



In vitro propagation of *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcanica Z.

Propagación *in vitro* de *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcánica Z.

Pérez-Sánchez, J., Reyero-Saavedra, R., Pozos-Ruiz, Y., Verastegui-Vidal, M. and Ortiz-Montiel, J.G.*.

Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio Cultivo de tejidos Vegetales, Unidad de Morfología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Av. De los Barrios 1, C.P. 54090. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. México.

ABSTRACT

Seeds of *Pinguicula moranensis* were collected in the "El Chico" National Park in the state of Hidalgo, Mexico, in order to develop a propagation strategy for *in vitro* mass multiplication. Seeds were germinated in medium $\frac{1}{4}$ MS supplemented with 100 mg L⁻¹ inositol, 0.4 mg L⁻¹ thiamine, 20 g L⁻¹ sucrose, 8.5 g L⁻¹ of agar, pH 5.7 (Basal medium with organics, MBO), without growth regulators showing low germination (5 %). Seedlings of 10 days, were incubated in medium MBO with BA (0, 0.5 mg L⁻¹) in combination with NAA (0, 0.5 mg L⁻¹), or 2,4D (0, 1.0 mg L⁻¹). The presence of 2,4-D (1.0 mg L⁻¹), caused necrosis in this species, however MBO medium, supplemented with BA 0.5 mg L⁻¹ and NAA 0.5 mg L⁻¹, allowed 100 % induction of callus which observed defined and friable. The callus obtained was incubated in the above medium MBO with BA (0, 1 and 2 mg L⁻¹) and NAA (0, 0.1, 0.5 mg L⁻¹). The best response was observed with medium MBO supplemented with BA (1mg L⁻¹) and NAA (0.5 mg L⁻¹), finding an average of 1,957 + 125 shoots per jar. The formed shoots were obtained with a large proportion of vitrification, so they were incubated in the same medium but without growth regulators, where they

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 2nd 2015.

Accepted/Aceptado: December 8th 2015.

RESUMEN

Se colectaron semillas de violeta de barranca (*Pinguicula moranensis* H.B. Kunth, var. Neovolcánica Zamudio) en el Parque Nacional "El Chico" en el Estado de Hidalgo, México, con el objetivo de desarrollar una estrategia de propagación masiva *in vitro* mediante la regeneración de brotes a partir de callos. Se germinaron las semillas en el medio $\frac{1}{4}$ MS, con 100 mg L⁻¹ de inositol, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 8.5 g L⁻¹ de agar y pH 5.7, (medio basal con orgánicos, MBO), sin reguladores de crecimiento, donde presentaron baja germinación (5 %). De estas se seleccionaron plántulas de 10 días, se incubaron en medio MBO, con BA (0, 0.5 mg L⁻¹) en combinación con ANA (0, 0.5 mg L⁻¹), o 2,4 D (0, 1.0 mg L⁻¹). La presencia de 2,4-D (1.0 mg L⁻¹), produjo necrosis en esta especie en todos los casos; sin embargo, el medio MBO, con BA 0.5 mg L⁻¹, ANA 0.5 mg L⁻¹, permitió la inducción de 100 % de callo, que se observó definido y friable. El callo obtenido se incubó en medio MBO, con BA (0, 1 y 2 mg L⁻¹) y ANA (0, 0.1, 0.5 mg L⁻¹). Se observó la mejor inducción de brotes a partir de callos, en el tratamiento MBO, adicionado con BA (1 mg L⁻¹) y ANA (0.5 mg L⁻¹), encontrando un promedio de 1,957±125 brotes por frasco. Los brotes formados se obtuvieron con una gran proporción de vitrificación, por lo que se incubaron en el mismo medio pero sin reguladores, donde se desvitrificaron e individualizaron y formaron raíz espontáneamente. Lo que permite definir de esta forma un eficiente protocolo de propagación masiva para esta especie.

*Corresponding Author:

Ortiz Montiel, J.G., Laboratorio Cultivo de tejidos Vegetales, Unidad de Morfología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Av. De los Barrios 1, C.P. 54090, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México. Phone: +52(0155) 5623 1262. E-mail: jgerardo@unam.mx

were devitrified and individualized, rooting spontaneously. Allowing thereby the definition of an efficient protocol for mass propagation of the species.

KEY WORDS

In vitro, *Pinguicula*, *Lentibulariaceae*, ornamental, insectivorous.

Introduction

There are over 23,000 species, only vascular plants, in Mexico's flora (Villaseñor, 2004), where at least 20 % present ornamental potential, which is determined by religious, cultural or economic reasons (Espinosa *et al.*, 2009). Particularly, the genre *Pinguicula* has a high ornamental potential given its morphologic characteristics such as its thick fleshy leaves, with glandular hair and mucilage, which have the power to attract, immobilize and digest small insects, besides presenting flowers of different colors that grant a noticeable decorative value (Clapa *et al.*, 2010; Zamudio, 2005). In Mexico, there are over 40 species of *Pinguicula* and 38 of them are endemic, so it is recommended to include them in reproduction programs to optimize their management and avoid their illegal use as traffic or collection (Espinosa *et al.*, 2009).

Some species of pinguicolas propagate by seeds or explants from leaf of winter rosette which regenerate shoots in their basal part; however, this propagation is limited in number to such material (Gutiérrez, 2005), so *in vitro* propagation of this species can be a useful methodology for its multiplication. Response to *in vitro* propagation of some species of the genre *Pinguicula* (Adams *et al.*, 1979; Clapa *et al.*, 2010) has been studied and the proliferation of shoots with mediums that use low concentrations of nutrients in diverse species of insectivore plants has been evaluated (Adams *et al.*, 1979; Goncalves *et al.*, 2008; Clapa *et al.*, 2010); and also the application of regulators of growth (Saetiew *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2008), with direct formation of shoots in complete leaves of *P. lusitanica* L. and *P. vulgaris* L. before the application of 0.5 mg L⁻¹ of 6-bencil adenine (BA) o kinetin (KIN) (Goncalves *et al.*, 2008; Clapa *et al.*, 2010). On the other hand, *P. moranensis* H.B. Kunth formed shoots from explants of complete

PALABRAS CLAVE

In vitro, *Pinguicula*, *Lentibulariaceae*, ornamental, insectívoras.

Introducción

Existen más de 23,000 especies, solo de plantas vasculares en la flora de México (Villaseñor, 2004), donde al menos 20 % presenta un potencial ornamental, que se determina por motivos religiosos, culturales o económicos (Espinosa *et al.*, 2009). Particularmente el género *Pinguicula* posee un elevado potencial ornamental, dadas sus características morfológicas, como son sus hojas gruesas y carnosas, con pelos glandulares y mucílago, que tienen el papel de atraer, inmovilizar y digerir pequeños insectos, además de presentar flores de diversos colores que le confieren un notable valor decorativo (Clapa *et al.*, 2010; Zamudio, 2005). En México existen más de 40 especies de *Pinguicula* y 38 son endémicas, por lo que se recomienda se incluyan en programas de reproducción para optimizar su manejo y evitar que estos ejemplares sean objeto de prácticas indebidas como la colecta y el tráfico ilegal (Espinosa *et al.*, 2009).

Algunas especies de pinguicolas se propagan mediante semillas o explantes de hoja de roseta de invierno que regeneran brotes en su parte basal, sin embargo esta propagación se limita en número a dicho material (Gutiérrez, 2005), por lo que la propagación *in vitro* de estas especies puede ser una metodología útil para su multiplicación. Se ha estudiado la respuesta a la propagación *in vitro* de algunas especies del género *Pinguicula* (Adams *et al.*, 1979; Clapa *et al.*, 2010) y se ha evaluado la proliferación de brotes con medios que utilizan bajas concentraciones de nutrientes en diversas especies de plantas insectívoras (Adams *et al.*, 1979; Goncalves *et al.*, 2008; Clapa *et al.*, 2010); así como la aplicación de reguladores de crecimiento (Saetiew *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2008), con formación directa de brotes en hojas completas de *P. lusitanica* L. y *P. vulgaris* L. ante la aplicación de 0.5 mg L⁻¹ de 6-bencil adenina (BA) o cinetina (KIN) (Goncalves *et al.*, 2008; Clapa *et al.*, 2010). Por otro lado, *P. moranensis* H.B. Kunth, formó brotes a partir de explantes de hoja madura completa, en medio Linsmaier y Skoog (1965), a 1/5 de su concentración, adicionado con 0.02 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de ácido 2-naftalen acético (ANA), con la presencia de algunos microorganismos endógenos que dificultaron el establecimiento del cultivo (Adams *et al.*, 1979). Sin embargo, Becerra *et al.*, (2004) registra una mejor respuesta morfológica

mature leaves in medium Linsmaier and Skoog (1965), at 1/5 of their concentration, added with 0.02 mg L⁻¹ of BA and 0.1 mg L⁻¹ of 2-naftalen acetic acid (NAA), with the presence of some endogenous microorganisms that hindered the establishment of the culture (Adams et al., 1979). However, Becerra et al., (2004) recorded a better morphogenetic response even in callus and mentions the decrease of the morphogenetic capacity in relation to the age of the explant. The existent bibliography for this genre reports the induction of shoots in direct form on explants of mature leaves; however, the regeneration of shoots or embryos from the induced callus has not been reported. As indicated by the foregoing, the aim of this work was to obtain a protocol for the multiplication *in vitro* of *P. moranensis* H.B. Kunth, var. Neovolcanic Z. through the regeneration of shoots in callus induced from small seedlings obtained from seeds.

Materials and Methods

The work was performed in the laboratory of Culture of Vegetative Tissues from the Unit of Function and Morphology in the Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Mexico. Seeds of *P. Moranensis* H.B. Kunth., var. Neovolcanic Z. collected in June 2015 in the dam "El Cedral" within the National Park "El Chico", Hidalgo, Mex. were used; after a week, they were washed with water and commercial detergent, rinsed with distilled water twice and disinfected in alcohol at 70 % during 2 minutes. After, they were submerged in a solution of sodium hypochlorite at 20 % (from commercial chlorine at 6 %), with 150 µL L⁻¹ of Tween-20, during 5 minutes and rinsed three times with distilled sterile water in laminar flux chamber.

Culture conditions

For their germination, seeds were sowed in medium Murashigue and Skoog (1962) at a quarter of its concentration ¼ MS, with 100 mg L⁻¹ inositol, 0.4 mg L⁻¹ thiamine, with 20 g L⁻¹ sucrose, 8.5 g L⁻¹ agar and pH 5.7, with no growth regulators (MBO medium).

To induce callus formation, seedling of 10 days of emergence were used, placing them in glass jars of 120 mL with 20 mL of MBO, added with BA and NAA or 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), with 20 g L⁻¹ sucrose, 8.5 g L⁻¹ agar and pH 5.7, with six repetitions per treatment (Table 1), using a factorial design completely randomized.

incluso en callo y menciona la disminución de la capacidad morfogénica en relación a la edad del explante. La bibliografía existente para este género reporta la inducción de brotes de forma directa sobre explantes de hoja madura, sin embargo, no se ha reportado la regeneración de brotes o embriones a partir de callos inducidos. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener un protocolo para multiplicación *in vitro* de *P. moranensis* H.B. Kunth, var. Neovolcanic Z. a través de la regeneración de brotes en callos inducidos a partir de plántulas pequeñas obtenidas de semillas.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Morfología y Función en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. Se utilizaron semillas de *P. moranensis* H.B. Kunth., var. neovolcánica Z. que fueron colectadas en el mes de junio del 2015, en la presa "El Cedral" dentro del Parque Nacional "El Chico", Hidalgo, México, una semana después, éstas se lavaron con agua y detergente comercial, se enjuagaron con agua destilada dos veces y se desinfectaron en alcohol al 70 % durante 2 minutos. Después se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % (a partir de cloro comercial al 6 %), con 150 µL L⁻¹ de Tween-20, durante 5 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar.

Condiciones de cultivo

Para su germinación, las semillas se sembraron en medio Murashigue y Skoog (1962), a un cuarto de su concentración ¼ MS, con 100 mg L⁻¹ de inositol, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, con 20 g L⁻¹ de sacarosa, 8.5 g L⁻¹ de agar y pH 5.7, sin reguladores de crecimiento (medio MBO).

Para inducir la formación de callo, se utilizaron plántulas de 10 días de emergidas, colocándose en frascos de vidrio de 120 mL con 20 mL de medio MBO, adicionado con BA y ANA ó Ácido 2,4 Diclorofenoxyacético (2,4-D), con 20 g L⁻¹ de sacarosa, 8.5 g L⁻¹ de agar y pH 5.7, con seis repeticiones por tratamiento (Tabla 1), en un diseño factorial completamente al azar.

Una vez inducida la formación del callo, se tomó 1 cm³ del mismo, como explante para inducir la formación de brotes, incubando el tejido en 20 mL de medio MBO, con BA 0, 1.0, 2.0 mg L⁻¹ y ANA 0, 0.1 y 0.5 mg L⁻¹, con 6 repeticiones por tratamiento (Tabla 2), utilizando un diseño factorial completamente al azar.

Table 1.
Treatments evaluated for the formation of callus in seedlings of *Pinguicula moranensis* with 10 days of emergence.

Tabla 1.
Tratamientos evaluados para la formación de callo en plántulas de *Pinguicula moranensis* con 10 días de emergidas.

Treatments	MS	Growth regulators (mg L ⁻¹)		
		BA	NAA	2,4 D
1	1/4	0	0	0
2	1/4	0	0.5	0
3	1/4	0	0	1
4	1/4	0.5	0	0
5	1/4	0.5	0.5	0
6	1/4	0.5	0	1

All mediums contain as organic part: Inositol (100 mg L⁻¹), Thiamine (0.4 mg L⁻¹), sucrose (20 g L⁻¹), agar (8.5 g L⁻¹) and pH 5.7.

Todos los medios contienen como parte orgánica: Inositol (100 mg L⁻¹), Tiamina (0.4 mg L⁻¹), sacarosa (20 g L⁻¹), agar (8.5 g L⁻¹) y pH 5.7

Table 2.
Treatments to evaluate the effect of regulators of growth on the formation of shoots from callus of *Pinguicula moranensis*.

Tabla 2.
Tratamientos para evaluar el efecto de reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes a partir de callos de *Pinguicula moranensis*.

Treatments	MS	Growth regulators (mg L ⁻¹)	
		BA	NAA
1	1/4	0	0
2	1/4	1	0
3	1/4	2	0
4	1/4	0	0.1
5	1/4	1	0.1
6	1/4	2	0.1
7	1/4	0	0.5
8	1/4	1	0.5
9	1/4	2	0.5

Once the formation of the callus was induced, 1 cm³ was taken as explant to induce the formation of shoots, incubating tissue in 20 mL of medium MBO with BA 0, 1.0, 2.0 mg L⁻¹ and NAA 0, 0.1 and 0.5 mg L⁻¹, with 6 repetitions per treatment (Table 2), using a factorial design completely randomized.

The mediums used in this study were sterilized by autoclave at 121 °C and 1.05 kg cm⁻². All treatments were placed in a growth chamber with 22-26 °C, photoperiod of 16/8 hours (light/darkness), with a photosynthetically active radiation of 100 μmol m⁻² s⁻¹ from fluorescent white cold tubes.

Los medios utilizados en este estudio se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1.05 kg cm⁻². Todos los tratamientos se colocaron en una cámara de crecimiento con 22-26 °C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/obscuridad), con una radiación fotosintéticamente activa de 100 μmol m⁻² s⁻¹, a partir de tubos fluorescentes blanco frío.

Análisis estadístico

Los datos de brotes observados, se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), para evaluar diferencias entre tratamientos utilizando el paquete Sigma Plot for Windows V.11 (Systat Software, Inc.). Las diferencias significativas entre me-

Statistical analysis

Data from the observed shoots were submitted to a variance analysis (ANOVA) to evaluate the differences between treatments using the package Sigma Plot for Windows V.11 (Systat Software, Inc.). Significant differences between averages were determined by using a Tukey test ($p=0.05$). Data are presented as average \pm standard deviation.

Results and discussion

A low percentage (5 %) of germination *in vitro* of seeds of *P. moranensis* was observed, as reported by Grevenstuk and Romano (2012) for *P. vulgaris*. Nevertheless, this germination might be higher with a stratification treatment in cold, as recommended by Heslop-Harrison (2004) for this genre, even when it seems there are no differences according to the same author.

Small seedlings used as explants for the callus induction presented darkness and tissue necrosis in all treatments with 2,4-D acid, so it can be assured that the presence of this auxin is strongly limiting in the viability of *P. moranensis*.

días se determinaron usando una prueba de Tukey ($p=0.05$). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Resultados y Discusión

Se observó un bajo porcentaje (5 %), de germinación *in vitro* de las semillas de *P. moranensis*, tal como lo reportan Grevenstuk y Romano (2012), para *P. vulgaris*. Sin embargo, esta germinación podría ser mayor con un tratamiento de estratificación con frío como lo recomienda Heslop-Harrison (2004), para este género, aun cuando parece no haber diferencias de acuerdo al mismo autor.

Las pequeñas plántulas usadas como explantes para la inducción de callo, presentaron oscurecimiento y necrosis de tejidos en todos los tratamientos con Ácido 2,4-D, por lo que se puede asegurar que la presencia de esta auxina es fuertemente limitante en la viabilidad en *P. moranensis*, sin embargo la aplicación de ANA en combinación con BA, permitió la inducción total de callos a partir de este tipo de explante, el callo producido se observó definido y friable solo en el medio MBO, adicionado con BA 0.5 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹ (Tabla 3).

Table 3.
Effect of growth regulators on the formation of callus in seedlings of 10 days (0.5 cm) of *Pinguicula moranensis* after 10 days in culture.

Tabla 3.
Efecto de reguladores de crecimiento sobre la formación callo en plántulas de 10 días (0.5 cm) de *Pinguicula moranensis* después de 30 días de cultivo.

Growth regulators (mg L ⁻¹)				Type of morphogenic response observed at 30 days of incubation	
Medium	BA	NAA	2,4 D	State of culture in the jars	% callus
1	0	0	0	Without loss of chlorophyll, without morphogen response	0
2	0	0.5	0	Formation of no friable callus, with posterior necrosis	20
3	0	0	1	Total necrosis of tissue	0
4	0.5	0	0	No response was observed except for hydration with no loss of chlorophyll	0
5	0.5	0.5	0	Formation of friable callus, hydrated with chlorophyll	100
6	0.5	0	1	Gradual necrosis of tissue	0

sis; however, the application of NAA in combination with BA allowed the total induction of callus from this type of explant, the callus produced was observed defined and friable only in the MBO medium, added with BA 0.5 mg L⁻¹ and NAA 0.5 mg L⁻¹ (Table 3).

In treatments to induce shoots, as result of the incubation of 1 cm³ of callus (Table 4), the induction of some shoots per jar (230±35 and 278±54) was observed with the presence of BA (1 and 2 mg L⁻¹). The number of shoots was increased by the presence of both hormones, 1 and 2 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA (1,128±192 and 1,393±283, respectively). The best results in induction of shoots were found in treatments with 1 and

En los tratamientos para inducir brotes, como resultado de la incubación de 1 cm³ de callo (Tabla 4), se observó la inducción de algunos brotes por frasco (230±35 y 278±54) con la presencia de BA (1 y 2 mg L⁻¹). El número de brotes se incrementó al estar presentes ambas hormonas, 1 y 2 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de ANA (1,128±192 y 1,393±283 respectivamente).

Los mejores resultados en la inducción de brotes se encontraron en los tratamientos con 1 y 2 mg L⁻¹ de BA y 0.5 mg L⁻¹ de ANA respectivamente, donde se encontraron 1,957±125 y 1,530±211 brotes por frasco, sin embargo la presencia de BA en el medio indujo la formación de brotes vitrificados en un porcentaje mayor de un 80 % en el medio

Table 4.
Effect of growth regulators on the formation of shoots from callus of *Pinguicula moranensis* after 30 days in culture.

Tabla 4.
Efecto de reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes a partir de callos de *Pinguicula moranensis* después de 30 días de cultivo.

Growth regulators (mg L ⁻¹)			Type of morphogenic response observed at 30 days of incubation	
Medium	BA	NAA	State of culture in jars	shoots/jar
1	0	0	Morphology of friable callus is maintained, 10 % of necrotic material	0
2	1	0	The morphology of friable callus was maintained, well hydrated cells and with chlorophyll	230±35 ^a
3	2	0	The morphology of friable callus was maintained, well hydrated cells and with chlorophyll	278±54 ^a
4	0	0.1	The morphology of friable callus was maintained, well hydrated cells and with chlorophyll	0
5	1	0.1	The formation of vitrified shoots was observed, well hydrated cells and with chlorophyll	1,128±192 ^b
6	2	0.1	The formation of vitrified shoots was observed, well hydrated cells and with chlorophyll	1,393±283 ^b
7	0	0.5	The formation of vitrified shoots was observed, well hydrated cells and with chlorophyll	0
8	1	0.5	The formation of vitrified shoots was observed, well hydrated cells and with chlorophyll	1,957±125 ^b
9	2	0.5	Vitrified shoots were formed, with very hydrated cells and low chlorophyll	1,530±211 ^b

Values represent average per treatment + standard deviation (n=6). Different letters represent significant differences, Tukey ($p < 0.05$)

Los valores representan promedios por tratamiento + desviación estándar (n=6). Las letras diferentes representan diferencias significativas, Tukey ($p < 0.05$)



Figure 1. A) Formation of callus in *P. moranensis* in medium $\frac{1}{4}$ MS added with 20 g L^{-1} sucrose, 8.5 g L^{-1} agar and pH 5.7 added with BA [0.5 mg L^{-1}] + NAA [0.5 mg L^{-1}]. B) Induction of shoots in *P. moranensis* with the previous medium added with BA [1.0 mg L^{-1}] + NAA [0.5 mg L^{-1}], observe the presence of vitrification. C) Normal shoots of *P. moranensis* in medium with no hormones. D) Detail of individualized shoots obtained (5 cm diameter).

Figura 1. A) Formación de callo en *P. moranensis* en medio $\frac{1}{4}$ MS adicionado con 20 g L^{-1} de sacarosa, 8.5 g L^{-1} de agar y pH 5.7 adicionado con BA [0.5 mg L^{-1}] + ANA [0.5 mg L^{-1}]. B) Inducción de brotes en *P. moranensis* con el medio anterior adicionado con BA [1.0 mg L^{-1}] + ANA [0.5 mg L^{-1}], obsérvese la presencia de vitrificación. C) Brotes normales de *P. moranensis* en medio sin hormonas. D) Detalle de brotes individualizados obtenidos (5 cm diámetro).

2 mg L^{-1} BA and 0.5 mg L^{-1} NAA respectively, where $1,957 \pm 125$ and $1,530 \pm 211$ shoots per jar were found; nevertheless, the presence of BA in the medium induced the formation of vitrified shoots in a percentage higher than 80 % in the medium with 1 mg L^{-1} BA and 0.5 mg L^{-1} NAA (Figure 1B); this state of vitrification is known as hyperhydration and it is a malformation, anatomic and physiologic, that makes the tissue to be overhydrated (Paques and Boxus, 1987), where the new plants present hypertrophy, with deficiency of chlorophyll a and b, loss of lignification in the cellular wall and leaves with big intercellular spaces in mesophyll, the tissue has been correlated with the availability of water, microelements and hormonal unbalance in the culture medium (Kataeva et al., 1991). It has been reported that the verified tissue can return to normality by aeration of the culture and change to mediums with no hormones (Chien-Chou et al., 2005), therefore vitrified shoots of *P. moranensis* were transferred at the same time with no hormones.

con 1 mg L^{-1} de BA y 0.5 mg L^{-1} de ANA (Figura 1B), este estado de vitrificación se conoce como hiperhidratación y es una malformación, anatómica y fisiológica, que hace que el tejido se sobrehidrate (Paques y Boxus, 1987), donde las nuevas plantas presentan además hipertrofia, con deficiencia de clorofila a y b, pérdida de la lignificación en la pared celular y hojas con grandes espacios intercelulares en mesófilo, el tejido se ha correlacionado con la disponibilidad de agua, microelementos y desbalance hormonal en el medio de cultivo (Kataeva et al., 1991). Se ha reportado que el tejido vitrificado se puede retornar a la normalidad mediante aereación del cultivo y cambio a medios sin hormonas (Chien-Chou et al., 2005), por lo que los brotes de *P. moranensis* vitrificados se transfirieron al mismo medio pero sin hormonas.

De forma semejante a lo encontrado por Grevenstuk y Romano (2012), y Clapa et al., (2010), en *P. vulgaris*, quienes reportan enraizamiento espontaneo en un medio sin reguladores. Este medio permitió no solo desvitrificar los brotes

Similarly to what Grevenstuk and Romano (2012), and Clapa *et al.*, (2010) found in *P. vulgaris*, reporting a spontaneous rooting in a medium with no regulators. This medium allowed not only the devitrification and freed of shoots, but we also observed the spontaneous formation of roots in more than 70 % of shoots after 30 days of incubation, which can be due to the presence of high levels of endogen auxins as it has been found in other species (Malá *et al.*, 2005).

Similarly, after 60 days of growth in medium MBO, plants presented a size between 4 and 5 cm (Figure 2), they were moved

e independizarlos, también observamos formación espontánea de raíces en más del 70 % de brotes después de 30 días de incubación, lo que puede deberse a la presencia de altos niveles de auxinas endógenas como se ha encontrado para otras especies (Malá *et al.*, 2005).

Después de 60 días de crecimiento en medio MBO, las plantas presentaron un tamaño entre 4 y 5 cm (Figura 2), se trasladaron a contenedores de 200 ml con 100 mL de peat moss – agrolita (1:1) y con 30 días de aclimatación se observó floración (Figura 3).



Figure 2. Plant of *P. moranensis* in conditions *in vitro*, with 60 days of development.

Figura 2. Planta de *P. moranensis* en condiciones *in vitro*, con 60 días de desarrollo.



Figure 3. Plant of *P. moranensis* coming from *in vitro* conditions, with 30 days of acclimation in peat moss – agrolite 1:1 (5 cm diameter).

Figura 3. Planta de *P. moranensis* proveniente de condiciones *in vitro*, con 30 días de aclimatación en peat moss – agrolita 1:1 (5 cm diámetro).

to containers of 200 ml with 100 ml of peat moss – agrolite (1:1) and with 30 days of acclimation flowering was observed (Figure 3).

Conclusions

Under conditions of long photoperiod and MBO medium, only 5 % of the seeds of *P. moranensis* germinated. Small seedlings, obtained from seeds of *Pinguicula moranensis*, used as explants, allowed the obtaining of a rapid induction of callus *in vitro*, using the medium MBO, with BA 0.5 mg L⁻¹ and NAA 0.5 mg L⁻¹. Obtained shoots were found vitrified and returned to a normal state when placing them for 30 days in medium with no regulators of growth, achieving a spontaneous rooting. The procedure hereby described allows to define an efficient protocol of massive propagation of *Pinguicula moranensis*.

Conclusiones

Bajo condiciones de fotoperiodo largo y medio MBO, germinaron solo un 5 % de semillas de *P. moranensis*. Las plántulas pequeñas, obtenidas a partir de las semillas de *Pinguicula moranensis*, usadas como explantes, permitieron obtener una rápida inducción de callos *in vitro*, utilizando el medio MBO, con BA 0.5 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹. Posteriormente el callo obtenido, presentó la mejor inducción de brotes después de 30 días de incubación en medio MBO, adicionado con BA 1.0 mg L⁻¹ + ANA 0.5 mg L⁻¹. Los brotes obtenidos, se encontraron vitrificados y retornaron a un estado normal al colocarlos por 30 días en medio sin reguladores de crecimiento, logrando también el enraizamiento espontáneo. El procedimiento descrito aquí permite definir un protocolo eficiente de propagación masiva de *Pinguicula moranensis*.

References

- Adams R.M., Koenigsberg, S.S. and Langhans, R.W. 1979. *In vitro* propagation of the butterwort *Pinguicula moranensis* H.B.K. *Hortscience* 14: 701-702.
- Becerra, D.C., Forero, A.P. and Góngora, G.A. 2004. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 87-90. <http://link.springer.com/article/10.1023/B:TICU.0000049440.10767.29>
- Chien-Chou, L., Hong-Ming, L., Satish, M.N., Fang, W. and Hsin-Sheng, T. 2005. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *Journal of plant physiology* 162: 355-361. [http://www.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/ebook/Ventilation%20\(JPP\)%202005.pdf](http://www.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/ebook/Ventilation%20(JPP)%202005.pdf)
- Clapa, D., Fira, A. and Pacurar, I. 2010. *In vitro* propagation of *Pinguicula vulgaris*. *Bulletin UASVM Horticulture* 67 suppl1: 330-335.
- Espinosa, F.A., Mejía, M.J.M., Colinas, L.M.T., Rodríguez, E.M.A., Urbaczyc P.A.E. and Beltrán, B.M.A. 2009. Catálogo nacional de especies y variedades comerciales de plantas y flores producidas en México y Universidad Autónoma Chapingo. México: Chapingo. 350 pp. <https://es.scribd.com/doc/214931355/CATALOGO-DE-PLANTAS-DEFINITIVO-pdf>
- Goncalves, S., Escalpa, A., Grevenstuk, T. and Romano, A. 2008. An efficient *in vitro* propagation protocol for *Pinguicula lusitanica*, a rare insectivorous plant. *PCTOC* 95: 242.
- Grevenstuk, T. and Romano, A. 2012. *In vitro* plantlet production of the endangered *Pinguicula vulgaris*. *Central European Journal* 7 suppl 1: 48-53.
- Gutiérrez, A.R. 2005. Plantas insectívoras mexicanas: el género *Pinguicula*. *Boletín SUCCUS* 1 suppl 2: 1-5.
- Helstop-Harrison, Y. 2004. *Pinguicula* L. *Journal Ecology* 92: 1071-1081. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-0477.2004.00942.x/full>
- Kataeva, N.V., Alexanandrova, I.G., Butenko, R.G. and Dragavtceva, E.V. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 27(2): 149-154 <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00041283>
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 18: 100-127. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x/abstract>
- Malá, J., Gaudinová, A., Dobrev, P., Eder, J. and Cvikrová, M. 2005. Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. *Biologia Plantarum* 50 suppl 1: 8-14. http://www.ueb.asuch.cas.cz/bp/contents_bp50-1.htm

- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/pdf>
- Paques, M. and Boxus, P. 1987. Vitrification: review of literature. *Acta Horticulturae* 212: 155-166. http://www.actahort.org/members/showpdf?booknr=212_26
- Saetiew, K., Sang-in, V. and Arunyanart, S. 2011. The effects of BA and NAA on multiplication of butterwort (*Pinguicula gigantea*) *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology* 7 suppl 5: 1349-1354. http://www.ijat-aatsea.com/pdf/September_v7_n5_11/18_IJAT2011_7_5_%20Dr%20kajana_F.pdf
- Villaseñor, J.L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75:105-135. <http://www.redalyc.org/pdf/577/57707506.pdf>
- Zamudio, R.S. 2005. Lentibulariaceae. Flora del bajo y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo 136: 66 pp. <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOBA/Lentibulariaceae-136.pdf>

Cite this paper/Como citar este artículo: Pérez-Sánchez, J., Reyero-Saavedra, R., Pozos-Ruiz, Y., Verastegui-Vidal, M. and Ortiz-Montiel, J. G. (2017). *In vitro* propagation of *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcánica Z. *Revista Bio Ciencias* 4(3): 179-188. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/232/266>

