

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN – HUÁNUCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGRONÓMICA



EFFECTO DE LAS CITOQUININAS Y LA CONCENTRACIÓN NUTRICIONAL
EN LA TASA DE MULTIPLICACIÓN DE VENUS ATRAPAMOSCA (*Dionaea
muscipula* Ellis) A TRAVÉS DE LA ORGANOGÉNESIS DIRECTA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

GARCIA NIEVES, Leslie Anait

HUÁNUCO - PERÚ

2016

DEDICATORIA

El trabajo realizado esta dedicado a las personas que quieran utilizar la técnica de *cultivo in vitro* para la propagación de plantas.

A Dios Padre por iluminar mi camino y por darme fuerzas para vencer los obstáculos en cada momento de mi vida, a mis padres por todo el esfuerzo, amor y apoyo que me brindaron.

Leslie A. Garcia Nieves

AGRADECIMIENTO

A Dios por el regalo de la vida y salud,

A mi familia, por brindarme todo su apoyo y confianza,

A todas las personas que trabajan en el laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por brindarme todo su apoyo para la ejecución de este proyecto, en especial al Dr. Jorge Jiménez Dávalos, Ing. Piero Huari Soto y al Bach. José Laguna Runser.

A mis amigas y amigos por su cariño y apoyo,

A mis compañeros del laboratorio por su inapreciable colaboración en todo momento.

A mi asesora Dra. MilkaTello Villavicencio, por su paciencia, conocimientos y tiempo para encaminar este proyecto.

A todos mis docentes que fueron cómplices de mi formación profesional como ingeniero agrónomo.

Resumen

Se realizó el estudio del “efecto de las citoquininas y la concentración nutricional en la tasa de multiplicación de venus atrapamosca (*Dionaea muscipula* Ellis) a través de la organogénesis directa”, con la finalidad de incrementar las tasas de multiplicación de *Dionaea muscipula* aplicando la técnica del cultivo *in vitro* a partir de hojas de plantas *in vitro*, se instaló 12 tratamientos que estuvieron constituidas por la interacción de dos concentraciones nutricionales modificadas del medio Murashige y Skoog (MS), dos fuentes de citoquininas (kinetina y BAP) a diferentes concentraciones (0,5, 1,0 y 2,0 mg/l KIN y 2,5 mg/l BAP), a un pH de $5,6 \pm 0,1$. Se evaluó el número de brotes y hojas por explante, tamaño promedio de los brotes, tasa de velocidad de multiplicación, tiempo que demora el explante para diferenciarse, el porcentaje de tejido diferenciado, presencia de raíces y la oxidación. Se empleó el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2A3B2C cuyos factores en estudio fueron: A=concentraciones nutricionales modificadas del medio MS con niveles $a_1=MS/2$ y $a_2=MS/3$, B=concentraciones de kinetina con niveles $b_1=0,5\text{mg/l}$, $b_2=1,0\text{mg/l}$ y $b_3=2,0\text{mg/l}$ y C=concentraciones de BAP con niveles $c_1=0,0\text{mg/l}$ y $2,5\text{mg/l}$.

Los tratamientos T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP), T3 (MS/2+1,0mg/l KIN+0,0mg/l BAP) y T6 (MS/3+2,0mg/l KIN+0,0mg/l BAP) resultaron ser superiores al testigo y con los mayores índices de brotes (13,2, 12,3 y 11,4), hojas (74,2, 73,3 y 51,8), altura promedio de los brotes (1,12, 0,99 y 1,06 cm) porcentaje de tejido diferenciado (70,8%, 95,8% y 100%), tasas de velocidad de multiplicación (2,6, 3,1 y 2,5 respectivamente) y no presentaron índices de oxidación; sin embargo, el T6 (MS/3+2,0mg/l KIN+0,0mg/l BAP) hasta los 53 días se mantuvo con los altos índices de tejido diferenciado, reportándose con el 97,2 % de tejido diferenciado respecto al testigo. El medio MS/2 fue la concentración nutricional adecuada para la obtención del mayor número de brote y hojas por explante. El medio MS/3 induce a obtener mayores índices de tejido diferenciado, de igual manera la adición de 1,0 mg/l y 2,0 mg/l de kinetina beneficia para reducir el porcentaje

de mortandad, oxidación e induce a obtener mayor índice de tejido diferenciado, como también reducen el efecto negativo de BAP. El uso de BAP para la multiplicación de *Dionaea muscipula* presentó efectos positivos para la formación y desarrollo de los brotes y hojas viables, pero también se han obtenido resultados negativos, la adición de 2,5 mg/l de BAP provoca la oxidación de los tejidos y mortandad.

Palabras claves: cultivo *in vitro*, diferenciación, medio MS (Murashige and Skoog).

ABSTRACT

The study of the "effect of cytokinins and nutritional concentration in the rate of multiplication of *atrapamosca venus* (*Dionaea muscipula* Ellis) through the direct organogenesis", with the aim of increasing rates of multiplication of *Dionaea muscipula* by applying the technique of *in vitro* from leaves of plants *in vitro*, was installed 12 treatments that were formed by the interaction of two modifications nutritional concentrations of Murashige and Skoog (MS), two sources of cytokinin (kinetin and BAP) at different concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mg/l KIN and 2.5 mg/l BAP), at a pH of 5.6 ± 0.1 . We evaluated the number of shoots and leaves per explant, average size of outbreaks, multiplication rate of speed, time it takes for the explant to differentiate, the percentage of differentiated tissue, presence of roots and oxidation. The Completely Randomized Design (DCA) in a factorial arrangement 2A3B2C whose factors in study were: A=nutritional concentrations modified MS medium with levels a1=2 and MS/MS/a2=3, B=concentrations of kinetin with levels B1=0.5mg/l, b2=1.0mg/l and b3=2,0mg/l and C=concentrations of BAP levels c1=0,0mg/l and 2.5mg/l.

The treatments T11 (MS/2 2,0mg/l KIN 2.5mg/l BAP), T3 (MS/2 1.0mg/l KIN 0,0mg/l BAP) and T6 (MS/3 0,0MG KIN 2,0mg/l/l BAP) proved to be superior to the witness and with the highest levels of outbreaks (13.2, 12.3 and 11.4), leaves (74.2, 73.3 and 51.8), average height of the shoots (1.12, 0.99 and 1.06 cm) percentage of differentiated tissue (70.8%, 95.8% and 100%), rates of speed multiplication (2.6, 3.1 and 2.5 respectively) and there were rates of oxidation; however, the T6 (MS/3 0,0MG KIN 2,0mg/l/l BAP) up to 53 days was maintained with the high levels of differentiated tissue, with the 97.2 % of diferenciado tissue compared with the control. The MS/2 was adequate nutritional concentration to obtain the greatest number of outbreak and leaves per explant. The MS/3 induces to obtain higher rates of differentiated tissue, as well as the addition of 1.0 mg/L and 2.0 mg/l of kinetin benefits to reduce the percentage of mortality, oxidation and induces to obtain higher rate of differentiated tissue, as well as reduce the negative effect of BAP. The use of

BAP for the multiplication of *Dionaea muscipula* presented positive effects for the formation and development of the shoots and leaves viable, but also negative results have been obtained, the addition of 2.5 mg/l of BAP causes the oxidation of tissues and mortality.

Key words: *in vitro* culture, differentiation and MS medium (Murashige and Skoog).

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	17
1.1.	Objetivos	18
	Objetivo general	18
	Objetivos específicos	18
II.	MARCO TEÓRICO.....	19
2.1.	<i>Dionaea muscipula</i> Ellis	19
2.1.1.	Generalidades de <i>Dionaea muscipula</i>	19
2.1.2.	Taxonomía	20
2.1.3.	Descripción general.....	21
2.1.4.	Distribución geográfica e importancia socioeconómica	21
2.1.5.	Conservación	22
2.1.6.	Formas de propagación de <i>Dionaea mucipula</i> Ellis	23
2.2.	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	23
2.2.1.	Definición del cultivo <i>in vitro</i>	23
2.2.2.	Avances del cultivo <i>in vitro</i>	24
2.2.3.	Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	24
2.2.4.	Características del cultivo <i>in vitro</i>	25
2.2.5.	Principales métodos de micropropagación.....	25
2.2.6.	Consideraciones en la micropropagación durante la fase de multiplicación	26
2.2.6.1.	Fase de multiplicación.....	26
2.2.6.2.	La planta donadora	27
2.2.6.3.	Explante	27
2.2.6.4.	Composición de los medios de cultivo para la multiplicación de <i>Dionaea muscipula</i> Ellis	28
2.2.6.5.	Factores físicos	31
2.2.6.6.	Problemas asociados al cultivo <i>in vitro</i> durante la fase de multiplicación	32
2.2.6.7.	Ventajas y desventajas de la micropropagación durante la fase de multiplicación.....	34
2.3.	Antecedentes.....	34
2.3.1.	Micropropagación de <i>Dionaea mucipula</i> Ellis.....	34

2.4. Hipótesis.....	41
Hipótesis general.....	41
Hipótesis específica	41
2.5. Variables y operacionalización de variables.....	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Lugar de ejecución	43
3.2. Tipo y nivel de investigación.....	43
3.3. Población, muestra y unidad de análisis	44
3.4. Tratamientos en estudio	44
3.5. Prueba de hipótesis.....	45
3.5.1. Datos registrados	46
3.5.2. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de información	47
3.6. Materiales y equipos	47
3.7. Conducción de la investigación	49
1. Acondicionamiento de las herramientas para la etapa de siembra	49
2. Preparación del medio de cultivo	49
3. Siembra bajo condiciones <i>in vitro</i>	50
4. Incubación de las plantas <i>in vitro</i>	51
3.8. Evaluaciones	51
3.8.1. Determinación de la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	51
3.8.1.1. Número de brotes por explante.....	51
3.8.1.2. Número de hojas por explante	52
3.8.1.3. Tamaño promedio de los brotes	52
3.8.1.4. Tasa de velocidad de la multiplicación (TVM)	52
3.8.1.5. Porcentaje de tejido diferenciado	52
3.8.2. Tiempo que demora el explante para diferenciarse	52
3.8.3. Oxidación	53
3.8.4. Presencia de raíces.....	53
IV. RESULTADOS	54
V. DISCUSIÓN.....	105

CONCLUSIONES	113
RECOMENDACIONES	115
VI. LITERATURA CITADA	116

Abreviaturas

BAP Bencil amino purina

KIN Kinetina

MS Murashige and Skoog

MS/2 Murashige and Skoog de concentración media

MS/3 Murashige and Skoog de concentración a la tercera parte

LS Linsmaier and Skoog

B5 Gambort

NAA Acido Naftalenoacético

μM micro moles

AIA Ácido Indol Acético

A Concentraciones nutricionales modificadas del medio MS o Medios MS

a1=MS/2

a2=MS/3

B Concentraciones de Kinetina

b1=0,5mg/l KIN

b2=1,0mg/l KIN

b3=2,0mg/l KIN

C Concentraciones de BAP

c1=0,0mg/l BAP

c2=2,5mg/l BAP

AB Medios MS*Kinetina

AC Medios MS*BAP

BC Kinetina*BAP

ABC Medios MS*Kinetina*BAP

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 01: Factores climáticos óptimos que influyen en el desarrollo de <i>Dionaea muscipula</i> Ellis.....	23
Cuadro 02: Resultados de la propagación <i>in vitro</i> de <i>Drosera burmanii</i>	38
Cuadro 03: Operacionalización de variables.....	42
Cuadro 04: Tratamientos estudiados durante la investigación.....	45
Cuadro 05: Cuadro de ANOVA del diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2A3B2C.....	46
Cuadro 06: Materiales utilizados durante el ensayo.....	48
Cuadro 07: Insumos utilizados durante el ensayo.....	48
Cuadro 08: Equipos utilizados durante el ensayo.....	48
Cuadro 09: Escala numeral para la determinación del índice de tejido diferenciado.	53
Cuadro 10: Análisis de varianza de los factores en estudios para el número de brotes.....	55
Cuadro 11: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el número de brotes por explante	56
Cuadro 12: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el número de brotes por explante.....	57
Cuadro 13: ANOVA de efectos simples sobre el número de brotes por explante.....	58
Cuadro 14: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre el número de brotes por explante.....	59
Cuadro 15: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre el número de brotes por explante	60
Cuadro 16: Análisis de varianza para el número de hojas por explante.....	62
Cuadro 17: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el número de hojas por explante	62

Cuadro 18: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el número de hojas por explante.....	63
Cuadro 19: ANOVA de efectos simples sobre el número de hojas por explante.....	64
Cuadro 20: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre el número de hojas por explante.....	65
Cuadro 21: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre el número de hojas por explante.....	67
Cuadro 22: Análisis de varianza para el tamaño promedio de los brotes.....	68
Cuadro 23: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el tamaño promedio de los brotes.....	68
Cuadro 24: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el tamaño promedio de los brotes.....	69
Cuadro 25: ANOVA de efectos simples sobre el tamaño promedio de los brotes.....	70
Cuadro 26: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre el tamaño promedio de los brotes.....	71
Cuadro 27: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre tamaño promedio de los brotes.....	73
Cuadro 28: Prueba de ANOVA para la tasa de velocidad de multiplicación (TVM).....	74
Cuadro 29: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre la tasa de velocidad de multiplicación TVM.....	74
Cuadro 30: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre la tasa de velocidad de multiplicación.....	75
Cuadro 31: ANOVA de efectos simples sobre la tasa de velocidad de multiplicación.....	77
Cuadro 32: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la tasa de velocidad de multiplicación.....	78
Cuadro 33: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la tasa de velocidad de multiplicación.....	79
Cuadro 34: Cuadro de ANOVA del porcentaje de tejido diferenciado.....	80

Cuadro 35: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el porcentaje de tejido diferenciado.....	81
Cuadro 36: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el tejido diferenciado.....	82
Cuadro 37: ANOVA de efectos simples sobre el tejido diferenciado.....	83
Cuadro 38: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la diferenciación del tejido de <i>Dionaea muscipula</i>	84
Cuadro 39: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la diferenciación del tejido de <i>Dionaea muscipula</i>	85
Cuadro 40: Efecto de los tratamientos sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i> Ellis.....	87
Cuadro 41: Comparación de los niveles de significancia de las dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	87
Cuadro 42: Comparación de los niveles de significancia de los efectos simples sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	89
Cuadro 43: Comparación de los niveles de significancia de los efectos principales sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	90
Cuadro 44: Análisis de varianza de la oxidación.....	92
Cuadro 45: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre la oxidación.....	92
Cuadro 46: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre la oxidación.....	93
Cuadro 47: ANOVA de efectos simples sobre la oxidación.....	94
Cuadro 48: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la oxidación.....	96
Cuadro 49: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la oxidación..	97
Cuadro 50: ANOVA para la presencia de raíces.....	99
Cuadro 51: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre la presencia de raíces.....	99
Cuadro 52: ANOVA de efectos simples sobre la presencia de raíces.....	100

Cuadro 53: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la presencia de raíces.....	102
Cuadro 54: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la presencia de raíces.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: <i>Dionaea muscipula</i> Ellis.....	20
Figura 02: Flujograma para la preparación del medio de cultivo MS.....	50
Figura 03: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para el número de brotes por explante.....	60
Figura 04: Grafica de los efectos principales A, B y C para el número de brotes por explante.....	61
Figura 05: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para el número de hojas por explante.....	66
Figura 06: Gráfica de los efectos principales A, B y C para el número de hojas por explante.....	67
Figura 07: Grafica de los efectos simples AB, BC y AC para el tamaño promedio de los brotes.....	72
Figura 08: Gráfica de los efectos principales A, B y C para el tamaño promedio de los brotes.....	73
Figura 09: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para la TVM.....	79
Figura 10: Gráfica de los efectos principales A, B y C para la TVM	80
Figura 11: Grafica de los efectos simples AB, BC y AC para el porcentaje de tejido diferenciado	85
Figura 12: Gráfica de los efectos principales A, B y C sobre el porcentaje de tejido diferenciado.	86
Figura 13: Tiempo que demora el tejido para diferenciarse variando las concentraciones de dos citoquininas y nutrientes del medio MS.....	91
Figura 14: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC sobre la oxidación...97	
Figura 15: Gráfica de los efectos principales A, B y C sobre la oxidación.....98	
Figura 16: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC sobre la presencia de raíces	103
Figura 17: Gráfica de los efectos principales A, B y C para la presencia de raíces	104

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Características botánicas de <i>Dionaea muscipula</i>	122
ANEXO 2: Sales que componen el medio MS.....	123
ANEXO 3: Preparación del medio MS (Murashige and Skoog).....	124
ANEXO 4: Siembra <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	125
ANEXO 5: Metodología de evaluación.....	126
ANEXO 6: Zonas de regeneración de brotes del explante.....	126
ANEXO 7: Presencia de oxidación en los explantes.....	127
ANEXO 8: Componentes del medio Murashige y Skoog completo (1X).....	127
ANEXO 9: Respuesta de los explantes durante los 72 días de evaluación..	128
ANEXO 10: Respuesta de las unidades experimentales después de 120 días de la siembra <i>in vitro</i> de <i>Dionaea muscipula</i>	129

I. INTRODUCCIÓN

Venus atrapamosca (*Dionaea muscipula*) es una especie nativa subtropical originaria de Wilmintong situado en Carolina del Norte de los Estados Unidos; esta especie se encuentra en peligro de extinción; sin embargo, en la actualidad tiene una gran acogida como planta ornamental y medicinal, *Dionaea muscipula* posee compuestos farmacológicamente importantes como: naftoquinonas, flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos, estos componentes están siendo utilizados como insumo en la elaboración de productos farmacéuticos para tratar diferentes enfermedades (Banasiuk *et al*, 2012). En los Estados Unidos se comercializa un medicamento a base del extracto de *Dionaea muscipula* que parece ser muy efectivo contra las células cancerígenas (Philipp, 2010).

Debido a los atributos mencionados anteriormente el interés comercial de *Dionaea muscipula* Ellis ha incrementado; sin embargo, la producción masal de esta especie tanto por el método convencional como también empleando la técnica del cultivo de tejidos *in vitro* no compensa las demandas comerciales; por lo tanto, es necesario superar la tasa de multiplicación a través del cultivo de tejidos *in vitro* estudiando las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS y de las citoquininas. El incremento de la productividad de *Dionaea muscipula* aportará a satisfacer la demanda, a conservar su habitat natural y hará posible que la producción masal *in vitro* sea rentable.

1.1. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de las citoquininas y la concentración nutricional modificada del medio MS (Murashige & Skoog) sobre la tasa de multiplicación de venus atrapamosca (*Dionaea muscipula* Ellis) a través de la organogénesis directa a partir de hojas de plantas *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la KIN (kinetina) y BAP (bencil-amino purina) sobre la tasa de multiplicación de *Dionaea muscipula* Ellis.
2. Determinar el efecto del medio MS/2 (Murashige & Skoog de concentración media) y MS/3 (Murashige & Skoog de concentración a la tercera parte) sobre la tasa de multiplicación de *Dionaea muscipula* Ellis.
3. Determinar una concentración nutricional modificada del medio MS y de las citoquininas para reducir el tiempo de diferenciación del explante.
4. Determinar el efecto de las citoquininas y las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS sobre la oxidación del tejido de *Dionaea muscipula*.
5. Determinar el efecto de las citoquininas y las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS sobre la presencia de raíces en plántulas *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Dionaea muscipula* Ellis

2.1.1. Generalidades de *Dionaea muscipula*

Dionaea muscipula, también llamada venus atrapamoscas, pertenece a la especie monotípico de la familia Droseráceae, se caracteriza por atrapar presas vivas, principalmente insectos y arácnidos. *Dionaea muscipula* Ellis es una planta ornamental importante y atractiva, esta planta ha sido utilizado durante años como fuente para elaborar medicamentos, posee varios metabolitos secundarios (naftoquinonas) que han sido identificados por Dietzel *et al*, en 1985; Kreher *et al*, en 1990; Pakulski y Budzianowski, en 1996a (Wuu Yang y Lyon, 2005)

Dionaea muscipula está adaptada a vivir de forma natural en suelos ácidos, pantanosas y pobres en nutrientes como fósforo y nitrógeno, sobreviven muy bien en laderas de piedra caliza y de turba húmeda (Anchor, 2014, Cahuinadencul, 2006 y The International Carnivorous Plant Society, 2008). En la actualidad se están realizando investigaciones en el campo de la medicina por las posibilidades de uso en el tratamiento contra el cáncer (Vilchez *et al*, 2006).

Se estima que existe alrededor de 600 especies que cumplen esta característica; casi todas crecen en suelos ácidos y pobres en nitrógeno asimilable; sin embargo, capturan insectos para obtener compuestos nitrogenados sin necesidad de sintetizarlos, al mismo tiempo las hojas verdes de estas plantas fabrican hidratos de carbono, el mecanismo de captura ocupa un espacio pequeño, siendo sus presas insectos diminutos. Existen principalmente cinco métodos de captura que son utilizados por las plantas carnívoras entre los cuales se agrupan en activos y pasivos, distinguiéndose a: Jarras (ej. *Nepenthes*), Pegamento (ej. *Droseras*), Maxilares (ej. *Dionaeas*), Succión (ej. *Utricularia*) y Nasa (ej. *Genlisea*) (Vilchez *et al*, 2006).

2.1.2. Taxonomía

Según *Bold System* (2016) e *International Carnivorous Plant Society* (2016) mencionan que venus atrapamosca pertenece a la siguiente clasificación:

Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta
Superdivisión	: Spermatophyta
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Dilleniidae
Orden	: Caryophyllales
Familia	: Droseraceae
Género	: <i>Dionaea</i>
Especie	: <i>Dionaea muscipula</i> Ellis

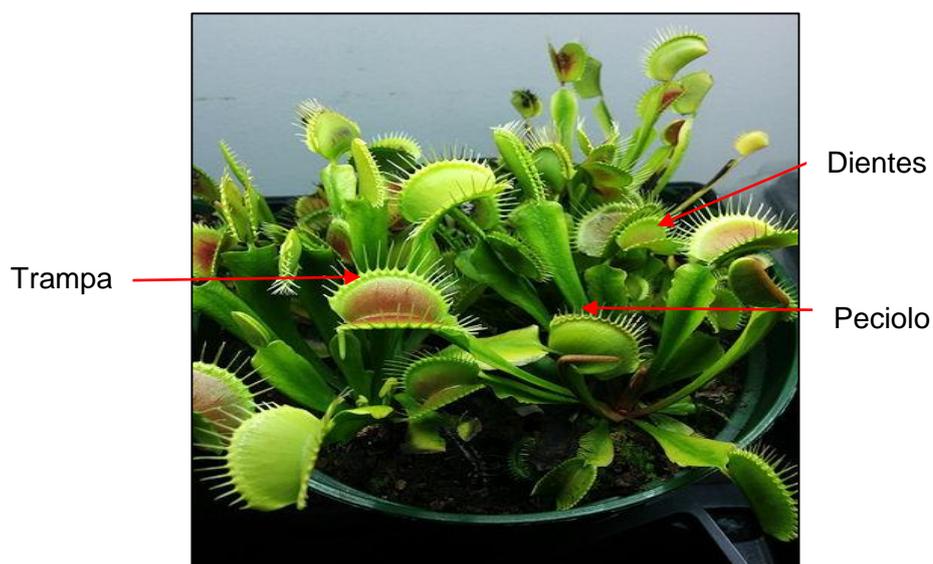


Figura 01: Partes de *Dionaea muscipula* Ellis

Fuente: International Carnivorous Plant Society (2016)

2.1.3. Descripción general

Venus atrapamosca es una planta perenne con al menos 5 hojas alargadas que acaban en una trampa, esta consiste en dos lóbulos con forma redondeada que tiene entre 14 y 20 dientes en los bordes; en el interior de las bocas de color rojizo existen generalmente 3 pelos excitables y muchas glándulas digestivas, estas glándulas secretan un ácido digestivo que contienen numerosas enzimas como proteasas, nucleasas, fosfatasas y amilasas para la digestión de su presa; detrás de los dientes se encuentran células productoras de néctar que atraen a los insectos. Después de absorber los nutrientes de las partes blandas del insecto, la trampa se abre; el tiempo de apertura dependerá del tamaño y peso de su presa, generalmente las trampas se abren después de dos semanas mostrando el esqueleto no digerible del insecto, quedando lista para la siguiente comida (Philipp, 2010 y Cahuinadencul, 2006).

Banasiuk *et al*, (2012) mencionan que el término plantas carnívoras lo designó Charles Darwin al referirse a las plantas que se alimentan de insectos y que pueden digerir a su presa a través de la secreción de enzimas, no incluyó a las plantas que dependen de la actividad bacteriana para su digestión; a su vez también mencionó que su medio de supervivencia son suelos pobres en nutrientes. Se ha estimado que existen 600 especies identificadas tanto monocotiledóneas y dicotiledóneas.

2.1.4. Distribución geográfica e importancia socioeconómica

La Venus atrapamoscas (*Dionaea muscipula* Ellis) es la única especie del género *Dionaea*, esta planta subtropical es originaria de Wilmintong de Carolina del Norte, al parecer se presume que existe una población naturalizada de la Venus atrapamoscas en el norte de Florida y Nueva Jersey, así como también existe una población introducida en Westernnig - Washington (National Wildlife Federation, 2016).

Las plantas carnívoras fueron utilizadas por las poblaciones nativas de todo el mundo durante cientos de años como medicina tradicional. En Europa

y América del Norte, *Pinguicula vulgaris* y *Pinguicula alpina* fueron utilizadas para el tratamiento de heridas; por otro lado en el sureste de Asia y la India, los nativos de las tribus locales utilizaron el jugo de las flores de las plantas carnívoras como plantas medicinales para tratar el dolor de estómago, de los ojos (cataratas y ceguera nocturna), problemas urinarios y enfermedades de la piel; estos preparados también controlaron la malaria, la lepra y el cólera (Philipp, 2010). Sin embargo, también se usó para tratar enfermedades pulmonares y la tos (Didry *et al*, citado por Banasiuk *et al*, 2012).

Banasiuk *et al*, 2012, mencionan que el género *Drosera* y *Dionaea* son fuentes naturales de compuestos farmacológicamente importantes como las naftoquinonas, flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos. En la actualidad se encontró evidencias de la actividad bacteriostática y antitumoral de los extractos de *Drosera*, el extracto de *Venus atrapamosca* está disponible en el mercado como remedio herbal, según la Sociedad Americana del Cáncer, estos productos se promueven en la medicina como una alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, incluyendo el VIH y el cáncer de piel de Crohn (Philipp, 2010).

2.1.5. Conservación

La especie *Dionaea muscipula* está clasificada como vulnerable por la Federación Nacional de Vida Silvestre. En el 2015, se estimaba que había menos de 33 000 plantas en la naturaleza, todo estuvo distribuida en menos de 75 millas de la ciudad de Wilmington y todos los lugares de propiedad de The Nature Conservancy (Wikipedia, 2006)

Las condiciones óptimas para la sobrevivencia de *Dionaea muscipula* son: alta intensidad de luz solar, alta humedad y temperatura suave de 25 – 35°C. Generalmente la planta se alimenta principalmente de insectos y arácnidos, pero no es preocupante si la planta cultivada no caza por sus propios medios, ya que *Dionaea muscipula* puede sobrevivir perfectamente durante meses haciendo fotosíntesis (Wuu y Lyon, 2005)

2.1.6. Formas de propagación de *Dionaea muscipula* Ellis

La propagación de Venus atrapamosca generalmente se da a través de rizomas, esquejes de hoja y semillas; sin embargo, las semillas necesitan alrededor de cuatro a cinco años para alcanzar su madurez; no obstante, las plantas tardan mucho tiempo en hacerse adultas para producir semillas, incluso pierden energía para producir flores (Philipp, 2010)

Cuadro 01: Factores climáticos óptimos para el desarrollo de *Dionaea muscipula* Ellis.

	T° Verano	T° Invierno	Riego	Humedad	Luz Solar	Hibernación
<i>Dionaea</i>	20 / 35 °C	0 / 10 °C	X bandeja moderado	60 / 70 %	Directa	Invierno

Fuente: Springer (1999)

2.2. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

2.2.1. Definición del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es la habilidad de establecer y mantener órganos y/o tejidos vegetales (hoja, tallo, raíz, yemas, capítulos florales, anteras, etc.) en un medio artificial estéril con fuentes de carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y agar del que se nutrirán las células, proporcionándole artificialmente las condiciones físicas (temperatura, intensidad de luz, periodo y humedad) apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido para generar un individuo completo (Cubero, 2003, Dubos, 2006, Aguirre *et al*, 2010, Bermejo, 2010 y Jacome, 2011)

El desarrollo del tejido o explante puede ser dirigido a través de diferentes vías hasta que finalmente se regenere una planta; toda la progenie proviene de una sola planta madre, a estas progenies se les denomina

clones. La micropropagación ha resultado especialmente útil en la multiplicación de una amplia variedad de cultivos, obteniendo una producción a gran escala, de calidad y libre de enfermedades (Smith y Wood citado por Rodríguez *et al*, 2010)

2.2.2. Avances del cultivo *in vitro*

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a principios del siglo XX cuando Haberlandt intentó cultivar células aisladas de plantas (Aguirre *et al*, 2010). Estudios detallados comenzaron en los años 1930 – 1935 por el descubrimiento de la primera sustancia natural reguladora del crecimiento vegetal, es decir la auxina (ácido indolacético) (Rodríguez *et al*, 2010).

Las bases científicas para el desarrollo del cultivo de células y tejidos vegetales se fundamentan en la teoría celular de Schleiden y Schwann (teoría de la totipotencia) quienes enuncian que las células individuales de un organismo tienen la capacidad de generar un individuo completo e idéntica a la planta madre. Sin embargo, en la década de los 50, el descubrimiento de los reguladores de crecimiento y los medios de cultivo aceleraron el desarrollo de la técnica del cultivo *in vitro*. (Rodríguez *et al*, 2010).

A partir de 1970 Milller y sus colaboradores en el año 1995 aislaron la kinetina, cuya función es la inducción de las divisiones celulares. Por otro lado, Morel y Martin en 1952 inician el cultivo de meristemos, generando plantas libres de virus a partir de las Dalias virósicas; también Carlson en 1972 inició la fusión de protoplasto obteniendo el primer híbrido interespecífico en el género *Nicotiana* (Aguirre *et al*, 2010)

2.2.3. Aplicaciones del cultivo *in vitro*

La técnica del cultivo *in vitro* está siendo empleada eficientemente para la propagación de muchos cultivos hortícolas, ornamentales y recientemente en especies leñosas (Rojas *et al*, 2004). También se está usando como parte de la conservación *ex situ* en bancos de semillas y para el rescate de especies que tienen problemas de propagación o conservación, en especies

con semillas recalcitrantes, especies que no producen semillas viables, con baja fertilidad o con producción reducida de semillas y polen (Pence citado por Jacome, 2011)

Además, esta técnica constituye una alternativa válida para propagar y conservar clones con elevado grado de heterocigosis, especies perennes con ciclos de vida muy largos y que no producen semilla hasta cierta edad (Ibañez 2013).

2.2.4. Características del cultivo *in vitro*

1. Se realiza a micro-escala, sobre una superficie relativamente pequeña.
2. Se optimizan las condiciones ambientales, factores físicos, nutricionales y hormonales.
3. Se excluyen todos los microorganismos (hongo, bacterias y virus), insectos y nemátodos.
4. Existe la capacidad de cultivar protoplastos o células individuales y genera organismos completos (Cubero, 2003).

2.2.5. Principales métodos de micropropagación

Dubos (2006) recalca que de acuerdo a George & Sherrington en 1984 y Roca & Mroginski en 1991 señalaron los métodos de regeneración empleados para la propagación *in vitro* de plantas:

- a) Organogénesis directa, consiste en la multiplicación de brotes provenientes de yemas axilares, terminales o laterales; el tejido usado como inicial es meristemático.
- b) Organogénesis indirecta, este método permite la formación del brote adventicio o de la raíz a partir del callo; el tejido usado como inicial es parenquimático.
- c) Embriogénesis somática, forma embriones directamente en el explante primario o indirectamente de células cultivadas en suspensión o en un medio líquido.

2.2.6. Consideraciones en la micropropagación durante la fase de multiplicación

2.2.6.1. Fase de multiplicación

El principal objetivo de esta fase es aumentar el número de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc), produciendo así mayor número de plantas posibles en el menor espacio de tiempo (Aguirre *et al*, 2010, Jacome, 2011 y Mafla, 2006)

Lo importante de esta fase es obtener una tasa media satisfactoria con el mínimo de variación de explante a explante; la tasa de multiplicación es el número de explantes nuevos producido a partir de un explante inicial en un cierto periodo de tiempo, la determinación de este valor indica la eficiencia biológica y económica, es decir el número de propágulos, la rapidez en el crecimiento, la formación de embriones somáticos y brotes formados a partir del explante inicial (Rojas citado por Jacome, 2011).

La multiplicación de individuos *in vitro* se sub divide en 3 vías: activación y proliferación de yemas axilares, producción de yemas adventicias (organogénesis adventicia) y embriogénesis somática (Torpe *et al*, citado por Candela, 2008); ambas vías de regeneración: organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta (Mafla, 2006)

La organogénesis es una de las vías para regenerar una planta, los ápices caulinares y/o radiculares conduce a la diferenciación de meristemas. La inducción de la organogénesis *in vitro* depende de múltiples factores como: la planta madre, la versatilidad de las especies y los reguladores de crecimiento que desempeñan un papel fundamental en el control de la morfogénesis (Leal, 2003). Sin embargo, el balance e interacción de algunas fitohormonas como las auxinas y citoquininas favorecen el proceso de morfogénesis (Jacome, 2011)

Por otro lado, a medida que el explante comienza a crecer y multiplicarse es subdividido y cada nuevo propágulo es cultivado individualmente en un nuevo medio de cultivo, una vez que se multiplique y crezca, nuevamente es subdividido otra vez; a esta parte se le llama subcultivo. El número de subdivisiones depende de la especie, pero en general no se puede exagerar, porque pueden presentarse efectos negativos en las vitroplántulas; por ejemplo, puede haber cambios genéticos por la acción de las hormonas, para el caso del plátano solo se pueden realizar de 5 a 7 subdivisiones (Rojas *et al*, 2004). Sin embargo, los brotes deben tener una longitud superior a un centímetro para poder facilitar su manejo al ser subcultivados y con la finalidad de incrementar la tasa de multiplicación (Vilchez *et al*, 2008).

2.2.6.2. La planta donadora

La planta madre o también llamada planta donadora, debe ser sana y poseer características varietales de la especie elegida, de estas plantas se toman los primeros explantes para iniciar la multiplicación *in vitro*, obteniendo finalmente un elevado número de plantas sanas genéticamente iguales a la planta madre.

Las condiciones internas y externas en que se encuentra la planta donante antes de iniciar el cultivo pueden influir en el futuro desarrollo del explante. La planta donante debe estar libre de enfermedades, sin sufrir stress alguno y preferiblemente debe estar en activo crecimiento (Rojas *et al*, 2004)

2.2.6.3. Explante

El explante es la pequeña porción del tejido vegetal que funciona como generador de nuevas plantas (Badillo *et al*, 2009)

Rojas (2004), García (2010) y Jacome (2011) indican que la madurez o inmadurez, es decir la edad fisiológica es de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e

indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*; y cuanto más grande sea el explante mayor será la posibilidad de inducir a la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos.

2.2.6.4. Composición de los medios de cultivo para la multiplicación de *Dionaea muscipula* Ellis

Aguirre *et al* (2010) señalan que el medio MS (Murashige & Skoog) es considerado como el medio basal más utilizado en la regeneración de plantas y apto para el desarrollo de varias especies; sin embargo, existen numerosas variaciones comerciales de este medio que son utilizados de acuerdo al requerimiento del cultivo.

Rojas *et al* (2004) y Badillo *et al* (2009) mencionan que el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) está conformado por macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) esenciales para la supervivencia de la planta; también está conformado por hidratos de carbono, vitaminas, agentes reguladores del crecimiento que promueven la elongación celular, la formación de callos, raíces adventicias, la división celular y regulan el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Los tejidos cultivados *in vitro* en la mayoría de los casos no son autótrofos dependen completamente de una fuente externa y en proporciones adecuadas para obtener una planta completa.

a. Macro y micronutrientes

Los macroelementos indispensables para el desarrollo de la planta son el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio, los cuales intervienen en la conservación de los equilibrios iónicos de las plantas (Margara, citado por Dubos, 2006). El nitrógeno, se encuentra en grandes cantidades y están presentes en el medio en forma de nitratos o iones de amonio, estos compuestos son necesarios para el crecimiento vegetal; el magnesio se adiciona al medio en forma de sulfato de magnesio, esta sal es importante porque es un componente de la clorofila y facilita el funcionamiento de

enzimas; el fósforo se adiciona en forma de fosfato de potasio, esta sal es un componente principal de los ácidos nucleicos; el potasio se adiciona en forma de nitrato de potasio que sirve como el mayor ion positivo para el balance de los iones negativos (Leal, 2003).

b. Vitaminas y aminoácidos

La presencia de vitaminas son primordiales en el medio de cultivo entre ellas se encuentran la tiamina (vitamina B1), el ácido nicotínico o niacina y la piridoxina (vitamina B6); estas vitaminas junto al myo - inositol, son consideradas esenciales en muchos casos; sin embargo, no todas las vitaminas pueden ser consideradas totalmente esenciales, su ausencia o presencia en el medio y sus concentraciones dependen de la especie vegetal como también el tipo de cultivo que se esté desarrollando (George, citado por Cedeño, 2015). Las vitaminas no son resistentes al calor y no deben ser autoclavados (Molina, 2012).

c. Reguladores de crecimiento

La iniciación de raíces y brotes en las plantas, se encuentra regulada básicamente por la interacción de auxinas y citoquininas (Dubos, 2006).

Las fuentes de las citoquininas más usadas son la benzil amino purina (BAP), kinetina (KIN) y N⁶ – isopenteniladenina (2 - iP). Para algunas especies la adición de BAP única o combinada con otras citoquininas afecta la capacidad de formación de yemas; sin embargo, la exposición prolongada a citoquininas puede suprimir el crecimiento y desarrollo de brotes (Leal, 2003)

Por otro lado, los cambios de los niveles hormonales endógenos de auxinas y citoquininas regula la organogénesis *in vitro*, se determinó que altas concentraciones de auxinas con respecto a las citoquininas induce a la formación de raíces, mientras que lo contrario favorece a la formación de yemas vegetativas (Leal, 2003)

1. Citoquininas

Son hormonas vegetales que intervienen en el crecimiento y diferenciación de las células (Garate, 2010). Las citoquininas endógenas y exógenas pertenecen en un grupo de estructura química simple (N^6 – sustituto derivado de adenina); la zeatina (ZEA) fue la citoquininas más activa encontrada en plantas de maíz (Vidales, 2002 y Leal, 2003). Generalmente las citoquininas se producen en las zonas de crecimiento, en los meristemas radicales y caulinares que son transportadas vía acropétalo (Rojas *et al*, 2004).

Las citoquininas ayudan a la planta a inhibir la degradación de la clorofila, retarda el envejecimiento, estimula la división celular en tejidos no meristemáticos; promueve la formación de brotes adventicios o axilares en callos y órganos, promueve la embriogénesis e inhibe la formación de raíces (Cutz, 2004 y Molina, 2012). Dentro del grupo, las fuentes de citoquininas más utilizadas son: BA (benciladenina) llamada también bencilaminopurina (BAP), la kinetina y zeatina (Cutz, 2004 y Del Campo *et al*, 2007)

Vilchez *et al*, (2008) indicaron que la adición de N - 6 bencilaminopurina (BAP) en los medios de cultivo induce a la formación de nuevos brotes durante la multiplicación *in vitro* de Ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). La concentración de 3 mg/l de BAP resultó ser mejor para la obtención del mayor número de brotes. Además, obtuvo comportamiento similar adicionando kinetina en combinación con el ácido indolacético (AIA).

d. Carbohidratos

Los cultivos *in vitro* no son suficientemente autótrofos debido a que posee condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis, por lo tanto, la adición de azúcares al medio de cultivo es fundamental para satisfacer la demanda energética y de carbono, generando el crecimiento y desarrollo celular (Rukundo *et al*, citado por Minerva, 2013). Además los carbohidratos tienen efecto positivo en la fisiología, crecimiento y diferenciación de las células (Del Campo *et al*, 2007).

Dentro de las fuentes de carbono el azúcar es más utilizado por ser metabolizable por las plantas, en algunos casos se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa; en general la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Dubos, 2006).

Las concentraciones de 2 % a 5 % de sacarosa son suficientes para actuar como una fuente de energía para las semillas hasta que ellas produzcan clorofila y sean independientes (Molina, 2012).

e. Agentes gelificantes

Roca y Mroginski (1991) la efectividad del cultivo de tejidos depende de los agentes gelatinizador, existen varios agentes gelatinizadores como la agarosa, alginato, gelrita, el fitagel y el agar.

En general la sustancia gelificante más empleada es el agar, el cual forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica. El agar es una gelatina vegetal de origen marino que se obtiene a partir de diversas especies de algas rojas (*Rhodophyceae*) (Molina, 2012). Además, el agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, tiene la capacidad para gelificar los medios (Del Campo *et al*, 2007).

f. pH del medio de cultivo

Es muy importante ajustar el pH de acuerdo a la especie cultivada ya que permite una mejor solubilidad y absorción de los nutrientes que componen el medio de cultivo. Valores inferiores a 3,5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos; por otro lado; el potencial de hidrogeniones puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas; la absorción de iones de NO^{-3} aumenta la acidez del medio (Rey, 2012)

2.2.6.5. Factores físicos

Los factores físicos que influyen de forma significativa en la micropropagación son: la luz y la temperatura; las plantas necesitan luz para

regular ciertos procesos morfogénicos como para la formación del tallo, inducción radicular o embriogénesis somática, este proceso está influenciado por la intensidad, el fotoperiodo y la calidad de luz (Hartmann y Kester, citado por Dubos, 2006). La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C con 16/8 horas de luz/oscuridad (Jacome, 2011 y García, 2010)

Dubos (2006) menciona que al sellar los recipientes de cultivo con papel de aluminio o parafilm se crea un microambiente con humedad relativa cercana a 100 %, por lo que no es necesario prever dispositivos adicionales que permitan controlar la higrometría de la cámara de cultivo.

2.2.6.6. Problemas asociados al cultivo *in vitro* durante la fase de multiplicación

1. Contaminación

La contaminación se produce por la presencia de microorganismos superficiales o sistémicos provenientes de la planta donadora, la presencia de microorganismos patogénicos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados; para evitar la contaminación es necesario trabajar en ambientes asépticos (Villalobos, 2007)

2. Oxidación

La coloración café que presenta el explante en el medio de cultivo es causado por la oxidación de los compuestos fenólicos provocado al realizar una herida al tejido. Estos exudados son atrapados por el agar y acumulados en el medio de cultivo formándose un área negra alrededor del explante, los compuestos fenólicos interfieren en la absorción de nutrientes e inhiben el crecimiento de las plantas. Se evidenció que al herir o romper los tejidos se estimula la respiración ocasionando así la rápida oxidación de los compuestos fenólicos (Villalobos, 2007).

Sin embargo, los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar, los productos generados por la oxidación tienen carácter fitotóxico, porque son capaces de alterar eventos morfogénéticos, el crecimiento y desarrollo (Afanador, 2005)

En común el fenómeno de oxidación del explante y del medio de cultivo se presenta cuando el explante sufre cortes, la primera respuesta es la exudación de los compuestos fenólicos en el sitio de corte, posteriormente se provoca un severo oscurecimiento del tejido y del medio circundante, este factor limita la respuesta del explante provocando inclusive la muerte. Para mantener la capacidad de regeneración de los explantes, es importante la aplicación de agentes adsorbentes (ácido nítrico y el carbón activado) para detoxificar el medio y evitar la acción negativa de los exudados fenólicos (Del Campo *et al*, 2007).

El carbón activado (CA) es el agente adsorbente más utilizado, este compuesto dispersa y adsorbe las sustancias fenólicas o la polivinilpirrolidona (PVP) del medio, también es un buen modificador del potencial de redox, oxígeno y permite incubar en condiciones de oscuridad, bajo pH y temperaturas bajas (Afanador, 2005).

3. Vitrificación e hiperhidratación

Es un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados *in vitro*, especialmente en las hojas; los niveles de proteína de las hojas hiperhidratadas son inferiores a las hojas normales, los factores que intervienen en la hiperhidratación son altas concentraciones de sales, el agente gelificante, elevada dosis de reguladores de crecimiento (citoquinias, auxinas, etileno y otras); una baja intensidad lumínica, la humedad relativa y el potencial hídrico durante la incubación (Afanador, 2005).

Los primeros signos de esta anomalía se manifiestan durante las primeras semanas, inicialmente las hojas que están en contacto con el medio presentan un crecimiento más de lo normal, una apariencia frágil y translúcida, la capa cuticular y la epidermis se vuelven más delgadas, con

estomas anormales y con cantidades inferiores de cloroplastos y proteínas. Todas estos factores interfieren negativamente en la aclimatación y el trasplante, obteniendo supervivencias bajas e incluso la muerte (Afanador, 2005).

2.2.6.7. Ventajas y desventajas de la micropropagación durante la fase de multiplicación

Las ventajas potenciales de esta técnica son la obtención de altas tasas de multiplicación, obtención de cultivos asépticos que puede mantenerse libre de hongos, bacterias, virus e insectos; como también la producción masiva en espacios reducidos, a la vez esta técnica es bastante aplicada en programas de mejora genética de plantas siendo económicas frente a colecciones de campo (Iriundo citado por Jacome, 2011). También esta técnica permite el incremento acelerado del número de plantas por cada genotipo y la reducción del tiempo de multiplicación (Rojas *et al* 2004).

Sin embargo, la técnica del cultivo *in vitro* no está exenta de problemas, en muchos casos la micropropagación de una especie presenta enormes dificultades debida a la contaminación del material de partida, la falta de respuesta del explante inicial, la hiperhidratación de los tallos, la ausencia de enraizamiento y la variación somaclonal (variación genética en el material vegetal a consecuencia del cultivo *in vitro*) (Rojas *et al*, 2004).

2.3. Antecedentes

2.3.1. Micropropagación de *Dionaea muscipula* Ellis

Hutchinson, (1984) en su trabajo *in vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis, probó el medio LS (Linsmaier & Skoog) para la micropropagación de *Dionaea muscipula*, la reducción de la concentración de nitrógeno en el medio redujo el porcentaje de multiplicación, las hojas se tornaron amarillentas y la producción de antocianina en las trampas. Obtuvo 9,6 de brotes con el medio LS de concentración completa y 3,6 brotes con el

medio LS de menor concentración de sales (LS/2). También probó diferentes concentraciones de citoquininas de manera independiente que fueron 5, 10, 15, 20 μM de kinetina y BAP; determinó la concentración óptima de kinetina, la adición de 10 μM KIN fue la mejor, por debajo o encima de este valor se redujo la proliferación de brotes, sin embargo, al incrementar la concentración de BAP se produjo el incremento de plántulas, pero con hojas poco desarrolladas, trampas distorsionadas y raíces cortas. La Kinetina tuvo mayor proliferación de brotes que BAP.

También Hutchinson (1984) probó una gama de niveles de pH (3,7 – 6,7) y confirma que los valores de 5,7 – 6,7 son los óptimos para el cultivo de *Dionaea muscipula*, con valores menores a 4,7 obtuvo menor número de plantas (2,8 – 3,7 plantas). También obtuvo menor número de brotes en niveles de luz baja 25 y 50 $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$ reportándose con 6,8 brotes por explante, sin embargo no observó mejoría al incrementar el nivel de luz.

Curcovic & Berljak, (1996) en su trabajo, *In Vitro Growth and Regeneration of Drosera spatulata* Labill on Various Media, regeneraron plantas *in vitro* de *Drosera spatulata* a partir del explante hoja, el MS completo resultó ser el mejor para *D. spatulata* obteniendo plantas de mayor altura. Al reducir la concentración de nutrientes del medio MS también se redujo la tasa de multiplicación, obtuvieron de 83 a 100 % de regeneración de plantas con el medio MS completo y a la mitad, en un periodo de cuatro meses y dos semanas. La adición de reguladores de crecimiento a altas concentraciones retardó el crecimiento de las plántulas; sin embargo, observaron que con el medio MS sin hormonas se produjo raíces accidentalmente, el crecimiento y la multiplicación fue mejor.

Ichiishi *et al*, (1999) en su trabajo Effects of Macro – Components and Sucrose in the Medium on *in vitro* red color pigmentation in *Dionaea Muscipula* Ellis and *Drosera Spathulata* Labill, determinaron que la organogénesis y su respuesta al crecimiento estuvo alterada por la alta o baja concentración de KNO_3 y BAP. La disminución de la concentración nutricional

de medio MS (MS/2) y sacarosa a 1,5 % influyó en la pigmentación roja de las hojas, la cantidad y tamaño de las hojas. Sin embargo, al cultivar en el medio MS de concentración nutricional completa, sin NH_4NO_3 y sin KNO_3 la coloración roja en las hojas incremento y el crecimiento de la planta se vió reducida. Concluyeron que el medio MS/2 es una fuente principal de nitrógeno para la familia de las Droseráceas favoreciendo en el crecimiento de la planta.

Teng, (1999) regeneró plantas de *Dionaea muscipula* usando el medio MS adicionado 2 g/l de carbón activado más 0,57 μM IAA y 2,32 μM kinetina, en cuatro meses obtuvo un promedio de 16 brotes por explante; a su vez cultivó explantes de *D. muscipula* en el medio MS sin carbón activado, en el transcurso del tiempo las plantas que permanecían en el medio sin carbón activado se tornaron oscuras y murieron dentro de un mes, efectos contrarios obtuvo al cultivar los explantes en el medio con carbón activado; sin embargo, tardaron varias semanas en crecer, quedándose enanas.

Katsuhiko *et al* (2000) en su investigación, Finding and Visualizing Some Unknown Natural Phenomena in Carnivorous Plants by Tissue Culture, con el objetivo de estudiar la relación entre la organogénesis y los componentes químicos específicos del medio, probaron tres concentraciones del medio MS (MS completo, MS/2 y MS/3) y determinaron al medio MS/2 de promover mayor crecimiento y proliferación de brotes. También determinaron que la presencia de BAP y KNO_3 controla la organogénesis en el cultivo de tejidos de *Utricularia praelonga*, a su vez llegaron a la conclusión que la diferenciación puede ser provocada por el nitrógeno y no por la fitohormona.

Gi – Won *et al*, (2002) en su investigación, Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture, trabajaron con explantes de tres meses de edad, probaron tres tipos de medio (MS, B5 y LS) y determinaron que el medio MS fue el mejor para la micropropagación de *Dionaea muscipula*, a su vez mencionaron que estos resultados se debe a que el factor importante fue la absorción de nitrógeno, las fuentes más importantes de nitrógeno fueron el NO_3 y NH_4 presentes en el medio MS; también probaron tres concentraciones

diferentes del medio Murashige & Skoog, MS/3, MS/6 y MS/9 sin hormonas. Determinaron tener mayor número de brotes con el medio MS/3 obteniendo $19,55 \pm 2,96$ brotes por explante y 2,85 cm de altura de planta.

También determinaron el efecto de la kinetina (0, 0,5, 2,3, 4,7, 14,0 y 23,3) complementado con MS/3, como también el efecto de BAP (0 a 22,2 μM) complementado con MS/3, concluyeron determinando que la presencia de BAP suprimió la proliferación de brotes y la longitud de las hojas; sin embargo, 2,3 μM de kinetina + MS/3 fue la mejor interacción debido a que obtuvo mayor número de brotes ($33,50 \pm 3,14$ brotes por explante) y hojas por explante. Por otro lado reportó, que al incrementar la concentración de kinetina la cantidad de brotes producidos se vieron reducidos obteniéndose con 4,7 μM de kinetina un total de 20,25 brotes por explante y con 14,0 μM , 23,3 μM de kinetina obtuvieron 12,55 y 3,25 brotes por explante respectivamente.

Obtuvieron alta proliferación de brotes con el MS/3 más 2,3 μM Kinetina, la aplicación de la bencil amino purina (BAP) en el medio de cultivo suprimió la proliferación de brotes y la longitud de las hojas, observándose peciolo y trampas distorsionadas. La adición de auxinas NAA y 2,4 – D inhibe fuertemente la formación de raíces, a su vez concluyeron que las auxinas tienen un efecto inhibitorio sobre la formación de raíces en *Dionaea muscipula*; sin embargo, la proliferación de los brotes también fue influenciada por la edad y tipo del explante.

Jayaram & Prasad (2007) en su trabajo, rapid *in vitro* multiplicación of *Drosera burmanii* Vahl: Vulnerable and medicinally important insectivorous plant, con el objetivo de establecer un protocolo para incrementar la escala de multiplicación *in vitro* de *Drosera burmanii*, probaron cuatro concentraciones del medio MS (MS completo, MS/2, MS/3 y MS/4) e interaccionaron con dos citoquininas (kinetina y BAP a concentraciones de 0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/l). el medio MS/2 resultó influir en gran medida para el aumento de brotes.

Por otro lado, las citoquininas inhiben el crecimiento radicular y promueve la proliferación de brotes; sin embargo, al incrementar la concentración de BAP y kinetina se retrasó el crecimiento de los brotes y su formación, también se hallaron brotes y hojas atrofiadas, efectos fueron más pronunciada en BAP que en kinetina. Por otro lado, las plantas de crecimiento retardado de *D burmanii* cuando se transfirieron al medio de MS de menor concentración de kinetina y BAP, las plantas se recuperaron y comenzaron a crecer normalmente, a desarrollar brotes y hojas. El mejor medio de enraizamiento fue el medio MS basal sin hormonas de crecimiento, también se formaron raíces en los ensayos a mayor concentración de 1,0 mg/l de kinetina y 0,5 mg/l de BAP, las raíces que formaron fueron gruesas no ramificadas y con pelos radiculares muy densos.

Con el medio de cultivo el MS/2 y MS/3 se produjo un promedio de 2,2 y 1,3 plantas por explante, también se obtuvieron de 70 y 63,3 % respectivamente de tejido diferenciado. Sin embargo, con la interacción del medio MS + 0,1 KIN se obtuvo en promedio 1,9 plantas por explante.

Cuadro 02: Resultados de la propagación *in vitro* de *Drosera burmanii*

Medio MS con citoquininas (mg/l)	N° brotes/explante	% de diferenciación
MS + 0,1 KIN	1,9 ± 1,5	40
MS + 0,5 KIN	4,6 ± 3,3	53,3
MS + 1,0 KIN	7,5 ± 4,3	63,3
MS + 2,0 KIN	8,6 ± 3,4	46,6
MS + 0,1 BAP	2,5 ± 1,4	36,6
MS + 0,5 BAP	6,3 ± 3,5	33,3
MS + 1,0 BAP	8,7 ± 3,7	23,3
MS + 2,0 BAP	7,2 ± 2,0	16,6

Fuente: Jayaram & Prasad (2007)

Wawrosch *et al* (2009) An Improved 2-step Liquid Culture System for Efficient *In Vitro* Shoot Proliferation of Sundew (*Drosera rotundifolia* L.). determinaron que la adición de kinetina y BAP a los medios de cultivo tuvieron respuesta negativa en cuanto al porcentaje de diferenciación; sin embargo, se formó brotes cubriendo todo el explante, pero posteriormente no prosperaron. Por otro lado, adicionando 10 μ M de BAP en el medio MS se formaron pequeños brotes. El medio MS/2 produjo 9 brotes por explante aproximadamente resultando ser la concentración óptima.

Con la adición 2, 4, 6, 8 y 10 μ M de kinetina se produjo un total de 96,7, 86,7, 100, 76,7 y 80 % de explantes diferenciadas respectivamente, el número total de plantas que produjeron por explante fueron 10,1, 12, 11,2, 7 y 7,2 respectivamente. Efectos contrarios se obtuvo adicionando BAP, con la aplicación de 2, 4, 6, 8, 10 μ M de BAP, se redujo el porcentaje de diferenciación obteniendo 60, 56,7, 53,3, 46,7 y 23,3 %, los brotes obtenidos por explante no resultaron prosperar.

Banasiuk *et al*, (2012) en su trabajo *In vitro* cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites; con el objetivo que incrementar la producción de plantas de la familia Droseráceas cultivó *Dionaea muscipula*, *Drosera spathulata* y *D. pursh* en medios de Reinert & Morh (RM) y Murashige Skoog (MS); probaron dos concentraciones, el medio de cultivo completo y a la mitad. El medio MS completo reportó mejores resultados con un promedio de 7 plantas por explante. La aplicación del cultivo *in vitro* para *Dionaea muscipula* incrementa el contenido de metabolitos secundarios que esta especie posee.

Rejthar *et al*, (2014) en su trabajo, *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* as influenced by cytokinins, pH, sucrose, and nutrient concentration, probaron cuatro concentraciones del medio de cultivo MS (MS completo, MS/2, MS/4 y MS/8) y dos concentraciones de citoquininas, 0,1 y 0,3 mg/l de kinetina y BAP, también probaron 4 concentraciones de sacarosa (10, 20, 30 y 40 $g\ l^{-1}$). Concluyeron que el medio MS con menor concentración

de sacarosa demostró tener mayor capacidad de proliferación de brotes y tener un mayor diámetro de la roseta.

El medio de cultivo sin hormonas de crecimiento respondió mejor mostrando tener mayor capacidad de proliferación y crecimiento de brotes. Sin embargo, con la aplicación de kinetina y BAP se produjeron plantas anormales y morfológicamente enanas, el medio MS/2 resultó tener 20,10 mm de altura de brote y 2,6 brotes/ explante. Por otro lado, con el medio MS/8 se obtuvieron mayor altura de brotes y mayor cantidad de brotes en *D. intermedia*.

Con la adición de 0,5 mg/l y 1 mg/l de kinetina se obtuvieron plantas de 4-5 mm de altura y 1 brote por explante, no se halló presencia de raíz. Sin embargo, al adicionar 3 mg/l BA se halló presencia de raíz, la reducción de la concentración nutricional fue significativa para la presencia de raíces, estas presentaron ser más largas y más delgadas. La variación de niveles de los factores abióticos puede afectar en gran medida el crecimiento y desarrollo de plantas de *D. intermedia* cultivadas *in vitro*.

2.4. Hipótesis

Hipótesis general

Las citoquininas y las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (Murashige & Skoog) tienen efectos sobre la tasa de multiplicación de venus atrapamosca (*Dionaea muscipula* Ellis) a través de la organogénesis directa a partir de hojas de plantas *in vitro*.

Hipótesis específica

1. La adición de KIN (kinetina) y BAP (bencil-amino purina) a los medios de cultivo beneficiaron sobre la tasa de multiplicación de *Dionaea muscipula* Ellis.
2. El medio MS/2 (Murashige & Skoog de concentración media) y MS/3 (Murashige & Skoog de concentración a la tercera parte) tienen efecto sobre la tasa de multiplicación de *Dionaea muscipula* Ellis.
3. Una de las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS y de las citoquininas influenciaron sobre la reducción del tiempo de diferenciación del explante.
4. Las citoquininas y una de las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS influyeron sobre la oxidación del tejido de *Dionaea muscipula*.
5. Las citoquininas y las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS tienen efecto sobre la presencia de raíces en plántulas *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

2.5. Variables y operacionalización de variables

Cuadro 03: Operacionalización de variables

Variable dependiente multiplicación de <i>Dionaea muscipula</i> Ellis	Tasa de multiplicación	N° de brotes por explante N° de hojas por explante Tamaño promedio de los brotes Tasa de velocidad de multiplicación (TVM) Porcentaje de tejido diferenciado	
		Tiempo que demora el explante para diferenciarse	
		Oxidación	
		Presencia de raíces	
Variable independiente efecto de las citoquininas y la concentración nutricional	Concentraciones de dos citoquininas	kinetina 0,5 mg/l 1 mg/l 2 mg/l	BAP 0 mg/l 2,5 mg/l
		Concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (Murashige & Skoog)	MS/2 (Murashige & Skoog de concentración media) MS/3 (Murashige & Skoog de concentración a la tercera parte)
Variable interviniente Consideraciones en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	Temperatura Humedad Iluminación Fotoperiodo		

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Ubicación geográfica

Departamento : Lima

Provincia : Lima

Distrito : La Molina

Lugar : Universidad Nacional Agraria La Molina

Posición política

Altitud :245 msnm

Latitud Sur : 12° 4' 40,22"

Longitud Oeste : 76° 56' 37,41"

3.2. Tipo y nivel de investigación

Tipo de investigación

Aplicada, porque se recurrió a los conocimientos previos de la ciencia sobre temas de propagación *in vitro* de especies vegetales para incrementar la tasa de multiplicación de *Dionaea muscipula* y así abastecer la demanda.

Nivel de investigación

Experimental, porque se manipuló las concentraciones de las citoquininas y nutrientes del medio MS que fueron los componentes de los

medios de multiplicación, luego han sido comparadas con el testigo para determinar su efecto sobre la variable dependiente.

3.3. Población, muestra y unidad de análisis

Población

La población estuvo conformada por plantas *in vitro* de 18 meses de edad, se instaló 12 tratamientos con 6 repeticiones cada uno, haciendo en total 72 unidades experimentales.

Muestra

Estuvo conformada por todos los individuos que constituyó la población.

Unidad de análisis

La unidad de análisis fue cada frasco que contenía 20 ml de medio de multiplicación con 6 explantes hojas provenientes de plantas *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

3.4. Tratamientos en estudio

Se eligieron dos fuentes de citoquininas y se definieron las concentraciones respectivas (kinetina 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2mg/l y BAP 2,5 ml/l y 0,0 mg/l), así como las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (MS/2 y MS/3). La interacción del medio de cultivo MS/3 + 0,5 KIN se tomó como testigo debido Gi – Won *et al*, 2002 obtuvo buenos resultados en *Dionaea muscipula* Ellis; también tengo como referencia personal que esta interacción es el más usado hasta la fecha por las empresas en el Perú que se dedican a la producción de plantas carnívoras. Los tratamientos estudiados se presentan en el cuadro 04.

Cuadro 04: Tratamientos estudiados durante la investigación.

Tratamiento	Concentraciones nutricionales modificadas del Medio Murashige & Skoog (MS)	Hormonas (citoquininas)	
		KIN	BAP
T1	MS/2	0,5 mg/l	0 mg/l
T2 testigo	MS/3	0,5 mg/l	0 mg/l
T3	MS/2	1 mg/l	0 mg/l
T4	MS/3	1 mg/l	0 mg/l
T5	MS/2	2 mg/l	0 mg/l
T6	MS/3	2 mg/l	0 mg/l
T7	MS/2	0,5 mg/l	2,5 mg/l
T8	MS/3	0,5 mg/l	2,5 mg/l
T9	MS/2	1 mg/l	2,5 mg/l
T10	MS/3	1 mg/l	2,5 mg/l
T11	MS/2	2 mg/l	2,5 mg/l
T12	MS/3	2 mg/l	2,5 mg/l

Fuente: Elaboración propia

3.5. Prueba de hipótesis

Análisis estadístico

El experimento se instaló bajo un Diseño Completo al Azar (DCA) con arreglo factorial 2A3B2C cuyos factores en estudio fueron: A=concentraciones nutricionales modificadas del medio MS con niveles (a1=MS/2; a2=MS/3), B=concentraciones de kinetina con niveles (b1=0,5mg/l; b2=1,0mg/l y b3=2,0mg/l) y C=concentraciones de BAP con niveles (c1=0,0mg/l; c2=2,5mg/l).

Cuadro 05: Cuadro de ANOVA del diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2A3B2C

Fuentes de variación	GL	CM	Media de cuadrados esperados
Tratamientos	$abc - 1$	CM_T	
A	$a - 1$	CM_A	$\delta_e^2 + bcr \sum A_i^2 / GL_A$
B	$b - 1$	CM_B	$\delta_e^2 + acr \sum B_j^2 / GL_B$
C	$c - 1$	CM_C	$\delta_e^2 + abr \sum C_k^2 / GL_C$
AB	$(a - 1)(b - 1)$	CM_{AB}	$\delta_e^2 + cr \sum (AB)_{ij}^2 / GL_{AB}$
BC	$(b - 1)(c - 1)$	CM_{BC}	$\delta_e^2 + br \sum (AC)_{ik}^2 / GL_{AC}$
AC	$(a - 1)(c - 1)$	CM_{AC}	$\delta_e^2 + ar \sum (AB)_{jk}^2 / GL_{BC}$
ABC	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	CM_{ABC}	$\delta_e^2 + r \sum (ABC)_{ijk}^2 / GL_{ABC}$
Error	$(r - 1)abc$	CM_{ERROR}	δ_e^2
Total	$rabc - 1$		

3.5.1. Datos registrados

Para determinar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula* se evaluó las siguientes variables:

- ✓ Número de brotes por explante
- ✓ Número de hojas por explante
- ✓ Tamaño promedio de los brotes
- ✓ Tasa de velocidad de multiplicación (TVM)
- ✓ Porcentaje de tejido diferenciado

También se evaluó:

- ✓ Tiempo que demora el explante para diferenciarse
- ✓ Presencia de raíces
- ✓ Oxidación

3.5.2. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de información

Técnicas de evaluación

Observación

Permitió obtener datos directamente de las variables cualitativas en estudio, a través de esta técnica se determinó la oxidación, el tiempo que demora el explantes para diferenciarse y la presencia de raíces.

Conteo

A través de esta técnica se realizó el recuento de datos de las variables cuantitativas como el número de brotes y hojas por explante, el tamaño promedio de los brotes y el porcentaje de tejido diferenciado.

Instrumentos de recolección de información

Fichas de evaluación y cuaderno de apuntes.

3.6. Materiales y equipos

Material vegetal

Plantas *in vitro* de venus atrapamosca (*Dionaea muscipula* Ellis) de un 18 meses de edad (Subcultivo N° 6), adquiridas de la empresa SK VIVEROS.

Explante: hojas basales de plantas *in vitro* de *Dionaea muscipula* de 18 meses de edad.

Cuadro 06: Materiales utilizados durante el ensayo.

Materiales		
Material de vidrio	Material metálico	Otros materiales
Probetas de 100 y 500 ml	Hojas de bisturí N° 21	Papel aluminio
Erlenmeyer	Mango de bisturí N°4	Papel toalla
Placas Petri	Pinza de punta fina	Parafilm
Vaso precipitado de 1 l	Pinzas largo y curvo	Alcohol de 96°
80 Frascos de 200 ml		Alcohol de 70°
		Fosforo
		Mechero

Cuadro 07: Insumos utilizados durante el ensayo.

Insumos	
Sales de MS (Murashige y Skoog)	Myo – inositol
Agar	Carbón activado
Citoquininas (kinetina y BAP)	Vitaminas

Cuadro 08: Equipos utilizados durante el ensayo.

Equipos	
Micropipetas	Cámaras de flujo laminar
Autoclave	Microondas
pHmetro	Balanza analítica
Agitador	Refrigerador

3.7. Conducción de la investigación

La metodología de la investigación se subdividió en 4 etapas: acondicionamiento de las herramientas para la etapa de siembra, preparación del medio de cultivo, siembra bajo condiciones *in vitro* e incubación de las plantas *in vitro*.

1. Acondicionamiento de las herramientas para la etapa de siembra

Todo material de vidrio y de metal utilizados para la siembra se desinfectaron con alcohol etílico de 96° y se envolvieron con papel, posteriormente se autoclavó a 121°C durante 20 minutos.

2. Preparación del medio de cultivo

En esta etapa se preparó 1 litro de medio MS (Murashige & Skoog) universal, los componentes se listan en el anexo 08; se pesó 1,650 mg/l (NH_4NO_3), 440 mg/l ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 370 mg/l ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 170 mg/l (KH_2PO_4) y 1,900 mg/l (KNO_3) y se disolvió respectivamente en un vaso precipitado que contenía 300 ml de agua destilada. Luego se añadió los micronutrientes y posteriormente con la ayuda de una micropipeta se añadió 5 mg/l Acido nicotínico, 5 mg/l piridoxina, 1 mg/l tiamina y 2 mg/l glicina; posterior a ello se añadió 1 g/l myo inositol y 30 g/l de sacarosa, se trasvasó a una probeta de 1000 ml de capacidad y se enrazó.

2.1. Obtención del medio MS/2

De los 1000 ml del medio MS de concentración completa se extrajo 500 ml y se enrazó con agua destilada hasta obtener 1 litro de volumen, de esta manera se obtuvo 1 litro del medio MS/2. Posteriormente se fraccionó el volumen en seis frascos.

2.2. Obtención del medio MS/3

Se extrajo 333,3 ml del medio MS de concentración completa y se enrazó hasta obtener 1 litro de volumen, obteniendo de esta manera 1 litro del medio MS/3. Posteriormente se fraccionó el volumen en seis frascos.

Luego se añadió a cada frasco las concentraciones respectivas kinetina y BAP, cumpliéndose con los tratamientos como se muestran en el cuadro 04, posteriormente se ajustó el pH a $5,6 \pm 0,1$. Después se añadió 7 gr/l de agar (Sigma) y 4 gr/l de carbón activado (Sigma), se licuó en el microondas por 7 minutos hasta que el agar esté totalmente disuelto; se dispensó 20 ml del medio por cada frasco de vidrio y se cubrió con tapas de papel aluminio. Finalmente se esterilizó en la autoclave a 121°C por 20 minutos. Todo este procedimiento para la preparación de medios se detalla en la figura 2 que se presenta a continuación.

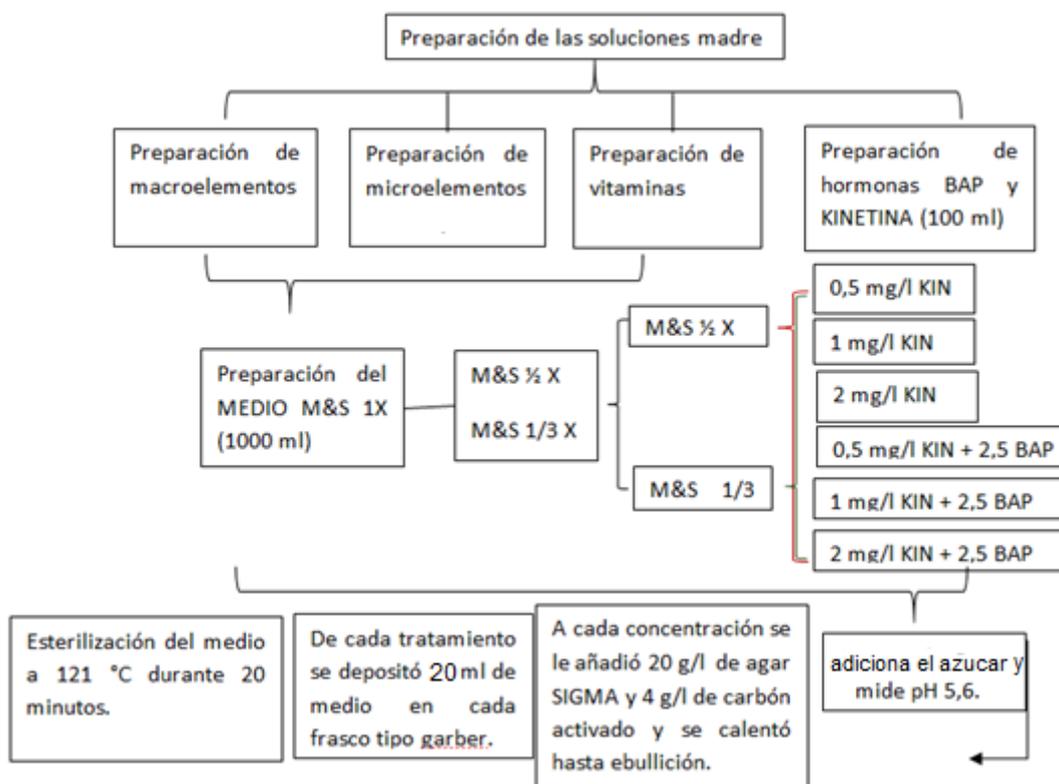


Figura 2: Flujograma para la preparación del medio de cultivo

3. Siembra bajo condiciones *in vitro*

Previo a la siembra se extrajeron las hojas basales de las plantas *in vitro* seleccionadas como proveedores de explantes para esta investigación, los mismos que con la ayuda del bisturí y una pinza se separaron del rizoma dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente se desinfectó las manos con alcohol etílico de 70° , al igual que la superficie de la cámara de flujo

laminar y del material de trabajo. Dentro de la cámara de flujo laminar se flameó todo el material metálico antes de su uso, se retiró la tapa de aluminio de los frascos e inmediatamente con la ayuda de una pinza se colocaron 6 explantes en cada frasco. Después de colocar los explantes se taparon y se sellaron con parafilm. Se rotuló cada frasco al tratamiento que pertenecía. Los procedimientos se muestran en el anexo 04.

4. Incubación de las plantas *in vitro*

Los explantes *in vitro* de *Dionaea muscipula* fueron colocados en condiciones de la cámara de crecimiento a 25°C de temperatura, 80 % de humedad relativa, 16 horas de luz de fotoperiodo y a una intensidad de 4305,56 lux durante cuatro meses.

3.8. Evaluaciones

Para la evaluación de las variables en estudio se realizó un subcultivo, se evaluaron variables cuantitativas y cualitativas como: el número de brotes y hojas por explante, altura promedio de los brotes, presencia de raíces y oxidación, estas variables se evaluaron a los 120 días de haber iniciado la siembra *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

3.8.1. Determinación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

3.8.1.1. Número de brotes por explante

Con la ayuda de un par de pinzas estériles se separó los brotes formados sobre el explante, posteriormente se realizó el conteo de brotes totales por unidad de análisis y se promedió con el número de explantes introducidos en el mismo; determinándose el número de brotes por explante para cada tratamiento.

3.8.1.2. Número de hojas por explante

Se contabilizó el número total de hojas desarrolladas por unidad de análisis y se promedió con el número de explantes introducidos en el mismo; determinándose el número de hojas por explante para cada tratamiento.

3.8.1.3. Tamaño promedio de los brotes

Con la cámara de medición se registró la altura de los brotes generados por unidad de análisis y se promedió con el total de brotes generados en este, la medida se tomó desde la base del rizoma hasta el extremo apical de las hojas de cada brote.

3.8.1.4. Tasa de velocidad de la multiplicación (TVM) (Afanador, 2005)

Para el cálculo de esta variable se realizó contabilizando el número de explantes (hoja) generados menos el número de explantes (hoja) introducidos de cada unidad de análisis sobre el tiempo que fueron 120 días.

$$TVM = \frac{N^{\circ} \text{ explantes obtenidos al final} - N^{\circ} \text{ explantes introducidos}}{\text{tiempo}}$$

3.8.1.5. Porcentaje de tejido diferenciado

La cantidad de tejido diferenciado de cada unidad experimental se realizó en base a la escala presentada en el cuadro 09, se distinguió como tejido diferenciado observando pequeños brotes pronunciados sobre el tejido del explante hoja, se evaluó esta variable hasta los 72 días después de la siembra bajo condiciones *in vitro*.

3.8.2. Tiempo que demora el explante para diferenciarse

Esta variable se evaluó a los 29 días, 35 días, 46 días, 53 días y 72 días, se tomaron estos intervalos de tiempo de evaluación debido a que la planta empezó a diferenciarse a los 29 días después de la siembra *in vitro* de *Dionaea muscipula*; con la finalidad de determinar el tratamiento que tenga

corto periodo de diferenciación en su totalidad se evaluó hasta los 72 días como tiempo límite, porque el testigo llegó a diferenciarse al 100 % en ese intervalo de tiempo. Se determinó la diferenciación del explante al observar la aparición de pequeños brotes sobre la superficie del mismo, la cuantificación del área de tejido diferenciado de cada unidad experimental se realizó en base a la escala que se presenta en el cuadro 09.

Cuadro 09: Escala numeral para la determinación del índice de tejido diferenciado.

ESCALA NUMERAL	DESCRIPCIÓN
16.67 %	1 explante completamente diferenciado
33.33 %	2 explantes completamente diferenciados
50.00 %	3 explantes completamente diferenciados
66.67 %	4 explantes completamente diferenciados
83.33 %	5 explantes completamente diferenciados
100.00 %	6 explantes completamente diferenciados

Fuente: Elaboración propia

La escala se diseñó en base a la cantidad de explantes diferenciados y muertos que contenía cada unidad de análisis.

3.8.3. Oxidación

Esta variable se evaluó visualmente cada 2 días hasta los 15 días después de la siembra *in vitro* de *Dionaea muscipula*, se determinó como tejido oxidado a los explantes que contenían sobre ellas manchas de coloración marrón clara u oscura.

3.8.4. Presencia de raíces

Esta variable se evaluó después de los 120 días de haber iniciado la siembra *in vitro* de *Dionaea muscipula*, se evaluó observando y contabilizando el número de raíces por cada unidad experimental y se promedió con el número de brotes generados en este, determinando así el número de raíces generados por brote.

IV. RESULTADOS

Los datos obtenidos fueron procesados en SAS y Minitab, el diseño estadístico utilizado fue DCA con arreglo factorial 2A3B2C cuyos factores en estudio fueron: A=concentraciones nutricionales modificadas del medio MS con dos niveles ($a_1=MS/2$; $a_2=MS/3$), B=concentraciones de kinetina con tres niveles ($b_1=0,5\text{mg/l}$; $b_2=1,0\text{mg/l}$ y $b_3=2,0\text{mg/l}$) y C=concentraciones de BAP con dos niveles ($c_1=0,0\text{mg/l}$; $c_2=2,5\text{mg/l}$).

Los resultados fueron evaluados a los niveles de significación de 1% y 5%, se interpretó los cuadros de ANVA con la finalidad de determinar los niveles de significancia estadística, se denotó como no significativo (ns), significativo (*) y altamente significativo (**).

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey a los dos niveles de significación de 1% y 5%.

4.1. Determinación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

Para la determinación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula* se evaluó el número de brotes y hojas por explante, altura promedio de los brotes, la tasa de velocidad de multiplicación y el porcentaje de tejido diferenciado.

4.1.1. Número de brotes por explante

En el cuadro 10 se observa que existe alta significancia en la doble interacción simple ABC (Medios MS*kinetina*BAP), en la interacción simple BC (kinetina*BAP) y al evaluar independientemente el efecto de las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (A); resultó significativa la interacción simple AC (Medios MS*BAP) con un coeficiente de variabilidad de 12,077 % y una desviación estándar de $\pm 1,35$.

Cuadro 10: Análisis de varianza de los factores en estudios para el número de brotes

Fuente	GL	SC	CM	F _{cal}	F _{tab}	
					5%	1%
Tratamientos	11	186,807	16,982	9,30 **	1,95	2,56
A=Medios MS	1	46,320	46,320	25,36 **	4,00	7,08
B=Kinetina	2	5,690	2,845	1,56 n.s	3,15	4,98
C=BAP	1	1,758	1,758	0,96 n.s	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	7,019	3,509	1,92 n.s	3,15	4,98
AC=Medios MS*BAP	1	9,938	9,938	5,44 *	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	20,255	10,128	5,54**	3,15	4,98
Medios MS*kinetina*BAP	2	95,934	47,967	26,26 **	3,15	4,98
Error	60	109,607	1,827			
Total	71	296,414				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 12, 077%

S = $\pm 1,352$

\bar{X} =11,1909

Cuadro 11: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el número de brotes por explante

O.M	Tratamientos	N° de brotes	Agrupación	
			5%	1%
1	T11(MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP)	13,2	a	a
2	T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	12,9	b	a
3	T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	12,5	b	a
4	T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	12,3	b	a
5	T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	12,2	b	a
6	T1 (MS/2+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	12,1	b	a
7	T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	11,4	c	b
8	T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	10,9	d	b
9	T7 (MS/2+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	10,5	d	b
10	T2 (testigo) (MS/3+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	8,8	d	b
11	T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	8,8	d	b
12	T10 (MS/3+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	8,5	d	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

En el cuadro 11 se muestra el efecto de los tratamientos sobre el número de brotes, el tratamiento T11 fue superior a los demás tratamientos con una media de 13,2 brotes por explante. Sin embargo, los tratamientos T9, T4, T3, T8 y T1 son estadísticamente similares y superiores al testigo, siendo estos tratamientos las óptimas para obtener altos índices de brotes por explante. Para evaluar el efecto y el comportamiento de las interacciones de los factores con sus respectivos niveles se realizó la prueba de ANOVA para determinar su significancia.

Cuadro 12: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el número de brotes por explante

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	31,655	31,655	17,33 **	4,00	7,08
A(b1c2)	1	9,612	9,612	5,26 *	4,00	7,08
A(b2c1)	1	0,083	0,083	0,05 n.s	4,00	7,08
A(b2c2)	1	59,586	59,586	32,62 **	4,00	7,08
A(b3c1)	1	0,745	0,745	0,41 n.s	4,00	7,08
A(b3c2)	1	57,422	57,422	31,43 **	4,00	7,08
B(a1c1)	2	6,838	3,419	1,87 n.s	3,15	4,98
B(a1c2)	2	27,750	13,875	7,60 **	3,15	4,98
B(a2c1)	2	42,583	21,292	11,66 **	3,15	4,98
B(a2c2)	2	51,619	25,809	14,13 **	3,15	4,98
C(a1b1)	1	7,906	7,906	4,33 *	4,00	7,08
C(a1b2)	1	1,172	1,172	0,64 n.s	4,00	7,08
C(a1b3)	1	15,732	15,732	8,61 **	4,00	7,08
C(a2b1)	1	34,987	34,987	19,15 **	4,00	7,08
C(a2b2)	1	47,960	47,960	26,25 **	4,00	7,08
C(a2b3)	1	20,021	20,021	10,96 **	4,00	7,08
Error	60	109,607	1,827			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor C (BAP) es altamente significativa para el número de brotes en cualquiera de las interacciones de los niveles de AB (MediosMS*Kinetina); pero no fue así bajo la presencia de a1b2 (MS/2*1,0mg/lKIN); de igual manera no presentaron significación para el efecto de A (concentración nutricional modificada del medio MS) con las interacciones b2c1 (1,0mg/lKIN*0,0mg/lBAP), b3c1 (2,0mg/l*0,0mg/l), también no observamos significación en el efecto del factor B (Kinetina) con la interacción de a1c1 (MS/2*0,0mg/lBAP).

Cuadro 13: ANOVA de efectos simples sobre el número de brotes por explante

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
B(c1)	2	23,611	11,806	6,46 *	3,15	4,98
B(c2)	2	2,335	1,167	0,64 n.s	3,15	4,98
C(b1)	1	4,815	4,815	2,64 n.s	4,00	7,08
C(b2)	1	17,069	17,069	9,34 **	4,00	7,08
C(b3)	1	0,129	0,129	0,07 n.s	4,00	7,08
C(a1)	1	1,668	1,668	0,91 n.s	4,00	7,08
C(a2)	1	10,028	10,028	5,49 *	4,00	7,08
A(c1)	1	6,674	6,674	3,65 n.s	4,00	7,08
A(c2)	1	49,585	49,586	27,14 **	4,00	7,08
A(b1)	1	3,190	3,190	1,75 n.s	4,00	7,08
A(b2)	1	27,606	27,606	15,11 **	4,00	7,08
A(b3)	1	22,543	22,543	12,34 **	4,00	7,08
B(a1)	2	11,446	5,723	3,13 n.s	3,15	4,98
B(a2)	2	1,263	0,632	0,35 n.s	3,15	4,98
Error	60	109,607	1,827			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) solo presenta diferencias en el nivel c1 (0,0mg/l), el factor C (BAP) presenta diferencia estadística en el nivel de b2 (1,0mg/lKIN), y a2 (MS/3), a la vez el factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) presenta efecto interactivo altamente significativo con el nivel c2 (2,5mg/lBAP), b2 (1,0mg/lKIN) y b3 (2,0mg/lKIN) sobre la producción de brotes para ambos niveles de significación.

Cuadro 14: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre el número de brotes por explante

O.M	Fuentes		Promedio del N° de brotes	Significación	
				5%	1%
1	b2	c1	12,4	a	a
2	b1	c2	11,4	b	b
3	b3	c1	11,2	b	b
4	b3	c2	11,0	b	b
5	b2	c2	10,7	b	b
6	b1	c1	10,5	b	b
1	a1	c2	12,2	a	a
2	a1	c1	11,8	b	a
3	a2	c1	10,9	c	b
4	a2	c2	9,9	c	b
1	a1	b2	12,6	a	a
2	a1	b3	12,0	b	b
3	a1	b1	11,2	c	b
4	a2	b1	10,5	c	b
5	a2	b2	11,5	c	b
6	a2	b3	10,1	c	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

En el cuadro 14 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC la mejor interacción fue b2c1 (1,0mg/lKIN*0,0mg/lBAP) reportándose con una media de 12,4 brotes por explante, siendo superior a los demás, b2 (1,0mg/lKIN) actúa mejor sin la presencia de BAP. Para el efecto simple AC las mejores interacciones fueron a1c2 (MS/2*2,5mg/lBAP) y a1c1 (MS/2*0,0mg/l), el efecto de las concentraciones nutricionales modificadas se ven afectadas por la adición de BAP. Para el efecto simple AB la mejor interacción fue a1b2 (MS/2*1,0mg/lKIN), esto indica que el efecto del medio MS/2 esta influenciado por la adición de 1,0mg/l y 2,0mg/l de KIN para incrementar el número de brotes por explante para *Dionaea muscipula*. Las demás interacciones siguen la misma tendencia; es decir que ninguno se ve alterado por la presencia del otro factor.

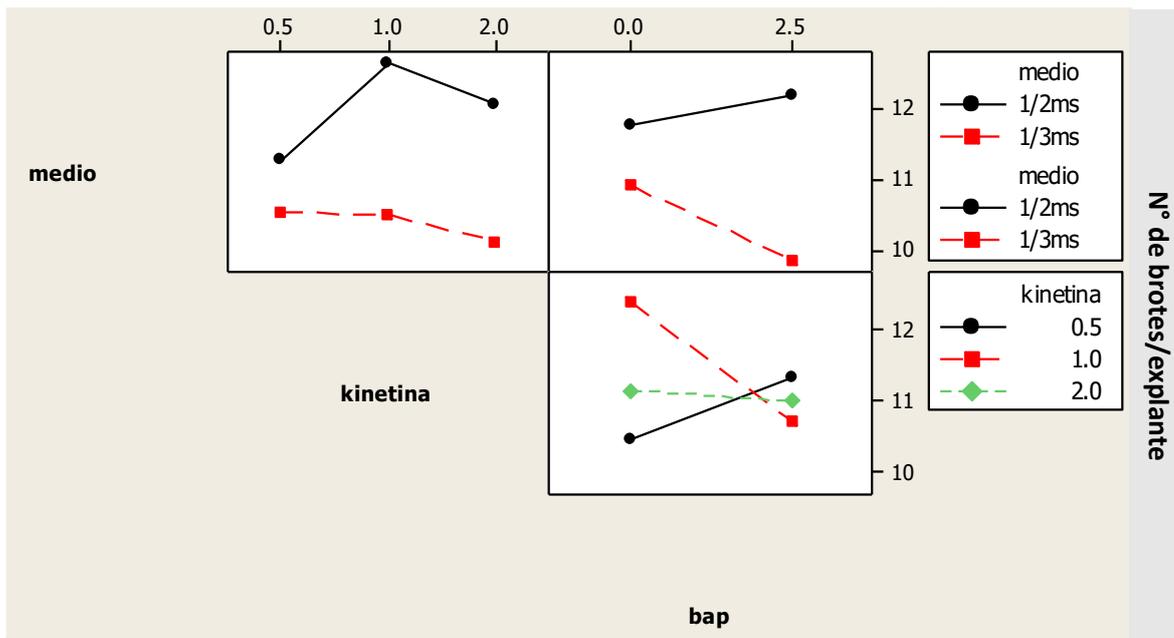


Figura 03: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para el número de brotes por explante.

Se muestra que existe interacción simple en los factores MediosMS*Kinetina, MediosMS*BAP y Kinetina*BAP, la interacción de los niveles MS/2*1,0mg/l KIN, MS/2*2,0mg/l KIN, MS/2*2,5mg/l BAP y 1,0mg/l KIN*0,0mg/l BAP muestran mayor número de brotes.

Cuadro 15: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre el número de brotes por explante

O.M	Fuente		N° de brotes	Significación	
				5%	1%
1	A	a1	11,99	a	a
2		a2	10,38	b	b
1	B	b2	11,57	a	a
2		b3	11,09	a	a
3		b1	10,91	a	a
1	c	c1	11,34	a	a
2		c2	11,03	a	a

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P<0,05; 0,01)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor A (Concentraciones nutricionales modificadas del medio MS) sobre el número de brotes por explante, siendo el nivel a1 (MS/2) el que mejor responde para esta variable.

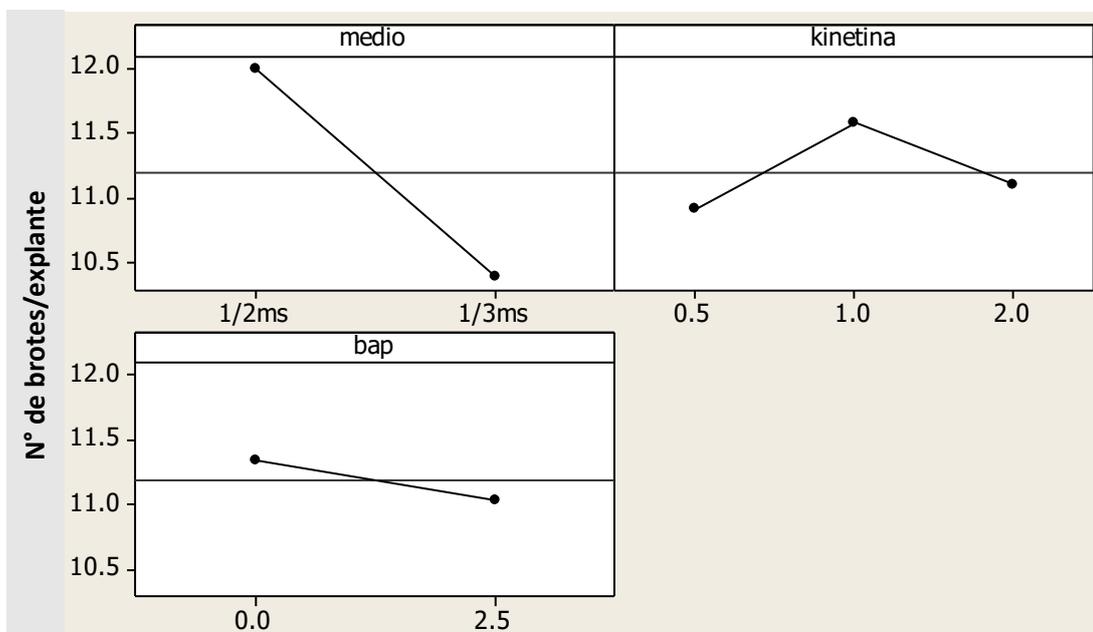


Figura 04: Gráfica de los efectos principales A, B y C para el número de brotes por explante

Solo las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS tienen efecto sobre la producción de brotes por explante, el Medio MS/2 avaluado independientemente produce mayor número de brotes de *Dionaea muscipula*.

4.1.2. Número de hojas por explante

En el cuadro de ANOVA se muestra que existe alta diferencia significativa en la doble interacción simple ABC (MediosMS*kinetina*BAP), en la interacción simple BC (kinetina*BAP), AB (Medios MS*kinetina) y al evaluar independientemente el efecto de las concentraciones nutricionales modificadas (A), con una desviación estándar de $\pm 5,97$ y $10,61$ % coeficiente de variabilidad indicando este valor la confiabilidad de los datos tabulados.

Cuadro 16: Análisis de varianza para el número de hojas por explante

Fuente	GL	SC	CM	Fcal	Ftab	
					5%	1%
Tratamientos	11	8665,659	787,787	22,13 **	1,95	2,56
A=Medios MS	1	3883,44	3883,44	109,11 **	4,00	7,08
B=Kinetina	2	37,89	18,94	0,53 n.s	3,15	4,98
C=BAP	1	113,10	113,10	3,18 n.s	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	969,25	484,62	13,62 **	3,15	4,98
AC=Medios MS*BAP	1	7,19	7,19	0,20 n.s	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	1211,51	605,76	17,02 **	3,15	4,98
MediosMS*kinetina*BAP	2	2443,27	1221,63	34,32 **	3,15	4,98
Error	60	2135,58	35,59			
Total	71	10801,24				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 10,612 %

S = ±5,97

\bar{X} = 56,219

Cuadro 17: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el número de hojas por explante

O.M	Tratamientos	Promedio (unidades)	Significación	
			5%	1%
1	T11(MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP)	74,2	a	a
2	T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	73,3	a	a
3	T1 (MS/2+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	67,5	b	b
4	T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	64,7	b	c
5	T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	57,8	c	d
6	T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	52,7	c	d
7	T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	52,7	c	d
8	T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	51,8	c	d
9	T7 (MS/2+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	49,0	d	e
10	T2 (testigo) (MS/3+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	46,8	d	e
11	T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	46,5	d	e
12	T10 (MS/3+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	37,6	d	e

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

En el cuadro 17 se muestra el efecto de los tratamientos sobre el número de hojas por explante, el T11 y T3 son estadísticamente similares y

superiores a los demás tratamientos para ambos niveles de significación, reportándose con los mejores promedios de 74,2 y 73,3 hojas respectivamente; la diferencia entre ambos tratamientos es de 1 hoja, considerándose ambos tratamientos como los mejores para esta variable y a la vez son superiores al testigo. Para evaluar el efecto y el comportamiento de las interacciones de los factores con sus respectivos niveles se realizó la prueba de ANOVA para determinar su significancia.

Cuadro 18: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el número de hojas por explante

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	1281,333	1281,333	36,00 **	4,00	7,08
A(b1c2)	1	234,083	234,083	6,58 *	4,00	7,08
A(b2c1)	1	1281,333	1281,333	36,00 **	4,00	7,08
A(b2c2)	1	2201,062	2201,062	61,84 **	4,00	7,08
A(b3c1)	1	2,091	2,091	0,06 n.s	4,00	7,08
A(b3c2)	1	2303,255	2303,255	64,71 **	4,00	7,08
B(a1c1)	2	1362,096	681,048	19,13 **	3,15	4,98
B(a1c2)	2	1944,168	972,084	27,31 **	3,15	4,98
B(a2c1)	2	119,444	59,722	1,68 n.s	3,15	4,98
B(a2c2)	2	1236,206	618,103	17,37 **	3,15	4,98
C(a1b1)	1	1026,750	1026,750	28,85 **	4,00	7,08
C(a1b2)	1	225,246	225,246	6,33 *	4,00	7,08
C(a1b3)	1	1392,130	1392,130	39,11 **	4,00	7,08
C(a2b1)	1	363,000	363,000	10,20 **	4,00	7,08
C(a2b2)	1	682,671	682,671	19,18 **	4,00	7,08
C(a2b3)	1	85,280	85,280	2,40 n.s	4,00	7,08
Error	60	2135,580	35,590			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) presenta diferencias en cualquiera de las interacciones simples BC, pero no en b3c1 (2,0mg/lKIN*0,0mg/lBAP). El factor B (kinetina) de igual manera presenta diferencias en la cualquiera de las interacciones simples AC; sin embargo no así bajo la presencia de a2c1 (MS/3*0,0mg/lBAP). En el factor C (BAP) es altamente significativa para el número de hojas en cualquiera de las interacciones de los niveles de AB (MediosMS*Kinetina), pero no fue así bajo la presencia de a2b3 (MS/3*2,0mg/l KIN), estos datos indican que el efecto del factor A y B sobre el número de brotes están influenciadas por la adición de BAP.

Cuadro 19: ANOVA de efectos simples sobre el número de hojas por explante

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
B(c1)	2	694,951	347,475	9,76 **	3,15	4,98
B(c2)	2	554,448	277,224	7,79 **	3,15	4,98
C(b1)	1	84,375	84,375	2,37 n.s	4,00	7,08
C(b2)	1	846,093	846,093	23,77 **	4,00	7,08
C(b3)	1	394,146	394,146	11,07 **	4,00	7,08
C(a1)	1	31,621	31,621	0,89 n.s	4,00	7,08
C(a2)	1	88,673	88,673	2,49 n.s	4,00	7,08
A(c1)	1	1778,168	1778,168	49,96 **	4,00	7,08
A(c2)	1	2112,474	2112,474	59,35 **	4,00	7,08
A(b1)	1	210,041	210,041	5,90 *	4,00	7,08
A(b2)	1	3420,571	3420,571	96,10 **	4,00	7,08
A(b3)	1	1222,082	1222,082	34,33 **	4,00	7,08
B(a1)	2	693,760	346,880	9,75 **	3,15	4,98
B(a2)	2	313,372	156,686	4,40 *	3,15	4,98
Error	60	2135,580	35,590			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) presenta diferencias en todos los niveles de C (BAP) y A (Medios MS), esto indica que el efecto de B (Kinetina) es dependiente de los niveles de A (MediosMS) y C (BAP) para incrementar la producción de hojas por explante. También observamos en el efecto del factor C (BAP) diferencias en el nivel b2 (1,0mg/l) y b3 (2,0mg/l), pero no así bajo a1 (MS/2) y a2 (MS/3), esto indica que no existe interacción entre ellos y actúan de manera independiente. El factor A (Medios MS) presenta diferencias en cualquier nivel de C (BAP) y B (Kinetina).

Cuadro 20: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre el número de hojas por explante

O.M	Fuentes		Promedio del N° de hojas	Significación	
				5%	1%
1	b2	c1	63,0	a	a
2	b3	c2	60,3	b	b
3	b1	c1	57,1	c	c
4	b1	c2	53,4	c	c
5	b3	c1	52,2	c	c
6	b2	c2	51,1	c	c
1	a1	c1	64,5	a	a
2	a1	c2	62,6	a	a
3	a2	c1	50,4	b	b
4	a2	c2	47,3	b	b
1	a1	b2	69,0	a	a
2	a1	b3	63,4	b	b
3	a1	b1	58,2	c	c
4	a2	b1	52,3	d	d
5	a2	b3	49,1	e	d
6	a2	b2	45,1	e	d

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

En el cuadro 20 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC la mejor interacción fue b2c1 (1,0mg/IKIN*0,0mg/IBAP) reportándose con una media de 63,0 hojas por

explante, siendo superior a los demás; b2 (1,0mg/lKIN) actúa mejor sin la presencia de BAP. Para el efecto simple AC las mejores interacciones fueron a1c1 (MS/2*0,0mg/IBAP) y a1c2 (MS/2*2,5mg/IBAP), estos resultados indican que las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (MS/2) tienen efecto con la adición de BAP sobre la producción de hojas por explante. Para el efecto simple AB la mejor interacción fue a1b2 (MS/2*1,0mg/lKIN) reportándose con un promedio de 69 hojas, esto indica que el efecto del medio MS/2 esta influenciado por la adición de 1,0 mg/l de kinetina. Las demás interacciones no tienen mucha relevancia en sus resultados probablemente se deba a que un factor es independiente del otro para demostrar su efecto.

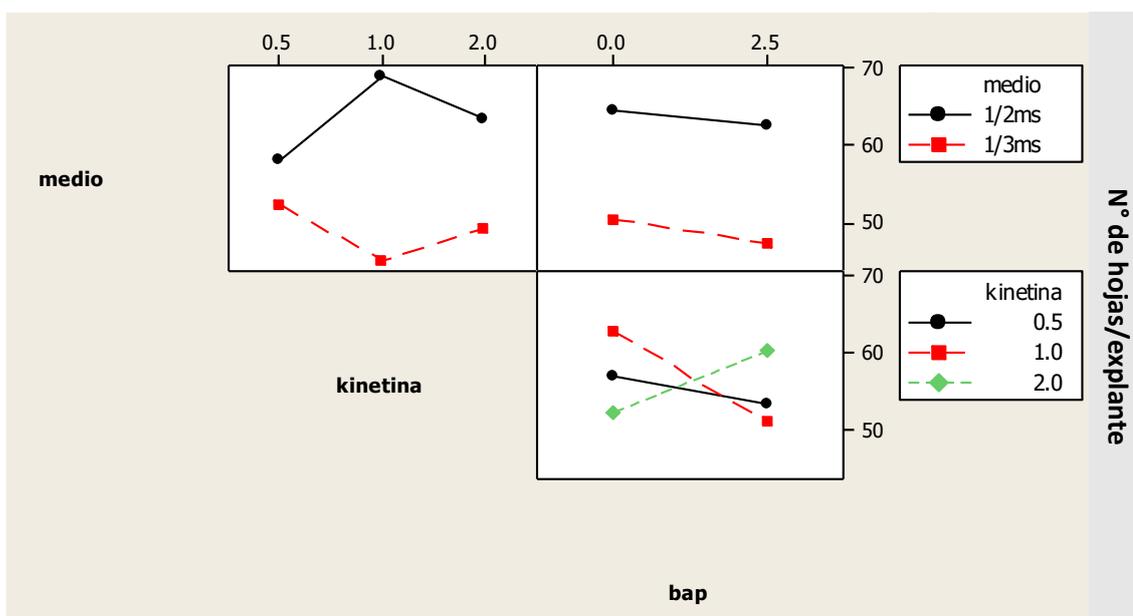


Figura 05: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para el número de hojas por explante

En la figura 05 observamos que existe interacción simple entre los factores A y B sobre el número de hojas por explante, a la vez también se observa interacción simple entre los factores B y C. Sin embargo, no se observa interacción entre niveles de los factores A y C, es decir siguen la misma tendencia sobre la producción de hojas por explante.

Cuadro 21: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre el número de hojas por explante

O.M	Fuente		N° de hojas	Significación	
				5%	1%
1	A	a1	63,56	a	a
2		a2	48,87	b	b
1	B	b2	57,06	a	a
2		b3	56,30	a	a
3		b1	55,29	a	a
1	c	c1	57,47	a	a
2		c2	54,96	a	a

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor A (Concentraciones nutricionales modificadas del medio MS) sobre el número de hojas por explante, siendo el nivel a1 (MS/2) el que mejor responde para esta variable reportándose con una media de 63,56 hojas por explante.

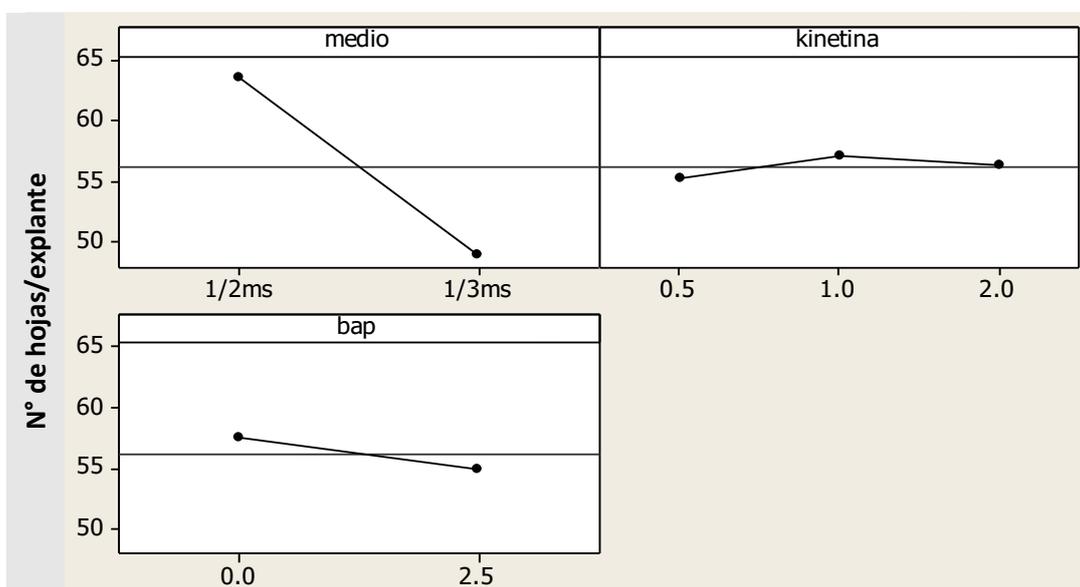


Figura 06: Gráfica de los efectos principales A, B y C para el número de hojas por explante.

En la figura 06 se observa que existe efecto del factor A sobre el número de hojas por explante, el medio MS/2 resulta producir mayor número de hojas por explante.

4.1.3. Tamaño promedio de los brotes

En el cuadro 22 se observa que existe alta significancia en la doble interacción simple ABC (Medios MS*kinetina*BAP), y al evaluar independientemente el efecto de Kinetina (B) y de las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (A), con un coeficiente de variabilidad de 8,4 % indicando alto nivel de confiabilidad del trabajo, también se obtuvo una desviación estándar de $\pm 0,084$.

Cuadro 22: Análisis de varianza para el tamaño promedio de los brotes

Fuente	GL	SC Sec.	CM	Fcal	Ftab	
					5%	1%
Tratamientos	11	0,3187	0,0289	4,14**	1,95	2,56
A=Medios MS	1	0,0081	0,0081	1,16 n.s	4,00	7,08
B=Kinetina	2	0,1078	0,0539	7,70 **	3,15	4,98
C=BAP	1	0,0514	0,0514	7,35 **	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	0,0222	0,0111	1,59 n.s	3,15	4,98
AC=MediosMS*BAP	1	0,0006	0,0006	0,09 n.s	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	0,0192	0,0096	1,37 n.s	3,15	4,98
Medios MS*kinetina*BAP	2	0,1092	0,0546	7,80 **	3,15	4,98
Error	60	0,4199	0,0070			
Total	71	0,7387				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 8,409 %

S = $\pm 0,084$

\bar{X} = 0,995

Cuadro 23: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el tamaño promedio de los brotes

O.M	Tratamientos	Promedio (cm)	Significación	
			5%	1%
1	T11(MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP)	1,12	a	a
2	T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	1,06	b	b
3	T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	1,05	b	c
4	T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	1,04	b	c
5	T1 (MS/2+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	1,01	c	c
6	T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	0,99	c	c

7	T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,99	c	c
8	T10 (MS/3+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	0,97	c	c
9	T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,94	c	c
10	T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,94	c	c
11	T7 (MS/2+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	0,92	c	c
12	T2 (testigo) (MS/3+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,86	c	c

En el cuadro 23 se observa el efecto de los tratamientos sobre el tamaño promedio de los brotes, el T11 fue superior a los demás tratamientos reportándose con una media de 1,12 cm siendo a la vez superior al testigo con una diferencia de medias de 0,26 cm.

Cuadro 24: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el tamaño promedio de los brotes

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	0,063	0,063	9,05 **	4,00	7,08
A(b1c2)	1	0,014	0,014	2,14 n.s	4,00	7,08
A(b2c1)	1	0,006	0,006	0,86 n.s	4,00	7,08
A(b2c2)	1	0,011	0,011	1,71 n.s	4,00	7,08
A(b3c1)	1	0,035	0,035	5,06 *	4,00	7,08
A(b3c2)	1	0,008	0,008	1,23 n.s	4,00	7,08
B(a1c1)	2	0,016	0,008	1,14 n.s	3,15	4,98
B(a1c2)	2	0,115	0,057	8,23 **	3,15	4,98
B(a2c1)	2	0,100	0,050	7,20 **	3,15	4,98
B(a2c2)	2	0,026	0,013	1,90 n.s	3,15	4,98
C(a1b1)	1	0,022	0,022	3,22 n.s	4,00	7,08
C(a1b2)	1	0,007	0,007	1,07 n.s	4,00	7,08
C(a1b3)	1	0,096	0,096	13,78 **	4,00	7,08
C(a2b1)	1	0,050	0,050	7,17 *	4,00	7,08
C(a2b2)	1	0,003	0,003	0,43 n.s	4,00	7,08

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
C(a2b3)	1	0,001	0,001	0,13 ^{n.s}	4,00	7,08
Error	60	0,419	0,007			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor C (BAP) es significativa sobre el tamaño promedio de los brotes con las interacciones de los niveles de a2b3 (MS/3*2,0mg/IKIN) y a2b1 (MS/3*0,5mg/IKIN), esto quiere decir que BAP tiene efecto sobre el tamaño cuando el medio MS/3 se interacciona con Kinetina. El factor A (kinetina) presentó diferencias solo con la interacción b3c1 (2,0mg/IKIN*0,0mg/IBAP); también, el factor B presentó diferencias con la interacción a1c2 (MS/2*2,5mg/l BAP) y a2c1 (MS/3*0,0mg/l BAP), con las demás interacciones no resultó significativa para ambos niveles de significación.

Cuadro 25: ANOVA de efectos simples sobre el tamaño promedio de los brotes

Fuentes de variación	GL	SM	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
B(c1)	2	0,018	0,009	1,34 ^{n.s}	3,15	4,98
B(c2)	2	0,108	0,054	7,74 ^{**}	3,15	4,98
C(b1)	1	0,002	0,002	0,39 ^{n.s}	4,00	7,08
C(b2)	1	0,009	0,009	1,43 ^{n.s}	4,00	7,08
C(b3)	1	0,057	0,057	8,28 ^{**}	4,00	7,08
C(a1)	1	0,020	0,020	2,91 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a2)	1	0,031	0,031	4,53 [*]	4,00	7,08
A(c1)	1	0,006	0,006	0,95 ^{n.s}	4,00	7,08
A(c2)	1	0,002	0,002	0,30 ^{n.s}	4,00	7,08
A(b1)	1	0,008	0,008	1,19 ^{n.s}	4,00	7,08
A(b2)	1	0,017	0,017	2,50 ^{n.s}	4,00	7,08

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
A(b3)	1	0,004	0,004	0,65 ^{n.s}	4,00	7,08
B(a1)	2	0,025	0,012	1,79 ^{n.s}	3,15	4,98
B(a2)	2	0,105	0,052	7,50 ^{**}	3,15	4,98
Error	60	0,419	0,007			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) solo presenta diferencias en el nivel c2 (2,5mg/l) y a2 (MS/3), el factor C (BAP) presenta diferencia estadística en el nivel de b3 (2,0mg/lKIN), y a2 (MS/3), esto quiere decir que el factor BAP tiene efecto cuando se interacciona con 2,0mg/l KIN y MS/3. El factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) no presento diferencias bajo la presencia de cualquiera de los niveles C y B.

Cuadro 26: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre el tamaño promedio de los brotes

O.M	Fuentes		Promedio (cm)	Significación	
				5%	1%
1	b3	c2	1,09	a	a
2	b2	c2	1,01	b	b
3	b3	c1	0,99	b	b
4	b2	c1	0,97	b	b
5	b1	c2	0,96	b	b
6	b1	c1	0,93	b	b
1	a1	c2	1,02	a	a
2	a2	c2	1,01	b	a
3	a1	c1	0,98	b	a
4	a2	c1	0,95	b	a
1	a2	b3	1,05	a	a
2	a1	b3	1,03	b	b
3	a1	b2	1,01	b	b
4	a1	b1	0,96	b	b
5	a2	b2	0,96	b	b
6	a2	b1	0,93	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$: 0,01)

En el cuadro 26 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC la mejor interacción fue b3c2 (2,0mg/l KIN*2,5mg/l BAP) reportándose con una media de 1,09 cm, las demás interacciones no presentaron diferencias, esto indica que el factor B actúa independientemente del otro. Para el efecto simple AC la mejor interacción fue a1c2 (MS/2*2,5mg/l BAP) y a2c2 (MS/3*2,5mg/l BAP) reportándose con las medias de 1,02 y 1,01 cm respectivamente, el efecto de las concentraciones nutricionales modificadas se ven influenciadas por la adición de BAP. Para el efecto simple AB la mejor interacción fue a2b3 (MS/3*2,0mg/l KIN), esto indica que el efecto del medio MS/3 esta influenciado por la adición de 2,0mg/l de KIN para el desarrollo del brote. Las demás interacciones siguen la misma tendencia; es decir que ninguno se ve alterado por la presencia del otro factor.

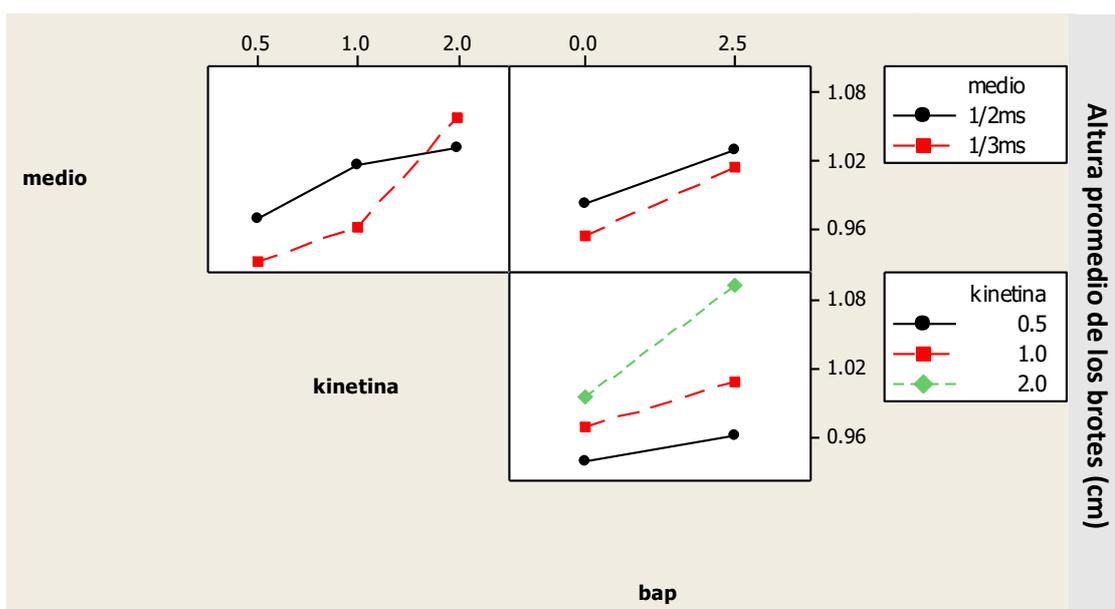


Figura 07: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para el tamaño promedio de los brotes

Como se muestra en la figura 07, existe interacción entre los niveles del factor A (Medios MS) y B (kinetina), como también entre los niveles del factor A (Medios MS) y C (BAP), sin embargo, existe interacción con algunos de los niveles de los factores A (Medios MS) y C (BAP).

Cuadro 27: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre tamaño promedio de los brotes

O.M	Fuente		Promedio (cm)	Significación	
				5%	1%
1	A	a1	1,01	a	a
2		a2	0,98	a	a
1	B	b3	1,04	a	a
2		b2	0,98	a	a
3		b1	0,95	a	a
1	c	c2	1,02	a	a
2		c1	0,96	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor C (BAP) sobre el tamaño promedio de los brotes, siendo el nivel c2 (2,5mg/l BAP) el que mejor responde para esta variable reportándose con una media de 1,02 cm.

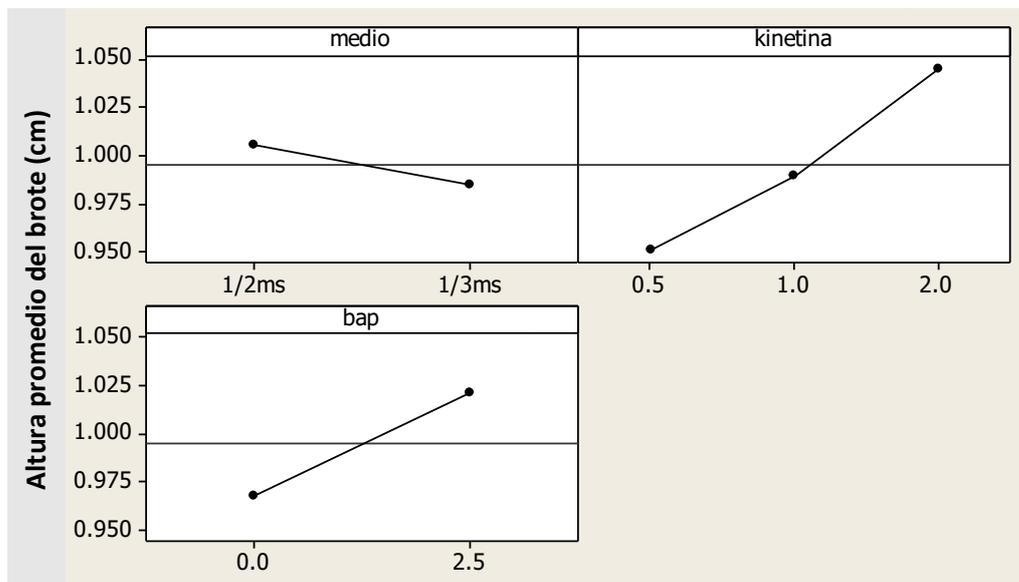


Figura 08: Gráfica de los efectos principales A, B y C para el tamaño promedio de los brotes

Observamos en la figura 08, que existe diferencias estadísticas en el efecto del factor B (kinetina), el factor C (BAP) sobre el tamaño de los brotes de *Dionaea muscipula*, Siendo los niveles b3 (2,0mg/l KIN) y c2 (2,5mg/l BAP) los que producen mayor altura de brotes.

4.1.4. Tasa de velocidad de la multiplicación (TVM)

En el cuadro 28 se observa que existe alta significancia en la doble interacción simple ABC (MediosMS*kinetina*BAP), en la interacción simple BC (kinetina*BAP) y al evaluar independientemente el efecto de las concentraciones de BAP; también resultó significativa la interacción simple AB (Medios MS*kinetina) con un coeficiente de variabilidad de 8,21% indicándonos que existe alta confianza experimental en los datos tabulados.

Cuadro 28: Prueba de ANOVA para la tasa de velocidad de multiplicación (TVM)

Fuente	GL	SC	CM	F _{cal}	F _{tab}	
					5%	1%
Tratamientos	11	20,294	1,845	11,16 **	1,95	2,56
A=Medios MS	1	0,068	0,068	0,43 n.s	4,00	7,08
B=Kinetina	2	0,814	0,407	2,60 n.s	3,15	4,98
C=BAP	1	4,019	4,019	25,62 **	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	1,274	0,637	4,06 *	3,15	4,98
AC=Medios MS*BAP	1	0,205	0,205	1,31 n.s	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	6,985	3,492	22,26 **	3,15	4,98
MediosMS*kinetina*BAP	2	6,929	3,464	22,09 **	3,15	4,98
Error	60	9,412	0,157			
Total	71	29,706				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 8,21 %

S = ±0,396

\bar{X} = 2,214

Cuadro 29: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre la tasa de velocidad de multiplicación TVM

O.M	Tratamientos	Promedio TVM	Significación	
			5%	1%
1	T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	3,1	a	a
2	T1 (MS/2+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	2,9	b	b
3	T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	2,6	c	c
4	T11(MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP)	2,6	c	c
5	T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	2,5	d	d
6	T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	2,2	e	e
7	T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	2,1	e	f

8	T2 (testigo) (MS/3+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	2,0	f	f
9	T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	2,0	f	f
10	T10 (MS/3+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	1,7	f	f
11	T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	1,5	f	f
12	T7 (MS/2+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	1,3	f	f

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

En el cuadro 29 se muestra el efecto de los tratamientos sobre la tasa de velocidad de multiplicación, el T3 (MS/2 + 1 mg/l KIN + 0 mg/l BAP) se ubica en el primer orden de mérito con un promedio de 3,1 explantes de cada unidad de análisis por día, siendo este valor superior al testigo y a los demás tratamientos puestos en prueba. Sin embargo, la diferencia de medias del tratamiento T1 y T3 es de 0,2 explantes generados por cada unidad de análisis por día, considerándose a ambos tratamientos óptimos para incrementar la multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula* para ambos niveles de significación.

Cuadro 30: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre la tasa de velocidad de multiplicación

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	2,396	2,396	15,28 **	4,00	7,08
A(b1c2)	1	2,041	2,041	13,02 **	4,00	7,08
A(b2c1)	1	0,814	0,814	5,19 *	4,00	7,08
A(b2c2)	1	0,233	0,233	1,49 ^{n.s}	4,00	7,08
A(b3c1)	1	2,485	2,485	15,84 **	4,00	7,08
A(b3c2)	1	0,504	0,504	3,22 ^{n.s}	4,00	7,08
B(a1c1)	2	8,835	4,417	28,16 **	3,15	4,98
B(a1c2)	2	5,217	2,608	16,63 **	3,15	4,98
B(a2c1)	2	1,072	0,536	3,42 ^{n.s}	3,15	4,98
B(a2c2)	2	0,877	0,438	2,80 ^{n.s}	3,15	4,98
C(a1b1)	1	8,042	8,042	51,27 **	4,00	7,08

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
C(a1b2)	1	4,011	4,011	25,57 **	4,00	7,08
C(a1b3)	1	3,345	3,345	21,33 **	4,00	7,08
C(a2b1)	1	0,019	0,019	0,13 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a2b2)	1	2,508	2,508	15,99 **	4,00	7,08
C(a2b3)	1	0,209	0,209	1.34 ^{n.s}	4,00	7,08
Error	60	9,412	0,157			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor C (BAP) es altamente significativa para la tasa de velocidad de multiplicación en cualquiera de las interacciones de los niveles de AB (MediosMS*Kinetina); pero no fue así bajo la presencia de a2b3 (MS/3*2,0mg/lKIN) y a2b1 (MS/3*0,5mg/lKIN); el efecto del factor B no presenta diferencias en las interacciones a2c1 (MS/3*0,0mg/l BAP) y a2c2 (MS/3*2,5mg/l BAP), esto quiere decir que no existe interacción entre estos niveles, su efecto es independiente de BAP. El efecto de A (concentración nutricional modificada del medio MS) fue significativa en cualquiera de los niveles de la interacción AB (MediosMS*Kinetina), excepto con b2c2 (1,0mg/lKIN*2,5mg/lBAP) y b3c2 (2,0mg/lKIN*2,5mg/lBAP), estos resultados indican que el efecto del factor A (Medios MS) es independiente a las interacciones b2c2 (1,0mg/l KIN*2,5mg/l BAP) y b3c2 (2,0 mg/l KIN* 2,5mg/l BAP).

Cuadro 31: ANOVA de efectos simples sobre la tasa de velocidad de multiplicación

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
B(c1)	2	4,466	2,233	14,24 **	3,15	4,98
B(c2)	2	3,332	1,666	10,62 **	3,15	4,98
C(b1)	1	3,630	3,630	23,15 **	4,00	7,08
C(b2)	1	6,432	6,432	41,01 **	4,00	7,08
C(b3)	1	0,940	0,940	5,99 *	4,00	7,08
C(a1)	1	3,019	3,019	19,25 **	4,00	7,08
C(a2)	1	1,204	1,204	7,68 **	4,00	7,08
A(c1)	1	0,254	0,254	1,62 n.s	4,00	7,08
A(c2)	1	0,018	0,018	0,12 n.s	4,00	7,08
A(b1)	1	0,007	0,007	0,05 n.s	4,00	7,08
A(b2)	1	0,960	0,960	6,12 *	4,00	7,08
A(b3)	1	0,375	0,375	2,39 n.s	4,00	7,08
B(a1)	2	1,673	0,836	5,33 **	3,15	4,98
B(a2)	2	0,414	0,207	1,32 n.s	3,15	4,98
Error	60	9,412	0,157			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) presenta diferencias en todos los niveles de C (BAP) y A (Medios MS), a excepción del nivel a2 (MS/3), es decir que el efecto del factor B (kinetina) es independiente del nivel a2 (MS/3). El factor C (BAP) presenta diferencias significativas en todos los niveles de B y A. El efecto del factor A (Medios MS), solo es dependiente del nivel b2 (1,0mg/l KIN), esto indica que no existe interacción entre los niveles c1 (0,0mg/l BAP), c2 (2,5mg/l BAP), y b1 (0,5mg/l KIN), es decir actúan de manera independiente.

Cuadro 32: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la tasa de velocidad de multiplicación

O.M	Fuentes		Promedio de TVM	Significación	
				5%	1%
1	b2	c1	2,86	a	a
2	b1	c1	2,47	b	b
3	b3	c2	2,40	b	c
4	b3	c1	2,00	c	d
5	b2	c2	1,83	c	d
6	b1	c2	1,70	c	d
1	a1	c1	2,53	a	a
2	a2	c1	2,36	a	b
3	a2	c2	2,00	b	b
4	a1	c2	1,95	b	b
1	a1	b2	2,54	a	a
2	a2	b3	2,32	b	a
3	a2	b2	2,14	b	a
4	a1	b1	2,10	b	a
5	a1	b3	2,07	b	a
6	a2	b1	2,07	b	a

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$: 0,01)

En el cuadro 32 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC (Kinetina*BAP) la mejor interacción fue b2c1 (1,0mg/IKIN*0,0mg/IBAP) reportándose con una media de 2,86 explantes de cada unidad de análisis por día, el nivel b2 (1,0mg/IKIN) actúa mejor sin la presencia de BAP. Para el efecto simple AC (Medios MS*BAP) las mejores interacciones fueron a1c1 (MS/2*0,0mg/IBAP) y a2c1 (MS/3*0,0mg/l), el efecto de las concentraciones nutricionales modificadas se ven afectadas por la adición de BAP. Para el efecto simple AB (Medios MS*kinetina) la mejor interacción fue a1b2 (MS/2*1,0mg/IKIN), esto indica que el efecto del medio MS/2 esta influenciado por la adición de 1,0mg/l para incrementar la TVM para *Dionaea muscipula*.

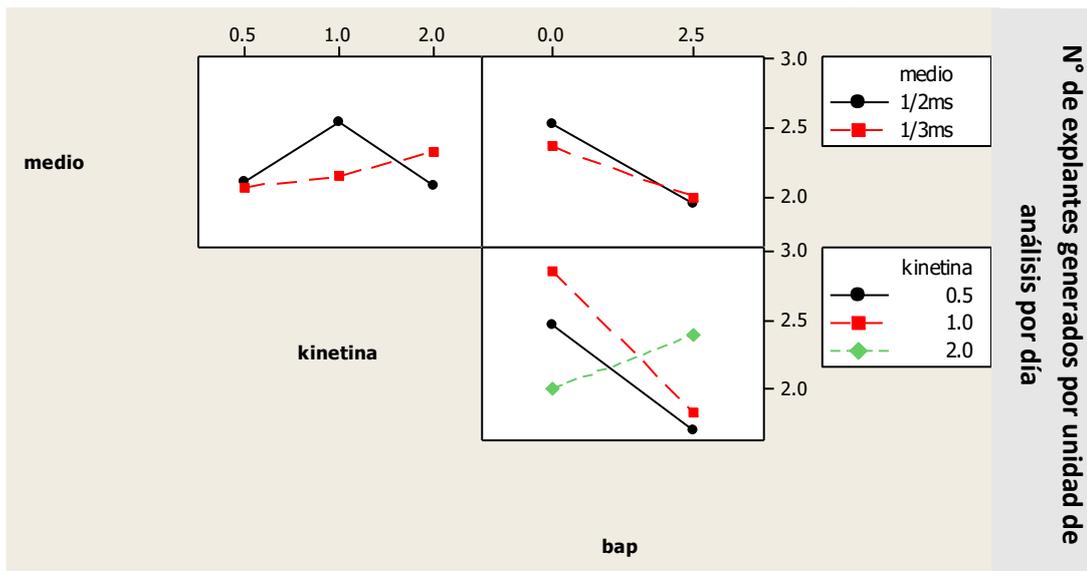


Figura 09: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para la TVM

En la figura 09, observamos interacción en todos los niveles del factor AB (medio MS*Kinetina), AC (Medios MS*BAP) y BC (Kinetina*BAP)

Cuadro 33: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la tasa de velocidad de multiplicación

O.M	Fuente		Promedio TVM	Significación	
				5%	1%
1	A	a1	2,24	a	a
2		a2	2,18	a	a
1	B	b2	2,34	a	a
2		b3	2,20	a	a
3		b1	2,08	a	a
1	c	c1	2,45	a	a
2		c2	1,97	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor C (BAP) sobre la tasa de velocidad de multiplicación, siendo el nivel c1 (0,0mg/l BAP) el que mejor responde para esta variable al nivel de significación de 1%.

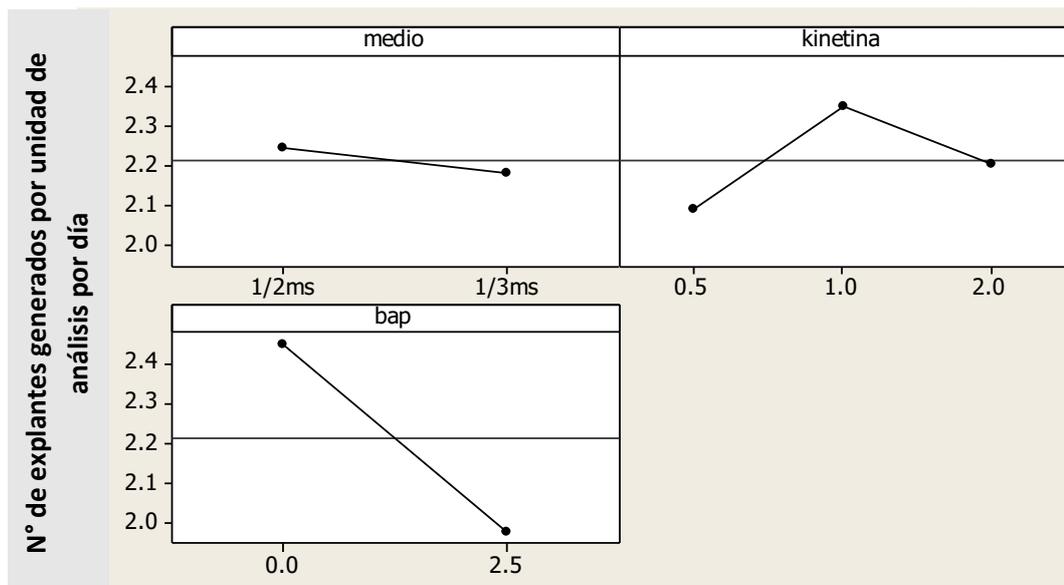


Figura 10: Gráfica de los efectos principales A, B y C para la TVM

En la figura 10, observamos diferencia estadística en el factor C sobre la tasa de velocidad de multiplicación, la ausencia de BAP resulta ser favorable para incrementar la tasa de velocidad de multiplicación.

4.1.5. Porcentaje de tejido diferenciado

En el cuadro 34 se observa que existe alta significancia en la doble interacción simple ABC (MediosMS*kinetina*BAP), en la interacción simple BC (kinetina*BAP), AB (Medios MS*kinetina) y al evaluar independientemente el efecto de BAP y de las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS a un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ y $0,01$, con un coeficiente de variabilidad de 13,36 % y una desviación estándar de $\pm 10,81$.

Cuadro 34: Cuadro de ANOVA del porcentaje de tejido diferenciado

Fuente	GL	SC	CM	F _{cal}	F _{tab}	
					5%	1%
Tratamientos	11	16137,1	1467,0	12,55	1,95	2,56
A=Medios MS	1	7300,5	7300,5	62,46 **	4,00	7,08
B=Kinetina	2	538,2	269,1	2,30 n.s	3,15	4,98
C=BAP	1	3828,8	3828,8	32,76 **	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	1058,8	529,4	4,53 *	3,15	4,98
AC=Medios MS*BAP	1	78,1	78,1	0,67 n.s	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	1926,8	963,4	8,24 **	3,15	4,98
MediosMS*kinetina*BAP	2	1405,7	702,9	6,01 **	3,15	4,98

Error	60	7013,5	116,8			
Total	71	23150,6				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 13,36 %

S = ±10,81

\bar{X} =80,90%

Cuadro 35: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre el porcentaje de tejido diferenciado

O.M	Tratamiento	Promedio (%)	Significación	
			5%	1%
1	T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	100,0	a	a
2	T2 (testigo) (MS/3+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	100,0	a	a
3	T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	95,8	b	b
4	T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	95,8	b	b
5	T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	91,7	c	c
6	T10 (MS/3+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	83,3	d	d
7	T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	75,0	e	e
8	T1 (MS/2+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	75,0	e	e
9	T11(MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP)	70,8	e	e
10	T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	66,7	e	e
11	T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	58,3	e	e
12	T7 (MS/2+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	58,3	e	e

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

En el cuadro 35 se muestra el efecto de los tratamientos sobre el índice del tejido diferenciado, el tratamiento el T6 (MS/3 + 2,0 mg/l KIN + 0 mg/l BAP) y T2 (testigo) (MS/3 + 0,5 mg/l KIN + 0 mg/l BAP) son estadísticamente similares y fueron superiores a los demás tratamientos, reportándose con una media de 100% de tejido diferenciado. Sin embargo, los tratamientos T12 (MS/3 + 2 mg/l KIN + 2,5 mg/l BAP) y T3 (MS/2 + 1 mg/l KIN + 0 mg/l BAP) son estadísticamente similares y cercanas a los resultados comparados con el testigo haciendo una diferencia de media de 4,2 % inferior al testigo, los cuatro primeros tratamientos fueron considerados como los mejores para la obtención de la mayor cantidad de tejido diferenciado. Los tratamientos ubicadas en el orden de mérito del 7 al 12 son inferiores a los demás

tratamientos y al testigo siendo estos tratamientos desfavorables para incrementar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

Cuadro 36: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre el tejido diferenciado

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	1875,000	1875,000	16,04 **	4,00	7,08
A(b1c2)	1	833,500	833,500	7,13 **	4,00	7,08
A(b2c1)	1	52,000	52,000	0,44 ^{n.s}	4,00	7,08
A(b2c2)	1	1874,750	1874,750	16,04 **	4,00	7,08
A(b3c1)	1	3333,000	3333,000	28,51 **	4,00	7,08
A(b3c2)	1	1875,000	1875,000	16,04 **	4,00	7,08
B(a1c1)	2	2707,750	1353,875	11,58 **	3,15	4,98
B(a1c2)	2	624,916	312,458	2,67 ^{n.s}	3,15	4,98
B(a2c1)	2	277,666	138,833	1,19 ^{n.s}	3,15	4,98
B(a2c2)	2	1319,250	659,625	5,64 **	3,15	4,98
C(a1b1)	1	833,500	833,500	7,13 **	4,00	7,08
C(a1b2)	1	4218,375	4218,375	36,09 **	4,00	7,08
C(a1b3)	1	52,000	52,000	0,44 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a2b1)	1	1875,000	1875,000	16,04 **	4,00	7,08
C(a2b2)	1	208,500	208,500	1,78 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a2b3)	1	52,125	52,125	0,45 ^{n.s}	4,00	7,08
Error	60	7013,5	116,8			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor C (BAP) es altamente significativa para la diferenciación del tejido en cualquiera de las interacciones de los niveles de AB (MediosMS*Kinetina); pero no fue así bajo la presencia de a1b3 (MS/2*2,0mg/lKIN), a2b2 (MS/3*1,0mg/l KIN) y a2b3 (MS/3*2,0mg/l KIN). El

efecto del factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) fue significativa en cualquiera de las interacciones de los niveles BC (kinetina*BAP), pero no fue así con la interacción de los niveles b2c1 (1,0mg/l KIN*0,0mg/l BAP); el factor B presentó diferencias con los niveles de la interacción a1c1 (MS/2*0,0mg/lBAP) y a2c2 (MS/3*2,5mg/lBAP), estos resultados indican que el efecto del factor B (BAP) se influenciada por la interacción (MS/2*0,0mg/lBAP) y MS/3*2,5mg/lBAP.

Cuadro 37: ANOVA de efectos simples sobre el tejido diferenciado

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
B(c1)	2	659,625	329,812	2,82 ^{n.s}	3,15	4,98
B(c2)	2	1805,361	902,680	7,72 **	3,15	4,98
C(b1)	1	2604,375	2604,375	22,28 **	4,00	7,08
C(b2)	1	3151,270	3151,270	26,96 **	4,00	7,08
C(b3)	1	0,00003	0,00003	0,00 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a1)	1	2500,333	2500,333	21,39 **	4,00	7,08
C(a2)	1	1406,625	1406,625	12,03 **	4,00	7,08
A(c1)	1	2934,208	2934,208	25,10 **	4,00	7,08
A(c2)	1	4444,444	4444,444	38,02 **	4,00	7,08
A(b1)	1	2604,375	2604,375	22,28 **	4,00	7,08
A(b2)	1	651,145	651,145	5,57 *	4,00	7,08
A(b3)	1	5103,875	5103,875	43,66 **	4,00	7,08
B(a1)	2	729,125	364,562	3,12 ^{n.s}	3,15	4,98
B(a2)	2	867,916	433,958	3,71 *	3,15	4,98
Error	60	7013,5	116,8			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) presenta diferencias en los niveles c2 (2,5mg/l BAP) y a2 (MS/3), este resultado indica que el efecto de kinetina está influenciada por la

adición de 2,5mg/l BAP y MS/3 para incrementar el índice de tejido diferenciado. También observamos en el factor C (BAP) diferencias en todos los niveles del factor A (Medios MS) y en los niveles b1 (0,5mg/l KIN) y b2 (1,0mg/l KIN). El factor A (Medios MS) presenta diferencias en cualquier nivel del factor C (BAP) y B (Kinetina).

Cuadro 38: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la diferenciación del tejido de *Dionaea muscipula*

O.M	Fuentes		Promedio (%)	Significación	
				5%	1%
1	b2	c1	93,75	a	a
2	b1	c1	87,50	a	a
3	b3	c1	83,33	b	b
4	b3	c2	83,33	b	b
5	b2	c2	70,83	c	c
6	b1	c2	66,67	c	c
1	a2	c1	97,22	a	a
2	a2	c2	84,72	b	b
3	a1	c1	79,17	b	b
4	a1	c2	62,50	c	c
1	a2	b3	97,92	a	a
2	a2	b2	87,50	b	b
3	a2	b1	87,50	b	b
4	a1	b2	77,08	c	c
5	a1	b3	68,75	c	c
6	a1	b1	66,67	c	c

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

En el cuadro 38 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC (Kinetina*BAP) las mejores interacción fueron b2c1 (1,0mg/l KIN*0,0mg/l BAP) y b1c1 (0,5mg/l KIN*0,0mg/l BAP) reportándose con una media de 93,75% y 87,50% de tejido diferenciado; b2 (1,0mg/l KIN) y b1 (0,5mg/l KIN), estos niveles de kinetina actúan mejor sin la adición de BAP sobre la diferenciación de tejidos. Para el efecto simple AC la mejor interacción fue a2c1 (MS/3*0,0mg/l BAP) reportándose con una media de 97,22%, el efecto de las concentraciones nutricionales MS/3 no depende de las concentraciones de BAP para su efecto sobre la diferenciación. Del efecto

simple AB (Medios MS*Kinetina) la mejor interacción fue a2b3 (MS/3*2,0mg/lKIN) para ambos niveles de significación, esto indica que el efecto del medio MS/3 esta influenciado por la adición de 2,0mg/l de KIN para incrementar el índice de tejido diferenciado para *Dionaea muscipula*.

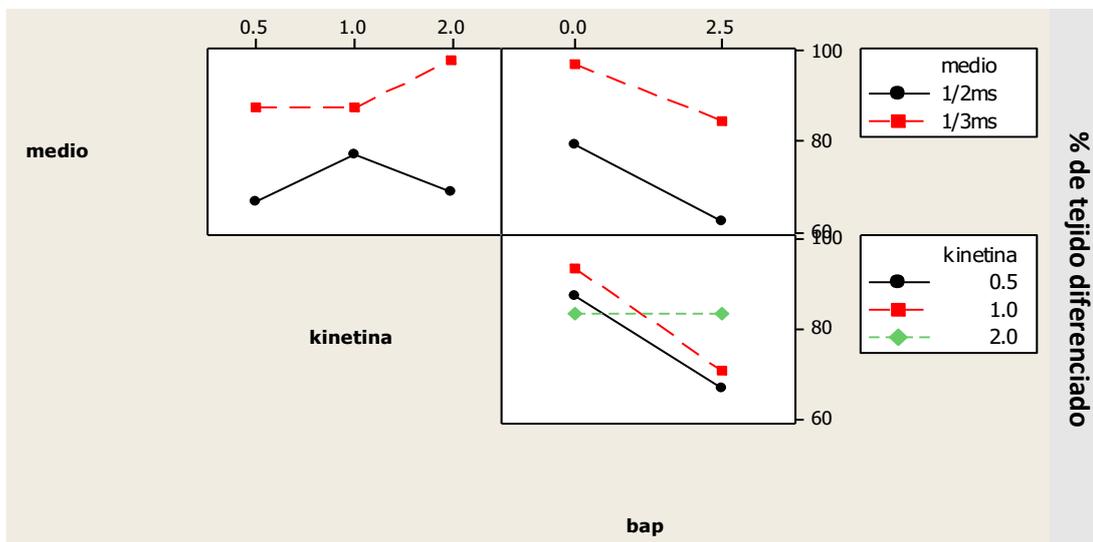


Figura 11: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC para el porcentaje de tejido diferenciado

En la figura 11, observamos que existe interacción entre el factor BC (Kinetina*BAP). Los demás factores en estudio no mostraron interacciones, este resultado indica que los factores que siguen la misma tendencia; es decir que ninguno se ve afectado o es dependiente del otro factor para elevar el índice de tejido diferenciado.

Cuadro 39: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la diferenciación del tejido de *Dionaea muscipula*

O.M	Fuente		Promedio (%)	Significación	
				5%	1%
1	A	a2	90,97	a	a
2		a1	70,83	b	b
1	B	b3	83,33	a	a
2		b2	82,29	a	a
3		b1	77,08	a	a
1	c	c1	88,19	a	a
2		c2	73,61	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor A (Concentraciones nutricionales modificadas del medio MS) sobre el índice de tejido diferenciado, siendo el nivel a2 (MS/3) el que mejor responde para esta variable reportándose con una media de 90,97% de tejido diferenciado. También observamos diferencia estadística en los niveles de C, la ausencia de BAP favorece para incrementar el índice de tejido diferenciado.

A pesar de no tener diferencias estadísticas para las concentraciones de kinetina, se observó diferencias cualitativas, es decir los tratamientos que contenían a Kinetina, los tejidos se diferenciaban e incluso podría asumir que esta hormona suprimió algún el efecto negativo del BAP.

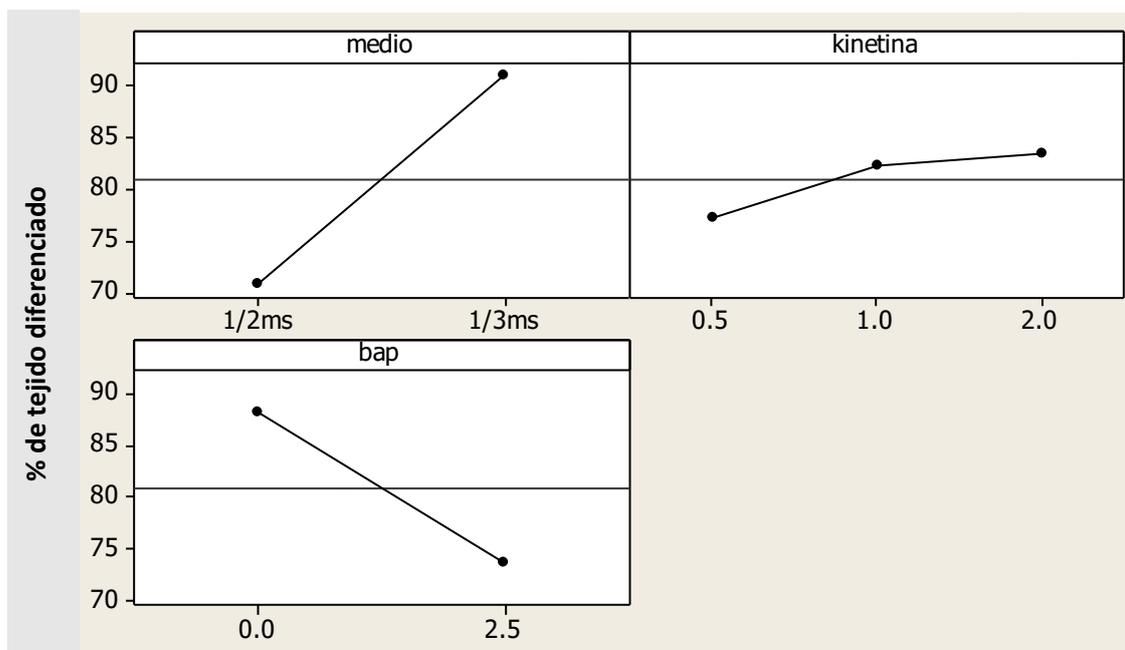


Figura 12: Gráfica de los efectos principales A, B y C sobre el porcentaje de tejido diferenciado.

Como muestra en la figura 12, al evaluar el efecto de los factores en estudio de manera independiente, observamos diferencias significativas en el factor A (concentraciones nutricionales modificadas del medio MS) sobre la diferenciación de tejidos, el medio MS/3 induce a obtener mayor índice de tejido diferenciado, efectos similares se obtuvo con la ausencia de BAP.

Resumen de los resultados para determinar la tasa de multiplicación

Cuadro 40: Efecto de los tratamientos sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula* Ellis

Variables	N° Brotes por explante		N° hojas por explante		Altura promedio de los brotes		TVM		% tejido diferenciado	
	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%
Tratamientos	T11	T11	T11	T11	T11	T11	T3	T3	T6	T6
	T9	T9	T3	T3	T12	T12	T1	T1	T2	T2
	T4	T4	T1	T1	T6	T6	T4	T4	T12	T12
	T3	T3	T9	T9	T9	T9	T11	T11	T3	T3
	T8	T8	T8	T8	T1	T1	T6	T6	T4	T4
	T1	T1	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T10	T10
	T6	T6	T5	T5	T3	T3	T8	T8	T8	T8
	T5	T5	T6	T6	T10	T10	T2	T2	T1	T1
	T7	T7	T7	T7	T4	T4	T9	T9	T11	T11
	T2	T2	T2	T2	T5	T5	T10	T10	T5	T5
	T12	T12	T12	T12	T7	T7	T5	T5	T9	T9
	T10	T10	T10	T10	T2	T2	T7	T7	T7	T7

Como se observa en el cuadro 40, el T11 resultó poseer mayores índices de brotes y hojas por explante, altura promedio de los brotes en comparación con el testigo; sin embargo los tratamientos T3 y T6 también presentaron con mayor frecuencia altos índices para la tasa de velocidad de multiplicación y para el porcentaje de tejido diferenciado.

Cuadro 41: Comparación de los niveles de significancia de las dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

Fuentes de variación	N° brotes por explante	N° de hojas por explante	Tamaño promedio de los brotes	TVM	Diferenciación
A(b1c1)	**	**	**	**	**
A(b1c2)	*	*	n.s	**	**
A(b2c1)	n.s	**	n.s	*	n.s
A(b2c2)	**	**	n.s	n.s	**
A(b3c1)	n.s	n.s	*	**	**

Fuentes de variación	N° brotes por explante	N° de hojas por explante	Tamaño promedio de los brotes	TVM	Diferenciación
A(b3c2)	**	**	n.s	n.s	**
B(a1c1)	n.s	**	n.s	**	**
B(a1c2)	**	**	**	**	n.s
B(a2c1)	**	n.s	**	n.s	n.s
B(a2c2)	**	**	n.s	n.s	**
C(a1b1)	*	**	n.s	**	**
C(a1b2)	n.s	*	n.s	**	**
C(a1b3)	**	**	**	**	n.s
C(a2b1)	**	**	*	n.s	**
C(a2b2)	**	**	n.s	**	n.s
C(a2b3)	**	n.s	n.s	n.s	n.s

En el cuadro 41 se muestran las comparaciones de las dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) para determinar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*, el efecto del factor A (medios MS) con las interacciones simples de los niveles b1c1 (0,5mg/l KIN*0,0mg/l BAP) y b1c2 (0,5mg/l KIN* 2,5mg/l BAP) son altamente significativos en los cinco indicadores para incrementar la tasa de multiplicación, sin embargo el efecto del factor A sobre el tamaño promedio de los brotes fue no significativa con la interacción simple b1c2, este resultado indica que la adición de 2,5mg/l BAP retarda el crecimiento de las plantas. El efecto del factor B (kinetina) con la interacción de los niveles a1c2 resultó altamente significativa sobre los cinco indicadores para la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*, este resultado indica que el efecto de kinetina se intensifica con la interacción simple a1c2.

Cuadro 42: Comparación de los niveles de significancia de los efectos simples sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

Fuentes de variación	N° de brotes por explante	N° de hojas por explante	Tamaño promedio de los brotes	TVM	Diferenciación
B(c1)	*	**	n.s	**	n.s
B(c2)	n.s	**	**	**	**
C(b1)	n.s	n.s	n.s	**	**
C(b2)	**	**	n.s	**	**
C(b3)	n.s	**	**	*	n.s
C(a1)	n.s	n.s	n.s	**	**
C(a2)	*	n.s	*	**	**
A(c1)	n.s	**	n.s	n.s	**
A(c2)	**	**	n.s	n.s	**
A(b1)	n.s	*	n.s	n.s	**
A(b2)	**	**	n.s	*	*
A(b3)	**	**	n.s	n.s	**
B(a1)	n.s	**	n.s	**	n.s
B(a2)	n.s	*	**	n.s	*

En el cuadro 42 observamos la comparación de resultados de los efectos simples sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*, el factor A (Medios MS) interaccionado con el nivel b2 (1,0mg/l KIN) resultó ser significativa sobre el número de brotes y hojas por explante, TVM y la diferenciación del tejido, este resultado indica que el efecto del factor A es dependiente del nivel b2. El factor B resultó ser altamente significativa interaccionado con el nivel c2 (2,5mg/l BAP) sobre el número de hojas por explante, tamaño promedio de los brotes, TVM y la

diferenciación del tejido, este resultado indica que el efecto de kinetina es mejor con la interacción c2 sobre las variables indicadas anteriormente.

El factor C (BAP) interaccionado con el nivel b2 (1,0 mg/l KIN), resultó ser altamente significativa sobre el número de brotes y hojas por explante, TVM y la diferenciación del tejido de *Dionaea muscipula*, este resultado indica que el efecto del factor C es dependiente del nivel b2 para su eficiencia.

Cuadro 43: Comparación de los niveles de significancia de los efectos principales sobre las variables para determinar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

Factores en estudio \ Variables		N° Brotes por explante		N° hojas por explante		Altura promedio de los brotes		TVM		% tejido diferenciado	
		5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%
A	a1=MS/2	SI*		SI*		NO		NO		SI	
	a2=MS/3	SI		SI		NO		NO		SI*	
B	b1=0,5 mg/l	NO		NO		NO		NO		NO	
	b2=1,0 mg/l	NO		NO		NO		NO		NO	
	b3=2,0 mg/l	NO		NO		NO		NO		NO	
C	c1=0,0 mg/l	NO		NO		SI		SI*		SI*	
	c2=2,5 mg/l	NO		NO		SI*		SI		SI	

*Resultó ser la mejor concentración

Al evaluar independientemente el efecto de los niveles de los factores en estudio sobre la tasa de multiplicación, se determinó que el nivel a1 (MS/2) tiene efecto positivo para incrementar el número de brotes y hojas por explante. El efecto de la kinetina evaluando independientemente sobre la tasa de multiplicación no se observó diferencias sobre las variables en estudio, este valor indica que los tres niveles b1, b2 y b3 tienen efecto similar sobre las variables en estudio ; sin embargo se observó diferencias cualitativas como la presencia de brotes vigorosos, el desarrollo de hojas de tamaño uniforme, y la cantidad de tejido diferenciado, la adición de 1,0 mg/l y 2,0 mg/l de KIN fue más beneficiosa para la multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*. El efecto de BAP evaluado independientemente sobre la tasa de multiplicación resultó

ser significativa sobre la altura promedio de los brotes, sin embargo se obtuvo altos índices en la TVM y la diferenciación del tejido de *Dionaea muscipula* sin la adición de BAP.

4.2. Tiempo que demora el explante en diferenciarse

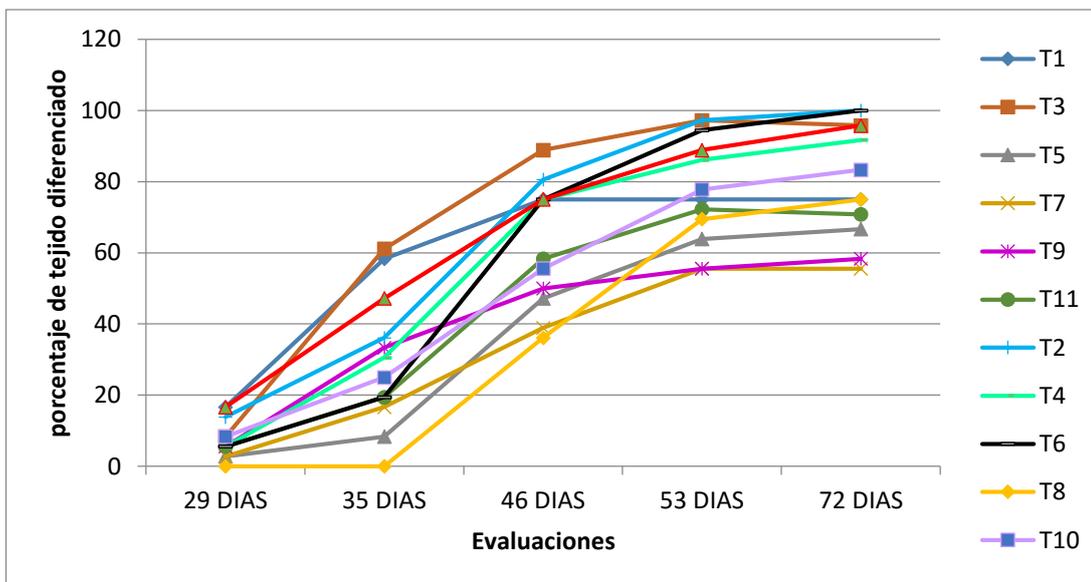


Figura 13: Tiempo que demora el tejido para diferenciarse variando las concentraciones de dos citoquininas y nutrientes del medio MS

Como se observa en la figura 13, se evaluó hasta los 72 días como referencia al T2 (testigo) para identificar al tratamiento que presenta mayor porcentaje de tejido diferenciado en un intervalo de tiempo; a los 29 días el tratamiento T12 y el T2 (testigo) respondieron mejor, debido a que tenían mayor cantidad de tejido diferenciado respecto a los demás tratamiento puestos en prueba. A los 35 días el T3 supero el índice de tejido diferenciado al igual que el T1; por otro lado, el T12 y T2 declinaron; sin embargo, a los 46 días el T3 superó a los demás tratamientos incluso supero al T2 (testigo).

A los 53 días el tratamiento T3 y T2 (testigo) alcanzaron su máximo apogeo presentando altos índices de tejido diferenciado con referencia a los demás tratamientos; sin embargo, a los 72 días el T6 superó al T3 reportándose con el 100 % de tejido diferenciado en su totalidad. El tratamiento T6, T3 y T2 (testigo) alcanzaron altos índices de tejido

diferenciado reportándose con el 100, 97 y 100% de tejido diferenciado en 72, 53 y 72 días respectivamente (figura 13).

4.3. Oxidación

En el análisis de varianza con un $\alpha = 0,05$ y $0,01$ para la oxidación, en el cuadro 44 se observa que existe alta significancia en la doble interacción simple ABC (MediosMS*kinetina*BAP), en la interacción simple BC (kinetina*BAP), AB (Medios MS*kinetina) y al evaluar independientemente el efecto de Kinetina, BAP y de las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS; con un coeficiente de variabilidad de 5,31 % indicándonos que existe alta confianza experimental en los datos tabulados.

Cuadro 44: Análisis de varianza de la oxidación

Fuente	GL	SC	CM	F _{cal}	F _{tab}	
					5%	1%
Tratamientos	11	7941,15	721,92	131,37	1,95	2,56
A=Medios MS	1	626,99	626,91	114,03 **	4,00	7,08
B=Kinetina	2	2765,08	1382,54	251,48 **	3,15	4,98
C=BAP	1	2363,70	2363,70	429,94 **	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	472,97	236,49	43,02 **	3,15	4,98
AC=medios MS*BAP	1	2,16	2,16	0,39 n.s	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	1445,51	722,75	131,47 **	3,15	4,98
MediosMS*kinetina*BAP	2	264,73	132,37	24,08 **	3,15	4,98
Error	60	329,71	5,50			
Total	71	8270,85				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 5,31 %

S = $\pm 2,34$

\bar{X} = 8,507

Cuadro 45: Prueba de Tukey de los tratamientos sobre la oxidación

O.M	Tratamiento	Media (%)	Significación	
			5%	1%
1	T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	27,1	a	a
2	T1 (MS/2+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	25,0	a	a
3	T10 (MS/3+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	16,7	b	b
4	T2 (testigo) (MS/3+0,5 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	16,7	b	b
5	T7 (MS/2+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	16,7	b	b
6	T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP)	0,0	c	c
7	T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,0	c	c

8	T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,0	c	c
9	T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	0,0	c	c
10	T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,0	c	c
11	T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP)	0,0	c	c
12	T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP)	0,0	c	c

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

En el cuadro 45 se muestra de acuerdo a la prueba de Tukey la respuesta de los tratamientos para el factor oxidación, se determinó a los tratamientos T11, T3, T6, T12, T5, T4 y T8 como los mejores porque no presentaron índices de oxidación, incluso son inferiores a los valores del testigo, se designó estos tratamientos como los mejores para obtener mayores tasas de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*, en el anexo 7 se muestran las zonas más frecuentes de los explantes que presentaron oxidación.

Cuadro 46: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre la oxidación

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	208,166	208,166	37,88 **	4,00	7,08
A(b1c2)	1	833,666	833,666	151,71 **	4,00	7,08
A(b2c1)	1	325,208	325,208	59,18 **	4,00	7,08
A(b2c2)	1	2,899	2,899	0,00 n.s	4,00	7,08
A(b3c1)	1	4,975	4,975	0,00 n.s	4,00	7,08
A(b3c2)	1	4,075	4,075	0,00 n.s	4,00	7,08
B(a1c1)	2	2725,500	1362,750	247,99 **	3,15	4,98
B(a1c2)	2	1111,555	555,777	101,14 **	3,15	4,98
B(a2c1)	2	1111,555	555,777	101,14 **	3,15	4,98
B(a2c2)	2	2,888	1,444	0,00 n.s	3,15	4,98
C(a1b1)	1	208,166	208,166	37,88 **	4,00	7,08
C(a1b2)	1	2200,250	2200,250	400,40 **	4,00	7,08

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
C(a1b3)	1	4,313	4,313	0,00 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a2b1)	1	833,666	833,666	151,71 **	4,00	7,08
C(a2b2)	1	833,666	833,666	151,71 **	4,00	7,08
C(a2b3)	1	4,274	4,274	0,00 ^{n.s}	4,00	7,08
Error	60	329,71	5,50			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor C (BAP) es altamente significativa para la oxidación en cualquiera de las interacciones de los niveles de AB (MediosMS*Kinetina); pero no fue así bajo la presencia de a1b3 (MS/2*2,0mg/lKIN) y a2b3 (MS/3*2,0ml/l), esto significa que el efecto de BAP es mejor con la interacción a1b3 (MS/2*2,0mg/lKIN) y a2b3 (MS/3*2,0ml/l) para reducir la oxidación; de igual manera no presentaron significancia para el efecto del factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) con la interacción b2c2 (1,0mg/lKIN*2,5mg/lBAP), b3c1 (2,0mg/l*0,0mg/l) y b3c2 (2,0mg/l KIN*2,5mg/l BAP), este resultado indica el efecto positivo que genera el factor A (medios MS) frente al efecto simple Kinetina*BAP para esta variable. También se observó no significativo en el efecto de B (Kinetina) con la interacción de a2c2 (MS/3*2,5mg/lBAP), estas interacciones no presentan índice de oxidación en el tejido cultivado *in vitro*.

Cuadro 47: ANOVA de efectos simples sobre la oxidación

Fuentes de variación	GL	SM	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
B(c1)	2	3654,930	1827,465	332,56 **	3,15	4,98
B(c2)	2	555,777	277,888	50,57 **	3,15	4,98
C(b1)	1	937,500	937,500	170,61 **	4,00	7,08
C(b2)	1	2871,312	2871,312	522,52 **	4,00	7,08

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
C(b3)	1	9,951	9,951	0,00 ^{n.s}	4,00	7,08
C(a1)	1	1253,986	1253,986	228,20 **	4,00	7,08
C(a2)	1	1111,555	1111,555	202,28 **	4,00	7,08
A(c1)	1	351,250	351,250	63,92 **	4,00	7,08
A(c2)	1	277,888	277,888	50,57 **	4,00	7,08
A(b1)	1	937,500	937,500	170,61 **	4,00	7,08
A(b2)	1	162,604	162,604	29,59 **	4,00	7,08
A(b3)	1	8,626	8,626	0,00 ^{n.s}	4,00	7,08
B(a1)	2	2682,625	1341,312	244,09 **	3,15	4,98
B(a2)	2	555,777	277,888	50,57 **	3,15	4,98
Error	60	329,71	5,50			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) presenta diferencias en cualquiera de los niveles del factor C (BAP) y A (Medios MS), el efecto del factor C (BAP) presenta diferencias estadísticas en cualquiera de los niveles del factor A (Medios MS) y B (Kinetina), excepto en el nivel b3 (2,0mg/l KIN). Este resultado indica que el efecto de BAP mejora o es contrarrestado por la presencia de 2,0 mg/l KIN sobre la oxidación. A la vez el factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) presenta efecto interactivo altamente significativo con cualquiera de los niveles del factor C y B, excepto el nivel b3 (2,0mg/l KIN), este resultado indica que el efecto de la concentración nutricional modificada del medio MS mejora o es contrarrestado por la presencia de 2,0mg/l KIN sobre la oxidación del tejido cultivado *in vitro*.

Cuadro 48: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la oxidación

O.M	Fuentes		Promedio de oxidación (%)	Significación	
				5%	1%
1	b2	c1	21,87	a	a
2	b1	c1	20,83	a	a
3	b1	c2	8,33	b	b
4	b3	c2	0,00	c	b
5	b2	c2	0,00	c	c
6	b3	c1	0,00	c	c
1	a1	c1	17,36	a	a
2	a2	c1	11,11	b	b
3	a1	c2	5,55	c	c
4	a2	c2	0,00	d	d
1	a1	b1	20,83	a	a
2	a1	b2	13,54	b	b
3	a2	b2	8,33	c	c
4	a2	b1	8,33	c	c
5	a1	b3	0,00	d	d
6	a2	b3	0,00	d	d

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

En el cuadro 48 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC las mejores interacciones fueron b3c2 (2,0mg/l KIN*2,5mg/l BAP), b2c2 (1,0mg/l KIN*2,5mg/l BAP) y b3c1 (2,0mg/l KIN*0,0mg/l BAP), reportándose de no presentar índices de oxidación, este resultado indica que el efecto negativo provocado por BAP es contrarrestado por la adición de Kinetina. Para el efecto simple AC la mejor interacción fue a2c2 (MS/3*2,5mg/l BAP), esta interacción no presento índices de oxidación; del efecto simple AB las mejores interacciones fueron a1b3 (MS/2*2,0mg/l KIN) y a2b3 (MS/3*2,0mg/l KIN), este resultado indica que el efecto Kinetina es primordial para reducir los índices de oxidación de los tejidos cultivados *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

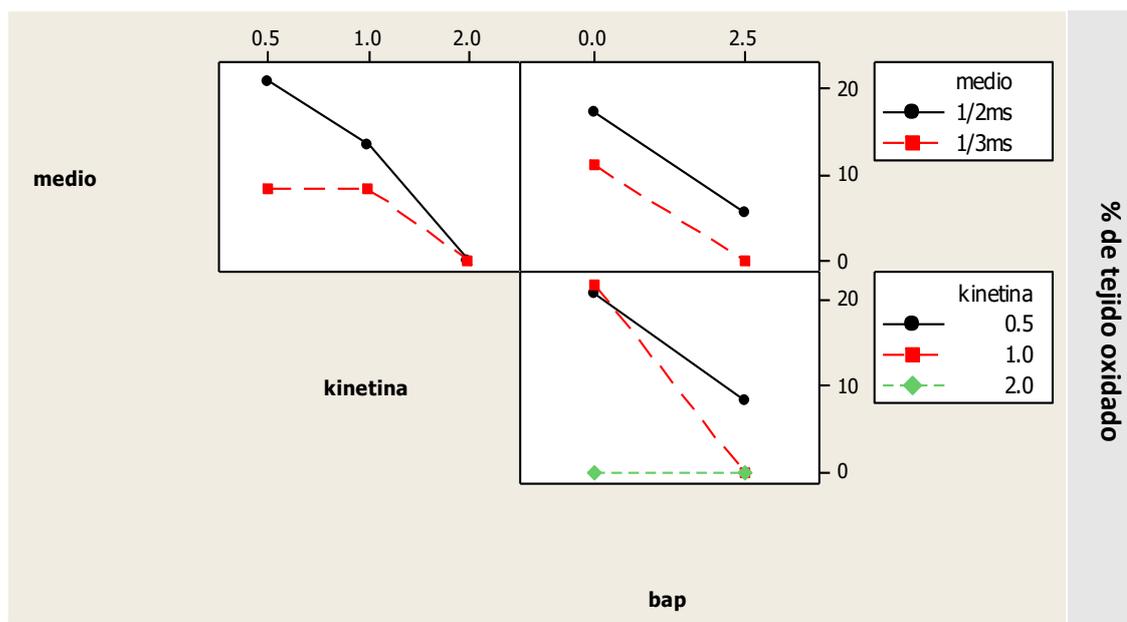


Figura 14: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC sobre la oxidación

En la figura 14 observamos que existe interacción simple entre los niveles de los factores AB (MediosMS*Kinetina) y BC (Kinetina*BAP), conforme se incrementa la concentración de kinetina para ambas concentraciones nutricionales modificadas del medio MS se reduce el índice de oxidación; con la interacción BC se observa que el nivel b3 (2,0mg/l KIN) interaccionado con ambos niveles del factor C (BAP) no reportan índices de oxidación. No existe interacción entre los niveles de los factores A y C, es decir siguen la misma tendencia.

Cuadro 49: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la oxidación

O.M	Fuente		Promedio de oxidación (%)	Significación	
				5%	1%
1	A	a1	11,45	a	a
2		a2	5,55	b	b
1	B	b1	14,58	a	a
2		b2	10,93	b	b
3		b3	0,00	c	c
1	c	c1	14,23	a	a
2		c2	2,77	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; $0,01$)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor A (Concentraciones nutricionales modificadas del medio MS) sobre la oxidación, siendo el nivel a2 (MS/3) el que mejor responde para esta variable reportándose con 5,5 % de tejido oxidado. También observamos diferencias al evaluar independientemente las concentraciones del factor B y C, siendo el nivel b3 (2,0mg/l KIN) y c2 (2,5mg/l BAP) los que reportaron menores índices de oxidación con 0,0% y 2,77% de tejido oxidado.

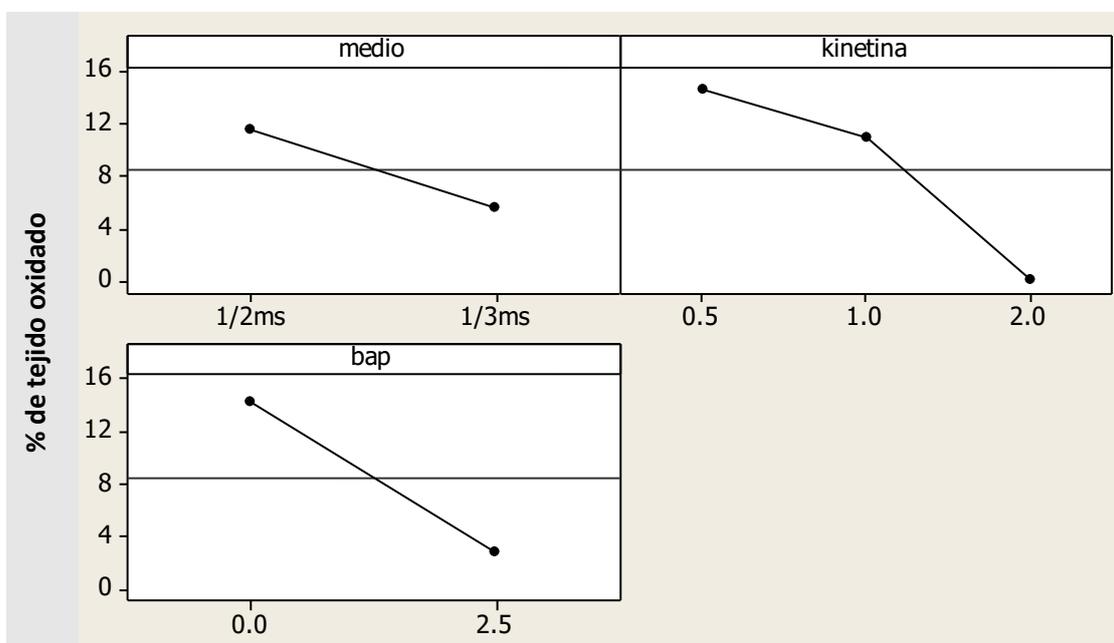


Figura 15: Gráfica de los efectos principales A, B y C sobre la oxidación

En la gráfica 15 observamos que existe diferencia estadística en todos los niveles de los factores en estudio, el medio MS/2 produce mayor índice de oxidación, conforme se redujo la concentración nutricional también se redujo la oxidación. La menor concentración de kinetina produce mayor índice de oxidación, sin embargo conforme se incrementa la concentración de kinetina se disminuyó el índice de oxidación. En nuestro experimento se reportó que la adición de BAP produce bajos índices de oxidación.

4.4. Presencia de raíces

En el cuadro 50 se observa que existe alta significancia en la interacción simple BC (kinetina*BAP) y al evaluar independientemente el efecto de B, C las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS (A); resultó significativa la interacción simple AB (Medios MS*kinetina) con un coeficiente de variabilidad de 7,68 % y de $\pm 0,94$ de desviación estándar, estos valores indican la confiabilidad de los datos tabulados.

Cuadro 50: ANOVA para la presencia de raíces

Fuente	GL	SC	CM	F _{cal}	F _{tab}	
					5%	1%
Tratamientos	11	80,125	7,284	8,32**	1,95	2,56
A=Medios MS	1	6,125	6,125	7,00 **	4,00	7,08
B=Kinetina	2	9,250	4,625	5,29 **	3,15	4,98
C=BAP	1	18,000	18,000	20,57 **	4,00	7,08
AB=Medios MS*kinetina	2	7,000	3,500	4,00 *	3,15	4,98
AC=Medios MS*BAP	1	2,000	2,000	2,29 n.s	4,00	7,08
BC=kinetina*BAP	2	36,750	18,375	21,00 **	3,15	4,98
MediosMS*kinetina*BAP	2	1,000	0,500	0,57 n.s	3,15	4,98
Error	60	52,500	0,875			
Total	71	132,625				

n.s (no significativo) ** (altamente significativo) * (significativo)

C.V = 7,68 %

S = $\pm 0,94$

Cuadro 51: ANOVA de dobles interacciones simples A(BC), B(AC) y C(AB) sobre la presencia de raíces

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
A(b1c1)	1	1,687	1,687	1,93 n.s	4,00	7,08
A(b1c2)	1	0,187	0,187	0,21 n.s	4,00	7,08
A(b2c1)	1	1,687	1,687	1,93 n.s	4,00	7,08
A(b2c2)	1	9,187	9,187	10,50 **	4,00	7,08
A(b3c1)	1	1,687	1,687	1,93 n.s	4,00	7,08
A(b3c2)	1	1,687	1,687	1,93 n.s	4,00	7,08
B(a1c1)	2	13,000	6,500	7,43 **	3,15	4,98

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
B(a1c2)	2	23,250	11,625	13,29 **	3,15	4,98
B(a2c1)	2	1,000	0,500	0,57 n.s	3,15	4,98
B(a2c2)	2	16,750	8,375	9,57 **	3,15	4,98
C(a1b1)	1	1,687	1,687	1,93 n.s	4,00	7,08
C(a1b2)	1	0,187	0,187	0,21 n.s	4,00	7,08
C(a1b3)	1	27,000	27,000	30,86 **	4,00	7,08
C(a2b1)	1	0,187	0,187	0,21 n.s	4,00	7,08
C(a2b2)	1	1,687	1,687	1,93 n.s	4,00	7,08
C(a2b3)	1	27,000	27,000	30,86 **	4,00	7,08
Error	60	52,500	0,875			

En el cuadro de ANOVA de dobles interacciones simples se muestra que el efecto del factor C (BAP) solo fue altamente significativa para la presencia de las raíces en las interacciones de los niveles de a1b3 (MS/2*2,0mg/IKIN) y a2b3 (MS/3*2,0mg/IKIN). El efecto del factor A (concentración nutricional modificada del medio MS) presentó interacción significativa solo con los niveles b2c2 (1,0mg/IKIN*2,5mg/IBAP) y el efecto del factor B (Kinetina) presentó significación con la interacción de los niveles a1c1 (MS/2*0,0mg/IBAP), a1c2 (MS/2*0,0mg/IBAP), a2c2 (MS/2*0,0mg/IBAP), estos resultados indican que el efecto de kinetina se intensifica sobre la presencia de raíces en *Dionaea muscipula* con las interacciones mencionadas anteriormente.

Cuadro 52: ANOVA de efectos simples sobre la presencia de raíces

Fuentes de variación	GL	SM	CM	F _c	F _{tab}	
					5%	1%
B(c1)	2	9,500	4,750	5,43 **	3,15	4,98
B(c2)	2	36,500	18,250	20,86 **	3,15	4,98

Fuentes de variación	GL	SM	CM	Fc	Ftab	
					5%	1%
C(b1)	1	0,375	0,375	0,43 ^{n.s}	4,00	7,08
C(b2)	1	0,375	0,375	0,43 ^{n.s}	4,00	7,08
C(b3)	1	54,000	54,000	61,71 ^{**}	4,00	7,08
C(a1)	1	4,000	4,000	4,57 [*]	4,00	7,08
C(a2)	1	16,000	16,000	18,29 ^{**}	4,00	7,08
A(c1)	1	0,562	0,562	0,64 ^{n.s}	4,00	7,08
A(c2)	1	7,562	7,562	8,64 ^{**}	4,00	7,08
A(b1)	1	0,375	0,375	0,43 ^{n.s}	4,00	7,08
A(b2)	1	9,375	9,375	10,71 ^{**}	4,00	7,08
A(b3)	1	3,375	3,375	3,86 ^{n.s}	4,00	7,08
B(a1)	2	11,375	5,687	6,50 ^{**}	3,15	4,98
B(a2)	2	4,875	2,437	2,79 ^{n.s}	3,15	4,98
Error	60	52,500	0,875			

En el cuadro de ANOVA de efectos simples observamos que el efecto del factor B (Kinetina) presenta diferencias en todos los niveles de C (BAP) y A (Medios MS), excepto el nivel a2 (MS/3), esto indica que el efecto de B (Kinetina) es dependiente de los niveles de C (BAP) y a1 (MS/2) para incrementar la presencia de raíces. También observamos en el efecto del factor C (BAP) diferencias en todos los niveles de A y el nivel b3 (2,0mg/l), este resultado indica que el efecto de BAP está influenciada por los niveles del factor A (mediosMS) y b3 (2,0mg/IKIN). El factor A (Medios MS) presenta diferencias en el nivel c2 y b2, con el resto no presento diferencias, esto indica que no existe interacción entre ellos y actúan de manera independiente.

Cuadro 53: Prueba de Tukey de los efectos simples sobre la presencia de raíces

O.M	Fuentes		Promedio de raíces /brote	Significación	
				5%	1%
1	b3	c2	4,12	a	a
2	b1	c1	2,37	b	b
3	b1	c2	2,12	b	b
4	b2	c2	1,87	c	b
5	b2	c1	1,62	c	b
6	b3	c1	1,12	c	b
1	a2	c2	3,16	a	a
2	a1	c2	2,25	b	b
3	a2	c1	1,83	b	b
4	a1	c1	1,53	b	b
1	a2	b3	3,00	a	a
2	a2	b2	2,37	a	b
3	a1	b1	2,37	a	b
4	a1	b3	2,25	a	b
5	a2	b1	2,12	b	b
6	a1	b2	1,12	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$; 0,01)

En el cuadro 53 se muestra la interacción de los niveles de cada factor, para el efecto simple BC la mejor interacción fue b3c2 (2,0mg/KIN*2,5mg/IBAP) reportándose con una media de 4,12 raíces por planta, siendo superior a las interacciones simples, este resultado indica el efecto del nivel b3 depende del nivel c2 para incrementar el número de raíces. Para el efecto simple AC la mejor interacción fue a2c2 (MS/3*2,5mg/IBAP), el efecto de las concentraciones nutricionales modificadas se ven afectadas por la adición de BAP. Para el efecto simple AB la mejor interacción fue a2b3 (MS/3*2,0mg/KIN), esto indica que el efecto del medio MS/3 esta influenciado por la adición de 2,0mg/l de KIN para incrementar el número raíces por brote de *Dionaea muscipula*. Las demás interacciones siguen la misma tendencia; no mostraron diferencias relevantes.

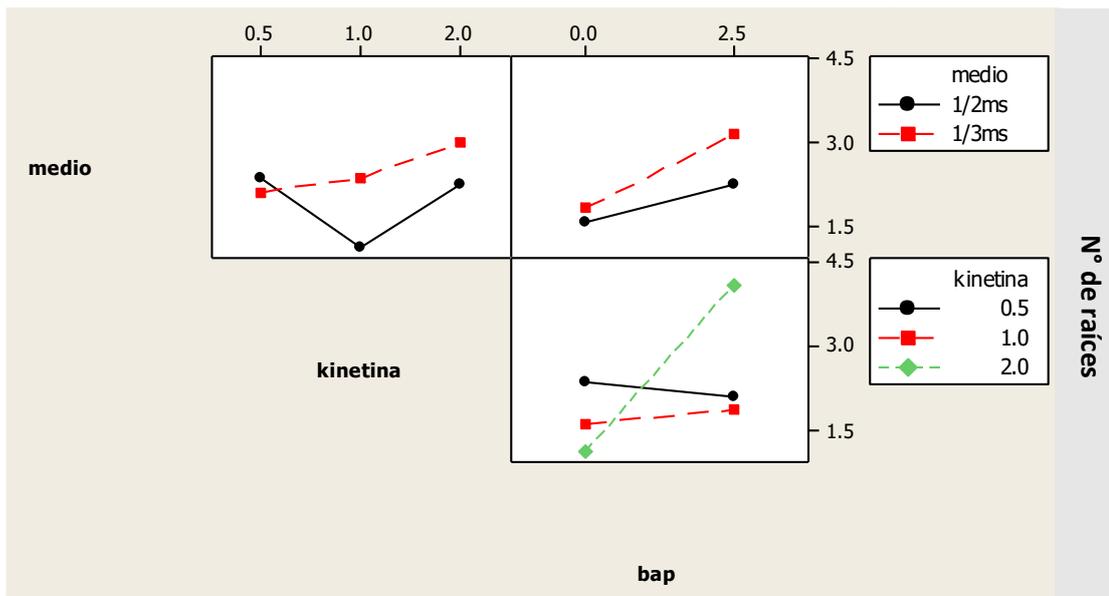


Figura 16: Gráfica de los efectos simples AB, BC y AC sobre la presencia de raíces

En la figura 16 observamos que existe interacción simple entre los niveles de los factores AB (Medios MS*Kinetina), BC (Kinetina*BAP) y AC (Medio MS*BAP) sobre la presencia de raíces, con las interacciones de los niveles MS/3*2,5mg/l BAP y 2,0mg/l KIN*2,5mg/l BAP se produjeron mayor número de raíces por brote.

Cuadro 54: Prueba de Tukey de los efectos principales sobre la presencia de raíces

O.M	Fuente		Promedio de oxidación (%)	Significación	
				5%	1%
1	A	a2	2,50	a	a
2		a1	1,91	a	a
1	B	b3	2,62	a	a
2		b1	2,25	b	b
3		b2	1,75	b	b
1	c	c2	2,71	a	a
2		c1	1,71	b	b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P<0,05; 0,01)

Al evaluar independientemente cada factor, se muestra en la prueba de Tukey que existe diferencia estadística para el factor C (BAP) sobre la oxidación, siendo el nivel c2 (2,5mg/l BAP) el que mejor responde para esta variable.

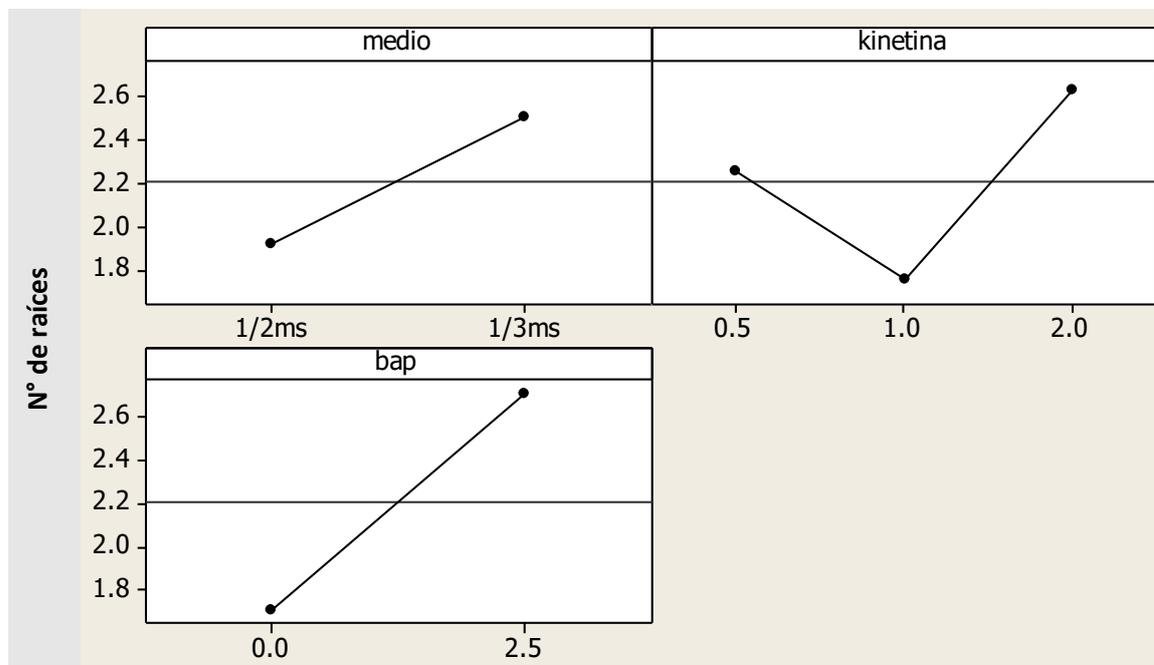


Figura 17: Gráfica de los efectos principales A, B y C para la presencia de raíces

En la figura 17 observamos que existe diferencias entre los niveles de cada factor respecto al índice de oxidación, la concentración de MS/3 favorece en gran medida en la formación de raíces, demostrando ser la concentración de nutrientes apropiada para esta finalidad. Por otro lado si se usa la concentración de MS/2 también se tendrá la presencia de raíz pero en menor proporción. La concentración de 2,0 mg/l de kinetina induce a incrementar la presencia de raíces de *Dionaea muscipula*. Sin embargo 0,5 mg/l y 1,0 mg/l de kinetina tienen efecto similar para la presencia de raíz, pero su índice es reducido mostrándose con 2,3 y 1,8 unidades respectivamente. La concentración de 2,5 mg/l BAP influye en gran medida para la proliferación de raíces en *Dionaea muscipula*, las raíces fueron de color negro y delgado.

V. DISCUSIÓN

Con este estudio se espera contribuir al desarrollo de nuevas investigaciones en *Dionaea muscipula* debido a que existen pocas publicaciones, y la población natural es cada vez más escasa; sin embargo, existe mucho interés por su valor medicinal, debido a que existen reportes de combatir enfermedades respiratorias e incluso están siendo utilizados en tratamientos para combatir el cáncer (Vilchez *et al*, 2008). La discusión estará basada en los efectos principales y también con observaciones realizadas en la investigación debido a que se dispone de pocas publicaciones sobre la especie.

5.1. Determinación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*

5.1.1. Número de brotes por explante

El tratamiento T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP) y T9 (MS/2+1,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP) destacaron por presentar altos índices de brotes (13 brotes por explante) superando con 4 brotes al testigo; al evaluar independientemente los factores en estudio, la concentración nutricional MS/2 fue significativa reportándose con 12 brotes por explante, la mayor disponibilidad nutricional del medio MS/2 respecto al medio MS/3 induce a la mayor proliferación de brotes, efectos similares obtuvieron Gi – Won *et al*, 2002; Hutchinson en 1984 menciona que este efecto se debe principalmente a la presencia y la absorción de nitrógeno, por lo tanto, al reducir la concentración nutricional a MS/3 también se redujo la producción de brotes, efectos similares obtuvo Hutchinson en 1984 quien produjo 9,6 de brotes con el medio MS de concentración completa y 3,6 brotes en el medio con menor concentración de sales; del mismo modo Wawrosh *et al*, en el 2009 registraron un promedio de 11 brotes por explante en el medio MS/2 cultivando *in vitro Drosera rotundifolia L.* Jayaram & Prasad, en el 2007 obtuvieron 2,2 plantas en promedio por explante en el medio de cultivo MS/2 en *Drosera burmanii*. Banasiuk *et al*, 2012, mencionan que en verdad es una

respuesta inesperada ya que la especie crece netamente en zonas pobres de nutrientes.

Probablemente, la diferencia de resultados con los otros investigadores se deba a que la proliferación del brote estuvo influenciada por la edad y tipo del explante (Gi – Won *et al*, 2002) o la concentración de sacarosa, debido a que Jejthar *et al*, 2014 obtuvieron mayor proliferación de brotes al reducir la concentración de sacarosa.

La concentración de kinetina (1,0 mg/l y 2 mg/l) y BAP (2,5 mg/l) también influenció en gran medida en estos resultados, debido a que Hutchinson en 1984 obtuvo mayor tasa de multiplicación para *Dionaea muscipula* al incrementar la concentración de KIN determinando como óptima 2,15 mg/l. Además, Jayaram & Prasad, en 2007 reportaron que al incrementar la concentración de KIN también se incrementó el número de brotes por explante, obteniendo mayor cantidad de brotes con 2 mg/l de KIN; sin embargo, Vilchez *et al* en el 2008 al adicionar 1 mg/l y 3 mg/l de BAP obtuvieron buenos resultados, produciendo 8,7 brotes por explante en promedio; consideraron la mejor concentración a 3 mg/l BAP por generar mayor proliferación de brotes.

No obstante, nuestros resultados fueron inferiores a los resultados de Gi – Won *et al*, en el 2002; quienes obtuvieron 33,50 brotes por explante aplicando 2,3 μ M de kinetina + MS/3, posiblemente se deba a la aplicación de carbón activado, debido a que Teng en 1999 en sus resultados reportó que al adicionar CA a los medios de cultivo se retrasó la tasa de regeneración de brotes. La proliferación de brotes estuvo influenciada en mayor proporción por las citoquininas ya que son las encargadas de la proliferación de brotes y diferenciación celular (Garate, 2010)

5.1.2. Número de hojas por explante

Las hojas son importantes debido a que concentran mayor cantidad de metabolitos secundarios como naftoquinonas, flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos. Los productos farmacéuticos que se comercializan en

los Estados Unidos se hacen a base de extractos de hojas de *Dionaea* por su actividad bacteriostática y antitumoral, también es muy efectivo contra las células cancerígenas (Philipp, 2010 y Banasiuk *et al*, 2012).

El tratamiento T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP) y T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP) destacaron con los mayores promedios de 74,2 y 73,3 hojas en promedio respectivamente, siendo 37% superior al testigo. Con el MS/2 se indujo mayor proliferación de hojas, efectos similares obtuvieron Ichiishi *et al* en 1999, quienes reportaron que a medida que se reduce la concentración nutricional y de sacarosa también influye en la reducción del número y tamaño de hojas, así como también en la coloración.

Del mismo modo la presencia de kinetina (1,0 mg/l y 2,0 mg/l) también favoreció el incremento del número de hojas, probablemente se deba a que esta fitohormona es primordial para la proliferación de brotes y hojas y por lo tanto se espera mayor contenido de plumbagina como lo manifiestan Crouch *et al*, citado por Banasiuk *et al*, 2012, que las plantas *in vitro* de Droseráceas demostraron poseer altos niveles de plumbagina (naftoquinona).

5.1.3. Tamaño promedio de los brotes

El T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP) superó sólo en 0,26 cm al testigo a los 120 días de cultivo; sin embargo, Katsuhiko *et al*, en el 2000 y Gi – Won *et al*, en el 2002; obtuvieron brotes de 2,85 cm de longitud en Droseráceas con el medio MS/2. Probablemente la diferencia de resultados se debe por los efectos secundarios que provoca kinetina y BAP, debido a que Curcovic & Berljak, en el 1996, en *Drosera sp*, Gi – Won *et al*, en el 2002 y Jayaram & Prasad, en el 2007 reportaron que la adición de altas concentraciones de Kinetina y BAP en los medios de cultivo, disminuyó la longitud de las hojas, se distorsionaron los peciolos y las trampas, también observaron pigmentación roja en las hojas de *Dionaea muscipula*; sin embargo, estas características fueron más pronunciadas cuando usó solo BAP. Por otro lado, Jejthar *et al*, en el 2014 utilizando 0,5 mg/l y 1 mg/l de kinetina obtuvieron plántulas con 4-5 mm de altura, estas plantas fueron

anormales y enanas en *Drosera intermedia*. No obstante, la presencia de kinetina es de suma importancia en el crecimiento de las plantas, debido a que existen reportes de ser menos inhibitoria a comparación de BAP (Gi – Won *et al*, 2002).

Una alternativa para incrementar la longitud de las hojas fue propuesta por Jayaram & Prasad, en el 2007, quienes transfirieron explantes con altos índices de diferenciación a un medio de MS de menor concentración de kinetina y BAP, las plantas de *D burmanii* de crecimiento retardado se recuperaron y comenzaron a crecer normalmente e incluso a desarrollar brotes y hojas. La variación de los factores abióticos (temperatura, humedad, fotoperiodo e iluminación) puede afectar en gran medida el crecimiento y desarrollo de plantas *D. intermedia* cultivadas *in vitro* (Jejthar *et al*, 2014)

5.1.4. Tasa de velocidad de la multiplicación (TVM)

La adición de 2,5 mg/l de BAP (bencil amino purina) al medio de multiplicación para *Dionaea muscipula* retardó la regeneración de brotes y hojas, el mismo efecto fue reportado por Hutchinson, 1984, Gi – Won *et al*, 2002 y Rejthar *et al*, 2014. El tratamiento T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP) tuvo el mayor índice de TVM (3,1 brotes/día) en comparación con testigo que tuvo 2,0 brotes/día, este resultado probablemente se debe a que la adición 1,0 mg/l de KIN aceleró el proceso de multiplicación (figura 10), estos resultados se asimilan a los datos obtenidos por Jayaram & Prasad, en el 2007 quienes trabajaron con *Drosera burmanii*.

Con el medio MS/2 se aceleró el proceso de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula* en una mínima proporción, efecto también reportado por Hutchinson en 1984 y Curcovic & Berljak, en 1996 en experimentos con *Drosera* y *Dionaea* quienes indicaron que el efecto de la reducción de la concentración de sales en el medio indujo al descenso del índice de la TVM.

5.1.5. Porcentaje de diferenciación

Con el tratamiento T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP) se obtuvo 100% de tejido diferenciado siendo similar al testigo; sin embargo, los tratamientos T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP) y T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP) también reportaron altos índices de tejido diferenciado siendo 95,8% de tejido diferenciado para ambos tratamientos. Evaluando independientemente los factores en estudio, se obtuvo diferencia estadísticas con la concentración nutricional del medio MS, siendo el medio MS/3 superior al MS/2 con 90,97% y 70,83% respectivamente de tejido diferenciado, este resultado indica que el medio MS/3 produce mayor índice de tejido diferenciado, mientras tanto con el medio MS/2 se redujo el porcentaje del mismo. La adición de BAP reduce la tasa de tejido diferenciado, un efecto similar obtuvieron Wawrosch *et al*, 2009 y Jayaram & Prasad, 2007 quienes dedujeron que con la adición de BAP se redujo la tasa de tejido diferenciado, adicionalmente Wawrosch *et al*, 2009 también afirman que la organogénesis y su respuesta al crecimiento es afectada por la alta o baja concentración de BAP; sin embargo, en otro de sus ensayos, donde utilizaron BAP en los medios de cultivo, los explantes se diferenciaron al 80 % pero no prosperaron, los brotes que se formaron se quedaron pequeños.

Sin embargo, la presencia de kinetina a 2,0 mg/l KIN incrementó el porcentaje la diferenciación del tejido de *Dionaea muscipula*, igual tendencia la obtuvo Hutchinson, en 1984; aplicando 2,15 mg/l de KIN obtuvo buenos resultados para esta variable, por otra parte, Jayaram & Prasad, 2007; obtuvieron 63 % de tejido diferenciado en *Drosera burmanii* adicionando 1 mg/l KIN; de igual manera Ichiishi *et al*, 1999 reporta que la hormona que mejor responde y aporta para la diferenciación de tejidos es la kinetina, adicionando 6 μ M de kinetina produjo un total de 100 % de tejido diferenciado en Droseráceas.

5.2. Tiempo que demora el explante para diferenciarse

En el T3 el 97% de los explantes se diferenció a los 53 días, el tratamiento T6 el 100 % de los explantes se diferenciaron a los 72 días siendo similar al testigo. El T3 estuvo compuesta por el medio MS/2+1,0mg/l, siendo esta concentración el que aceleró el proceso de diferenciación, efectos similares reportaron Jayaram & Prasad, en el 2007, obtuvieron mayor porcentaje de tejido diferenciado con el medio de cultivo MS/2 en 60 días; ellos reportan que esta respuesta se deba posiblemente al nitrato de potasio (KNO₃); por otro lado, Katsuhiko *et al*, en el 2000 mencionan que este macronutriente controla la organogénesis en el cultivo de tejidos de *Utricularia praelonga*.

Probablemente la kinetina también influenció en reducir el tiempo de diferenciación, como está reportado en el estudio de Wawrosch *et al*, en el 2009, obtuvieron buenos resultados al aplicar 10 µM KIN obteniendo 80% de tejido diferenciado en 60 días, mientras que al reducir la concentración de kinetina el tiempo de diferenciación se prolongó, esta tendencia también se observó en los resultados de Jayaram & Prasad, 2007 quienes obtuvieron 63 % de tejido diferenciado en 56 días utilizando 1 mg/l de KIN.

Los demás explantes en los otros tratamientos demoraron más tiempo en diferenciarse, como también murieron, la aplicación de 2,5 mg/l de BAP indujo a la mortalidad de los explantes en mínima proporción, efectos similares obtuvieron Ichiishi *et al*, en 1999 quienes reportaron en su ensayo que la adición de BAP produjo efectos negativos e incrementó la tasa de mortandad en cultivos *in vitro* de *Dionaea muscipula*, de la misma manera Wawrosch *et al*, en 2009, observó en cultivos *in vitro* de *Drosera rotundifolia*.

5.3. Oxidación

Durante la permanencia *in vitro* de *Dionaea muscipula* se observó el oscurecimiento del explante; esta reacción del explante probablemente se debió a la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies

químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al* y Bray *et al* citados por Azofeifa, 2009).

Los explantes de los tratamientos T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP), T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP), T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP), T12 (MS/3+2,0 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP), T5 (MS/2+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP), T4 (MS/3+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP) y T8 (MS/3+0,5 mg/l KIN+2,5 mg/l BAP) no presentaron oxidación. Al analizar independientemente los factores en estudio, la concentración nutricional MS/2 produjo mayor índice de oxidación reportándose con 11,45%, conforme se redujo la concentración nutricional (MS/3) también se redujo el índice de oxidación llegando a 5,55%. La presencia de kinetina a la concentración de 2,0 mg/l redujo el porcentaje de oxidación; la adición de 2,5mg/l de BAP reportó también índice de tejidos oxidados.

Por otro lado la adición de 4 g/l de carbón activado redujo la oxidación de los tejidos, efectos observados por Teng, en 1999 al cultivar Droseráceas en medio de cultivo sin carbón activado, obtuvo plantas que se tornaron oscuras y murieron dentro de un mes. Sin embargo, al añadir 2 g/l de carbón activado se redujo el índice de oxidación e influyó en la formación de brotes. El carbón activado absorbe sustancias fenólicas del ABA, etileno y azúcar que se pueden formar en el medio de cultivo durante el autoclavado (Cazuela, 1998).

5.4. Presencia de raíz

La presencia de raíces fue mayor con el medio MS/3, coincidiendo con el resultado obtenido por Jejthar *et al*, en el 2014, quienes reportaron que las bajas concentraciones de nutrientes del medio Murashige y Skoog fueron significativas para la presencia de raíces, los cuales fueron más largas y más delgadas en *Drosera intermedia*; sin embargo, Curcovic & Berljak en 1996 reportan que con el medio MS completo sin hormonas produjo raíces accidentalmente en *Drosera spatulata*.

La adición de 2,5 mg/l de BAP y 2,0 mg/l KIN tuvo efecto positivo en la formación de las raíces; del mismo modo Jejthar *et al*, 2014; obtuvieron resultados similares al incluir 3 mg/l BAP en el medio de multiplicación para *Drosera intermedia*; también Jayaram & Prasad, 2007; reportaron que la adición de concentraciones mayores a 1,0 mg/ de kinetina y 0,5 mg/l de BAP, se formaron raíces gruesas, no ramificadas y con pelos radiculares muy densos.

CONCLUSIONES

1. Las citoquininas y la concentración nutricional modificada del medio MS (Murashige & Skoog) puestos en prueba influyeron significativamente en el incremento de la tasa de multiplicación de *Dionaea muscipula* Ellis a través de la organogénesis directa a partir de hojas de plantas cultivadas *in vitro*.
2. La adición 1,0 mg/l y 2,0mg/l de kinetina incrementaron la tasa de multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*, también la adición de BAP benefició el incremento del número de brotes y hojas por explante.
3. El medio MS/2 (Murashige & Skoog de concentración media) resultó ser mejor para incrementar el número de brotes, hojas por explante; sin embargo el medio MS/3 (Murashige & Skoog de concentración a la tercera parte) promovió mayor diferenciación del explante de *Dionaea muscipula*
4. Las concentraciones nutricionales del medio MS no influyeron para reducir el tiempo de diferenciación del explante, sin embargo la concentraciones de kinetina tuvieron efecto positivo para reducir el tiempo de diferenciación del explante, el efecto de BAP fue negativo para esta variable.
5. Las citoquininas y las concentraciones nutricionales modificadas del medio MS tuvieron efecto sobre la presencia de raíces en plántulas *in vitro* de *Dionaea muscipula*; siendo el medio MS/3; 2,5 mg/l de BAP y todas las concentraciones de KIN las que influyeron para obtener mayor número de raíces.
6. El medio MS/3 redujo el índice de oxidación, las citoquininas influyeron sobre la oxidación del tejido, es decir la ausencia de BAP indujo a incrementar el índice de oxidación; sin embargo, con la adición de 2,5

mg/l de BAP se presenciaron índices de oxidación, por otro lado, la adición de 1,0 mg/l y 2,0 mg/l de KIN redujeron los índices de oxidación.

7. La adición de 2,5 mg/l de BAP retarda el crecimiento de las plantas, induce a la oxidación mínima de los explantes e incluso produce la mortandad de los explantes y retarda la diferenciación de los explantes.
8. Ambas concentraciones del medio MS inducen en la organogénesis directa de *Dionaea muscipula*, pero el medio MS/2 responde mejor produciendo mayor índice de brotes desarrollados y hojas vigorosas.
9. Con la adición de 2,0 mg/l de kinetina y con la concentración MS/2 se obtuvieron altos índices de diferenciación en menor tiempo, siendo beneficiosas para reducir el tiempo de producción *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

RECOMENDACIONES

Para la propagación masiva *in vitro* de *Dionaea muscipula*, se recomienda utilizar al T6 (MS/3+2,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP), T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP) y T11 (MS/2+2,0mg/l KIN+2,5mg/l BAP) para obtener altos índices de multiplicación *in vitro*.

Realizar el análisis fitoquímico de las plantas obtenidas para determinar la cantidad de metabolitos secundarios se encuentra disponibles en *Dionaea muscipula*.

Con la finalidad de abaratar costos, incrementar la producción de hojas de *Dionaea muscipula in vitro* y producir en menor tiempo, se recomienda el T3 (MS/2+1,0 mg/l KIN+0,0 mg/l BAP), debido a que respondió mejor y posee menor cantidad de hormonas en su composición.

El medio Murashige y Skoog de concentración media (MS/2), es el adecuado para la producción *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

Probar menores concentraciones de BAP para reducir el efecto negativo que se presentó en el durante la multiplicación *in vitro* de *Dionaea muscipula*.

VI. LITERATURA CITADA

- Afanador, AM. 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemas de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. Bogotá: Colombia. 140 p.
- Aguirre, VG, Baudoin, JP y Arnéz, L. 2010. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Bolivia: Cochabamba. 198 p.
- Anchor JE. 2014. Stealing Venus Flytrap plants now a felony (on line). Visitado 4 jun 2016. 8 p. Disponible en: <http://www.wect.com/story/26320766/stealing-venus-flytrap-plants-now-a-felony>
- Azofeifa Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana. Costa Rica: San Jose. 24 p.
- Badillo, JA, Oliver, SM, Moreno, KG, Pacheco, GV y Cortes, AH. 2009. Manual del laboratorio de cultivo de tejidos. México 146p.
- Banasiuk, R, Kawiak, A y Krolicka, A. 2012. *In vitro* cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. 2v. Journal of biotechnology, computational biology and bionanotechnology. 10 p.
- Bermejo, CM. 2010. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* para la obtención de curcuma. Morelos: Zaragoza. S.p.
- Bold system. 2016. *Dionaea muscipula* (on line). Visitado 8 jul 2016. Disponible en: https://www.amazon.it/Semi-Carnivora-Acchiappamosche-spettacolare-Coltivazione/dp/B017Y5BIGI/ref=sr_1_2?s=garden&ie=UTF8&qid=1467906804&sr=1-2&keywords=venus+flytrap

- Cahuinadencul. 2006. Manual cultivo de *Dionaea muscipula*. 3ed. 6p.
- Candela, M. 2008. Bases fisiológicas y moleculares en la micropropagación de familias de *Pinus pinea* L. tesis doctoral. Universidad de Oviedo. S p.
- Carnivorous plant photofinder. 2009. On line. Visitado 10 jul 2016. Disponible en: <http://cpphotofinder.com/dionaea-muscipula-2.html>
- Cazuela J & van Staden J. 1998. El uso de carbón de leña en en cultura *vitro*. 7 pag
- Cedeño, EM. 2015. Micropropagación de banano orito (*Musa acuminata* AA) a partir de meristemos florales [revista on - line]. Daule: Ecuador [acceso 13 de ene. 2016]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/re dug/8148/1/TESIS%20DE%20E MILIO%20CEDE%20C3%91O%2001.pdf>.
- Cubero, JI. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2 ed. Mundi-prensa. Madrid. 567p.
- Curkovic P y Berljak J. 1996. *In Vitro* Growth and Regeneration of *Drosera spatulata* Labill. on Various Media. Hortis Cience. Planinska: Zagreb. 2 p.
- Cutz, AJ. 2004. Micropropagación de tres variedades de arándano (*Vaccinium ashei* Readef). Guatemala. 300 p.
- Del Campo F, Sanz SA y Hernández LE. 2007. Módulo De Cultivo In Vitro. Universidad Autónoma de Madrid. Laboratorio Avanzado De Fisiología Vegetal. 14 p.

- Dubos, RG. 2006. Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Chile: Valdivia. 97 p.
- Gi-Won Jang, Kwang-Soo Kim y Ro-Dong Park. 2002. Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. Institute of Agricultural Science and Technology. Korea. 4 p.
- Gárate, MH. 2010. Técnicas de propagación por estacas. Tesis pregrado. Perú : Ucayali . 189 p.
- García, F. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 650p.
- Hutchinson, JF. 1984. *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus Fly Trap). Scientia Hortic.194 p.
- Ibáñez, MR .2013. Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. (on – line). Tesis Doctoral. Universidad de València. (consultado 12 feb. 2016). 125 p. Disponible en: file:///C:/Users/Toshiba/Downloads/tesis_visual13.pdf
- Ichiishi S, Nagamitsu T, Kondo Y, Iwashina T, Kondo K Y Tagashira N. 1999. Effects of Macro- Components and Sucrose in the Medium on in vitro Red- color Pigmentation in *Dionaea muscipula* Ellis and *Drosera spatulata* Labill. Plant Bio- technology Section, Japon. 5 p.
- Internacional Carnivorous Plant Society. 2016. On line. Visitado 20 jul. Disponible en: <http://www.carnivorousplants.org/cp/WhatAreCPs.php>
- Jácome, AS. 2011. Micropropagación *in vitro* de la especie endémica Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de

esta especie en peligro de extinción. Tesis pregrado. Sangolquí: Escuela politécnica del ejército .107p

Jayaram K y Prasad V. 2007. Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera burmanii* Vahl: A vulnerable and medicinally important insectivorous plant. India: Hyderabad. 6 p.

Katsuhiko Kondo, Yoshikazu Hoshi, Sayuri Ichiishi, Tsukasa Iwashina, Hiroshi Kajita, Yusuke Kondo, Toshiharu Nagamitsu y Norikazu Tagashira. 2000. Finding and Visualizing Some Unknown Natural Phenomena in Carnivorous Plants by Tissue Culture. Japón. 4 p.

Leal, C. 2003. Organogénesis *in vitro* a partir de discos de hoja de *Passiflora mollissima* HBK Bailey (curuba) infectados con *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis pregrado. Bogotá. 119 p.

Mafla, GB, Roa, JC. Aranzales, ER y Debouck, DG. 2006. Manual de procedimientos para la conservación *in vitro* del germoplasma del género *Manihot*. Chile. 51p.

Minerva, MV. 2013. Conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento y estabilidad genética de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum kitam*). Tesis magister. Mc. Chapingo: México 56 p.

Molina, J. 2012. Evaluación de cinco medios de cultivo (*Phytamax*, *Murashige Skoog*, *Knudson*, *Lindemann* y *Casero*) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Compartmentia speciosa Rchb.f.* Tesis pregrado. 171 p.

National wildlife federation. 2015. Venus flytrap (on line). Visited 4 jul 2016. Disponible en: <https://www.nwf.org/Wildlife/Wildlife-Library/Plants/Venus-Flytrap.aspx>

Philipp. 2010. *Dionaea muscipula*. Disponible (on – line). (Visitado 20 ene 2016). Disponible en

http://www.daepc.org/portal/kb.php?mode=article&k=16&page_num=1&start=0&print=true.

Rangel, OJ. 2014. Establecimiento de cultivos *in vitro* de albahaca (*Ocimum basilicum*) para la producción de aceite esencial. Toluca: México 99 p.

Rejthar J, Viehmannova I, Hlasna C, Fernández E y Milella L. 2014. *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* as influenced by cytokinins, pH, sucrose, and nutrient concentration. Faculty of tropical AgriSciences Culs. Italia. 7p.

Rey, AE. 2012. Generalidades del cultivo *in vitro*. (on - line) (Visitado 22 mar 2016) *Disponible en* <http://es.slideshare.net/pancharas59/generalidades-de-cultivos-in-vitro>.

Roca y Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali: Colombia. 953p.

Rodríguez, de la O, Martínez Ruiz, Azpiroz Rivero, Cetina Alcalá, Gutierrez Espinosa, Raudel Sañudo, Felix Herrán, Ruelas Ayala, Hernandez Lopez, Rojo Martinez, Bernal Lugo, Yohosca Osorno, Sanchez Teyller, Gutierrez Contreras, Lara Chavez, Lopez Medina, Dagoberto Armenta, Rodriguez Quiroz, Olalde Portugal, Apodaca Sanchez y Jasso Mata. 2010. Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales. Universidad autónoma Chapingo: México. 304 p.

Rojas, G, García J, Alarcón M. 2004. Propagación asexual de plantas. (on line). Bogotá: Colombia. 52p. (visitado 13 mayo 2016) Disponible en: <https://ecojardines.files.wordpress.com/2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf>.

Springer, V. 1999. Source, etiolation and orientation of explants affect *in vitro* regeneration of Venus fly-trap (*Dionaea muscipula*). Hong Kong Institute of Biotechnology Ltd., 6 p.

- Teng WL.1998. Source, etiolation and orientation of explants affect *in vitro* regeneration of Venus fly-trap (*Dionaea muscipula*). Springer-Verlag. 6 p.
- The International Carnivorous Plant Society. 2008. On line. Visitado 5 abr 2016. Disponible en: <http://sarracenia.com/faq/faq7000.html>
- Venus atrapamosca. 2008. On line. Visitado 15 mayo 2016. Disponible en: <http://dionaeamuscipula-venus.blogspot.pe/>
- Vidales, I. 2002. Efectos de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Will). Tesis doctorado. Tecoman: México. 170 p.
- Villalobos, RM. 2007. Establecimiento *in vitro* de explantes de maguey mexcalero (*Agave angustifolia* Haw). Obregón. Sonora. 76 p.
- Vilchez J, Rivas Y, Albany N, Molina, M. y Martínez, L. 2008. Effect of the N6-benzylaminopurine on *in vitro* multiplication of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). (on line) República Bolivariana: Venezuela. 11p. (visitado 1 mar 2016). Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182009000200005&script=sci_arttext.
- Vilchez, JA, Nilca, R, Albany, V, Orlek, F y Garcia-Aguila L. 2006. Cultivo de células y tejidos: Multiplicación de atrapamoscas de venus. VII Simposio Internacional Biotecnología Vegetal 6v. Abril - junio, 2006. República Bolivariana de Venezuela. S.p.
- Wawrosch, Benda Eva, Kopp Brigitte. 2009. An Improved 2-step Liquid Culture System for Efficient In Vitro Shoot Proliferation of Sundew (*Drosera rotundifolia* L.). Sci Pharm. Vienna, Austria. 9 p.
- Wikipedia. 2006. Venus flytrap (En line). Consultado 7 abr 2016.Sp. Disponible en https://en.wikipedia.org/wiki/Venus_flytrap

Wuu y Lyon F. 2005. *Dionaea Muscipula*: Investigación desafíos de la Ingeniería Biomimesis. S.p

ANEXO

ANEXO 1: Características botánicas de *Dionaea muscipula* **a)** Imagen del brotamiento de *Dionaea muscipula* a través de su semilla botánica **b)** opresorios de *Dionaea muscipula*, **c)** Flores de *Dionaea muscipula*, **d)** planta completa de venus atrapamosca **e)** Gineceo de *Dionaea muscipula* **f)** Androceo de *Dionaea muscipula* **g)** Flor de *Dionaea muscipula*.

Fuente: International Carnivorous Plant Society (2013), Ellison y Gotelli, (2009), Carnivorous plant photofinder (2009)



a)



b)



c)



d)



e)



f)



ANEXO 2: Sales que componen el medio MS



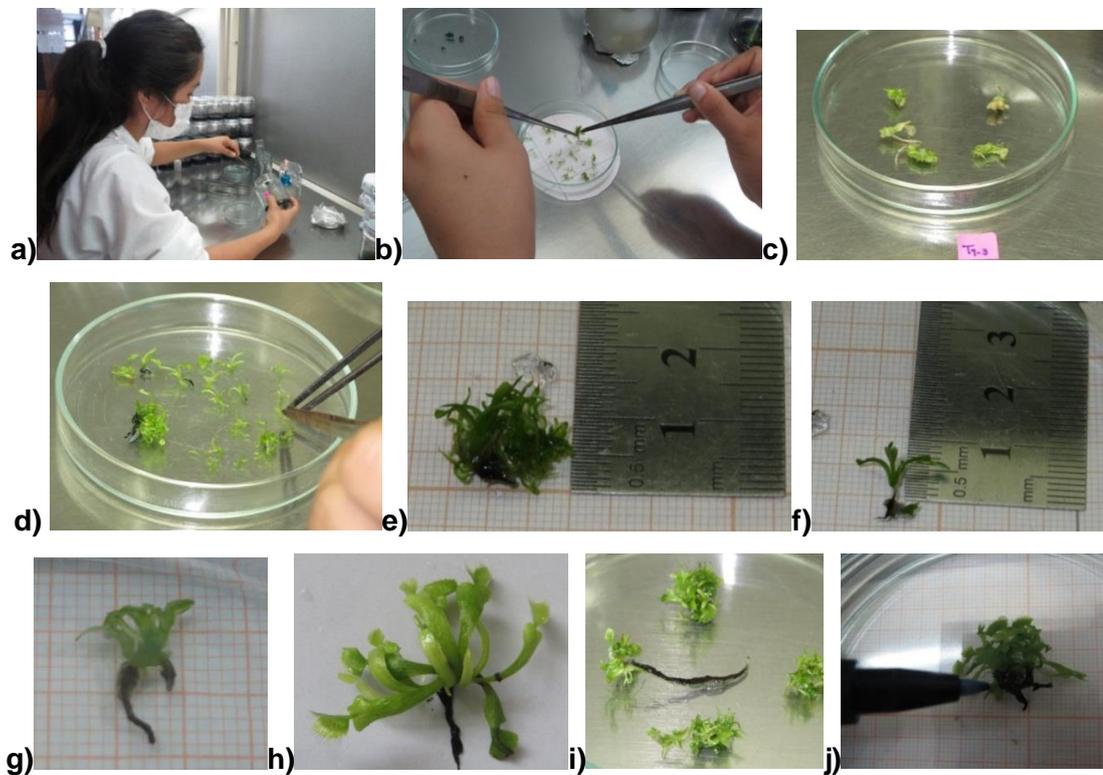
ANEXO 3: Preparación del medio MS (Murashige and Skoog) **a)** Pesado de las sales **b)** Dilución de las soluciones nutritivas y carbohidratos **c)** Adición de las citoquininas **d)** Adición del agar y carbón activado **e)** Licuación del agar **f)** Trasvasado del medio



ANEXO 4: Siembra *in vitro* de *Dionaea muscipula*. **a)** Flameo de materiales **b)** separación de hojas del rizoma **c)** y **d)** colocación de los explantes dentro del medio de cultivo **e)** introducción de los seis explantes dentro del medio.



ANEXO 5: Metodología de evaluación **a)** Evaluación de cada unidad experimental, **b)** y **c)** separación de los brotes **d)** conteo de hojas **e), f)** y **g)** medición de la altura del brote y planta **i)** y **j)** presencia de raíz



ANEXO 6: Zonas de regeneración de brotes del explante

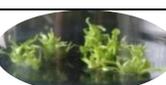


ANEXO 7: Presencia de oxidación en los explantes**ANEXO 8:** Componentes del medio Murashige y Skoog completo (1X)

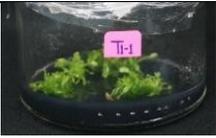
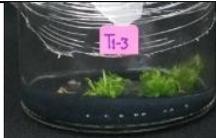
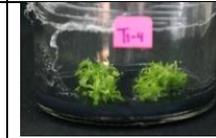
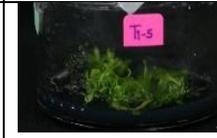
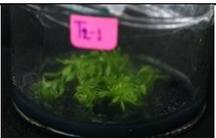
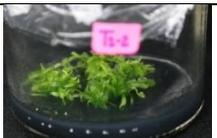
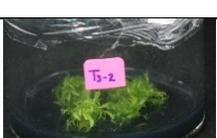
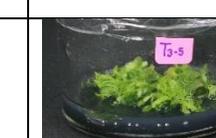
Sales de macronutrientes	(mg·L⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Sales de micronutrientes	(mg·L⁻¹)
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ ·EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
vitaminas	mg·L⁻¹
Ácido nicotínico	5
Tiamina	5
Piridoxina	1
Glicina	1
Myo-inositol	1 g/l
Sacarosa	30 g/l

Fuente: Del Campo *et al* (2007)

ANEXO 9: Respuesta de los explantes durante los 72 días de evaluación

TRATAMIENTOS	29 días	35 días	46 días	53 días	72 días
T1					
T2					
T3					
T4					
T5					
T6					
T7					
T8					
T9					
T10					
T11					
T12					

ANEXO 10: Respuesta de las unidades experimentales después de 120 días de la siembra *in vitro* de *Dionaea muscipula*

TRATAMIENTOS	R1	R2	R3	R4	R5	R6
T1						
T2						
T3						
T4						
T5		