Olvera M. 1977. Primer registro de *Utricularia erectiflora* (Lentibulariaceae) para México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, *Serie Botánica* 62: 43-45.
- Olvera M. y E. Martínez. 2002. Primer registro de *Genlisea* (Lentibulariaceae) para México. *Acta Botanica Mexicana* 59:71-73.
- Pérez-Molphe-Balch E., M. R. Ramírez, P. H. G. Núñez y A. N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 179 pp.
- Perica M. C. y J. Berljak. 1996. *In vitro* growth and regeneration of *Drosera spatulata* Labill. on various media. *Hort Science*, 31(6), 1033-1034.
- Pierik R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 pp.
- Pollard J. y J. Walker. 1990. Methods in molecular biology, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. USA. 6:150-160
- Pompeu G., P. Gratão, V. Vitorello y R. Azevedo. 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola* 65: 548-552
- Raghavendra A., V. Gonugunta, A. Christmann y E. Grill. 2010. ABA: perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15:395-401.

- Rai M., R. Kaliaa, Singha, M. Gangolaa, A. Dhawana. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection - an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71: 89-98.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2nd edition. Enfield. New Hampshire.pp. 233-244
- Saetiew, K., V. Sang-iny S. Arunyanart. 2011. The effects of BA and NAA on multiplication of Butterwort (*Pinguicula gigantea*) *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology*. 7(5): 1349-1354.
- Shao, H-B, L-Y. Chu, M-A Shao, A. Cheruth y H-M. MI. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies* 331: 433-441.
- Simola L.K. 1978. Dipeptides as nitrogen sources for *Drosera rotundifolia* in aseptic culture. *Physiologia Plantarum*. 44:315–318.
- Slack A. C. y J. Gate. 1980. Carnivorous plants. MIT Press. Great Britain. 240 pp.
- Starling R. J. y J. H. Dodds. 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1: 84-90.
- Steiger J. 1975. The *Pinguicula* species of the temperate growth type and their cultivation. *Carnivorous Plant Newsletter*. 4:8-18.
- Stewart Jr. C.N. y E.T. Nilsen. 1993. Responses of *Drosera capensis* and *D. binata* var. *multifida* (Droseraceae) to manipulations of insect availability and soil nutrient levels. *New Zealand Journal of Botany* 31: 385-390.
- Studnicka, M. 1991. Interesting succulent features in the *Pinguicula* species from the Mexican evolutionary center. *Folia Geobot. Phytotax*. 26:459-462.
- Sukamto L. A., Mujiono, Djukri y V. Henuhili. 2011. Shoot Tip Culture of *Nepenthes albomarginata* Lobb ex Lindl. *in vitro*. *Jurnal Biologi Indonesia*. 7:251-261
- Symons G M., J. J. Ross, C. E. Jager y J. B. Reid. 2007. Brassinosteroid transport. *Oxford Journals Life Sciences Journal of Experimental Botany*. 59:17-24.

- Tang W. y R. Newton 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167: 621-628.
- Teng W.L. 1999. Source, etiolation and orientation of explants affect *in vitro* regeneration of Venus fly trap (*Dionaea muscipula*). *Plant Cell Rep.* 18:363–368.
- The International Carnivorous Plant Society (ICPS). Página en red: <http://www.carnivorousplants.org/> Consultada en agosto de 2012.
- Trigiano R. y D. Gray. 2004. Plant development and biotechnology. CRC Press. USA.
- Tuleja M., A. Chmielowska, B. J. Płachno. 2014. The preliminary attempts of *In Vitro* regeneration from petioles of recalcitrant species of *Cephalotus follicularis* Labill. *Modern Phytomorphology* 6:37–38
- Turkan I. y T. Demiral. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67:2-9.
- Van Staden J, C. Fennell y N. Taylor, 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Vatanpour-Azghandi A., T. Villiers, A. Ghorbani, y A. Tajabadi. 2002. The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. *Acta Horticulturae* 591: 377-388
- Vogel S. 1998 Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. II. Nectarioles. *Flora* 193, 1–29.
- Zamudio S. y Ludlow-Wiechers B. 1993. Lentibulariaceae: *Pinguicula*. En: Ludlow-Wiechers B., Diego-Pérez N. y Márquez-Guzmán J. (Eds). *Flora paliológica de Guerrero* No. 4, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 16 pp.
- Zamudio, S. y M. Olvera. 2009. A new species of *Utricularia* (Lentibulariaceae) from Guerrero, México. *Brittonia* 61(2): 119-125.
- Zamudio S. y R. Z. Ortega. 1994. Una nueva especie de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de los estados de Querétaro e Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana* 28:57-62.

- Zamudio S. 1999. Notas sobre la identidad de *Pinguicula moranensis* H.B.K., con la descripción de una variedad nueva. *Acta Botanica Mexicana*. 49:23-34.
- Zamudio S. 2001a. Revisión de la sección *Orcheosanthus*, del género *Pinguicula* (Lentibulariaceae). Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México, D.F., 225 pp.
- Zamudio S. 2001b. Una especie nueva notable de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de los estados de Querétaro y San Luis Potosí, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68: 85-88.
- Zamudio, S. 2003. Las especies del género *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de México con potencial ornamental. En: Mejía-Muñoz, J. M. y A. Espinosa-Flores, Compiladores. Plantas Nativas de México con Potencial Ornamental. Universidad Autónoma de Chapingo. Pp. 89-99.
- Zamudio S. 2005. Familia Lentibulariaceae. Flora de Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C., Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo 136. .61pp.