



Facultade de ciencias

Dpto. de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía (Área de Botánica)

Dpto. de Bioloxía Celular e Molecular (Área de Xenética)

Estudio preparatorio para el análisis citogenético del
género *Drosera* en Galicia

Estudo preparatorio para a análise citoxenética do
xénero *Drosera* en Galicia

Preparatory study for the cytogenetic analysis of
Drosera genus in Galicia



Directores:

Dr. Manuel Pimentel Pereira.

Dra. Ana María González Tizón

Alejandro Durán Sotuela

Trabajo de Fin de Grado

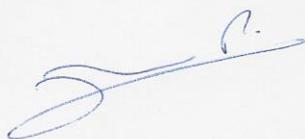
Fecha de defensa:

29/06/2015

TRABALLO FIN DE GRAO

Manuel Pimentel Pereira y Ana María González Tizón autorizan a presentación do traballo de fin de grao “Estudo preparatorio para a análise citoxenética do xénero Drosera en Galicia” realizado por Alejandro Durán Sotuela para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 18 de Xuño de 2015



Asdo.: Manuel Pimentel Pereira



Ana M. González Tizón

Directores do traballo

RESUMEN

El objetivo de este proyecto será dar los primeros pasos que permitan el diseño y la realización de un estudio citogenético para las especies *Drosera intermedia* Hayne y *Drosera rotundifolia* L. Los principales problemas que pretendemos resolver serían: (i) asegurar el mantenimiento de las plantas en el laboratorio de forma que se tenga una fuente constante de ápices radiculares y (ii) asegurar mediante un estudio filogenético que las especies de estudio son un buen modelo para el estudio citogenético. Asimismo se realizaron las primeras pruebas para la observación de los cromosomas.

El cultivo *in vivo* en vermiculita con agua destilada ofreció los mejores resultados, mientras que los *in vitro* resultaron complejos y no ofrecieron resultados satisfactorios. El análisis filogenético mostró que las especies a estudio se encuentran en la misma sección del género *Drosera*, siendo *taxa* próximos pero diferenciados. Se trata de especies adecuadas para realizar estudios citogenéticos que permitirán clarificar la taxonomía y evolución del grupo. Las primeras pruebas citogenéticas realizadas han permitido la observación de cromosomas pero con un elevado nivel de artefactación. Será necesario optimizar el protocolo utilizado para continuar con el estudio.

ABSTRACT

The aim of this project is to take the initial steps in order to be able to conduct a cytogenetic study focused on *Drosera intermedia* Hayne and *Drosera rotundifolia* L. The main problems that we try to solve are: (i) to ensure the maintenance of these plants in the laboratory, obtaining a constant source of root tips and (ii) to ensure, using a phylogenetic study, that these species are a suitable model for a cytogenetic study. In addition to this, we have also performed the first attempts at observing chromosomes in *Drosera*.

The *in vivo* culture with distilled water yielded the best results, in stark contrast with the *in vitro* cultivation, which were very complex and didn't produce any successful results. The phylogenetic analyses showed that these species belong to the *Drosera* section, being closely related but different *taxa*. These species are suitable to develop cytogenetic studies that can help us to unravel the taxonomy and evolution of the group. The first cytogenetic tests allowed us to observe highly altered chromosomes. It would be necessary to improve the used protocols in order to continue with this study.

INDICE

Introducción	1
Objetivos del trabajo	5
Materiales y métodos	6
Resultados	14
Discusión	21
Conclusiones	24
Bibliografía	25

INTRODUCCIÓN

Plantas carnívoras. Características generales y estatus de conservación

Las plantas carnívoras son organismos principalmente fotótrofos que han desarrollado mecanismos de atracción, captura y digestión de pequeños organismos para obtener un aporte extra de nutrientes (Król *et al.*, 2012; Fig. 1A, B). Estas plantas tienden a vivir en ambientes pobres en los que los recursos (sales minerales e iones principalmente) no son suficientes o no están accesibles (Brewer *et al.*, 2011). A menudo la captación de nutrientes a través de la carnivoría es facultativa, estando restringida a épocas de elevado crecimiento o de gran escasez de nutrientes (Ellison & Gotelli, 2009).



Figura 1.- A, *Dionaea muscipula* J. Ellis. Ejemplo de trampa activa. (<http://www.botanicalgarden.ubc.ca/potd/2014/02/dionaea-muscipula.php>) B, *Nepenthes mcfarnalei* Hemsley. Ejemplo de trampa pasiva. (http://www.daepc.org/portal/album.php?cat_id=5&user_id=25).

Si bien el número de plantas carnívoras es discutido, en la actualidad se considera que este supera las 700 especies agrupadas en 12 familias.

El origen evolutivo del “síndrome carnívoro” no está muy claro debido a la escasez de las plantas carnívoras en el registro fósil (las estructuras de captura de las presas suelen ser hojas modificadas que rara vez se fosilizan). Se trata sin embargo de un proceso de convergencia evolutiva, ya que las plantas carnívoras pertenecen a linajes muy diferentes de dicotiledóneas (Król *et al.*, 2012).

Debido a los hábitats que ocupan, estas plantas desarrollaron una serie de adaptaciones (Darwin, 1875):

- Atracción de presas mediante olores, néctares y colores vistosos.

- Captura mediante hojas modificadas que actúan como trampas. Esta adaptación genera una gran dicotomía en las plantas carnívoras, diferenciando (Król *et al.*, 2012):
 - a) Plantas carnívoras con trampas activas (Fig. 1A). Las menos comunes. Cazan a sus presas con movimientos, dejándolas encerradas y evitando así que puedan escapar. Destacan trampas adhesivas (ejemplo *Drosera*), trampas de succión (ejemplo *Utricularia*) y trampas de cebo (ejemplo *Dionaea*).
 - b) Plantas carnívoras con trampas pasivas (Fig. 1B). Aquellas que no producen ningún tipo de movimiento para la captura. Usan principalmente líquidos y sustancias pegajosas. Destacan las trampas de jarra (ejemplo *Nepenthes*).
- Mecanismos de digestión. Podemos diferenciar dos grandes tipos: mecanismos de digestión enzimáticos y digestión mediante bacterias.
- Absorción de nutrientes a través de las hojas. Es un carácter existente en todas las angiospermas. Se ha desarrollado especialmente en las plantas carnívoras (Adamec, 2002).

Diversos factores contribuyen a que más de la mitad de las plantas carnívoras se consideren en la actualidad amenazadas (Jennings & Rohr, 2010): su coleccionismo (Luken, 2005); su uso farmacológico (Banasiuk *et al.* 2012); la pérdida de hábitat (Brinson & Malvárez, 2002) y el elevado coste energético del desarrollo de estrategias de captura y digestión de organismos, lo que las hace poco adaptables (Ellison & Gotelli 2009).

En un contexto de pérdida de biodiversidad, será esencial conocer la taxonomía de los géneros y familias con el fin de identificar las unidades evolutivas a proteger (Mace, 2004). Esta tarea será especialmente urgente en el caso de grupos en los que el nivel de amenaza sea especialmente alto, como las plantas carnívoras. Los estudios citogenéticos serán una herramienta fundamental en esta tarea.

Género Drosera

Está constituido por plantas herbáceas perennes, rizomatosas con raíces adventicias con un tallo aéreo más o menos robusto (a veces trepador). Las hojas en roseta basal, las caulinares están muy reducidas, generalmente alternas, su forma puede variar desde suborbiculares a obovadas u ovo-lanceoladas. Las hojas presentan pecíolo, siendo este más largo que el limbo. Son redondeadas en el ápice y están cubiertas por el haz de pelos glandulíferos quimionásticos de tres tipos: marginales y muy largos (tentáculos), intramarginales y centrales (Paiva, 1997).

Cada planta forma entre 1-4 inflorescencias, con 1-3 cimas racemiformes, circinadas, paucifloras y ebracteadas. Flores de antesis fugaz, muchas veces cleistógamas. El cáliz presenta generalmente 5 lóbulos profundos (a veces 4 u 8). Flores de cinco pétalos (aunque hay casos con 4 u 8 pétalos), marcescentes, blancos. Estambres en número igual al de los pétalos. Gineceo con 3 carpelos y 3 estilos profundamente bífidos, con estigmas capitados y claviformes. Fruto dehiscente por 3 valvas. Semillas fusiformes, lisas, reticuladas o tuberculadas, raramente aladas (Paiva, 1997).

Los caracteres más usados para el estudio taxonómico de *Drosera* han sido su hábitat, la forma de la hoja, el número de estilos y su morfología, así como la presencia o ausencia de estípulas y yemas de crecimiento vegetativo (Paiva, 1997; Rivadavia *et al.*, 2003). En las últimas décadas, nueva información como el número de cromosomas, la morfología del polen y la presencia y composición de los metabolitos secundarios han sido añadidos a esta clasificación (Seine & Barthlott, 1994). A pesar del elevado número de caracteres empleados, la delimitación de los distintos subgéneros, secciones y especies de *Drosera* continúan siendo controvertida. Asimismo, las relaciones filogenéticas son bastante ambiguas debido a que en estos trabajos existe la tendencia a seleccionar algunas especies de cada sección del grupo, lo que no permite establecer unas relaciones filogenéticas generales para *Drosera* (e.g. Rivadavia *et al.*, 2003).

Drosera rotundifolia y *Drosera intermedia*

El género *Drosera* está representado en Galicia por dos especies, *D. rotundifolia* y *D. intermedia* (Fig. 2 A & B).



Figura 2.- A, *D. rotundifolia*. Hoja corta y orbicular (<http://www.juventudrebelde.cu/multimedia/fotografia/telefonía-insectívora-de-insectos/drosera-rotundifolia/>) B, *D. intermedia*. Hoja delgada y lanceolada (http://www.pabxks.com.br/plantas_carnívoras/images/intermedia.jpg).

Ambas especies son morfológicamente similares y se considera que están próximas evolutivamente, lo que se manifiesta en su capacidad de hibridación, siendo los híbridos

a menudo viables (Paiva, 1997). La diferenciación entre estos *taxa* diploides se ha venido estableciendo en base a la forma de sus hojas, siendo alargadas en *D. intermedia* (Fig. 2A), y redondeadas y achatadas en *D. rotundifolia* (Webb, 1964) (Fig. 2B). Sin embargo, la existencia de formas intermedias hace difícil el establecimiento de unidades de conservación coherentes (Mace, 2004).

Los estudios citogenéticos resultan muy útiles para el establecimiento de las relaciones taxonómicas y evolutivas entre grupos de plantas muy relacionados entre sí y en los que los procesos de reticulación son comunes (e.g. Betekhtin *et al.*, 2014). Asimismo, son herramientas especialmente útiles en la clarificación de la taxonomía en complejos de especies en proceso de diferenciación (e.g. Catalán *et al.*, 2012).

Estudios citogenéticos

Los estudios citogenéticos en plantas han permitido resolver numerosos problemas evolutivos y taxonómicos (Hoshi & Kondo 1998). Sin embargo, pocos trabajos se han centrado en nuestras especies de estudio. Así, en nuestra búsqueda bibliográfica encontramos únicamente tres trabajos (Tabla 1).

Tabla 1.- Resumen de estudios citogenéticos en *D. intermedia* y *D. rotundifolia*.

	Técnicas de bandeo	Número de cromosomas	Autor/es
<i>Drosera</i> (20 spp.)		2n= 20, 32, 40	Rivadavia <i>et. al.</i> (2005)
Spp. <i>rotundifolia</i>	Fluorocromos	2n= 20	Kondo (1969), Hoshi & Kondo (1998)
Spp. <i>intermedia</i>	Fluorocromos	2n=20	Kondo (1969), Hoshi & Kondo (1998)

La realización de las técnicas citogenéticas permitiría resolver los problemas taxonómicos en el complejo *D. rotundifolia/D. intermedia*. Sin embargo, los estudios citogenéticos pueden conllevar problemas que limiten su aplicación en especies vegetales. Algunos de estos problemas son:

- Las técnicas citogenéticas requieren muchos ápices jóvenes de la raíz, lo que en plantas de pequeño tamaño y bajas tasas de crecimiento puede conllevar la muerte de las plantas. La recolección continua de nuevos individuos puede suponer la disminución de las poblaciones naturales. Asimismo, la obtención de ápices a partir de plantas recogidas directamente del substrato es complicada por la gran cantidad de sedimentos adherida a las raíces.

- La hibridación de regiones cromosómicas o del genoma completo sólo se puede realizar entre especies próximas (Singh, 2002). La incertidumbre filogenética desaconseja el comienzo de este tipo de análisis que son costosos temporal y económicamente. Por otro lado, la homogeneidad morfológica del género *Drosera* (relacionada probablemente con las elevadas presiones selectivas del medio en el que viven) oculta una elevada diversidad genética y taxonómica (Rivadavia *et al.*, 2003).

En este trabajo planteamos un estudio preliminar para la realización de un análisis citogenético en el complejo *D. intermedia/D. rotundifolia*. Intentaremos resolver las cuestiones previas que decidirán si el estudio puede llevarse a cabo sin que suponga una carga elevada sobre las poblaciones. Así pues, los objetivos planteados son los siguientes.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

- a) Desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* y cultivos *in vivo* (cultivo de plantas completas en sustrato no estéril) que nos permitan una fuente continua de material.
- b) Determinar la posición filogenética (marcadores nucleares y plastídicos) de algunas poblaciones de *D. intermedia* y *D. rotundifolia*, candidatas para el estudio citogenético.
- c) Realización de las primeras pruebas del estudio citogenético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material

Realizamos tres recolecciones de material en poblaciones naturales de *Drosera* en Galicia (Tabla 2). Se recogieron 30 individuos por localidad.

Tabla 2.- Localidades de donde se obtuvo el material empleado. Se indica la localidad (con sus coordenadas), la fecha de recolección y las especies recolectadas en cada localidad.

Localidad y coordenadas geográficas	Fecha	Especie recolectada
Turbera de Labrada, Abadín, Lugo 43°N 24' 36,42'' / 007°W 29' 33,98''	27/09/14	<i>D. rotundifolia</i>
Encoro de San Xoan, Guitiriz, Lugo 43°N 23' 27,38'' / 007°W 55' 32,53''	09/02/15	<i>D. intermedia</i>
Encoro de San Xoán, Guitiriz, Lugo 43°N 23' 27,38'' / 007°W 55' 32,53''	07/03/15	<i>D. intermedia</i>

Las localidades se seleccionaron en base a sus características ambientales, favorables para el crecimiento de las especies objetivo (Encoro de San Xoán, Guitiriz, Lugo). Asimismo, se comprobó la existencia de los taxa en las localidades mediante la consulta de bases de datos (base de datos del Herbario de la Universidad de Santiago de Compostela; Turbera de Labrada, Abadín, Lugo).

Para recolectar el material nos ayudamos de una navaja, con la que se extrajo la planta junto al suelo sobre el que crecía. De esta forma se evitaron los daños en la planta producidos por el arranque mecánico. El material recolectado se llevó a la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña. A continuación, los fragmentos de suelo y las plantas se introdujeron en bandejas de plástico, llenándose los espacios vacíos con arena. Finalmente, las bandejas se llenaron de agua destilada y se depositaron en una cámara de cultivo bajo las siguientes condiciones: Temperatura: 22°C día/20°C noche; ciclo de luz/oscuridad: 16 horas luz/8 horas oscuridad.

Cultivos in vivo

Los cultivos *in vivo* se han realizado únicamente para la especie *D. intermedia*, aquella para la que se disponía de mayor cantidad de material, en vermiculita (Fig. 3; granulometría 0,5-3 mm; Projar, Valencia) y con distintos regímenes de abonado. La vermiculita es un mineral con alta capacidad de aislamiento térmico que se utiliza para la germinación de las semillas. Mezclado con otro tipo de sustratos, ayuda a mejorar la aireación y el drenaje. Colocamos una capa de vermiculita en las bandejas de plástico y la embebemos en una preparación líquida durante unos minutos. Se emplearon los

siguientes tratamientos: (i) vermiculita embebida en agua destilada; (ii) embebida en una solución de abono general (Globalplant; nitrógeno 3%, pentóxido de fósforo 3%, óxido de potasio 3%, micronutrientes: B, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn; INBISA, Barcelona) al 0,05%; (iii) embebida en una solución de abono (Globalplant; INBISA, Barcelona) al 0,5% y (iv) vermiculita embebida en agua comercial con una concentración controlada de sales minerales. El abono empleado presenta la siguiente concentración: Nitrógeno 3%, pentóxido de fósforo 3%, óxido de potasio 3%, micronutrientes solubles en agua: B, Cu, Fe, Mn, Mb y Zn. Por su parte, el agua comercial usada presenta los siguientes componentes: Ca: 86,1 mg/L; Mg: 22,5 mg/L; Na: 8,1 mg/L y bicarbonatos 312 mg/L.



Figura 3.- Ejemplo de planta de *Drosera intermedia* en el medio de cultivo con vermiculita.

Las plantas de *D. intermedia* se retiraron del suelo recolectado con la ayuda de pinzas. Los trozos de suelo arrastrados por las raíces se retiraron cortando las mismas y las plantas se lavaron bajo el grifo. Seguidamente, las plantas se colocaron en la vermiculita (Fig. 3). Los cultivos se mantuvieron saturados en medio líquido durante 5 semanas, y semanalmente se anotó el número de plantas que se mantenían en el cultivo. Se mantuvieron dos líneas de plantas diferentes (todos los medios de cultivo en cada una de las líneas). Una de ellas se empleó en la obtención de ápices radiculares para las pruebas citogenéticas, con lo que estaba sometida a perturbaciones continuas. Por su parte, la segunda línea se mantuvo intacta para comprobar la eficacia del procedimiento. En la primera línea se emplearon entre 4 y 9 plantas por tratamiento, mientras que en la segunda se emplearon 15. Las bandejas se mantuvieron en cámara de cultivo (temperatura, 22°C día/20°C noche; 16 horas de luz y 8 de oscuridad).

Cultivo in vitro. Medios de cultivo

Se han probado distintos medios de cultivo utilizados con éxito en la replicación *in vitro* de explantos (fragmentos de órganos vegetativos de la planta; Smith, 2013) y semillas, tanto de *Drosera* (Anthony, 1992; Bobák *et al.*, 1995; Jayaram & Prasad, 2007) como de otras angiospermas (e.g. Taji *et al.*, 2002; Rathore *et al.*, 2013; Smith, 2013).

En todos los casos el medio empleado ha tenido como principal constituyente la preparación de Murashige y Skoog (MS; Sigma-Aldrich, San Luís, USA) empleada a una concentración de 0,5X. Esta preparación presenta una elevada concentración de sales minerales y vitaminas esenciales (Smith, 2013). Asimismo, los medios presentaban una concentración de sacarosa y agar de 30g/l y 7,5 g/l, respectivamente (Tabla 3). Los aspectos variables de los medios empleados han sido: (i) la hormona Kinetina, de la familia de las citoquininas, que promueve la división celular (Amasino, 2005); (ii) las vitaminas de Morel (Smith, 2013), mezcla que incluye los siguientes elementos: mio-inositol, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, biotina y pantotenato cálcico, vitaminas que influyen en el crecimiento (componentes adquiridos en Sigma-Aldrich, San Luís, USA; Smith, 2013) y (iii) caseína (Sigma-Aldrich, San Luís, USA), fuente de aminoácidos, Ca y P (Chaturvedi *et al.*, 2007). Los distintos medios empleados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3.- Medios de cultivo. i) Medio sin hormona ni vitaminas. ii) Medio con vitaminas y caseína. iii) Medio con hormona (kinetina) sin vitaminas ni caseína. En todos los medios están presentes MS, agar y sacarosa.

Componente	Concentración
MS (i) (ii) (iii)	4,43 gr/L
Agar (i) (ii) (iii)	7,5 gr/L
Sacarosa (i) (ii) (iii)	30 gr/L
Vitaminas del Morel (ii)	1 ml/L
Caseína (ii)	0,250 gr/L
Kinetina (iii)	1 ml/L

El método de preparación del medio es igual en todos los casos salvo en los medios con vitamina y/u hormona, y se describe en Smith (2013).

En medios con hormona, en primer lugar se prepara la kinetina según Smith (2000). A continuación se añade al medio la cantidad de stock de kinetina necesaria para alcanzar la concentración final. Esto puede hacerse antes del autoclavado por la resistencia de la hormona a las altas temperaturas.

En aquellos medios con vitaminas del Morel y caseína, cuando la mezcla comienza a enfriar (tras su autoclavado) la llevamos a una cámara de flujo laminar y añadimos la mezcla de vitaminas. El autoclavado de las vitaminas podría conllevar su pérdida de función. El reparto del medio se realizó en cámara de flujo laminar y en botellas esterilizadas por autoclavado.

Una vez preparado el medio se realiza la introducción de los explantos (o de las semillas). Al tratarse de medios ricos en nutrientes será necesario establecer una serie de

protocolos de esterilización de los explantos y semillas para evitar la contaminación por hongos o bacterias que puedan tener adheridos a su superficie (o en su interior, Smith, 2013). Hemos realizado dos tipos de protocolos de esterilización, ambos basados en el uso de hipoclorito de sodio (Panreac AppliChem, Darmstadt, Alemania) a distintas concentraciones.

A) Protocolo 1 (Smith, 2013).

Se aplicó a plantas enteras (una vez cortadas las raíces) y a explantos. Consistió en la realización de: (i) lavado de la muestra en agua jabonosa; (ii) inmersión en hipoclorito de sodio (más dos gotas de tween 20) al 1% durante 10 minutos (plantas enteras) o 5 minutos (explantos) y (iii) 5 lavados en agua destilada para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

B) Protocolo 2 (Anthony, 1992).

Se aplicó únicamente a explantos. Consistió en la realización de los siguientes lavados: (i) 5 minutos en hipoclorito de sodio (más dos gotas de tween 20) al 1% durante 5 minutos y (ii) tres lavados de 5 minutos en agua destilada.

El protocolo 1 se aplicó a los explantos cultivados en los medios ii y iii (Tabla 3); mientras que ambos métodos de desinfección se emplearon en el medio i. Esta irregularidad se debió a que el protocolo 2 de desinfección (y el medio i de cultivo) se localizaron en una revisión bibliográfica posterior a los primeros ensayos con los medios ii y iii. Los explantos, una vez desinfectados, se depositaron en el medio estéril y se guardaron en cámara de cultivo (temperatura, 22°C día/20°C noche; 16 horas de luz y 8 de oscuridad; Fig. 4).



Figura. 4.- Botellas con explantos y medio de cultivo.

El trabajo con semillas tiene la ventaja de que las diásporas de los posibles contaminantes están solo presentes en la superficie, ya que en su interior está estéril y

por lo tanto, en caso de que ocurra una germinación, si hemos esterilizado en superficie, la plántula resultante va a estar completamente estéril. El protocolo de esterilización de las semillas se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar y consistió en la introducción de estas en una disolución de hipoclorito de sodio al 3% (50 minutos). Se observa una pérdida de coloración de las semillas. A continuación se realizan 5 lavados en agua destilada.

Se han realizado un total de 52 cultivos (más dos botellas en las que no se introdujo el explanto, ambas con medio i):

- Cultivos de explantos: 28 en el medio i, 11 en el medio ii y 7 en el medio iii. En todos los casos la planta cultivada fue *D. intermedia* excepto 2 de los cultivos del medio ii, que se realizaron con *Drosera* sp. Asimismo, en cuatro de los cultivos realizados en el medio ii el explanto estaba constituido por la planta completa (una vez retiradas las raíces), mientras que los restantes explantos estaban constituidos por hojas jóvenes. Los códigos de los medios se explican en la Tabla 3.
- Cultivos de semillas de *D. intermedia*: se cultivaron 27 semillas en el medio i. Las semillas se obtuvieron de la empresa *Carnivore Plants* (<http://www.carnivoreplants.co.uk/>).

Estudios filogenéticos

Extracción y cuantificación de ADN

Se realizó la extracción de un total de cuatro plantas, dos de *D. intermedia* recogidas en el Encoro de San Xoán (Guitiriz, Lugo) y dos de *D. rotundifolia* recogidas en la turbera de Labrada (Abadín, Lugo). La homogeneización del material se realizó con mortero y utilizando nitrógeno líquido. Para la extracción del ADN usamos el DNeasyPlant Mini Kit (Quiagen, Düsseldorf, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante.

La comprobación de la calidad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Para su cuantificación empleamos el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, USA).

Amplificación, revelado y secuenciación

Se han seleccionado dos regiones genéticas diferentes para el estudio, la región nuclear del ADN ribosomal multicopia (18S, ITS1, 5,8S, ITS2, 28S) y la región cloroplástica *rbcL* (ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxigenase). Se seleccionó una región cloroplástica y otra nuclear con el objetivo de observar posibles discrepancias entre la evolución de los distintos linajes celulares (e.g. Pimentel *et al.*, 2013). Las distintas regiones fueron seleccionadas por ser las más comunes en las bases de datos públicas y por su facilidad de amplificación.

Las condiciones de amplificación para el ADNr nuclear fueron las descritas por White *et al.* (1990), empleando los primers ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990). La mezcla final de la PCR (Polymerase Chain Reaction) tuvo un volumen de 25 µl, con 15,19 µl de agua destilada, 2,5 µl de Buffer 10X, 0,75 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl de dNTPs (10mM); 2,5 µl de cada primer, 0,06 µl de Taq polimerasa (5 U/µl; NZYTech, Lisboa, Portugal); y 1 µl de ADN. El programa de PCR consistió en: un paso de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 60 segundos a 94°C, una fase de anillamiento de 60 segundos a 53°C, y una extensión de 60 segundos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 10 minutos a 72°C. Para la amplificación de la región cloroplástica *rbcL* hemos seguido el protocolo de Hasebe *et al.* 1994. La amplificación de la molécula se realizó en tres partes, empleando los primers aF, AR, bf, BR, SR (Hasebe *et al.*, 1994). La mezcla final de PCR tiene un volumen de 25 µl, con 16,25 µl de agua destilada, 2,5 µl de Buffer 10X, 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl de dNTPs (10mM); 1 µl BSA (1%; Sigma-Aldrich, San Luís, Missouri, USA); 2,5 µl de cada primer, 0,06 µl de Taq polimerasa (5 U/ µl; NZYTech, Lisboa, Portugal); y 1µl de ADN. Para la amplificación se ha empleado el protocolo de Shaw *et al.* (2005) *Coldslow* que incluye los siguientes pasos: desnaturalización de 60 segundos a 80°C, seguido de 30 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 50°C con un incremento de 0,3°C por ciclo y una fase de extensión de 4 minutos a 65°C. Tras los 30 ciclos hay una última fase de extensión de 5 minutos a 65°C.

Los resultados de las amplificaciones se comprobaron mediante geles de agarosa al 1%, a los que se añade un marcador de peso molecular (MarkerLadder VI, NZYTech, Lisboa, Portugal) para verificar las secuencias y su tamaño. La secuenciación se llevó a cabo en el *Servizo de Bioloxía Molecular de la Universidade da Coruña*.

Análisis filogenéticos

Las secuencias que hemos empleado para el estudio filogenético tienen dos orígenes:

1. Bases de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Se descargaron todas las secuencias de las regiones seleccionadas pertenecientes al género *Drosera* con el objetivo de realizar una filogenia lo más completa posible. Asimismo, se descargaron secuencias del género *Aldrovanda* (Droseraceae) que se emplearon como grupos externos con los que enraizar la filogenia.
2. Secuenciaciones realizadas. Las lecturas *forward* y *reverse* fueron ensambladas usando el programa CodonCode Aligner v. 4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA).

Una vez construidas las matrices de secuencias se realizó un alineamiento mediante el algoritmo Muscle tal y como está implementado en los programas MEGA V.6 (Tamura *et al.*, 2013) y Seaview (Gouy *et al.*, 2010). Con cada alineamiento se construyó una matriz de secuencias en formato *fasta*. Ante la alta variabilidad observada en el alineamiento del ADNr se optó por construir una nueva matriz con las partes más estables de esta región, concretamente 18S parcial, 5,8S ITS2 y 28S parcial. El criterio de optimización empleado en el estudio filogenético fue la máxima parsimonia. Este método realiza una ordenación de las muestras según su semejanza evolutiva buscando la solución que requiera un menor número de cambios nucleotídicos (e.g. Lemey *et al.*, 2009). La filogenia se construyó usando el software PAUP v.4 (Swofford, 2000). Se realizó una búsqueda con 1000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva (*random addition sequence replicates*) usando una permutación de ramas tipo TBR (*Tree bisection reconnection*). Además empleamos el algoritmo *branch and bound* para aumentar la eficacia de las búsquedas. La fiabilidad de los nodos de la filogenia se estableció mediante la técnica del *bootstrap* con 1000 réplicas. Los árboles construidos se representaron con FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2012).

Estudios citogenéticos preliminares

Se trabajó con ápices radiculares (Fig. 5) de las plantas obtenidas de la naturaleza y cultivadas en vermiculita. Se trata de las estructuras más adecuadas para la obtención de metafases por su crecimiento continuo. La recolección de raíces se realizó en diversos momentos del día para evaluar la actividad meristemática.



Figura 5.- Ápice radicular de *D. intermedia*.

Los primeros ensayos de obtención de metafases se realizaron siguiendo el protocolo de Junichi *et al.* (2011). En este proceso se exponen los ápices a un tratamiento de dos horas en 8-hidroxiquinolina (2 mM) a T^a ambiente (21-22°C), luego se mantienen en fijador de Carnoy (Alcohol absoluto:ácido acético en proporción 3:1) hasta su uso. Tras este tratamiento inicial usamos una solución enzimática para atacar la pared celular de las células vegetales (Junichi *et al.*, 2011). Las enzimas empleadas fueron: (i) celulasa

“Onozuka” R10 4% (Yakult, Tokio, Japón) y (ii) macerozoma.R10 2% (incluyendo pectinasa; Yakult, Tokio, Japón). Tras la acción enzimática los ápices se guardaron de nuevo en el fijador de Carnoy hasta su procesado final.

Los ápices tratados con el protocolo de Junichi *et al.* (2011) fueron colocados sobre un portaobjetos y tapados con un cubreobjetos, tras lo cual se realizó el *squash*. Para poder observar los cromosomas en el microscopio de fluorescencia (Nikon Microphot-FXA; Nikon, Tokio, Japón) se tiñó el material con el fluorocromo 4'-6 diamidina-fenil indol (DAPI; Vectashield, Vector, Burlingame, USA). Para proceder a la tinción, se sumergieron los portaobjetos en nitrógeno líquido, y una vez congelados, se retiró el cubreobjetos haciendo palanca con una cuchilla. La tinción con DAPI se realizó colocando 35 μ l de solución DAPI (0,33 μ g/ml) en el portaobjetos durante 20-30 minutos en oscuridad (Schweizer, 1976). Tras esto se lava con agua destilada, se deja secar al aire y se tapa con un cubreobjetos nuevo. Este proceso se realizó con 6 ápices de *D. intermedia* y uno de *A. cepa*.

RESULTADOS

Cultivos in vivo

Los resultados obtenidos en ambas líneas de cultivo (i.e., 15 plantas por tratamiento sin perturbación y 4-9 plantas por tratamiento sometidas a perturbaciones constantes para la obtención de raíces) fueron coherentes, y se explicará lo observado en el experimento no sometido a perturbaciones. En las bandejas con vermiculita embebida en solución de abono al 0,5% se producían la rápida aparición de algas y hongos, además de la muerte de las todas las plantas de *Drosera* en la primera semana. En ninguno de los especímenes cultivados con este tratamiento se formaron ápices radiculares.

Las bandejas con la solución de abono al 0,05% producían la muerte de las plantas a lo largo de dos semanas: tres plantas murieron en la primera semana y doce en la segunda (aparición de hongos y algas). Se pudo estudiar la evolución de los ápices en únicamente dos plantas. Se observó que no aparecían ápices jóvenes sanos, únicamente había raíces viejas que no estaban en crecimiento (Fig. 6).



Figura 6.- Planta de *Drosera intermedia* cultivada con un régimen de abono diluido al 0.05% con numerosas raíces de color pardo y sin crecimiento activo.

Las plantas cultivadas en vermiculita embebida en agua mineral (Ca: 86,1 mg/l, Mg: 22,5 mg/l, Na: 8,1 mg/l y bicarbonatos: 312 mg/l) tuvieron una duración mayor, murieron tres a la tercera semana de cultivo, seis en la cuarta semana y tres en la quinta (fin de experimento; tres plantas estaban vivas al final del experimento). En este caso se observaba la aparición de pequeños ápices radiculares claramente activos (Fig. 7).

En las bandejas con agua destilada se observó que a las cinco semanas de duración del cultivo ninguna de las plantas había muerto. Además, el estudio del desarrollo de raíces mostraba que en todas las plantas estudiadas se habían desarrollado ápices (Fig. 8).



Figura 7.- Pequeño ápice en desarrollo en planta de *Drosera intermedia* cultivada en vermiculita embebida en agua mineral.



Figura 8.- Planta de *Drosera intermedia* cultivada en vermiculita embebida en agua destilada con raíces y ápices activos.

Cultivos in vitro.

Realizamos un total de 52 cultivos *in vitro* con las diferentes recetas planteadas en el apartado de metodología. En ninguno de los cultivos realizados se observó proliferación de los tejidos del explanto (o germinación de las semillas), produciéndose o bien la contaminación del medio o la muerte del explanto.

En los cultivos realizados con los medios ii y iii (Tabla 3), todos excepto 2 acabaron contaminándose en las primeras 5 semanas del experimento. En los dos casos donde no se produjo contaminación tampoco hubo proliferación, produciéndose la muerte del explanto. No se observaron diferencias entre el resultado del cultivo empleando hojas o

plantas enteras como explanto. Las pruebas realizadas con el medio i tampoco tuvieron éxito, independientemente del procedimiento de desinfección elegido. En todos los casos se produce la contaminación (Fig. 9A) o la muerte de los explantos (Fig. 9B).

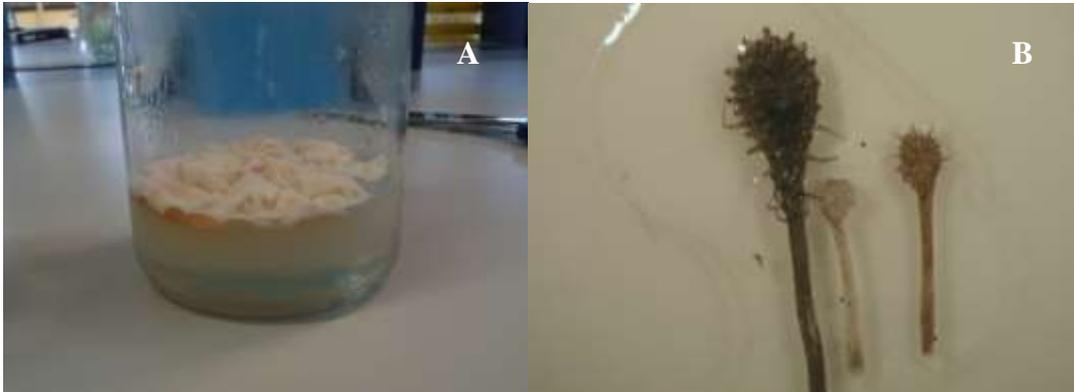


Figura 9.- A, cultivo contaminado por hongos; B, explantos no contaminados pero no viables.

De las tres botellas con medio de cultivo pero sin explanto, la autoclavada no se contaminó, mientras que de las no autoclavadas en una se observó crecimiento fúngico pero no en la otra.

Finalmente, si bien los medios en los que se sembraron las semillas no se contaminaron, no se produjo germinación de las mismas tras 11 semanas de cultivo (Fig. 10).



Figura 10.- Semilla extraída del medio de cultivo tras 11 semanas. No se observa desarrollo del embrión.

Estudios filogenéticos.

Los alineamientos empleados en el estudio están constituidos por 114 terminales (80 especies) para el *rbcL* y 61 terminales (53 especies) para el ADNr. Asimismo, la matriz plastídica tenía una longitud de 1428 pares de bases, 224 de las cuales son

parsimoniosamente informativas. Por su parte, la matriz nuclear presentaba 949 pares de bases, 535 de las cuales eran parsimoniosamente informativas.

Topología basada en la región cloroplástica rbcL

El árbol filogenético obtenido del estudio de máxima parsimonia basado en el ADN plastídico (CI, 0.502; RI, 0.902) generó la topología representada en la Fig. 11. El género *Drosera* aparece dividido en 12 secciones con apoyo estadístico *bootstrap* (BS) de moderado a alto. 2 de las secciones son monofiléticas, mientras que la sección *Drosera* es parafilética. Con respecto a los subgéneros, únicamente el subgénero *Regiae* es monofilético (BS 100%), mientras que los subgéneros *Drosera* y *Ergaleium* aparecen mezclados.

Centrándonos en las especies de interés, *D. intermedia* y *D. rotundifolia*, se observa que están situados dentro del mismo clado en el subgénero *Drosera* y en la sección *Drosera*. La muestra de *D. intermedia* recolectada en el Encoro de San Xoán (Guitiriz, Lugo) se agrupa en un clado de apoyo moderado (BS 73%) junto a otras muestras de *D. intermedia* procedentes del ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por su parte, las secuencias procedentes de muestras de *D. rotundifolia* recolectadas en la turbera de Labrada (Abadín, Lugo) aparecen en la misma sección *Drosera* que *D. intermedia*, pero su posición no está resuelta en el árbol filogenético plastídico (Fig. 11). Las secuencias de *D. rotundifolia* obtenidas del ncbi ocupan una posición idéntica.

Topología basada en la región nuclear ADNr.

Los resultados obtenidos en el estudio filogenético basado en las secuencias de ADNr (Fig. 12; CI, 0.421; RI, 0.727) son parcialmente coincidentes con los centrados en el ADN plastídico. La distribución de las secciones y subgéneros es completamente coincidente, y las pequeñas diferencias se centran en las posiciones de *D. rotundifolia* y *D. intermedia*.

Es importante señalar que no se consiguieron secuencias de *D. intermedia* a partir de los materiales recolectados en Galicia. Las secuencias de *D. rotundifolia* obtenidas en este estudio se agrupaban con un alto apoyo estadístico con las descargadas del ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (BS: 93%), si bien la posición de la especie en su conjunto no queda bien resuelta. Con respecto a *D. intermedia*, las secuencias obtenidas del ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) forman parte de un grupo con apoyo estadístico moderado (BS: 55%) dentro de la sección *Drosera*. El análisis filogenético realizado con la fracción más estable del ADNr (18S parcial, 5,8S, ITS2 y 28S parcial) no mejoró la resolución del árbol nuclear, por lo que no se muestra.

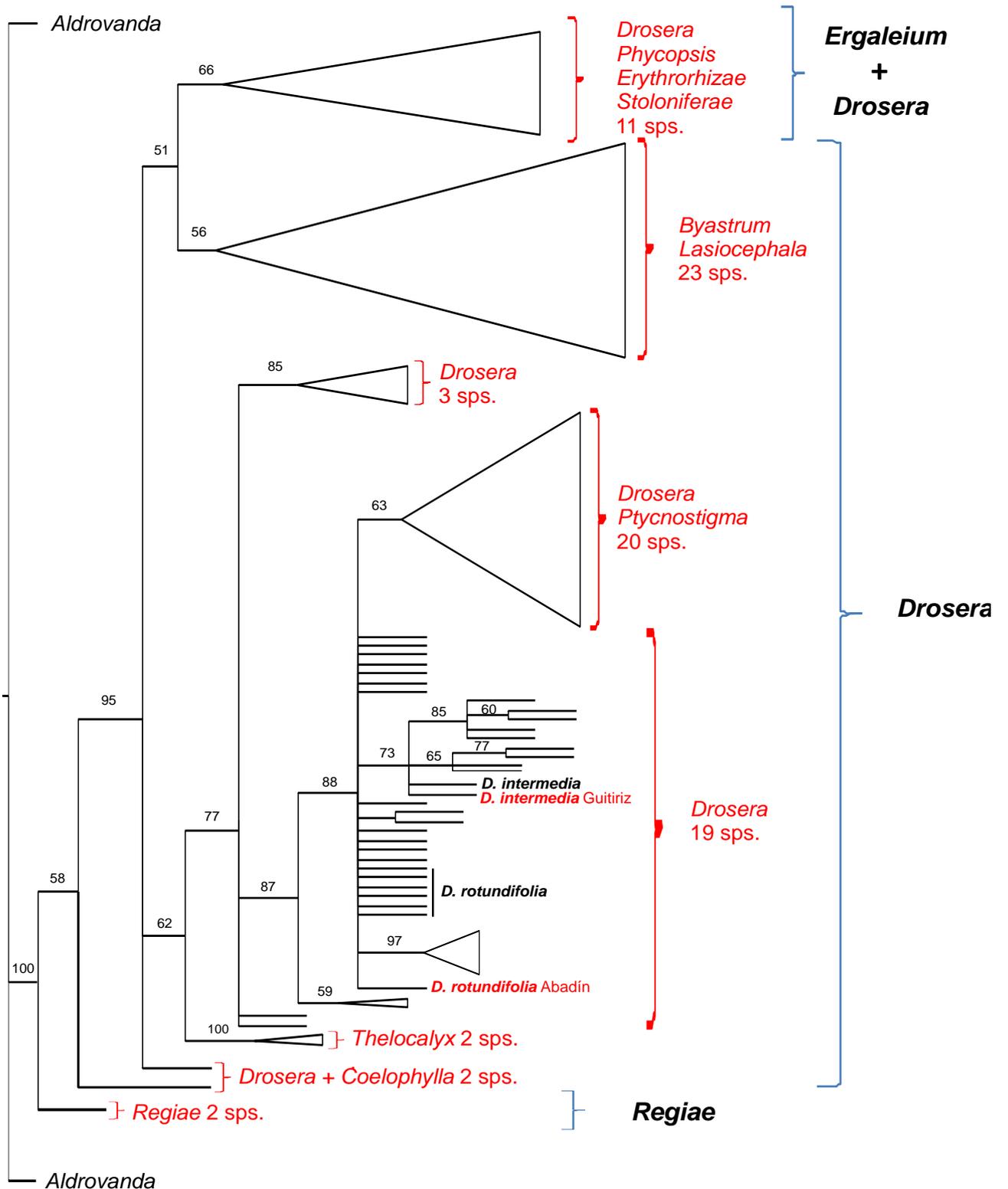


Figura 11.- Árbol filogenético baseado en la secuencia cloroplástica *rbcL* y obtenida mediante máxima parsimonia. Los valores de apoyo estadístico *bootstrap* figuran encima de las ramas. Las secciones del género *Drosera* se escriben en rojo, los subgéneros en negro.

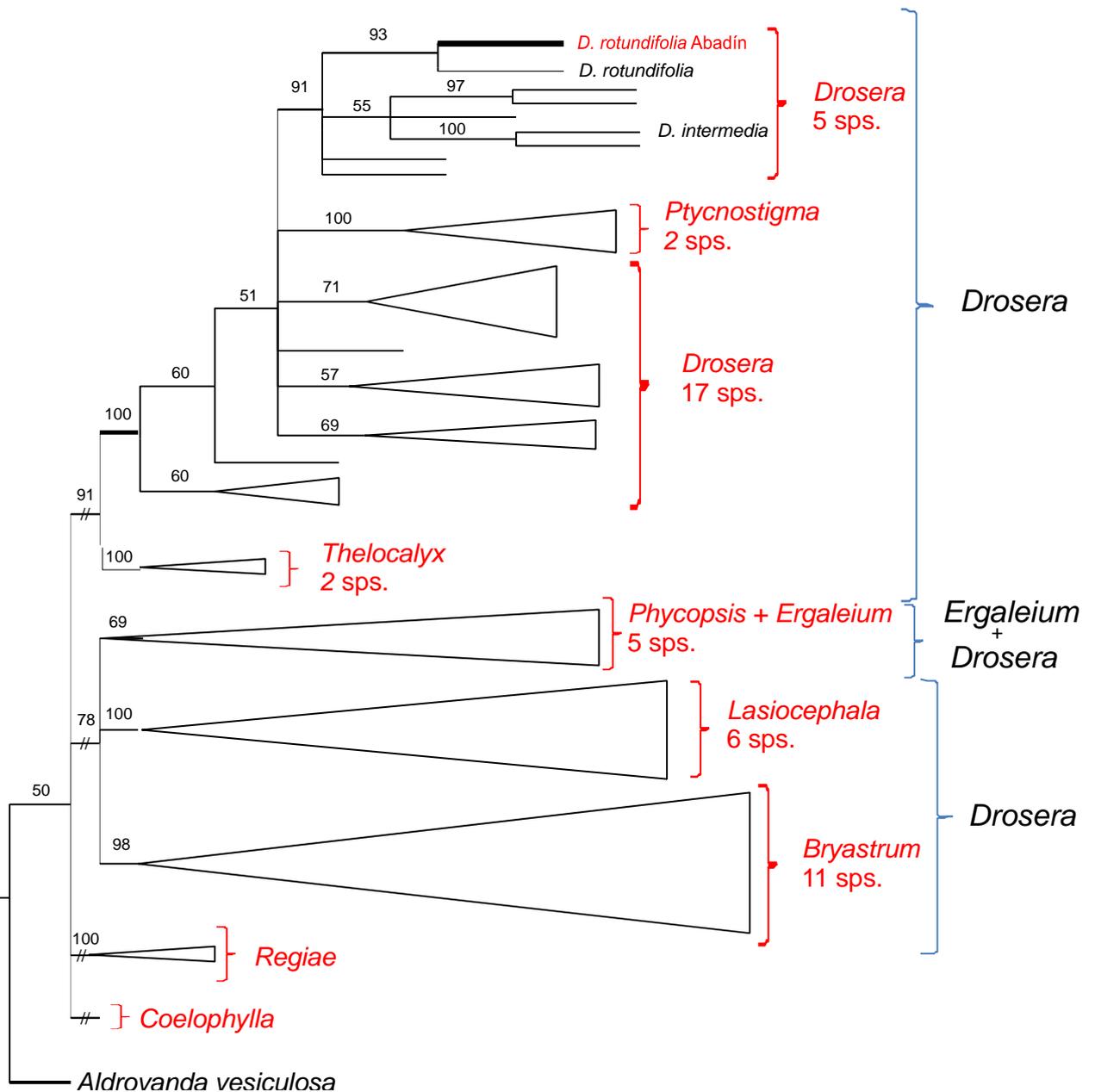


Figura 12.- Árbol filogenético basado en el ADNr y obtenida mediante máxima parsimonia. Los valores de apoyo estadístico *bootstrap* figuran encima de las ramas. Las secciones del género *Drosera* se escriben en rojo, los subgéneros en negro. // representa ramas reducidas para su representación.

Primeras tentativas en citogenética.

Se realizaron un total de dos observaciones distintas con ápices de *D. intermedia* y *A. cepa*. En una primera experiencia se tiñeron seis ápices (tres de cebolla y tres de *D. intermedia*) recolectados a las 16 horas. En la observación se observó poca actividad mitótica en la zona apical del ápice, siendo lo más abundante núcleos celulares que no

se habían llegado a lisar con el *squash* (Fig. 13A). No se observó ningún cromosoma condensado.

La segunda prueba consistió en una tinción de seis ápices de *D. intermedia* que fueron recolectados a primera hora de la mañana (9 horas). Todos ellos fueron tratados con el protocolo Junichi *et al.* (2011) y teñidos con DAPI durante 15 minutos. Esta observación mostró que a primera hora de la mañana la actividad mitótica del ápice es mucho mayor. También abundaban núcleos celulares sin lisar, pero se observó lo que se sospecha que son cromosomas de *D. intermedia* bastante alterados por el tratamiento (Fig. 13 B).

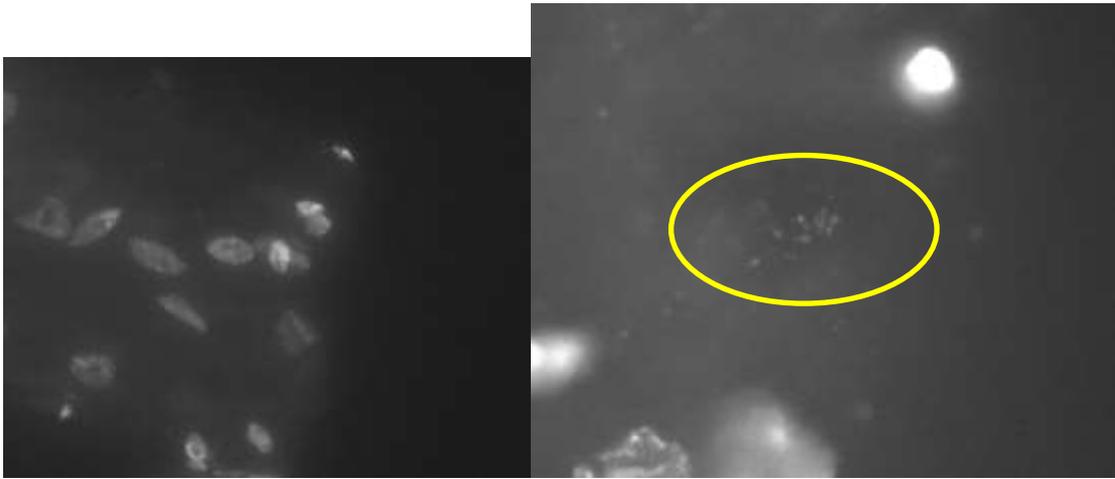


Figura 13.- A, Células apicales de la raíz de *D. intermedia*; B, Cromosomas dispersos de *D. intermedia* (rodeado en amarillo).

DISCUSIÓN

Los cultivos de plantas del género *Drosera* realizados en vermiculita han ofrecido unos resultados marcadamente diferentes dependiendo de las características del medio empleado. Así, con gran claridad el medio más apropiado ha sido el que posee una menor cantidad de nutrientes (vermiculita embebida en agua destilada), lo que coincide con las condiciones de los hábitats de estas especies, zonas a menudo muy ricas en materia orgánica pero en la que esta no está accesible para las plantas (e.g. Król *et al.*, 2012). Asimismo se observó que estas condiciones de cultivo permitían el desarrollo de ápices radiculares con un crecimiento muy activo (Fig. 8). Los restantes tratamientos empleados no permitían (con la excepción parcial de las plantas cultivadas con agua mineral; Fig. 7) el mantenimiento de las plantas a largo plazo, lo que no los hacía adecuados para el objetivo planteado para los cultivos, la consecución de ápices radiculares para el estudio citogenético sin la necesidad de acudir a las poblaciones naturales que están a menudo en regresión (e.g. Jennings & Rohr, 2011).

Ninguno de los cultivos *in vitro* de *Drosera* intentados en este estudio tuvo como resultado la proliferación del tejido del explanto o la germinación de las semillas, y en todos los casos tuvo lugar la contaminación de la muestra o su inactivación. Este mal resultado está en consonancia con lo observado en la bibliografía, donde se registran tasas de éxito muy bajas para el cultivo *in vitro* de *Drosera*, en ocasiones inferiores al 10% (Anthony, 1992; Bobák *et al.*, 1995). Si bien los resultados obtenidos no permiten sacar conclusiones claras, las pruebas realizadas indican que:

-La esterilización del explanto (o la semilla) es clave en el proceso de cultivo *in vitro* (e.g. Smith, 2013). En nuestro caso los resultados obtenidos señalan que los métodos han sido claramente inadecuados. Si bien han permitido eliminar la presencia de contaminantes en varios de los explantos cultivados, en estos casos se ha producido la pérdida de viabilidad del mismo (Fig. 9B, 11). La abundancia de glándulas y la facilidad de captación de nutrientes a través de las hojas que caracteriza al género *Drosera* lo hace especialmente delicado a la hora de realizar las esterilizaciones (Jayaram & Prasad, 2007).

-Se ha observado que no se produce contaminación en los medios autoclavados en los que no se introdujo explanto, así como tampoco en los medios en los que se intentó cultivar semillas. Esto podría indicar que la introducción del explanto es el punto clave en el que se produce la contaminación del cultivo, y que los contaminantes surgen del interior del explanto más que de su superficie.

En el marco de los objetivos planteados en este trabajo (estudio preparatorio para la realización de un análisis citogenético en el género *Drosera*), claramente nos decantaríamos por los cultivos *in vivo* en vermiculita embebida en agua destilada frente

a la opción de los cultivos *in vitro*. Además de por los resultados obtenidos, los cultivos *in vivo* en vermiculita con agua destilada presentan las siguientes ventajas:

1. Baratos.
2. Sencillos de diseñar.
3. Fáciles de manipular.
4. Ocupan poco espacio y permiten que dentro de una misma bandeja se coloquen numerosas plantas.
5. No se necesita un tratamiento de esterilización de la planta.
6. No se contaminan fácilmente.
7. Permiten la extracción repetida de la planta del medio para la recolección de los ápices y su reintroducción en el cultivo sin la necesidad de realizar pasos de re-esterilización.

Las filogenias construidas en base a la región cloroplástica *rbcL* (Fig. 12) y al ADNr (Fig. 12) son coincidentes con lo observado por Rivadavia *et al.* (2003). Las secciones tradicionalmente aceptadas para el género *Drosera* y que están representadas en los árboles filogenéticos son mayoritariamente monofiléticas en la topología basada en el ADN nuclear. Por contra, únicamente algunas de las secciones basales (*Thelocalyx*, *Regiae*) son monofiléticas según la topología plastídica (Fig. 12). Con respecto a los subgéneros, solamente el subgénero *Regiae* es monofilético. Ninguna de las filogenias construidas aclara las relaciones entre subgéneros y secciones, algo en lo que también coinciden con los resultados de Rivadavia *et al.* (2003).

En lo que se refiere a las especies en las que se centra el estudio y sobre las que se plantea la posibilidad de realizar el estudio citogenético, las secuencias obtenidas en el marco de este trabajo se agrupan con las secuencias de las mismas especies descargadas del ncbi (Figs. 12, 13). Con respecto a las relaciones entre las especies, ambas están claramente dentro de la sección *Drosera*. La posición filogenética de *D. rotundifolia* no está clara en la filogenia cloroplástica (Fig. 12), mientras que en la nuclear constituye un grupo con un apoyo estadístico alto (BS 93%). Por su parte, *D. intermedia* forma parte de un clado con un apoyo moderado (BS 73% en la filogenia plastídica y BS 55% en la filogenia nuclear). Ambas especies forman entidades próximas pero diferenciadas en la filogenia (si bien los apoyos estadísticos son relativamente bajos). El análisis de un mayor número de fragmentos será necesario para aclarar la topología de las especies del género *Drosera*.

La posición filogenética de las especies de interés dentro del género *Drosera* (próximas pero al menos parcialmente diferenciadas) las convierte en buenas candidatas para un estudio citogenético comparativo. Las técnicas de hibridación cromosómica *in situ* resultan especialmente adecuadas para el estudio de grupos vegetales en los que el proceso evolutivo aún no ha completado su diferenciación (Betekhtin *et al.*, 2014). Este

sería el caso de las especies en las que se centra este trabajo, que coinciden en el número cromosómico, cuya diferenciación morfológica no es completa (rangos solapantes en longitud y forma foliar) y entre las cuales se producen híbridos viables (Paiva, 1997).

Por último, los resultados obtenidos en los análisis citogenéticos no han sido especialmente relevantes. Debido a las limitaciones del tiempo se han realizado pocas pruebas. Se ha observado que el momento de extracción y fijación del ápice es especialmente importante, ya que a primera hora de la mañana la actividad meristemática es mucho mayor y pueden observarse más mitosis. También se han realizado los primeros intentos de obtención de cromosomas los cuales han sido poco relevantes (Fig. 13). Se necesita llevar a cabo un mayor número de pruebas variando distintos parámetros metodológicos.

CONCLUSIONES

- *Drosera intermedia* y *D. rotundifolia* se incluyen en la misma sección del género *Drosera*, siendo especies claramente relacionadas pero diferentes. Ambas taxa presentan complejidad morfológica, capacidad de hibridación y comparten número cromosómico. La realización de un estudio citogenético permitirá analizar las relaciones evolutivas entre estos dos taxa aún no completamente diferenciados. Las poblaciones gallegas analizadas en este trabajo serían adecuadas para la realización del estudio citogenético.
- Los cultivos de *Drosera* en recipientes con vermiculita embebida en agua destilada (cultivos *in vivo*) son idóneos para mantener vivas aquellas plantas obtenidas del medio natural, y además permiten un desarrollo constante de ápices jóvenes para estudios citogenéticos. Esta técnica disminuirá sensiblemente el impacto que la realización de un posible estudio citogenético tendría en las poblaciones naturales de estas plantas carnívoras.
- Los cultivos *in vitro* presentan una gran complejidad de realización y manejo, además de ser caros y de gran susceptibilidad a la contaminación. No resultan adecuados para el objetivo planteado en nuestro estudio.
- La extracción de los ápices radiculares en un futuro estudio citogenético de *Drosera* deberá hacerse a primera hora de la mañana. La tinción con DAPI parece ser adecuada para la observación de los cromosomas en *Drosera*.

CONCLUSIONS

- *Drosera intermedia* and *D. rotundifolia* belong to the same section in genus *Drosera*, being closely related but separate species. These taxa show morphological complexity, they hybridise and share the same number of chromosomes. Conducting a cytogenetic study would allow us to analyse the evolutionary relationships between these taxa not yet completely separated. The Galician populations selected for this study would be adequate for conducting such study.
- *Drosera* cultivation in vermiculite saturated in distilled water (*in vivo* culture) seems to be the right procedure to keep plants from natural populations alive. In addition to this, this technique allows the constant development of new root tips in the plant. The cultivation of plants in vermiculite will considerably reduce the impact that conducting a cytogenetic study might have in the natural populations of these carnivorous plants.
- The *in vitro* cultivation of carnivorous plants is complex and expensive. Besides, explants are very susceptible to contamination. In our view, *in vitro* culture is not adequate for the aims established in this work.
- Excision of root tips to be used in a cytogenetic study must be conducted early in the morning. Staining with DAPI seems to be procedure for chromosome observation in *Drosera*.

BIBLIOGRAFÍA.

- Adamec, L.** (2002). Leaf absorption of mineral nutrients in carnivorous plants stimulates root nutrient uptake. *New phytologist*. 155: 89-100.
- Amasino, R.** (2005). 1955: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone. *Plant Physiology*. 138: 1177-1184.
- Anthony, J.L.** (1992). Propagation of *Drosera* spp. *Hortscience*. 27: 850.
- Banasiuk, R., Kawiak, A. & Krolicka, A.** (2012). In vitro cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*. 93: 87-96.
- Betekhtin, A., Jenkins, G. & Hasterok, R.** (2014). Reconstructing the Evolution of *Brachypodium* Genomes Using Comparative Chromosome Painting. *PLoS ONE*. 9: e115108.
- Bobák, M., Blehova, A., Kristín, J., Ovecka, M. & Samaj, J.** (1995). Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 43: 43-49.
- Brewer, J.S., Baker, D.J., Nero, A.S., Patterson, A.L., Roberts, R.S. & Turner, L.M.** (2011). Carnivory in plants as a beneficial trait in wetlands. *Aquatic Botany*. 94: 62-70.
- Brinson, M.M. & Malvárez, A.I.** (2002). Temperate freshwater wetlands: types, status, and threats. *Environmental Conservation*. 29: 115-133.
- Catalán, P., Müller, J., Hasterok, R., Jenkins, G., Mur, L.A.J., Langdon, T., Betekhtin, A., Siwinska, D., Pimentel, M. & López, D.** (2012). Evolution and taxonomic split of the models of grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*. 109: 385-405.
- Chartudevi, H.C., Jain, M. & Kidwai, N.R.** (2007). Cloning of medicinal plants through tissue culture – A review. *Indian Journal of Experimental Biology*. 45: 937-948.
- Darwin, C.R.** (1875). *Insectivorous Plants*. John Murray. London. 455.
- Ellison, A.M. & Gotelli, J.N.** (2009). Energetics and the evolution of carnivorous plants—Darwin's 'most wonderful plants in the world'. *Journal of experimental Botany*. 60: 19-42.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O.** (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. 27: 221-224.
- Hasebe, M., Otori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. & Iwatsuki K.** (1994). rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 5730-5734.
- Hoshi, Y. & Kondo, K.** (1998). Chromosome differentiation in *Drosera*, Subgenus *Rorella*, Section *Rossilis*. *Cytologia*. 63: 199-211.

- Jayaram, K. & Prasad, M.N.V.** (2007). Rapid in vitro multiplication of *Drosera indica* L.: a vulnerable, medicinally important insectivorous plant. *Plant Biotechnology*. 1:79-84
- Jennings, D.E. & Rohr, J.R.** (2010). A review of the conservation threats to carnivorous plants. *Biological Conservation*. 144: 1356-1363.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J.** (2008). *Plant systematics: a phylogenetic approach* (3^a Ed.). Sinauer Associates. Sunderland (UK). 611.
- Junichi, S., Nagano, K. & Hoshi, Y.** (2011). A chromosome study of two centromer differentiating *Drosera* species, *D. arcturi* and *D. regia*. *Caryologia*. 64: 453-463.
- Kondo, K.** (1969). Chromosome numbers of carnivorous plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 96: 322-328.
- Król, E., Plachno, B.J., Adamec, L., Stolarz, M., Dziubinska, H. & Trebacz, K.** (2012). Quite a few reasons for calling carnivores ‘the most wonderful plants in the world’. *Annals of botany*. 109: 47-64.
- Lemey, P., Salemi, M. & Vandamme, A.M.** (2009). *The phylogenetic handbook*. Cambridge University Press. New York (USA). 723.
- Luken, J.O.** (2005). Characterizing illegal harvest of the Venus’ fly trap (*Dionaea muscipula* Ellis) at Lewis Ocean Bay Heritage Preserve, South Carolina, USA. *Natural Areas Journal*. 25: 295-299.
- Mace, G.M.** (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 359: 711- 719.
- Paiva, J.** (1997). *Drosera*. In: Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Morales, R., Muñoz, F., Nieto, G. & Paiva, J. (Eds.). *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol V. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid (España). 320.
- Pimentel, M., Sahuquillo, E., Torrecilla, Z., Popp, M., Catalán, P. & Brochmann, C.** (2013). Hybridization and long-distance colonization at different time scales: towards resolution of long-term controversies in the sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*). *Annals of Botany*. 112: 1015-1030.
- Rambaut, A.** (2012). *FigTree* v.1.4.0. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rathore, M.S.** (2013). Ex vivo implications of phytohormones on various in vitro responses in *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight. & Arn.—an endangered plant. *Environmental and Experimental Botany*. 86: 86-93.
- Rivadavia, F., Kondo, K., Kato, M. & Hasebe, M.** (2003). Phylogeny of the sundews, *Drosera* (Droseraceae), Based on chloroplast RBCL and Nuclear 18S Ribosomal DNA Sequences. *American Journal of Botany*. 90: 123-130.
- Rivadavia, F., Riberão, A. & Paulo, S.** (2005). New chromosome numbers for *Drosera* L. (Droseraceae). *Carnivorous Plant Newsletter*. 34: 85-91.

- Schweizer, D.** (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*. 58: 307-324.
- Seine, R. & Barthlott, W.** (1994). Some proposals on the infrageneric classification of *Drosera* L. *Taxon*. 43: 583-589.
- Singh, R.J.** (2003). *Plant Cytogenetics* (2^a Ed.). CRC Press. Florida (USA). 463.
- Smith, R.H.** (2000). *Plant tissue culture. Techniques and Experiments* (2^a Ed.). Academic Press. San Diego. 231.
- Smith, R.H.** (2013). *Plant tissue culture. Techniques and Experiments* (3^a Ed.). Elsevier. Croydon. 188.
- Swofford, D.L.** (2000). *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0*. Smithsonian Institution. Washington DC.
- Taji, A., Kumar, P. & Lakshamanan, P.** (2002). *In vitro Plant Breeding*. Food Products Press. Binghamton (USA). 167.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Webb, D.A.** (1964). *Drosera*. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb. D.A., Ball, P.W. & Chater, A.O. (Eds.). *Flora Europaea*. Vol 1. Cambridge University Press. Cambridge. 464.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds). *PCR protocols – a guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego. 315-322.