



**Universidad
Europea VALENCIA**

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

Curso 2024-2025

**Cultivo *in vitro*, micropropagación y
transformación genética de la planta
carnívora *Darlingtonia californica***

Autor

Rubén Estellés Giménez

Tutor interno

Dr. Fernando Martínez Montañés

Tutor externo

Dr. Alejandro Atarés Huerta

Cotutor externo

Alberto Coronado Martín

Valencia, 2025

**Cultivo *in vitro*, micropropagación y
transformación genética de la planta
carnívora *Darlingtonia californica***

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Rubén Estellés Giménez

Tutor interno:

Dr. Fernando Martínez Montañés

Tutor externo:

Dr. Alejandro Atarés Huerta

Cotutor externo:

Alberto Coronado Martín

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2024-2025

Dedicatoria:

Este trabajo ha sido una montaña rusa de emociones. Mucho trabajo, mucha paciencia y mucho crecimiento personal. Llegué al laboratorio 0.07 con miedo, incertidumbre y muchos nervios, enfrentándome yo solo a los retos que viniesen. Este laboratorio me acogió como uno más. Agradecer mil veces a Alejandro Atarés por adoptarme y darme la oportunidad de poder formarme en su laboratorio, lugar donde he conocido gente genial.

Como no, agradecer a mi mentor, la persona que ha estado ahí desde el minuto 0, la que me ha introducido en el mundo de las plantas carnívoras y a la que he sacado de quicio mínimo dos veces por semana. Gracias Alberto por tu paciencia, por tus ganas de enseñar y de formarme. He crecido en este laboratorio gracias a tu implicación e insistencia, algo de lo que siempre estaré agradecido.

Gracias, mamá y papá por apoyarme a lo largo de toda la carrera. El poder estudiar lo que siempre me ha encantado ha sido una oportunidad que solo vosotros habéis podido hacer posible.

A Nico, esa persona que me ha acompañado día y noche en mis aventuras, en mis sufrimientos, en mis alegrías. Gracias por estar siempre ahí cuando algo no salía bien, cuando había incertidumbre; animándome a seguir siempre adelante. También agradecerte por escuchar mis movidas científicas, aún no entendieses nada, y pese a esto, siempre has intentado entenderme, comprenderme y aprender de aquello que tenía que contar.

A mis amigas de la Universidad, sobre todo a María y Blanca, compañeras con las que he compartido 4 años de carrera intensos. Risas, lloros, mucho estrés. Pero sobre todo amistad, compañerismo, apoyo y mucho aprendizaje. Gracias por haber hecho que la Universidad sea mucho más amena, entretenida y un lugar más divertido.

Y finalmente agradecerme a mí mismo. Por crecer, por aprender, por ir detrás de aquello que me encanta. Por perseverar en los momentos difíciles y nunca darle la espalda al aprendizaje y a la autocrítica. Por todo esto me enorgullece, el haber aportado mi granito de arena a la ciencia.

Índice de contenidos

Índice de figuras	III
Índice de tablas.....	IV
Lista de símbolos y siglas.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
1. Introducción.....	1
1.1. Plantas Carnívoras, orígenes, filogenia y evolución.....	1
1.2. Clasificación según la naturaleza de las trampas.....	2
1.2.1. Trampas Pasivas.....	3
1.2.2. Trampas Semiactivas.....	4
1.2.3. Trampas Activas.....	4
1.3. Interés farmacéutico y biotecnológico.....	4
1.4. Cultivo <i>in vitro</i>	5
1.4.1. Micropropagación.....	5
1.4.2. Transformación genética.....	6
1.5. <i>Darlingtonia californica</i> , la planta cobra.....	7
2. Hipótesis.....	9
3. Objetivos.....	10
4. Materiales y Métodos.....	11
4.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	11
4.2. Preparación y esterilización de medios de cultivo.....	11
4.3. Implantación de material y establecimiento del cultivo.....	11
4.4. Propagación clonal de <i>Darlingtonia californica</i>	12
4.4.1. Inducción de la brotación axilar.....	12
4.5. Regeneración adventicia.....	13
4.5.1. Regeneración de explantes de hoja en presencia de zeatina.....	13
4.5.2. Evaluación de la resistencia a la kanamicina.....	13
4.5.3. Determinación de la ploidía de propágulos regenerados.....	13

4.6. Transformación genética de <i>Darlingtonia californica</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
4.6.1. Cepa, plásmido y genes empleados.....	14
4.6.2 Inoculación, selección y regeneración de plantas transgénicas.....	14
4.7. Aclimatación ex vivo.....	14
5. Resultados y discusión.....	16
5.1. Implantación de material y establecimiento del cultivo.....	16
5.2. Propagación clonal de <i>Darlingtonia californica</i>	17
5.2.1. Inducción de la brotación axilar.....	17
5.3. Regeneración adventicia.....	18
5.3.1 Regeneración de explantes de hoja.....	18
5.3.2. Evaluación de la resistencia a la kanamicina.....	19
5.4. Transformación genética de <i>Darlingtonia californica</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
5.5. Aclimatación ex vivo.....	22
6. Conclusión.....	24
7. Bibliografía.....	25

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la distribución de los géneros de plantas carnívoras en el árbol filogenético de las angiospermas. En verde las familias con todos sus géneros de plantas carnívoras. En amarillo y azul las familias con géneros de plantas carnívoras y no carnívoras. Fuente: Ellison & Gotelli, 2009.....	2
Figura 2. Clasificación de las plantas carnívoras según la naturaleza de sus trampas. Fuente: Blondeau,G (2020).	3
Figura 3. Morfología de diferentes especies de plantas jarrón de la familia <i>Sarraceniaceae</i> : A) <i>Sarracenia leucophylla</i> B) <i>Heliamphora heterodoxa x nutans</i> C) <i>Darlingtonia californica</i> D) <i>Sarracenia purpurea</i> E) <i>Sarracenia psittacina</i> F) <i>Nepenthes x ventrata</i> . Fuente: Blondeau,G (2020).	3
Figura 4. Morfología de las flores de <i>D. californica</i> , con sus pétalos colgantes característicos (izquierda). Estructura de la hoja en forma de trampa tubular (derecha). Fuente: Ellison & Farnsworth, 2005.....	7
Figura 5. Flujo de trabajo a desarrollar para conseguir la micropropagación de <i>D. californica</i> . Elaboración propia.....	10
Figura 6. Flujo de trabajo para conseguir la transformación genética de <i>D. californica</i> . Elaboración propia	10
Figura 7. Brotes con distintos niveles de respuesta a la zeatina tras 2 meses de cultivo. La barra representa 1cm. Elaboración propia	12
Figura 8. Componentes y estructura del plásmido pk2GW7-eGFP. Elaboración propia.....	14
Figura 9. Implantación <i>in vitro</i> de <i>D. californica</i> . A) Desarrollo de plántulas a partir de semillas cultivadas en MB3/3. B) Vitroplanta procedente de semilla. C) De izquierda a derecha, raíces típicas de <i>D. californica</i> con un estolón en formación, fragmento de estolón previo a la desinfección, fragmento de estolón posterior a la desinfección, brotes regenerando a partir de un estolón en diversas fases de su crecimiento durante su implantación y desarrollo de estolón <i>in vitro</i> . Las barras representan 1 cm excepto la de la imagen de las semillas que representa 1 mm Elaboración propia	16
Figura 10. Brotación axilar de <i>D. californica</i> . A) Efecto de la zeatina sobre brotes tras dos meses de cultivo. B) Representación del porcentaje de explantes con diferentes índices de respuesta a la zeatina. C) Corte transversal de un brote con índice 2. La barra representa 1 cm. Elaboración propia	17
Figura 11. Regeneración adventicia en <i>D. californica</i> . A) Regeneración a partir de una raíz. B) Efecto de distintas concentraciones de zeatina sobre la regeneración a partir de explantes de hoja. C) Explantes de hoja con eventos de regeneración en diferentes estadios. D) Efecto de distintas concentraciones de kanamicina sobre la regeneración de explantes de hoja y representación del porcentaje de explantes con regeneración en cada condición. La barra representa 1 cm. Elaboración propia	20
Figura 12. Transformación genética de <i>D. californica</i> . A) Explantes de hoja en medios sin presión selectiva (izquierda) y con presión selectiva (derecha) y detalles de un explante visualizado en tres condiciones distintas: BF -campo claro, no se ve la GFP-, GFP LP -permite ver la clorofila en rojo y GFP en verde- y ET GFP –permite ver la GFP verde-. La barra representa 1 cm. B) Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> . Izquierda no presenta ninguna región con expresión	

GFP, centro y derecha se aprecia parte del callo con expresión GFP. La barra representa 0.5 cm. Elaboración propia21

Figura 13. A) Explante proveniente de cultivo *in vitro*, trasplantado y tapado con un vaso para mantener la humedad. A la derecha, plántulas de *D. californica* 60 días después, desarrolladas en fibra de coco (izquierda) y *Sphagnum* (derecha). La barra representa 1cm B) Desarrollo de un explante, desde sus primeros estadios en *Sphagnum*, hasta su desarrollo en plantas adultas. La barra representa 1cm. Elaboración propia23

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio MB3/3. Elaboración propia12

Lista de símbolos y siglas

CPS: Con presión selectiva

DAPI: 4,6-diaminofenilindol

EtOH: Etanol

GFP: *Green fluorescent protein*

IAA: Ácido indolacético

IBA: Ácido indolbutírico

IBMCP: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

MB3/3: Medio basal MB3 diluido a la tercera parte

MES: 2-(N-morfolino) etanosulfónico

PPM: *Plant preservative mixture*

SPS: Sin presión selectiva

THCl: Tiamina Clorhidrato (Vitamina B1)

Z: Zeatina

Título: Cultivo *in vitro*, micropropagación y transformación genética de la planta carnívora *Darlingtonia californica*

Resumen: Las plantas carnívoras son organismos vegetales que han fascinado al ser humano desde la antigüedad. Tienen la capacidad de atraer, capturar y digerir toda clase de animales. También producen una amplia gama de compuestos medicinales que pueden usarse en el sector de la farmacología. Además, poseen un enorme valor ornamental, despertando un gran interés en coleccionistas y aficionados a la jardinería. Sin embargo, debido a todas estas características que las hacen únicas, su popularidad ha generado una creciente presión sobre las poblaciones silvestres y junto con la influencia del cambio climático, se ha llegado a una situación donde ciertas especies están en peligro de extinción. En el presente trabajo se aborda la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* a la planta carnívora *Darlingtonia californica*. Técnicas como la micropropagación serían una alternativa a los métodos de multiplicación tradicionales. En cuanto a la mejora genética, la técnica de transformación genética permitiría la introducción de una nueva característica mediante la transferencia de uno o pocos genes. En este proyecto se han formulado medios para la propagación clonal de esta especie mediante el cultivo de explantes con meristemas preexistentes. También se ha abordado la regeneración adventicia mediante el cultivo de explantes de hoja. Esta metodología ha servido de base para desarrollar, por primera vez para esta especie, un protocolo que nos permita la transformación genética mediante el cocultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens*. Para ello se ha empleado una construcción que portaba el gen NPTII, un gen marcador que confiere resistencia a la kanamicina, y el gen GFP, un gen delator que produce una proteína fluorescente fácilmente visualizable en el tejido donde está presente. Esto permitió seleccionar aquellos explantes que habían introducido en su genoma el gen de resistencia y se observó fluorescencia en algunos callos, fase inicial en la obtención de plantas transgénicas. En la fase final, se puso a punto un método de aclimatación, la transición entre el cultivo *in vitro* y el cultivo *ex vitro*, en el que se probaron varios sustratos. Por último, se ha analizado la incidencia de la variación somaclonal en las vitroplantas obtenidas mediante una evaluación fenotípica de las plantas aclimatadas y una evaluación genética mediante citometría de flujo. En ningún caso se han detectado plantas diferentes al material de partida. En definitiva, durante este trabajo se han puesto a punto nuevas metodología para la multiplicación y mejora genética de *Darlingtonia californica* basadas en técnicas de cultivo *in vitro*.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, micropropagación, *Darlingtonia californica*, regeneración adventicia, callo organogénico, transformación genética.

Title: *In vitro* cultivation, micropropagation, and genetic transformation of the carnivorous plant *Darlingtonia californica*.

Abstract: Carnivorous plants are organisms that have fascinated humans since ancient times. They have the ability to attract, capture, and digest all kinds of animals. They also produce a wide range of medicinal compounds that can be used in the pharmacological sector. In addition, they possess enormous ornamental value, arousing great interest among collectors and gardening enthusiasts. However, due to all these characteristics that make them unique, their popularity has generated increasing pressure on wild populations and, together with the influence of climate change, has led to a situation where certain species are in danger of extinction. This work addresses the application of *in vitro* cultivation techniques to the carnivorous plant *Darlingtonia californica*. Techniques such as micropropagation would be an alternative to traditional multiplication methods. Regarding genetic improvement, the genetic transformation technique would allow the introduction of a new trait through the transfer of one or a few genes. In this project, culture media have been formulated for the clonal propagation of this species through the cultivation of explants with preexisting meristems. Adventitious regeneration through the cultivation of leaf explants has also been addressed. This methodology has served as the basis to develop, for the first time for this species, a protocol that allows us to achieve genetic transformation through the cocultivation of primary explants with *Agrobacterium tumefaciens*. For this, a construct carrying the NPTII gene, a marker gene that confers resistance to kanamycin, and the GFP gene, a reporter gene that produces a fluorescent protein easily visualized in the tissue where it is present, was used. This allowed the selection of those explants that had introduced the resistance gene into their genome, and fluorescence was observed in some calluses, the initial phase in the production of transgenic plants. In the final phase, an acclimatization method was developed, the transition between *in vitro* and *ex vitro* cultivation, in which various substrates were tested. Finally, the incidence of somaclonal variation in the *vitro*plants obtained was analyzed through a phenotypic evaluation of the acclimatized plants and a genetic evaluation using flow cytometry. In no case were plants different from the original material detected. In short, during this work new methodologies have been developed for the multiplication and genetic improvement of *Darlingtonia californica* based on *in vitro* cultivation techniques.

Keywords: *In vitro* cultivation, micropropagation, *Darlingtonia californica*, adventitious regeneration, organogenic callus, genetic transformation.

1.Introducción

1.1. Plantas carnívoras, orígenes, filogenia y evolución

Las plantas son la base de las redes tróficas que se establecen entre los animales en nuestro planeta. Son algunos de los organismos más relevantes en nuestra cultura y no sólo forman parte de nuestra alimentación. También tienen propiedades medicinales, son aliadas para el desarrollo de nuevos materiales o nos atraen por sus características ornamentales. En este contexto, las plantas carnívoras han cautivado a los científicos desde hace siglos por una habilidad que hasta ese momento era desconocida, su capacidad de atrapar y digerir pequeños animales, cambiando la dirección en las cadenas tróficas.

Fue Charles Darwin en 1875 en su obra “Insectivorous Plants” quien acuñó por primera vez el término plantas insectívoras y en la que describió al detalle cómo ciertas plantas habían desarrollado mecanismos especializados para atraer, capturar y digerir insectos adaptándose a entornos hostiles y pobres en nutrientes (Charles Darwin A & Appleton, n.d.). Muchos científicos se han interesado desde entonces en estas plantas y se ha descubierto que no sólo capturan insectos, sino también anfibios y hasta pequeños mamíferos. También se han establecido relaciones mutualistas entre estas plantas y otros animales en los que las plantas les suministran alimento y protección a cambio de sus excrementos, que les proporcionan una fuente de nitrógeno asimilable.

Las plantas carnívoras atraen, contienen, matan y digieren animales posibilitando la absorción de sus nutrientes. El hecho de que estas plantas hayan evolucionado hacia el carnivorismo es un mecanismo más de adaptación a terrenos deficientes en nutrientes como nitrógeno, ecosistemas con mucha humedad como pantanos, turberas y zonas tropicales, y gran abundancia de luz (Givnish, Sparks, & Hunter, 2017).

En el siglo XX, en la década de los 80, muchos científicos postulaban la hipótesis de que las plantas carnívoras provenían de un mismo ancestro común, de que eran monofiléticas. Nuevos análisis filogenéticos permitieron afirmar que las plantas carnívoras tienen 6 orígenes evolutivos distintos (Figura.1). Pertenecen a cuatro de las principales categorías de angiospermas: Monocotiledóneas, Rósidas, Astéridas y Eudicotiledóneas básicas y se encuentran repartidas en cinco grupos taxonómicos: *Poales*, *Caryophyllales*, *Oxalidales*, *Ericales* y *Lamiales* (Ellison & Gotelli, 2009). La mayor representación se encuentra en los órdenes *Caryophyllales* y *Lamiales* con un 95% de las más de 600 especies de plantas carnívoras descubiertas (Ellison & Gotelli, 2009).

Las plantas de cada clado tienen su forma de capturar presas. Según investigaciones, Müller lanzó una hipótesis que defendía que aquellas plantas cuyo genoma evolucionaba más rápidamente como algunas de las de la familia *Lentibulariaceae* (*Utricularia* o *Pinguicula*), tenían mayor tasa de captura de presas que aquellas en las que su genoma evolucionaba con una tasa de evolución más lenta (Müller et al. (2004). La hipótesis también relacionó factores como el desarrollo de trampas más sofisticadas, la especialización por parte de la planta carnívora de atraer una sola especie de presa o un enfoque en el tamaño de la presa, con el aumento de la frecuencia de captura de la presa.

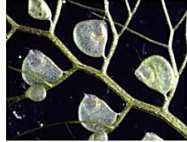
Activas	Semiactivas	Pasivas
 <i>Dionaea muscipula</i>  <i>Drosera burmannii</i>  <i>Utricularia sp.</i>	 <i>Pinguicula gigantea</i>  <i>Drosera capensis</i>	<i>Darlingtonia californica</i>   <i>Cephalotus follicularis</i>  <i>Nepenthes "Miranda"</i>

Figura 2. Clasificación de las plantas carnívoras según la naturaleza de sus trampas. Fuente: Blondeau,G (2020).

1.2.1. Trampas Pasivas

Las trampas pasivas capturan a su presa sin movimiento. Su secreción enzimática es constante, aunque aumenta cuando se detecta a la presa. Cuanto mayor sea el tamaño de la presa mayor será la cantidad de enzimas secretadas. Este proceso está regulado por un mecanismo de señales que ajusta la relación costo-beneficio de la planta (Gallie & Chang, 1997). Las trampas pasivas incluyen varios tipos: trampas de caída como *Darlingtonia*, *Nepenthes* y *Cephalotus*. Depósitos de agua como *Brocchinia* y *Catopsis*, vesículas como las presentes en *Genlisea* y trampas pegajosas como *Pinguicula*, *Byblis* y *Drosera* (Figura. 3).

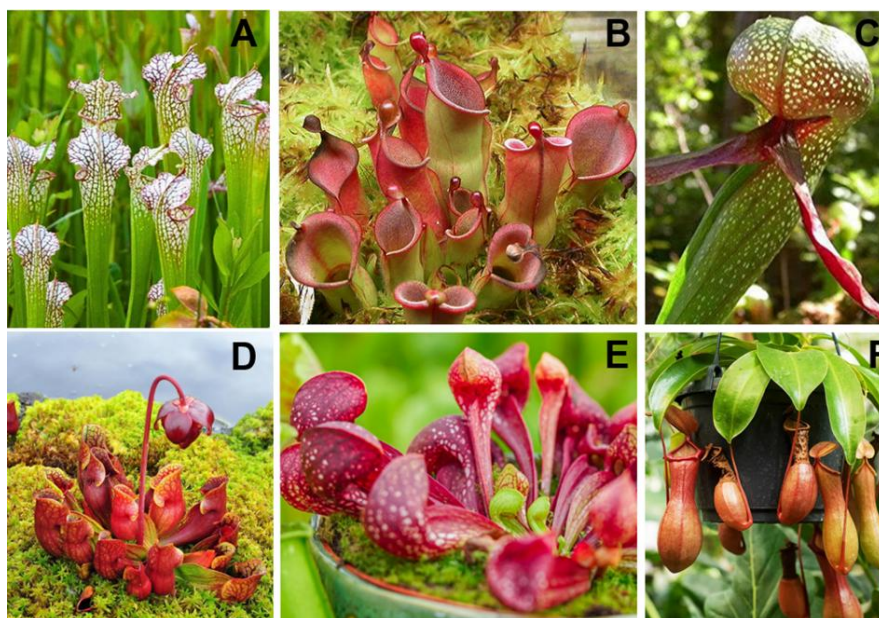


Figura 3. Morfología de diferentes especies de plantas jarrón de las familias Sarraceniaceae y Nepenthaceae: A) *Sarracenia leucophylla* B) *Heliamphora heterodoxa x nutans* C) *Darlingtonia californica* D) *Sarracenia purpurea* E) *Sarracenia psittacina* F) *Nepenthes x ventrata*. Fuente: Blondeau,G (2020).

Este trabajo se enfoca en un género con trampas de tipo jarrón, los pertenecientes a *Darlingtonia californica*. Estas trampas están compuestas por varias estructuras. Las más

relevantes son los nectarios o “tapas” que producen néctar dulce para atraer a las presas. Estas tapas o nectarios tienen una doble función puesto que además protegen sus jugos digestivos de la lluvia, evitando que se diluyan y pierdan su eficacia (Król et al., 2012). Por otro lado está el peristoma, una estructura en el borde de las jarras y las trompetas de textura cerosa y resbaladiza que ayuda a que las presas caigan al interior. Además, en el interior de la trampa se encuentra el líquido digestivo. Para evitar que la presa escape, las plantas tienen ciertas adaptaciones como escamas cerosas, pelos orientados hacia abajo y pliegues cuticulares (Bauer et al., 2013; Gaume et al., n.d). Por último, algunas especies como *Sarracenia flava* contienen sustancias como la conína, que actúan como anestésico para los insectos, aumentando la eficiencia en la caza (Hotti et al. 2017). En la base de la trampa, se encuentran las glándulas digestivas que secretan las enzimas para descomponer las presas. Entre las enzimas conocidas que secretan estas plantas encontramos proteasas, fosfatasas, quitinasas y nucleasas.

1.2.2. Trampas Semiactivas

Las plantas carnívoras semiactivas son aquellas que, aunque no tengan mecanismos rápidos de movimiento, sí que presentan cierta movilidad, reducida pero presente. Este mecanismo tiene el objetivo de evitar que la presa escape. Este tipo de plantas están representadas por especies del género *Drosera*, como *Drosera linearis* Goldie o *Drosera capensis*. Sus trampas funcionan mediante un sistema donde la presa, que suelen ser insectos de baja masa, son atraídos y quedan atrapados en las hojas, las cuales están recubiertas de tricomas glandulares que secretan una sustancia viscosa y brillante llamada mucílago. Al quedar atrapada, los tricomas se inclinan hacia ella y la hoja se enrolla, aumentando el contacto con las enzimas digestivas. Tras la digestión, la hoja se desenrolla para seguir cazando.

1.2.3. Trampas Activas

Las trampas activas se caracterizan por realizar rápidos movimientos durante la captura mediante potenciales de acción. Dentro de las trampas activas se incluyen trampas de cierre rápido y trampas de succión. La popular *Dionaea muscipula* es conocida mundialmente por ser la planta con el movimiento de cierre más rápido en el mundo vegetal. Está relacionada con la *Aldrovanda vesiculosa*, que también utiliza una técnica similar de captura, pero adaptada a su medio acuático. Ambas especies cierran sus trampas cuando la presa acciona una serie de pelos sensibles, como gatillos, ubicados en su superficie. En *Dionaea*, estos pelos son tres y están situados en el centro de la trampa. La digestión puede durar de uno a varios días, dependiendo del tamaño de la presa (Volkov et al., 2008)

Las trampas de succión están presentes exclusivamente en el género *Utricularia*, y se consideran una de las estructuras foliares más complejas entre las plantas. Los miembros de este género no poseen raíces y en su lugar tienen utrículos o vejigas, que funcionan de manera similar a un potente succionador capturando en su interior pequeños crustáceos y otros tipos de zooplancton. (Łachno et al., 2019)

1.3. Interés farmacéutico y biotecnológico de las plantas carnívoras

En el mundo vegetal, hay inmensidad de plantas con propiedades medicinales, las plantas carnívoras no son una excepción. El género *Drosera* es uno de los más estudiados en el campo de plantas carnívoras con extractos medicinales. Son fuentes de compuestos como cianógenos, flavonoides, antocianinas y naftoquinonas, los cuales poseen propiedades anticancerígenas, fungicidas, bactericida (Kawiak & Krölicka, 2012). Un ejemplo es *Drosera binata* que posee naftoquinonas como la plumbagina, que se acumulan en las raíces en altas concentraciones (Caniato et al., 1989) y han demostrado tener propiedades antineoplásicas, antifúngicas y la

capacidad de combatir bacterias resistentes a antibióticos. Otra especie, como *Drosera aliciae*, posee propiedades diuréticas, antitusivas y antioxidantes. (Krolicka et al., 2009).

Las plantas carnívoras tienen un alto valor ornamental y la biotecnología nos permite potenciar dicho valor. Su morfología, colores, trampas, todo lo que envuelve su fenotipo es algo apreciado por las empresas. Para ello, uno de los campos a explorar es la modificación y la mejora genéticas aplicadas en cultivo *in vitro*. Con estas técnicas y gracias a su cultivo en condiciones axénicas, se podrían conseguir plantas resistentes a una gran variedad de ambientes adversos como sequías, zonas con alta salinidad, medios pobres en nutrientes, incluso resistentes a herbicidas y con características morfológicas únicas (Keshavareddy et al., 2018).

1.4. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una potente herramienta en biotecnología vegetal para la propagación de plantas, la mejora genética y la conservación de especies, entre otros fines. El cultivo *in vitro* se realiza en condiciones axénicas y controladas, eliminando variables ambientales que podrían influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El proceso se inicia con la obtención de un explante, que puede ser un fragmento de hoja, un segmento de tallo con o sin meristemos preexistentes o incluso células individuales, que se cultiva en un medio con nutrientes específicos (Curkovic Perica & Berljak, 1996).

Este medio de cultivo contiene diferentes nutrientes inorgánicos como macronutrientes (iones de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y micronutrientes como molibdeno (Mo) zinc (Zn) cobalto (Co) o hierro (Fe) (George et al., 2008). También contiene sacarosa como fuente de carbono, vitaminas y, en algunos casos, reguladores del crecimiento vegetal como auxinas o citoquininas. En cuanto a la consistencia del medio, para lograr un medio sólido o semisólido se hace uso de compuestos como el alginato, agar, gelatina o agarosa (Shahzad et al., 2017). A lo largo de todo el proceso se tienen en cuenta factores esenciales como la luz, la temperatura, la humedad o el pH del medio. Dependiendo de la composición del medio y las condiciones de cultivo, los explantes pueden generar meristemos radiculares, apicales, callos y embriones. Así, podemos diferenciar entre organogénesis (desarrollo de órganos) y embriogénesis somática (desarrollo de embriones). Esto es posible gracias a la capacidad de las células vegetales de desdiferenciarse y de convertirse en células totipotentes a partir de la cual regenerar individuos completos.

El cultivo *in vitro* se puede utilizar para una amplia variedad de aplicaciones, desde conservación de especies en peligro de extinción (Engelmann, 2011), multiplicación mediante la micropropagación y obtención de plantas libres de patógenos mediante técnicas de saneamiento vegetal como el microinjerto entre otras. Además, existe una amplia gama de técnicas relacionadas con la mejora genética como el aprovechamiento de la variación somaclonal (variación genética producida como consecuencia del cultivo *in vitro*), el método haplo-diploide, las técnicas de hibridación somática, la transformación genética y, más recientemente, la edición génica.

1.4.1. Micropropagación

La micropropagación es el proceso mediante el cual se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* para la multiplicación masiva de plantas. Esta técnica se ha utilizado a lo largo de los años sobre todo con aquellas especies que como norma su reproducción es más compleja y por ende tiene más dificultad de reproducirse por medios tradicionales como semillas o esquejes. Dependiendo de la composición del medio de cultivo y del tipo de explante de partida, será más o menos frecuente la aparición de mutaciones que generen plantas genéticamente distintas al material de

partida. Estas últimas pueden tener características fenotípicas únicas y se conocen como variantes somaclonales.

La micropropagación se puede dividir en varias fases (Murashige, 1974). En la Fase 0 se prepara el material vegetal. Se reduce la carga de contaminantes en el material de partida y se ajusta su estado fisiológico para mejorar el éxito en las fases posteriores. Después, en la fase 1 se establece y se inicia el cultivo en condiciones axénicas, es decir, se desinfecta el material vegetal inicial para transferirlo a un medio estéril. La fase 2 es la fase de multiplicación del material vegetal con el objetivo de obtener un gran número de propágulos. Se utilizan explantes con meristemos preexistentes o sin ellos. Los explantes con meristemos generan pocas plantas, pero mantienen el genotipo de partida, mientras que los explantes sin meristemos preexistentes producen generalmente mayor cantidad de plantas y la posibilidad de obtener mutantes mediante regeneración adventicia. Esta regeneración puede ser organogénica o embriogénica. La fase 3 comprende la elongación y el enraizamiento de los propágulos en el caso de la ruta organogénica y la conversión de los embriones en la ruta embriogénica. Se usan medios con diferentes hormonas como citoquininas que inducen el crecimiento del meristemo apical o auxinas que estimulan el crecimiento del meristemo radicular. En la fase 4, los brotes o plantas obtenidas se trasladan a un sustrato adecuado y se aclimatan en invernadero. El objetivo de esta fase es asegurar que las plantas puedan adaptarse a las condiciones del exterior.

Algunas especies de plantas carnívoras, debido a la destrucción de sus hábitats, cambio climático y la recolección ilegal, están en riesgo de extinción. Un ejemplo son las especies de la familia *Sarraceniaceae* como *S. oreophila*, *S. leucophylla* y *S. purpurea* spp. *Venosa*, las cuales han disminuido en su hábitat en un 90% en los últimos tiempos (Northcutt et al, 2012). El cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de disponer de material vegetal de especies en riesgo, ya sea para programas de restauración o para investigaciones futuras. Por otra parte, existen varios ejemplos de especies de plantas carnívoras en las que se han puesto a punto métodos de micropropagación que pueden servir para su multiplicación. En el caso de *D. californica*, para poder llevar a cabo su micropropagación, se suele hacer uso de medios sólidos formulados con sales MS diluidas a la mitad o a la tercera parte, carbón activado, citoquininas como la zeatina para promover el crecimiento de los explantes en longitud y auxinas como ácido indolacético (IAA) y ácido indolbutírico (IBA) para lograr un buen enraizamiento. Estos explantes provienen de la escisión de la parte central, el tallo, de donde se obtienen varios fragmentos con meristemos axilares preexistentes, que, más tarde, se inoculan en el medio sólido enriquecido para su desarrollo en condiciones controladas (Uhnak, 2003).

1.4.2. Transformación genética

La transformación genética en plantas es una potente herramienta biotecnológica que permite estudiar la estructura de ciertos genes y su función en el organismo. También, ofrece información sobre la evolución de las especies carnívoras, cómo se han adaptado a climas y suelos pobres en nutrientes y sus distintos mecanismos de caza, captura y digestión (Coronado-Martín et al., 2024).

El organismo más utilizado para la transformación genética es el *Agrobacterium tumefaciens*, el cual posee el plásmido Ti, encargado del transporte del material genético de interés, a las células de la planta. Este plásmido posee una alta eficacia y ha demostrado ser muy versátil para protocolos de ingeniería genética vegetal en muchas especies vegetales. Especies como *Utricularia gibba*, una planta carnívora acuática caracterizada por poseer trampas en forma de válvulas de succión, han sido transformadas genéticamente. Esta modificación permitió investigar su genómica funcional y situarla como organismo modelo para estudiar a nivel genético aquellos procesos involucrados en la formación de trampas (Oropeza-Aburto et al., 2020).

Por otro lado, también se ha investigado en *Sarracenia purpurea*. Las raíces de esta especie y en general del género *Sarracenia*, contienen compuestos como los polifenoles, los cuales poseen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes y antimicrobianas. En este estudio se utilizó una cepa salvaje del organismo *Agrobacterium rhizogenes* y mediante ingeniería genética, se indujo el crecimiento de raíces con un contenido de polifenoles mucho más elevado (Pilarska et al., 2022).

1.5. *Darlingtonia californica*, la planta cobra

D. californica pertenece a la familia Sarraceniaceae. Esta es una familia de plantas carnívoras nativas de América del Norte y del Sur, compuesta por tres géneros: *Heliophora*, *Darlingtonia* y *Sarracenia*. *Heliophora* incluye seis especies distribuidas en Venezuela y la Guayana Británica, *Sarracenia* con al menos ocho especies en el sureste de EE. UU., y *Darlingtonia*, un género monotipo, en el norte de California y el oeste de Oregón.

D. californica, se conoce comúnmente como la planta jarra de California o “cobra Lily”, ya que su estructura recuerda mucho a una cobra. Habita en zonas húmedas y pantanosas, especialmente en suelos ácidos con escasos nutrientes. Se desarrolla en ambientes frescos y húmedos, típicos de los bosques montañosos, alrededor de temperaturas de 20C°. Las trampas de *D. californica* son pasivas, no poseen movimiento y tienen una estructura que se asemeja a una serpiente cobra en posición de ataque, lo que les da el nombre de *cobra lily* (Ellison & Farnsworth, 2005). Estas trampas están formadas por hojas modificadas en forma de tubos que atrapan los insectos. La hoja se pliega formando una especie de lengua que segrega un néctar atrayente que termina en una apertura en la parte superior, actuando como una boca para atraer y capturar presas (Figura.4).



Figura 4. Morfología de las flores de *D. californica*, con sus pétalos colgantes característicos (izquierda). Estructura de la hoja en forma de trampa tubular (derecha). Fuente: Ellison & Farnsworth, 2005.

Las trampas están preparadas para atraer a los insectos con néctar y luz. Una vez que el insecto entra, es engañado por esa estructura en forma de lengua que lo dirige hacia la "boca" de la trampa, donde es incapaz de escapar. Las paredes de la trampa presentan unas fenestraciones traslúcidas que aturden a la presa y son resbaladizas, lo que impide su salida. Una vez que el insecto es atrapado, la planta se aprovecha de su relación de mutualismo con algunos microorganismos para la degradación de los cadáveres, permitiéndole absorber los nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, que son deficientes en los suelos ácidos donde crece (Ravee et al., 2018).

Es una planta autógena que posee flores de color rojo y amarillo verdoso, que aparecen en una inflorescencia llamada "panícula" pudiendo alcanzar 90 cm de altura (Figura. 4). Estas flores son polinizadas por insectos, principalmente abejas (Meindl & Mesler, 2011). Las semillas de *D. californica* pueden tardar meses en germinar y pueden pasar hasta 5-7 años en conseguir plantas adultas capaces de florecer. Por este motivo, esta planta ha buscado alternativas más rápidas para colonizar nuevas zonas. Se reproduce de forma asexual mediante la formación de nuevas plantas a partir de estolones, que son un tipo de tallo horizontal y alargado que crece sobre la superficie del suelo o de forma subterránea. A lo largo de estas estructuras se desarrollan raíces y brotes que posteriormente darán lugar a nuevas plantas genéticamente idénticas a la planta madre. Sus raíces no suelen tolerar temperaturas superiores a 20C°, pero pese a esto, esta planta posee un largo sistema de raíces que tienen la increíble capacidad de sobrevivir a incendios y a suelos con altas concentraciones de metales pesados (Adlassnig, 2005).

A pesar del organismo tan cautivador y único que es la *D. californica*, el calentamiento global ha contribuido a la disminución de poblaciones como la de esta especie, así como el riesgo de extinción de muchas otras. Para ello, la finalidad de este trabajo es la optimización de distintas técnicas de cultivo *in vitro* que permitan la micropropagación, clonación y transformación genética de esta especie carnívora y poder establecer protocolos de transformación genética que doten a esta planta de características únicas y beneficiosas para su conservación a largo plazo.

Este proyecto se relaciona con el Objetivo de Desarrollo Sostenible número 15 (vida de ecosistemas terrestres), alineándose con la meta 15.5, donde se busca adoptar medidas para reducir la degradación de los ecosistemas naturales y detener la pérdida de biodiversidad, protegiendo las especies en peligro de extinción.

2. Hipótesis

D. californica es una planta carnívora escasamente estudiada. Pese a su gran valor como planta ornamental y su interés comercial, hay muy poca literatura científica en lo que respecta a técnicas de multiplicación y mejora genética. Para ello, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta eficaz y versátil que engloba técnicas que permiten la multiplicación, saneamiento y mejora genética de una gran variedad de especies. En este trabajo nos planteamos la aplicación del cultivo *in vitro* en *D. californica* como una alternativa a las técnicas de multiplicación y mejora tradicionales. La micropropagación facilitaría la obtención de mayor cantidad de material vegetal, tanto para conservar la especie *in vitro* como para, tras su aclimatación, la comercialización de plantas en maceta. Por otro lado, la transformación genética de esta especie abriría nuevas posibilidades a la introducción de caracteres deseados sin la modificación del resto de sus características.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para la multiplicación, micropropagación y transformación genética de la planta carnívora *D. californica*. Para ello también se han fijado una serie de objetivos secundarios que han permitido el avance del proyecto. Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Poner a punto un método de propagación clonal que permita la multiplicación de *D. californica* de forma eficaz y la aclimatación de las plantas obtenidas para su posterior cultivo *ex vitro* (Figura. 5).
2. Determinar las condiciones que permitan la regeneración adventicia a partir de explantes sin meristemos preexistentes y evaluar la variabilidad genética producida en las plantas obtenidas (Figura.5).
3. Desarrollar un método de transformación genética mediante cocultivo de explantes con *A. tumefaciens*, basada en la resistencia a la kanamicina y a la expresión de la GFP, que permita, por primera vez, la obtención de plantas transgénicas de *D. californica* (Figura. 6).

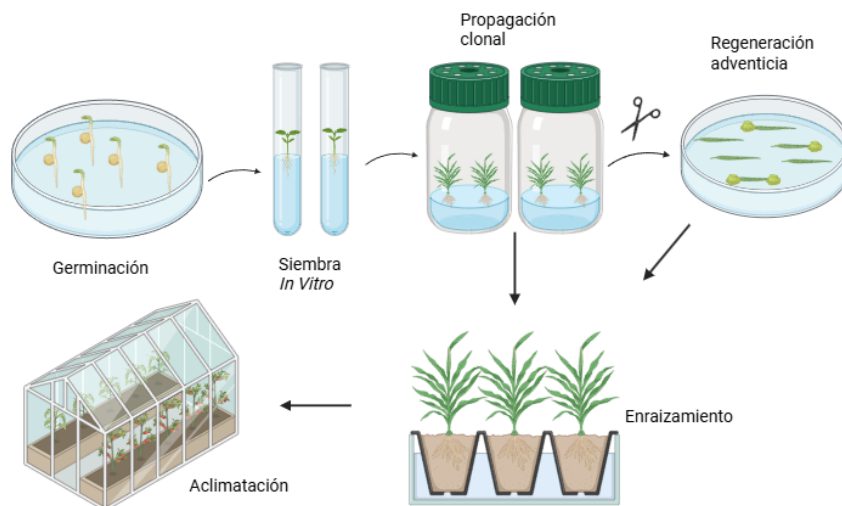


Figura 5. Flujo de trabajo a desarrollar para conseguir la micropropagación de *D. californica*. Elaboración propia con el programa Biorender.

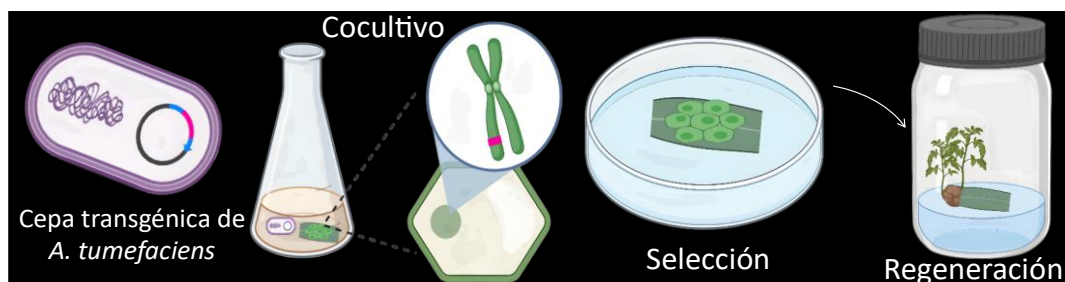


Figura 6. Flujo de trabajo para conseguir la transformación genética de *D. californica*. Elaboración propia.

4. Materiales y Métodos

4.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Todos los ensayos de este trabajo se realizaron una vez obtenido un cultivo axénico de *D. californica* que se estableció a partir de la implantación de semillas adquiridas a través de un vivero nacional especializado en el cultivo de plantas carnívoras.

Todos los ensayos de este trabajo se realizaron en condiciones axénicas, se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, intensidad lumínica de $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2. Preparación y esterilización de medios de cultivo

En este trabajo se utilizaron modificaciones de un medio basal a partir de una mezcla de sales Murashige y Skoog (Murashige and Skoog, 1962) reducidas a la tercera parte, 10 gL^{-1} de sacarosa como fuente de carbono, 100 mgL^{-1} de myo-inositol y 1 mgL^{-1} THCl como fuente de vitaminas. Una vez disueltos los componentes y aforado el volumen, se ajustó el pH -con HCl o KOH- a 5.7 y se añadieron 6.8 gL^{-1} de agar bacteriológico como agente gelificante.

Dependiendo del experimento, el medio puede contener componentes termolábiles. En el caso que no se utilicen, los medios se hierven en el microondas para fundir el agar y se distribuyen en botes para esterilizarlos después en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Por otro lado, si se añaden componentes termolábiles, primero se esteriliza el medio y posteriormente se añaden los componentes en cabina de flujo laminar horizontal y se distribuye en botes o placas estériles.

4.3. Implantación de material y establecimiento del cultivo

La desinfección superficial de semillas de *D. californica* se realizó a partir de una disolución de lejía comercial al 15% y unas gotas de Tween-20, un tensoactivo que permite un mejor contacto del desinfectante con la superficie del material vegetal. Se mantuvieron en esta disolución durante 10 minutos y a continuación se hicieron tres lavados sucesivos de 5, 10 y 15 minutos con agua destilada estéril. Una vez esterilizadas, se aplicó un tratamiento en frío manteniéndolas 30 días a 4°C en oscuridad en una placa Petri sobre un papel filtro estéril. Tras la estratificación las semillas se sembraron individualmente en MB3/3 hasta su germinación. Durante este trabajo, se han usado modificaciones del medio basal MB3/3 (Tabla 1), al que se le han añadido varios compuestos en función de la finalidad del medio.

Tabla 1. Composición del medio MB3/3. Elaboración propia.

Medio de cultivo	Sales minerales	Sacarosa	THCl	Myo-inositol	Agar bacteriológico
MB3/3	MS (Murashige y Skoog, 1962)	10 gL^{-1}	1 mgL^{-1}	100 mgL^{-1}	$6,8 \text{ gL}^{-1}$

Las plantas adultas que cultivamos en el invernadero emiten tallos rastreros subterráneos que utilizan para colonizar nuevos espacios de manera vegetativa, denominados estolones o “runners”. Estos tallos se caracterizan por su rápido crecimiento, presentan una coloración blanquecina, las hojas se atrofian y los entrenudos se separan. Este rápido crecimiento, su función meramente reproductiva, su recolección poco invasiva junto con el hecho de que no comprometen el desarrollo de la planta los convierten en órganos ideales para implantar material *in vitro*. Sin embargo, el hecho de que sean tallos subterráneos dificulta el proceso de desinfección.

Se recolectaron segmentos de estolones de unos 20 cm. Primero se enjuagaron con agua destilada para eliminar restos de sustrato. A continuación, se lavaron durante una hora en agitación con agua destilada y unas gotas de Tween-20 para conseguir una limpieza más profunda del material vegetal. Una vez lavados, los estolones se cortaron en secciones de unos 5 cm. Para la desinfección superficial se introdujeron de manera secuencial en las siguientes disoluciones: 3 min en 70% EtOH, 1 min en 96% EtOH y 30 min en 20% de lejía comercial. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos. Se sanearon los extremos dañados por el desinfectante con un bisturí estéril sobre un papel filtro estéril, y se probaron dos tipos de corte: cortes transversales del estolón y cortes en bisel para aislar la yema y mantenerla con la menor porción de estolón posible. Se separaron una a una todas las yemas axilares y se cultivaron en MB3/3 suplementados con 1 mL/L de PPM, 300 mgL⁻¹ de vancomicina para evitar una posible contaminación y 1 mgL⁻¹ de zeatina para favorecer la brotación axilar de estas yemas. El material se subcultivó en MB3/3 cada 3-4 semanas hasta confirmar la obtención del cultivo axénico libre de contaminaciones.

4.4. Propagación clonal de *D. californica*

La propagación clonal se realiza a partir de explantes con meristemos preexistentes que pueden provenir del meristemo apical (extremo del tallo que crece en longitud) o de las yemas axilares (presentes en los nudos, que pueden dar lugar a ramas laterales). Inicialmente, las plantas se multiplicaron subcultivando explantes de ápice meristemático y de yemas axilares a MB3/3.

4.4.1. Inducción de la brotación axilar

Con el objetivo de mejorar la eficacia de multiplicación de *D. californica*, se suplementó el MB3/3 con distintas concentraciones de zeatina (0, 0.1, 0.5, y 1 mgL⁻¹) para inducir la brotación axilar y conseguir mejores tasas de multiplicación. Para cada una de las condiciones se cultivaron 4 botes con 5 explantes/bote. Trascurridos 2 meses, se estableció un índice de respuesta a esta citoquinina (Figura. 7) para determinar el medio óptimo para la inducción de las yemas: 0 (explantes con crecimiento apical sin inducción o que presentan solo una yema axilar), 1 (explantes con brotación axilar intermedia, con brotes elongados) y 2 (brotación axilar muy vigorosa, pero brotes de menor tamaño).

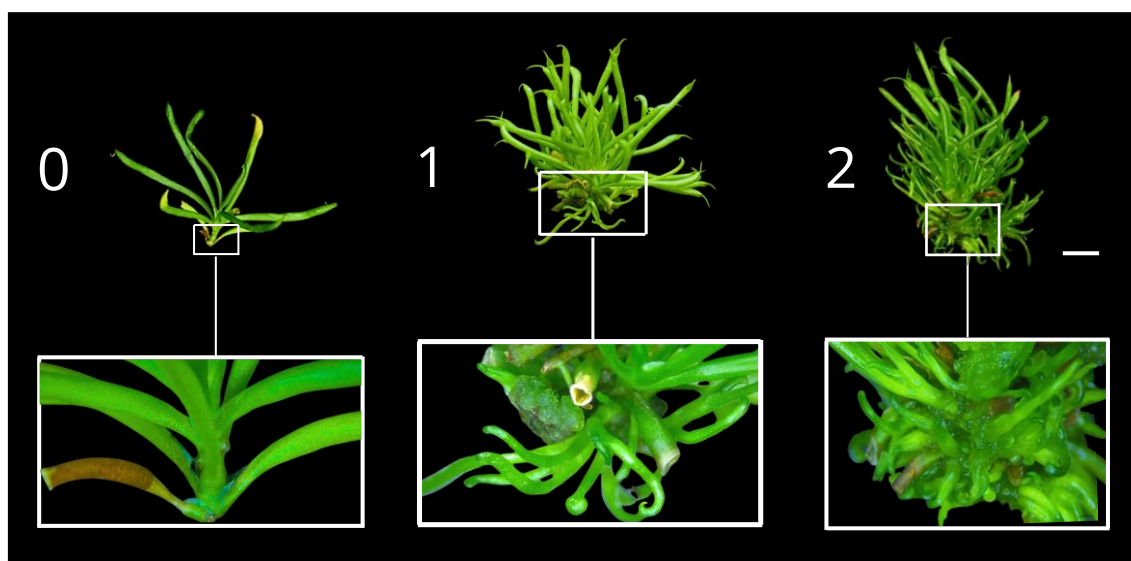


Figura 7. Brotes con distintos niveles de respuesta a la zeatina tras 2 meses de cultivo. La barra representa 1cm. Elaboración propia.

4.5. Regeneración adventicia

Los ensayos de regeneración adventicia permiten evaluar la capacidad de formación de nuevas plantas u órganos a partir de explantes sin meristemos preexistentes. A lo largo de este trabajo y dependiendo de la cantidad de material disponible se hicieron pruebas con explantes de hoja y raíz.

4.5.1. Efecto de la zeatina en la regeneración a partir de explantes de hoja

Se subcultivaron secciones transversales de hoja en MB3/3 suplementado con zeatina (0, 0.1, 0.5, y 1 mgL⁻¹). Para ello, en esta parte del experimento se ha utilizado la zeatina, una hormona de la familia de las citoquininas que estimula la división celular y promueve la formación de brotes y yemas axilares. Se utilizaron 4 placas Petri por condición con 15 explantes por placa. Se evaluó la tasa de regeneración a los 30 días.

4.5.2. Evaluación de la resistencia a la kanamicina

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la regeneración y con el objetivo de obtener plantas transgénicas de *D. californica*, se calculó empíricamente la concentración mínima de kanamicina que inhibe la regeneración de explantes de hoja. Para ello se cultivaron explantes de hoja en medio organogénico MB3/3 + 1 mgL⁻¹ de zeatina con distintas concentraciones de kanamicina (10, 50, 100 y 200 mgL⁻¹). Se cultivaron 4 placas por condición con 10 explantes por placa y se evaluó la eficacia de regeneración trascurridos 50 días.

4.5.3. Determinación de la ploidía de propágulos regenerados

La determinación de la ploidía permite comprobar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas y si es la misma que la del material original. De cada propágulo se extrajo una hoja joven y se siguió el método descrito por Smulders y colaboradores en 1994:

- a) En una placa Petri de vidrio, se añaden 200 µL de tampón de extracción de núcleos y se trocea el material vegetal con la ayuda de una cuchilla para romper las paredes celulares y extraer los núcleos.
- b) Se tiñen los núcleos celulares con 800 µL de una disolución 1 mgL⁻¹ de 4,6-diaminofenilindol (DAPI staining solution, Partec), fluorocromo que se une a los enlaces A-T del ADN.
- c) Por último, los núcleos celulares se filtran a través de una membrana de nylon de 50 µm, para separar estos núcleos de los restos de tejido vegetal que pueden llegar a interferir con el citómetro de flujo.
- d) Las muestras preparadas se analizan en el citómetro de flujo (Partec PA-II Ploidy Analyser).

4.6. Transformación genética de *D. californica* mediada por *A. tumefaciens*

4.6.1 Cepa, plásmido y genes empleados

Se utilizó la cepa desarmada de *A. tumefaciens* LBA 4404 con el plásmido pk2GW7-eGFP. Este plásmido posee entre los sitios de recombinación attB1 y attB2, el gen GFP que permite visualizar su expresión génica por fluorescencia (Figura. 8). Para la selección de plantas transformadas, también existe un casete de resistencia a kanamicina compuesto por el gen Kan, controlado por el promotor Pnos y el terminador Tnos. Por último, este plásmido posee los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB), que delimitan el T-DNA. Este segmento será el material genético que se transferirá a la planta huésped gracias a la cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404.

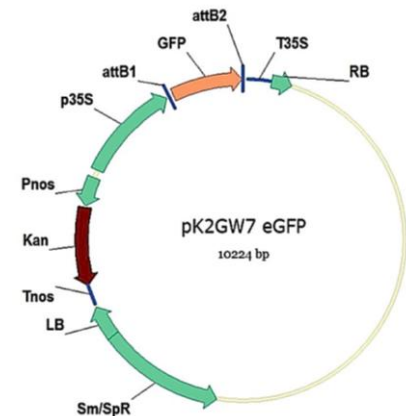


Figura 8. Componentes y estructura del plásmido pk2GW7-eGFP. Elaboración propia.

4.6.2. Inoculación, selección y regeneración de plantas transgénicas

Se prepararon 500 explantes de hoja de entre 1 y 1,5 cm de *D. californica*. Se usaron 40 para el control sin presión selectiva (SPS: explantes no inoculados y cultivados sin kanamicina), 40 para el control con presión selectiva (CPS: explantes no inoculados y cultivados con kanamicina) y 420 para la inoculación con *A. tumefaciens*.

Los controles están formados por explantes no inoculados con *A. tumefaciens* pero que han recibido exactamente los mismos tratamientos que los que han sido inoculados. Aquellos que se cultivan en medio SPS (MB3/3 + 1 mgL⁻¹ zeatina + 300 mgL⁻¹ timentina) nos permiten confirmar que los explantes no han perdido su capacidad organogénica. Aquellos que se cultivan en medio CPS (MB3/3 + 1 mgL⁻¹ zeatina + 300 mgL⁻¹ timentina + 50 mgL⁻¹ kanamicina) confirman que la presión selectiva, es decir, la concentración de kanamicina que hemos añadido inhibe la regeneración de dichos explantes no inoculados. Aquellos explantes inoculados que regeneren en medio con kanamicina serán potencialmente transgénicos.

Los 420 explantes se inocularon en un cultivo líquido de *A. tumefaciens* suplementado con 100 mgL⁻¹ de MES (2-(N-morfolino)etanosulfónico) y 200 mgL⁻¹ de acetosiringona, un compuesto que estimula la transferencia del ADN-T desde el *A. tumefaciens* hacia las células vegetales. Una vez inoculados, los explantes de hoja se co-cultivaron en placas Petri con medio organogénico + 200 mgL⁻¹ de acetosiringona. Los explantes se mantuvieron en la cámara de cultivo, en oscuridad, durante 3 días para favorecer la infección de las células vegetales. Los explantes se lavaron en medio líquido con 500 mgL⁻¹ de cefotaxima, antibiótico bacteriostático que inhibe el crecimiento del *A. tumefaciens* y se secaron sobre papel filtro estéril para eliminar al máximo cualquier resto de *A. tumefaciens*. Por último, se cultivaron en placas con MB3/3 + 1 mgL⁻¹ zeatina + 300 mgL⁻¹ timentina + 50 mgL⁻¹ kanamicina, colocando unos 20 explantes por placa. Este medio permite seleccionar aquellas células que han incorporado el gen de resistencia a la kanamicina. Cada dos semanas el material se subcultivaba a medio fresco con la misma composición.

4.7. Aclimatación ex vitro

La aclimatación consiste en la adaptación de las vitroplantas a condiciones variables. Se seleccionaron propágulos independientemente de si presentaban o no raíces. Este material se lavó con agua destilada para eliminar cualquier resto de agar que pudiera dar lugar al crecimiento de microorganismos perjudiciales. Una vez trasplantados al sustrato, las plantas se cubrieron

con un vaso de plástico o un film transparente, para mantener la humedad, que se retiró progresivamente durante los primeros 15 días. Las plantas se trasladaron a los invernaderos del IBMCP, donde la temperatura está controlada 22-27°C. Se regaban dos veces por semana con agua destilada hasta la eliminación del vaso de plástico o el film. Un mes después se evaluó su estado y se dio por concluida la aclimatación. En cuanto al tipo de sustrato, se hizo una prueba inicial con pocas plantas en dos tipos de sustrato, fibra de coco y *Sphagnum*. Una vez seleccionado el sustrato, se aclimataron 200 plantas provenientes de distintos eventos de regeneración. Se etiquetaron todos ellos para saber su origen y se analizó su fenotipo para detectar cambios morfológicos producidos por la variación somaclonal.

5. Resultados y discusión

5.1. Implantación de material y establecimiento del cultivo

Para el establecimiento del cultivo axénico de *D. californica* se partió de semillas y de segmentos de estolones recolectados de las plantas del invernadero. Tras la esterilización y siembra en condiciones axénicas, las semillas comenzaron a germinar 10 días después de su cultivo, aunque su germinación fue irregular. A pesar de que se consiguió la emisión de radícula en un 36% de las semillas (5 de 14) a los 40 días sólo dos se desarrollaron hasta formar una plántula (14%). No se observó contaminación en ninguna de las semillas esterilizadas. El crecimiento de estas dos plantas fue muy lento, obteniendo plántulas de apenas 1 cm 30 días después de la germinación (Figura. 9A) y no superando los 4 cm de diámetro con unas 7 hojas por plántula trascurridos los primeros 120 días. En este tiempo se observó un desarrollo muy escaso del sistema radicular y la brotación esporádica de alguna yema axilar. Las plantas procedentes de semillas aumentaron de tamaño, aunque siempre con apariencia juveniles, sin la característica forma de serpiente de las hojas de esta planta (Figura. 9B).

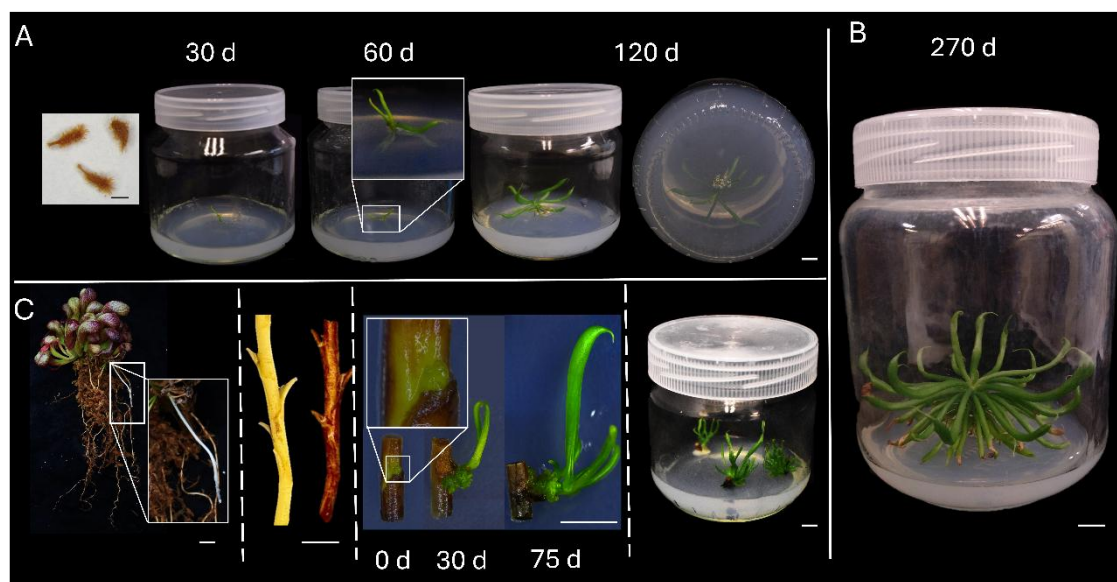


Figura 9. Implantación *in vitro* de *D. californica*. A) Desarrollo de plántulas a partir de semillas cultivadas en MB3/3. B) Vitroplanta procedente de semilla. C) De izquierda a derecha, raíces típicas de *D. californica* con un estolón en formación, fragmento de estolón previo a la desinfección, fragmento de estolón posterior a la desinfección, brotes regenerando a partir de un estolón en diversas fases de su crecimiento durante su implantación y desarrollo de estolón *in vitro*. Las barras representan 1 cm excepto la de la imagen de las semillas que representa 1 mm. Elaboración propia.

Los estolones, al ser tallos subterráneos que crecen en contacto directo con el sustrato, presentaban una alta tasa de contaminación incluso cuando su desinfección fue más agresiva y se sembraron en medio suplementado con PPM y antibióticos. Durante este proceso de esterilización los fragmentos se tornaban de una tonalidad marrón oscura, indicando que la superficie sufrió daño por la acción del hipoclorito (Figura. 9C). Sin embargo, al eliminar el tejido necrosado, se observaron como algunas yemas axilares comenzaron a brotar. Se logró implantar un 23% de los explantes sembrados, 7 de 30, que no presentaron contaminación. A las pocas semanas, gracias a la presencia de zeatina en el medio, se observó la brotación de más yemas axilares a partir de las cuales crecieron múltiples brotes (Figura. 9C).

La implantación por semillas no ofreció tanto problemas en cuanto a la eliminación de agentes contaminantes, sin embargo, tuvo la desventaja de presentar una viabilidad limitada y un crecimiento lento tras la germinación. Por otro lado, aunque los estolones sean más difíciles de esterilizar, nos permite implantar material con un crecimiento más rápido y manteniendo las

características genéticas del material de partida lo cual puede ser tremendamente interesante en el caso de trabajos de conservación.

En trabajos anteriores (Erst et al, 2022) se ha observado que las semillas germinaron en 2-3 días desde su siembra, con una tasa de germinación del 87%. En nuestro caso se logró la germinación de un 36% de las semillas, lo que plantea lo importante que es la fuente del material vegetal cuando se trata de la germinación de semillas. Más adelante, estos investigadores transfirieron estos explantes a medio MS suplementado con 5 μM de BAP (6-bencilaminopurina) durante un año. Durante esta etapa, en los primeros meses, observaron una organogénesis directa, ya que la regeneración ocurrió a partir de los meristemas ya preexistentes en la planta. En nuestro caso se dio la misma situación. Por último, tanto en el ensayo de Erst y colaboradores como el correspondiente a este trabajo, las hojas formadas eran juveniles y no se observaron trampas.

5.2. Propagación clonal de *Darlingtonia californica*

Inicialmente, se cultivaron explantes de ápice meristemático y yemas axilares en MB3/3 pero su crecimiento era muy lento. El tallo principal crecía en longitud, pero ramificaba muy escasamente, por lo que se decidió favorecer la brotación axilar mediante el uso de citoquininas.

5.2.1. Inducción de la brotación axilar

Con el fin de favorecer la ramificación de los explantes, se cultivaron brotes en medio MB3/3 suplementado con distintas concentraciones de zeatina (Figura. 10A). Transcurridos dos meses se evaluaron las plantas obtenidas en cada medio mediante un índice (Figura. 7).

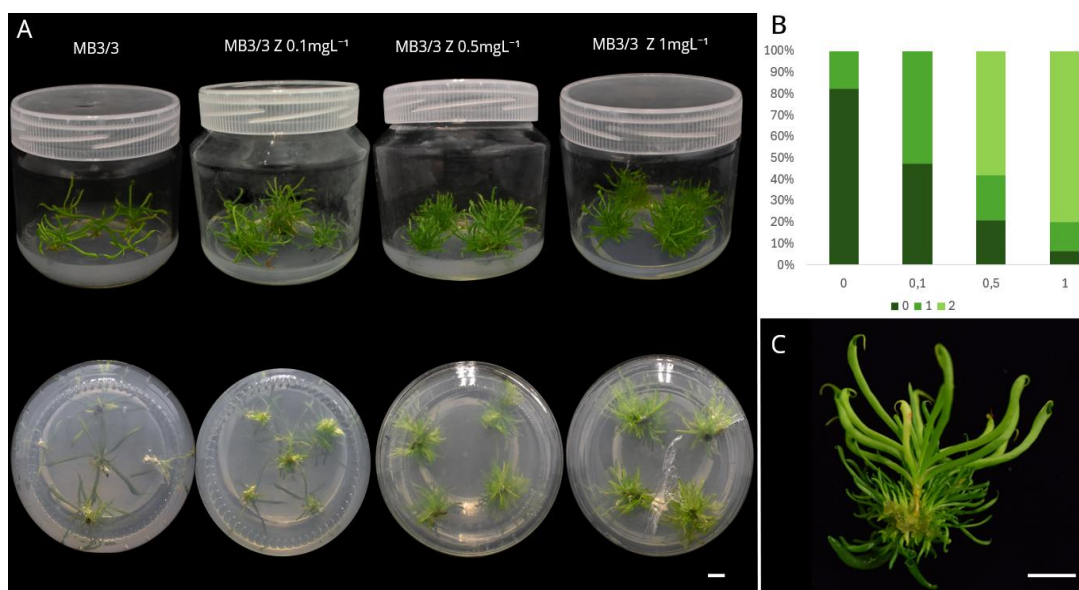


Figura 10. Brotación axilar de *D. californica*. A) Efecto de la zeatina sobre brotes tras dos meses de cultivo. B) Representación del porcentaje de explantes con diferentes índices de respuesta a la zeatina. C) Corte transversal de un brote con índice 2. La barra representa 1 cm. Elaboración propia.

En ausencia de zeatina se obtuvo un 82% de explantes con morfología típica del índice 0, no presentan ramificación y un 18% que presentaron entre 2 y 3 yemas axilares brotadas y con un tamaño similar al del tallo principal. A medida que la concentración de zeatina aumenta, también lo hace el número de yemas axilares que brotan. En 0.1 mgL^{-1} se observó un aumento en la cantidad de explantes de índice 1 hasta un 52% de explantes en esta concentración. Las concentraciones 0.5 y 1 mgL^{-1} fueron las más efectivas en cuanto a la brotación de yemas, consiguiendo tasas de explantes en índice 2 de 57% y 80% respectivamente (Figura. 10B). En estos explantes, la brotación es mucho más vigorosa pero el tamaño de las yemas es más

reducido. De hecho, este índice 2 se caracteriza por presentar una planta de tamaño “normal” y la formación de un tejido desorganizado en la base del explante a partir del que brotan todas las pequeñas yemas que se forman (Figura. 10C). Una vez inducida la brotación axilar, los explantes se subcultivaron en medio MB3/3 para favorecer su desarrollo sin la formación de nuevas yemas axilares y poder usarlos como material de partida para los distintos ensayos de este trabajo.

D. californica está muy poco estudiada en el ámbito de la micropropagación. Por otra parte, estudios previos realizados con *Sarracenia purpurea* (Northcutt et al, 2012), una especie de su misma familia, se utilizaron medios sin hormonas, con concentraciones muy similares de sales MS (Murashige y Skoog), tiamina, myo-inositol y sacarosa a las empleadas en nuestro trabajo. Los explantes cultivados crecieron alcanzando un tamaño muy similar entre todos ellos. Por otra parte, las hojas presentaban un tamaño reducido, eventos que también se repitieron en este trabajo. Por otro lado, estos mismos investigadores, utilizaron el medio MB3/3 suplementados con zeatina. En estas condiciones se consiguió un mayor crecimiento, duplicando el tamaño de los brotes y aumentando la longitud de las hojas. Estos resultados son similares a los que se obtuvimos en nuestro trabajo, ya que, los explantes cultivados en este medio también mostraron una respuesta vigorosa, con mayor crecimiento del meristemo apical, mayor formación de brotes axilares y mayor elongación foliar.

5.3. Regeneración adventicia

La regeneración adventicia favorece la obtención de variantes somaclonales, plantas con alguna diferencia genética respecto de la planta de la que proceden originada por el cultivo *in vitro*, y supone el primer paso para obtener plantas transgénicas. Se ha observado que, en algunas plantas envejecidas de *D. californica* había raíces que regeneraron brotes en medio libre de reguladores de crecimiento (Figura. 11A). Sin embargo, al no disponer de suficientes explantes de este tipo, se usaron explantes de hoja, de los que disponíamos en mayor cantidad, para evaluar su potencial organogénico.

5.3.1. Efecto de la zeatina en la regeneración a partir de explantes de hoja

Para la regeneración de explantes de hoja se utilizaron los mismos medios que en el ensayo anterior: MB3/3 suplementado con 0, 0.1, 0.5, y 1 mgL⁻¹ de zeatina. Transcurrido un mes se realizó la lectura del experimento. Las concentraciones de zeatina que presentaron el mayor número de explantes regenerados o con presencia de callos organogénicos fueron 0.5 y 1 mgL⁻¹ con un 9% y 6% de explantes regenerados respectivamente (Figura. 11B). En los medios MB3/3 y MB3/3 + 0.1 mgL⁻¹ de zeatina, la regeneración no superó el 1%. Dado el escaso número de explantes del que se partió (menos de 100 explantes por condición) no se pudo determinar cuál de las dos concentraciones más altas, 0.5 y 1 mgL⁻¹, era la óptima para la regeneración. En este contexto, se decidió seleccionar 1 mgL⁻¹ de zeatina para los siguientes ensayos ya que en otras especies de plantas carnívoras esta concentración era la que había ofrecido un mejor resultado.

El inicio de la regeneración se produce en las zonas de corte de las hojas (Figura. 11C), pero a los 45 días aproximadamente las zonas organogénicas se distribuyen por toda la superficie de la hoja. En el caso de no subcultivar estos explantes regenerados a medio de elongación se consiguen estructuras con un gran desarrollo de yemas adventicias y resulta imposible la cuantificación del número de propágulos obtenidos por explante. Este tipo de respuesta fue bastante notoria en los medios suplementados con 0.5 y 1 mgL⁻¹ de zeatina, donde se pudo observar el desarrollo de estos callos compactos. La determinación del nivel de ploidía de 60 propágulos regenerados mostró que su nivel de ploidía no variaba con respecto al del material original. Con estos datos podemos afirmar que los medios suplementados con zeatina mantienen una estabilidad genética en el tiempo y no producen alteraciones a nivel genómico,

por lo que estos medios se pueden seguir utilizando tanto para micropropagación como para otras técnicas como la transformación genética.

La regeneración de hojas de *D. californica* ha sido objeto de estudio en trabajos anteriores (Uhnak, 2003). En sus investigaciones diseccionó hojas de *D. californica* en 3 partes de menos de 1 cm cada una y las cultivo en medio MS suplementado con giberelinas durante 1 mes. De 20 fragmentos que cultivó, tan solo 3 regeneraron nuevas estructuras. Más adelante realizó otro ensayo con una muestra más grande. En este caso de 70 fragmentos de hoja, el 18% formaron estructuras organogénicas como callos, el resto se necrosaron. Los resultados de nuestro trabajos son parecidos a los suyos. Pese a que Uhnak (2003) utilizó giberelinas, la tasa de regeneración fue muy similar a la obtenida en explantes foliares de *D. californica* con zeatina.

5.3.2. Evaluación de la resistencia a la kanamicina

Una vez puesto a punto un protocolo para la regeneración adventicia se evaluó la concentración mínima de kanamicina que inhibía la regeneración de explantes de hoja para seleccionar eventos transgénicos que incorporen el T-DNA con el gen de resistencia a este antibiótico. Transcurridos 50 días, en 0 y 10 mgL⁻¹ de kanamicina, se consiguió una alta tasa de explantes con eventos de regeneración o callos desorganizados en los extremos de las hojas, aproximadamente de 22,5-25%, lo que indicaba un bajo impacto de este antibiótico en los explantes (Figura. 11C).

Al aumentar la concentración, como en 50 mgL⁻¹, el número de explantes viables disminuía, con un 10% de regenerados o con callo desorganizado. Por último, en 100 y 200 mgL⁻¹, no hubo presencia de regeneración ni de callos. El 96 % de los explantes necrosaron, lo que indica que a estas concentraciones la kanamicina es tóxica para *D. californica* (Figura. 11D). Se seleccionó 50 mgL⁻¹ para los ensayos posteriores puesto que supone una concentración subletal que inhibe de forma parcial la regeneración, pero no se compromete completamente el desarrollo. El objetivo es conseguir condiciones selectivas pero que, al mismo tiempo nos permitan obtener el mayor número de eventos potencialmente transgénicos a pesar de la baja tasa de regeneración de los explantes en medio organogénico sin kanamicina.

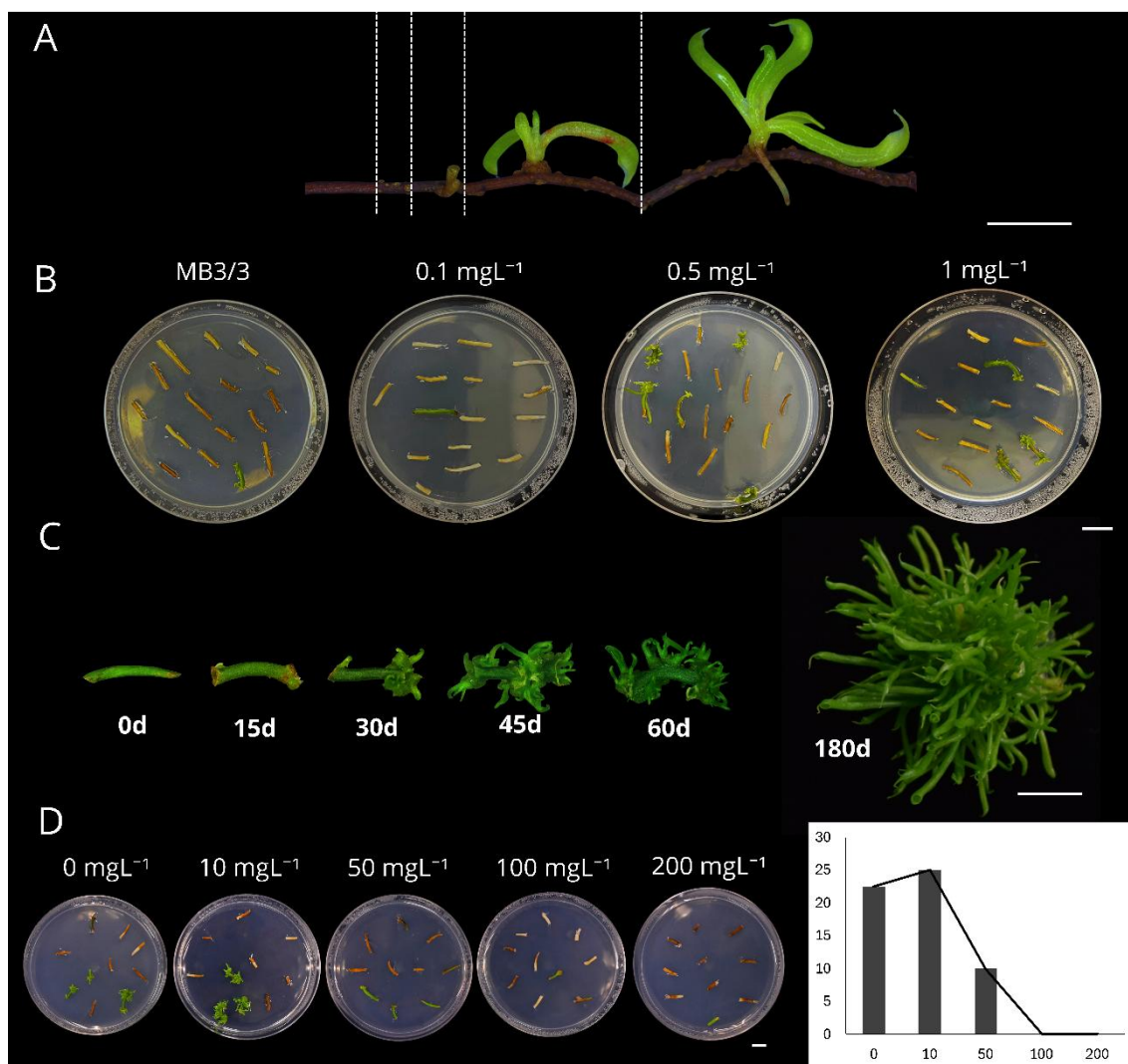


Figura 11. Regeneración adventicia en *D. californica*. A) Regeneración a partir de una raíz. B) Efecto de distintas concentraciones de zeatina sobre la regeneración a partir de explantes de hoja. C) Explantes de hoja con eventos de regeneración en diferentes estadios. D) Efecto de distintas concentraciones de kanamicina sobre la regeneración de explantes de hoja y representación del porcentaje de explantes con regeneración en cada condición. La barra representa 1 cm. Elaboración propia

5.4. Transformación genética de *Darlingtonia californica* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Se obtuvieron alrededor de medio millar de explantes, tanto para los controles con y sin presión selectiva (presencia o no de kanamicina) como para la transformación e inoculación del plásmido (Figura. 12A) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Los medios sin presión selectiva llevaban zeatina 1 mgL⁻¹ y timentina 300 mgL⁻¹. Los medios con presión selectiva además presentaban 50 mgL⁻¹ de kanamicina. El control SPS confirmó que los explantes regeneraban en medio organogénico y el CPS que la kanamicina detenía parcialmente esta formación de callo desorganizado y regeneración. El uso del gen GFP como gen delator nos permitió observar eventos transgénicos desde los primeros días de la transformación.

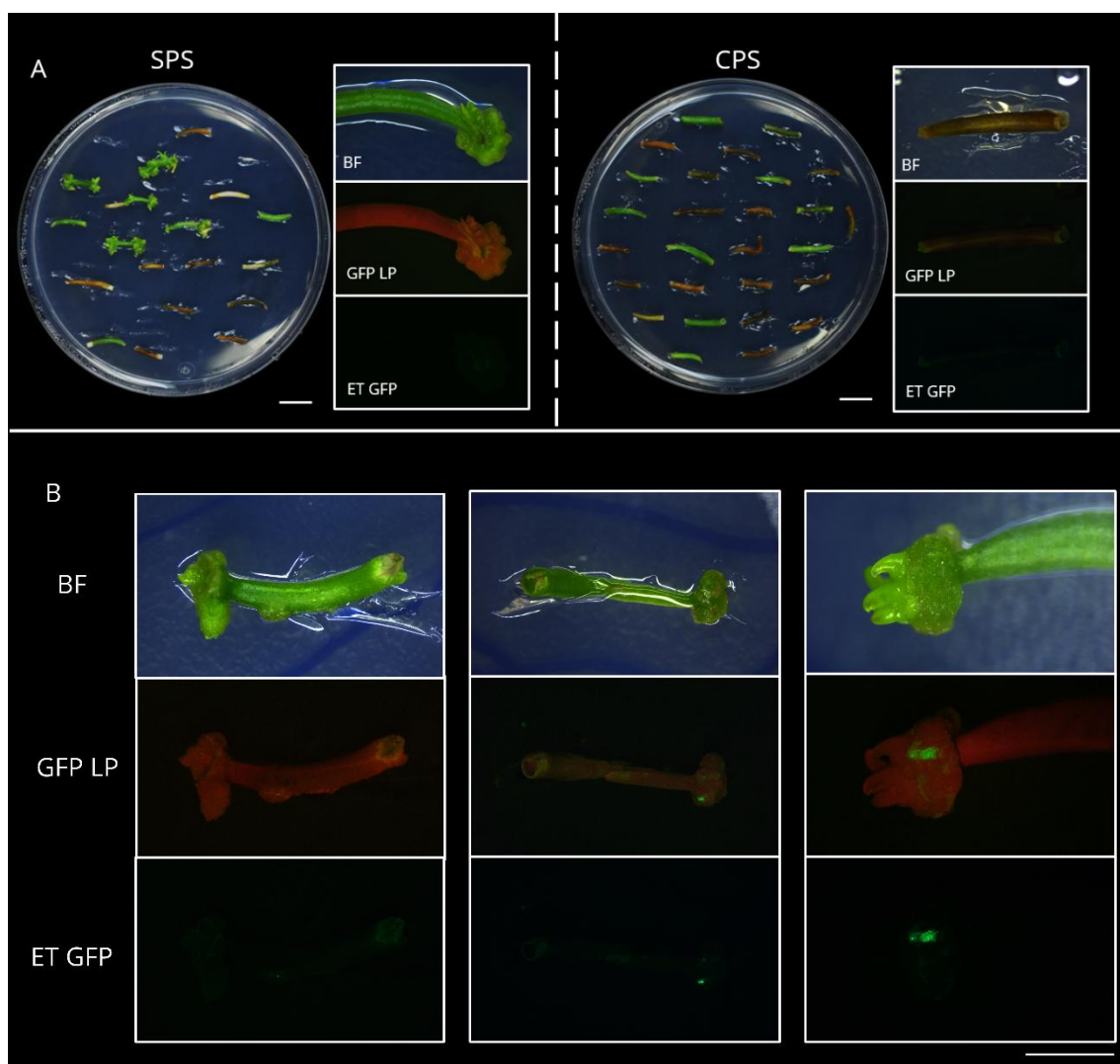


Figura 12. Transformación genética de *D. californica*. A) Explantes de hoja en medios sin presión selectiva (izquierda) y con presión selectiva (derecha) y detalles de un explante visualizado en tres condiciones distintas: BF -campo claro, no se ve la GFP-, GFP LP -permite ver la clorofila en rojo y GFP en verde- y ET GFP -permite ver la GFP verde-. La barra representa 1 cm. B) Explantes inoculados con *A. tumefaciens*. Izquierda no presenta ninguna región con expresión GFP, centro y derecha se aprecia parte del callo con expresión GFP. La barra representa 0.5 cm. Elaboración propia.

A las 4 semanas, en el medio control SPS, el 40% de los explantes regeneraron y formaron callos organogénicos (Figura. 12A). Por otro lado, en el medio CPS, el 4% de los explantes formaron callo o regeneraron. Como era de esperar, al no haber inoculado ninguno de estos explantes con la cepa de *A. tumefaciens*, no se observó emisión de fluorescencia característica de la GFP (Figura. 12A).

Los 420 explantes inoculados se cultivaron en MB3/3 + zeatina al 1 mgL^{-1} , timentina 300 mgL^{-1} y kanamicina 50 mgL^{-1} . Transcurrido un mes, y después de dos subcultivos en medio fresco, se examinó el material vegetal bajo el filtro GFP. Del total de 420 explantes inoculados, 299 se necrosaron en las primeras cuatro semanas de cultivo. Entre los 121 explantes que permanecían sin necrosis se identificaron 38 explantes con callos organogénicos resistentes a la kanamicina. Seis de ellos presentaban expresión GFP. Esta fluorescencia se podía apreciar claramente en algunos callos desarrollados (Figura. 12 B centro y derecha). Cabe destacar que ciertos tejidos necróticos emiten algo de fluorescencia basal, pero en este caso, esa fluorescencia es claramente distinta de la que emite la GFP (Figura 12B, izquierda). Por tanto, teniendo en cuenta aquellos explantes que regeneraron bajo esta presión selectiva, la tasa de

transformación entre los explantes no necrosados fue del 31% si el criterio es la resistencia a la kanamicina y del 5% si incluimos el criterio de expresión del gen GFP.

Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se consigue la transformación genética de *D. californica*. En este mismo grupo de investigación, se ha llevado a cabo la transformación de varias especies de plantas carnívoras, entre ellas *Byblis liniflora* (Coronado-Martín, 2024) la planta arcoíris. En esta investigación se logró establecer un protocolo de transformación genética con la misma cepa de *A. tumefaciens* con una eficacia de transformación del 7,7%. Tanto esta eficacia como la que hemos alcanzado con *D. californica* nos permitiría abordar cualquier programa de mejora basado en la obtención de plantas transgénicas con una elevada probabilidad de éxito.

5.5. Aclimatación ex vitro

Inicialmente se seleccionaron 12 plántulas *in vitro* y se trasplantaron en dos sustratos diferentes fibra de coco -un sustrato inerte que proviene de los desechos de la industria cocotera- y musgo *Sphagnum* -un musgo ampliamente utilizado en el cultivo de plantas carnívoras que se caracteriza por su capacidad de retención de agua y su aireación-. La fibra de coco fue el que mejor resultados mostró, obteniendo un 83% de brotes aclimatados a los 60 días. También se consiguió la aclimatación del 50% de los brotes cultivados en *Sphagnum*. (Figura. 13A). El factor que más ha influido en el éxito de la aclimatación ha sido el tamaño de los brotes en el momento de su traslado a condiciones *ex vitro*. Únicamente sobrevivieron aquellos con un tamaño aproximado de 3 cm. En ensayos posteriores, empleando *Sphagnum*, se han obtenido tasas de supervivencia cercanas al 100% partiendo de este tipo de vitroplanta, con lo que podemos concluir que en nuestras condiciones de invernadero podemos asegurar una correcta aclimatación de los propágulos independientemente del sustrato que utilicemos.

La fibra de coco es un sustrato mucho más económico y no tiene un impacto tan negativo en los ecosistemas como el musgo *Sphagnum*, puesto que se recolecta en turberas naturales y presenta un tiempo de regeneración muy largo. Muchos viveristas especializados en el cultivo de plantas carnívoras realizan sus aclimataciones en este musgo y luego trasplantan los propágulos enraizados y aclimatados a turba rubia. En nuestras condiciones, la fibra de coco supone una alternativa al uso de musgo *Sphagnum* para realizar una aclimatación previa al trasplante definitivo de estas plantas.

A diferencia de los resultados obtenidos *in vitro*, las plántulas aclimatadas desarrollaron su sistema radicular ramificado, con unos 7 cm de longitud a los 90 días (Figura. 13B). Durante los primeros estadios de desarrollo, las hojas de *D. californica* no poseían su característica forma de cobra. Sin embargo, con el paso de tiempo, las plantas juveniles pasaron a tener el aspecto de una planta madura, con su “lengua bífida” característica y con un claro aumento en la coloración y en las fenestraciones traslúcidas de la trampa (Figura. 13B).

En un estudio reciente (Erst et al, 2022) emplearon musgo *Sphagnum* como sustrato durante la fase de aclimatación, logrando una tasa de supervivencia del 85% en explantes regenerados. Observaron también como tras dos años de cultivo, se produjeron eventos de propagación vegetativa gracias a estructuras como los estolones.

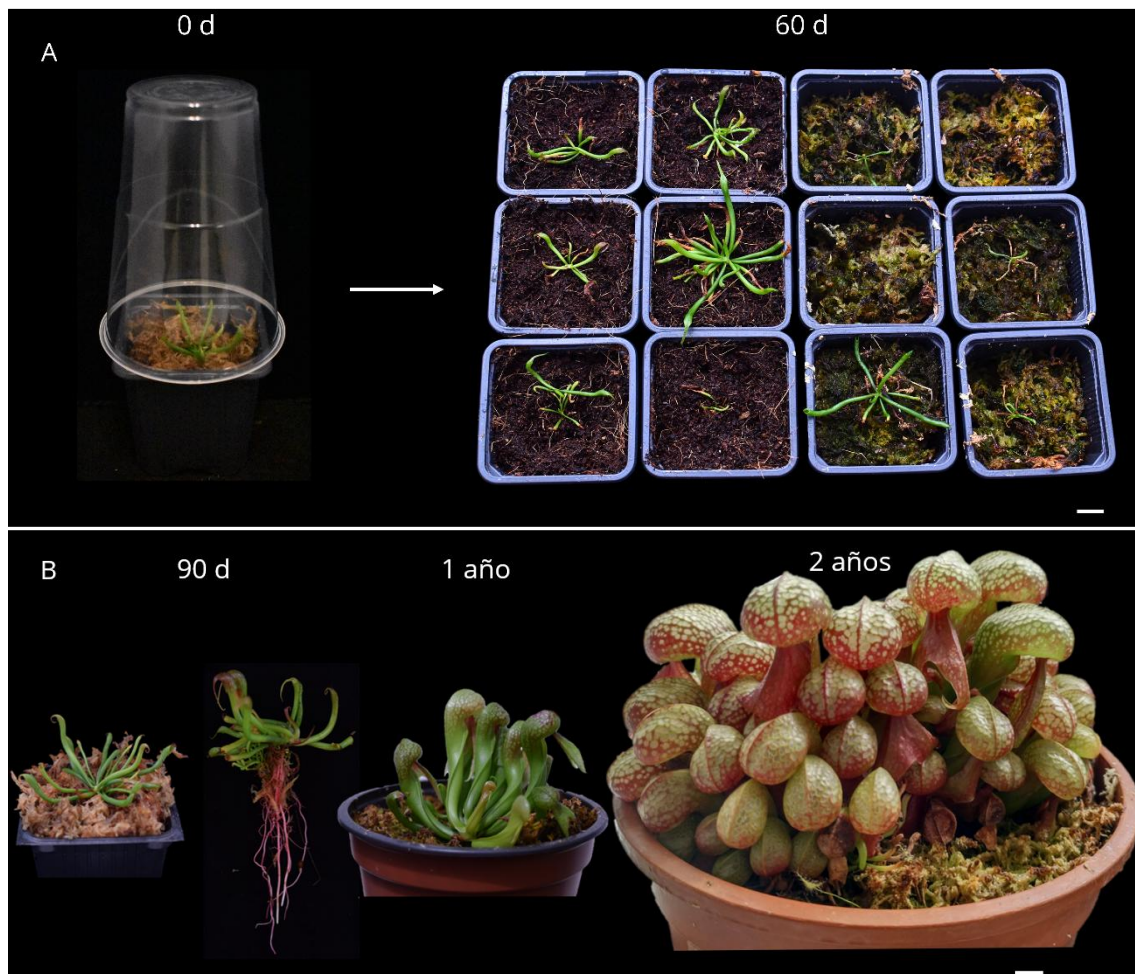


Figura 13. A) Explante proveniente de cultivo *in vitro*, trasplantado y tapado con un vaso para mantener la humedad. A la derecha, plántulas de *D. californica* 60 días después, desarrolladas en fibra de coco (izquierda) y *Sphagnum* (derecha). La barra representa 1cm B) Desarrollo de un explante, desde sus primeros estadios en *Sphagnum*, hasta su desarrollo en plantas adultas. La barra representa 1cm. Elaboración propia.

De los 200 propágulos adicionales provenientes de distintos eventos de regeneración y de propagación clonal que se aclimataron para evaluar posibles diferencias fenotípicas que nos permitiesen identificar variantes somaclonales, no se identificó ninguno que presentase diferencias morfológicas significativas respecto del material de partida. Teniendo en cuenta el resultado obtenido en el análisis mediante citometría de flujo comentado con anterioridad, podemos afirmar que todos los métodos de micropropagación empleados parecen producir plantas básicamente iguales al material de partida.

6. Conclusiones

Se ha conseguido establecer un cultivo axénico de *D. californica* a partir de la esterilización superficial de semillas y estolones provenientes de plantas cultivadas en el invernadero.

1. Se ha puesto a punto un protocolo para la multiplicación axilar y la regeneración adventicia de *D. californica* a partir de su cultivo en medio basal MB3/3 suplementado con zeatina. Se ha logrado la aclimatación de las vitroplantas obtenidos con una elevada eficacia.
2. La determinación del nivel de ploidía de 60 plantas provenientes de los ensayos de regeneración junto con la evaluación fenotípica *in vivo* de 200 plantas aclimatadas concluyó que la incidencia de la variación somaclonal sobre el material regenerado es muy baja o nula ya que no se observaron cambios en el nivel de ploidía ni en el fenotipo de estas plantas. Esta baja incidencia permite utilizar la regeneración adventicia de hojas como el mejor método para la multiplicación a gran escala y la transformación genética.
3. Se ha puesto a punto, por primera vez según la bibliografía consultada, un protocolo para la transformación genética de *D. californica* mediante cocultivo de explantes de hoja con *A. tumefaciens*. Un mes después de la inoculación se han identificado, entre los explantes no necrosados, un 31% de explantes con callos organogénicos resistentes a la kanamicina y un 5% de explantes con expresión del gen GFP.

Todas estas metodologías permitirán en el futuro poder llevar a cabo programas de multiplicación y mejora en esta especie de planta carnívora.

7. Bibliografía

- Adlassnig, W., Petrounka, M., Lambers, H., & Lichtscheidl, I. K. (2005). The roots of carnivorous plants. *Plant and Soil*, 274(1/2), 127-140. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-2754-2>
- Banasiuk, R., Kawiak, A., & Królicka, A. (2012). *In vitro* cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *BioTechnologia*, 93(2), 87–96. <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46572>
- Bauer, U., Scharmann, M., Skepper, J., & Federle, W. (2012). 'Insect aquaplaning' on a superhydrophilic hairy surface: how *Heliamphora nutans* Benth. pitcher plants capture prey. *Proceedings. Biological sciences*, 280(1753), 20122569. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2569>
- Blondeau, G. (2020). *El gran libro de las plantas carnívoras*. De Vecchi ediciones
- Caniato, R., Filippini, R., & Cappelletti, E. M. (1989). Naphthoquinone Contents of Cultivated *Drosera* Species *Drosera binata*, *D. binata* var. *dichotoma*, and *D. capensis*. *International Journal of Crude Drug Research*, 27(3), 129–136. <https://doi.org/10.3109/13880208909053952>
- Coronado-Martín, A., Martín-Vásquez, C., Jáquez, M., Bahaji, A., & Atarés, A. (2024, August 6). Micropropagation and genetic transformation of *Byblis liniflora*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. Springer Science and Business Media LLC. <http://doi.org/10.1007/s11627-024-10448-7>
- Darwin C. (1875). *Insectivorous plants*. London, UK: John Murray.
- Ellison, A. M., & Farnsworth, E. J. (2005). The cost of carnivory for *Darlingtonia californica* (Sarraceniaceae): evidence from relationships among leaf traits. *American journal of botany*, 92(7), 1085–1093. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.7.1085>
- Ellison, A. M., & Gotelli, N. J. (2009). Energetics and the evolution of carnivorous plants--Darwin's 'most wonderful plants in the world'. *Journal of experimental botany*, 60(1), 19–42. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern179>
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- Erst, A.A., Lebedeva, M.A., Syso, A.I., & Banaev, E.V. (2022). The Accumulation of Cu, Co, and Mg Ions and Its Effect on the Growth of *Darlingtonia californica* Torr. *In Vitro. Contemporary Problems of Ecology*, 15, 528-540. <http://doi.org/10.1134/s1995425522050055>
- Ferreira, M. d. S., Rocha, A. d. J., Nascimento, F. d. S., Oliveira, W. D. d. S., Soares, J. M. d. S., Rebouças, T. A., Morais Lino, L. S., Haddad, F., Ferreira, C. F., Santos-Serejo, J. A. d., Fernández, J. S., & Amorim, E. P. (2023). The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. *Agronomy*, 13(3), 730. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030730>
- Gallie, D. R., & Chang, S. C. (1997). Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources. *Plant physiology*, 115(4), 1461–1471. <https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1461>

- Gaume, L., Gorb, S., & Rowe, N. (2002). Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *The New phytologist*, 156(3), 479–489. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00530.x>
- George, E. F., Hall, M. A., & de Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In E. F. George, M. A. Hall, & G. J. de Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (pp. 65–113). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Givnish, T. J., Sparks, K. W., & Hunter, S. J. (2017). Why are plants carnivorous? Cost/benefit analysis, whole-plant growth, and the context-specific advantages of botanical carnivory. In A. M. Ellison & L. Adamec (Eds.), *Carnivorous plants: Physiology, ecology, and evolution* (pp. 211–224). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198779841.003.0018>
- Hotti, H., Gopalacharyulu, P., Seppänen-Laakso, T., & Rischer, H. (2017). Metabolite profiling of the carnivorous pitcher plants *Darlingtonia* and *Sarracenia*. *PloS one*, 12(2), e0171078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171078>
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & Ramu, V. S. (2018). Methods of plant transformation: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(7), 2656–2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>
- Król, E., Płachno, B. J., Adamec, L., Stolarz, M., Dziubińska, H., & Trebacz, K. (2012). Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. *Annals of botany*, 109(1), 47–64. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr249>
- Krolicka, A., Szpitter, A., Maciag, M., Biskup, E., Gilgenast, E., Wegrzyn, G., & Lojkowska, E. (2009). Antibacterial and antioxidant activity of the secondary metabolites from in vitro cultures of the Alice sundew (*Drosera aliciae*). *Biotechnology and applied biochemistry*, 53(3), 175–184. <https://doi.org/10.1042/BA20080088>
- Lachno, B. J., Świątek, P., Adamec, L., Carvalho, S., & Miranda, V. F. O. (2019). The Trap Architecture of *Utricularia multifida* and *Utricularia westonii* (subg. *Polypompholyx*). *Frontiers in plant science*, 10, 336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00336>
- Meindl, George A., & Mesler, Michael R. (2011). Pollination Biology of *Darlingtonia californica* (Sarraceniaceae), the California Pitcher Plant. *Madroño; a West American Journal of Botany*, 58, 22–31. <https://doi.org/10.3120/0024-9637-58.1.22>
- Müller, K., Borsch, T., Legendre, L., Porembski, S., Theisen, I., & Barthlott, W. (2004). Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. *Plant Biology*, 6(5), 477–490. <https://doi.org/10.1055/s-2004-817909>
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>
- Northcutt, C., Davies, D., Gagliardo, R., Bucalo, K., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M., & Pullman, G. S. (2012). Germination In Vitro, Micropropagation, and Cryogenic Storage for Three Rare Pitcher Plants: *Sarracenia oreophila* (Kearney) Wherry (Federally Endangered), *S. leucophylla* Raf., and *S. purpurea* spp. *venosa* (Raf.) Wherry. *HortScience horts*, 47(1), 74-80. Retrieved Apr 21, 2025, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.1.74>

- Oropeza-Aburto, A., Cervantes-Pérez, S.A., Albert, V.A. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the aquatic carnivorous plant *Utricularia gibba*. *Plant Methods* 16, 50 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00592-7>
- Perica, M. C., & Berljak, J. (1996). In Vitro Growth and Regeneration of *Drosera spatulata* Labill. on Various Media. *HortScience HortSci*, 31(6), 1033-1034. Retrieved Apr 21, 2025, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.6.1033>
- Pilarska, K. M., Panić, M., Redovniković, I. R., & Wróbel-Kwiatkowska, M. (2022). Characterization of Carnivorous Plants *Sarracenia purpurea* L. Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Applied Sciences*, 12(20), 10289. <https://doi.org/10.3390/app122010289>
- Poppinga, S., Masselter, T., & Speck, T. (2013). Faster than their prey: New insights into the rapid movements of active carnivorous plants traps. *BioEssays*, 35(7), 649–657. <https://doi.org/10.1002/bies.201200175>
- Ravee, R., Mohd Salleh, F., & Goh, H. H. (2018). Discovery of digestive enzymes in carnivorous plants with focus on proteases. *PeerJ*, 6, e4914. <https://doi.org/10.7717/peerj.4914>
- Shahzad, A., Saeed, T., Rao, A. R., & Anis, M. (2017). Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In M. Abdin, U. Kiran, K. Kamaluddin, & A. Ali (Eds.), *Plant biotechnology: Principles and applications* (pp. 1–36). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_1
- Uhnak, Kenneth Stephen. (2003)."Micropropagation of Carnivorous Plants" *Open Access Dissertations*. Paper 471. <https://doi.org/10.23860/diss-uhnak-kenneth-2003>
- Volkov, A. G., Adesina, T., Markin, V. S., & Jovanov, E. (2008). Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* closing. *Plant physiology*, 146(2), 694–702. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108241>