

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA A LA CONSERVACIÓN  
Y USO DE LA PLANTA MEDICINAL *Psychotria acuminata* BENTH  
(RUBIACEAE)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de Magister Scientiae

**ALFONSO LARA QUESADA**

**Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”, Costa Rica**

**2002**

## DEDICATORIA

**A mis Padres Alfonso y Ana Virginia, a mis hermanos Erick y Oscar  
por su amor, apoyo y comprensión durante mi trabajo de tesis  
y en todas las etapas de mi vida**

*"Nunca te conceden un deseo sin  
concederte también la facultad de  
convertirlo en realidad."*

*Richard Bach*

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco en primer lugar al Dr. Roberto Valverde, amigo y guía que con su apoyo, su constante empuje e interés hizo que finalizara mi trabajo de tesis con éxito.**

**Al Dr. Oscar Rocha N., M.Sc. Nancy Hidalgo D. y M.Sc. Luis Gómez A., por su amistad, los comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.**

**A todos los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas, que me brindaron su amistad y contribuyeron de una u otra forma en la realización de mis investigaciones.**

**Al Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica por permitirme llevar a cabo con éxito las investigaciones de mi tesis.**

**Gracias a todos.**

**Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae.**

**Dr. Víctor Jiménez García.**  
En representación de la Decana del  
Sistema de Estudios de Posgrado



**Dr. Roberto Valverde Castro.**  
Director de Tesis



**M.Sc. Nancy Hidalgo Dittel.**  
Asesora



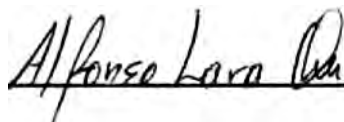
**Dr. Oscar Rocha Núñez.**  
Asesor



**Dra. Virginia Solís Alvarado.**  
Directora del Programa de  
Posgrado en Biología



**Alfonso Lara Quesada**  
Sustentante



## **PREFACIO**

**Esta tesis fue escrita de acuerdo con el Reglamento del Sistema de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica.**

**Está dividida en tres capítulos y cada uno sigue las normas de presentación de manuscritos de la Revista AGRONOMÍA COSTARRICENSE.**

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
HOJA DE APROBACIÓN .....	iv
PREFACIO .....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS .....	xi
RESUMEN .....	1
<b>ARTÍCULO I: MICROPROPAGACIÓN DE LA PLANTA MEDICINAL</b> <i>Psychotria acuminata</i> .....	<b>16</b>
<b>ARTÍCULO II: HISTOLOGIA DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y</b> <b>BROTOS ADVENTICIOS INDUCIDOS EN HOJAS DE</b> <i>Psychotria acuminata</i> .....	<b>44</b>
<b>ARTÍCULO III: VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA</b> <b>EN CUATRO POBLACIONES DE LA PLANTA MEDICINAL</b> <i>Psychotria acuminata</i> .....	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Artículo I

FIGURA #	CONTENIDO	PÁGINA
1	Ubicación geográfica de los sitios de colecta de la planta <i>Psychotria acuminata</i> en Costa Rica. 1-La Cruz, Guanacaste; 2-Sarapiquí, Heredia; 3-Puriscal, San José; y 4-Golfito, Puntarenas.....	19
2	Entrenados en la etapa de establecimiento. Recién inoculados (A) y con una semana de cultivo (B).....	24
3	Entrenado de <i>P. acuminata</i> con ocho semanas de cultivo (A), entrenado con 16 semanas (B). C = callo...	24
4	Microestaca de Puriscal mostrando crecimiento y formación de un brote apical.....	25
5	Hoja de Puriscal a las 12 semanas de cultivo con arrollamiento y brotación en la vena media.....	25
6	Proceso de multiplicación de <i>Psychotria acuminata</i> (Puriscal-1) desde la semana dos hasta la 12. En cada semana, la fotografía de la izquierda presenta la multiplicación a partir de hojas y la de la derecha la multiplicación a partir de microestacas.....	26
7	Número de brotes promedio ( $\pm$ error estándar) por microestaca según su procedencia en <i>P. acuminata</i> .....	27
8	Promedio de brotes a partir de hojas según su procedencia. Las barras indican el error estándar.....	29
9	Enraizamiento de plántulas de <i>P. acuminata</i> con cuatro semanas (A) y 12 semanas (B) de cultivo en un medio con 6 mg l <sup>-1</sup> de AIA.....	31
10	Desarrollo de raíces en plantas de <i>P. acuminata</i> después de ocho semanas de aclimatización. (A) Control, (B) Agriroot 1 DP <sup>®</sup> , (C) Rootone-F <sup>®</sup> y (D) AIA 50 mg l <sup>-1</sup> .....	32

## Artículo II

<b>FIGURA #</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Hoja de <i>P. acuminata</i> con un claro arrollamiento a los ocho días de cultivo (barra = 1 cm).....	50
2	Inicio de brotes en el lado adaxial de las nervaduras media y secundarias de la hoja. Nótese las protuberancias (Pr) a lo largo de las venas, (VM) vena media (barra = 2 mm).....	50
3	Brotes en diferentes estados de desarrollo, nótese los embrioides (EM) en su fase globular. (barra = 5 mm)..	50
4	Hoja arrollada con un gran número de brotes y el desarrollo de una plántula (PL)(barra = 1 cm).....	50
5	Embrioides en la fase previa a la de torpedo (barra = 5 mm) .....	50
6	Brote de origen organogénico (BO). Nótese también la ausencia casi total de morfogénesis en la superficie abaxial (barra = 8 mm).....	50
7	Embrioides separados del tejido madre (barra = 2 mm)....	50
8	Brote de origen organogénico separado del tejido madre (barra = 2 mm).....	50
9A	Corte transversal de una hoja de <i>P. acuminata</i> en condiciones previas al contacto con el medio de cultivo, (VM) vena media, (L) lámina (40 X).....	52
9B	Nervadura central de la hoja, donde se observa el tejido vascular y el parénquima que lo rodea (100 X)....	52
10A	Corte transversal de una hoja arrollada (100 X).....	52
10B	Acercamiento de la figura 10A mostrando los grupos de células meristemáticas (CM) en la superficie adaxial de la hoja (250 X).....	52
11	Zonas epidérmica y subepidérmica de la hoja con gran actividad meristemática. Nótese la formación de embrioides de origen unicelular (EU) y multicelular (EM). Además de las células epidérmicas (CE) en proceso de división (400 X).....	52



12A	Planos de división celular: periclinal, anticlinal y oblicuo de las células, formación de un embriode de origen unicelular (250 X).....	52
12B	Acercamiento de la figura 12A que muestra el embriode con el suspensor (S) y la estructura globular (G) en el extremo terminal (400 X).....	52
13	Meristemoide (M) desarrollándose cerca de los haces vasculares de la vena media (250 X).....	52
14A	Fase globular de un embriode de origen unicelular con restos de lo que fue el suspensor (S) (400 X).....	54
14B	Embriode de origen multicelular desarrollándose a partir de células de parénquima de la región subepidérmica de la hoja (400 X).....	54
15	Estructura globular del embriode (100 X).....	54
16	Embriode en su fase acorazonada (400 X).....	54
17	Embriode en un estado temprano de torpedo mostrando el meristema apical, el polo radical, las bandas procambiales (BP) y las hojas cotiledonales (250 X).....	54
18	Corte de un embriode, cuya apariencia es típica de la fase de torpedo (100 X).....	54
19	Embriode con sus polos apical (PA) y radical (PR), y los cotiledones (Co). Las bandas procambiales (PB) no se extienden fuera del embriode (100X).....	54
20A	Brote organogénico con tejido vascular desarrollado (250 X).....	54
20B	Brotos organogénicos que emergieron sobre la superficie adaxial, nótese la conexión directa entre su tejido vascular y el del explante (100 X), (BrBP) bandas procambiales del brote, (ExTV) tejido vascular del explante.....	54

---

### Artículo III

<b>FIGURA #</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Ubicación geográfica de los sitios de colecta de <i>Psychotria acuminata</i> en Costa Rica. 1-La Cruz, Guanacaste; 2-Sarapiquí, Heredia; 3-Puriscal, San José; 4-Golfito, Puntarenas.....	72
2	Productos de amplificación de las cuatro poblaciones de <i>P. acuminata</i> con el imprimador OPC-20. M=marcador de peso molecular Lamda DNA/ <i>EcoR</i> I + <i>Hind</i> III.....	76
3	Productos de amplificación en las cuatro poblaciones de <i>P. acuminata</i> con el imprimador ISSR-827. M=marcador de peso molecular Lamda DNA/ <i>EcoR</i> I + <i>Hind</i> III.....	77
4	Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de RAPDs. Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5.....	78
5	Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de ISSRs. Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5.....	78
6	Dendrograma generado a partir de los datos climáticos: temperatura, humedad relativa y precipitación para cada una de las cuatro localidades.....	80
7	Dendrograma generado a partir de las distancias geográficas entre las cuatro localidades.....	82

## ÍNDICE DE CUADROS

### Artículo I

<b>CUADRO #</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Porcentaje de brotación y promedio de brotes por microestaca de <i>Psychotria acuminata</i> , de diferente procedencia, a las 12 semanas.....	28
2	Porcentaje de brotación y promedio de brotes por hoja de <i>Psychotria acuminata</i> , de diferente procedencia, a las 12 semanas.....	30

### Artículo III

<b>CUADRO #</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Condiciones climáticas y altura sobre el nivel del mar de los sitios de colecta de muestras de <i>Psychotria acuminata</i> .....	73
2	Secuencias de los decámeros, con el número total de bandas, el número de polimorfismos y el número de patrones producidos.....	76
3	Secuencias de los imprimadores usados para el análisis con los ISSR, el número total de polimorfismos y el número de patrones producidos.....	77
4	Matriz de distancias genéticas Nei (1978) con los datos generados por los RAPDs.....	79
5	Matriz de distancias genéticas Nei (1978) con los datos generados por los ISSRs.....	79
6	Matriz de distancias geográficas lineales entre los sitios donde se ubican las poblaciones.....	81

**APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA A LA CONSERVACIÓN Y USO DE  
LA PLANTA MEDICINAL *Psychotria acuminata* (Rubiaceae)**

**RESUMEN**

**Información descriptiva:**

Lara Quesada, Alfonso

APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA A LA CONSERVACIÓN Y USO DE LA PLANTA  
MEDICINAL *Psychotria acuminata* (Rubiaceae)

Tesis de Magister Scientiae.- San José, C.R.

91 h.: 42 Fig.: 8 Cuadros -84 refs.

**INTRODUCCIÓN**

*Psychotria acuminata* es una planta medicinal, que se encuentra aún en estado no domesticado. El interés medicinal y comercial en esta planta radica en la presencia de los alcaloides derivados de isoquinolina emetina y cefalina en sus raíces, además de otros compuestos de interés científico presentes en esta especie (Itoh *et al.* 1999, Solis *et al.* 1993, Glinski *et al.* 1995, Teshima *et al.* 1990). Estos alcaloides son utilizados como expectorantes y eméticos en casos de envenenamiento y para el tratamiento de la disentería amébrica causada por *Entamoeba histolytica* (Skorupa y Assis 1998, Solis *et al.* 1993, Yoshimatsu y Shimomura 1991). Otros alcaloides encontrados son la Psychotrina y su *O*-metil éter los cuales son inhibidores selectivos de la transcriptasa reversa I del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Tan *et al.* 1991).

*Psychotria acuminata* es una planta de sotobosque que requiere de condiciones ambientales muy específicas para su desarrollo, por lo que las plantas utilizadas para extraer los alcaloides se obtienen de los bosques, lo que podría convertirse en una amenaza para esta especie. Para resolver el problema de la extracción de plantas del bosque, una alternativa es la propagación asexual o vegetativa de esta planta, lo que permitiría generar un gran número de individuos con una misma identidad genética. A pesar de esto, las técnicas de propagación asexual convencionales han demostrado ser poco eficientes en la multiplicación de un gran número de especies. El cultivo *in vitro*

se perfila como una solución que beneficia tanto la conservación de especies vegetales como la reproducción de especies difíciles de cultivar. Algunos investigadores señalan que la identificación de ecotipos y la regeneración *in vitro* de los mismos es el mecanismo más apropiado para obtener la mayor tasa de multiplicación. En adición, por ser plantas producidas *in vitro* se puede garantizar las características fitosanitarias y la estabilidad genética necesarias para un cultivo exitoso de plantas medicinales (Palma e Hidalgo 1993).

En la literatura son muchos los ejemplos de cómo actualmente el cultivo de tejidos ha sido tomado como el método alternativo en la reproducción de plantas medicinales (Roussos *et al.* 1999, Gao *et al.* 1999, Mohamed *et al.* 1999). El cultivo *in vitro* como método de reproducción comprende varias etapas: el establecimiento del explante en forma aséptica, la multiplicación por alguna de las vías morfogénicas (embriogénesis somática y organogénesis), el enraizamiento y la aclimatización en el invernadero (George y Sherrington 1984).

La formación de embriones somáticos (embrioides) es un proceso de gran importancia en la micropropagación, manipulación genética y estudios morfogénicos de plantas, ya que permite una rápida multiplicación (Wawrosch y Kopp 1999, Wilhelm 1999, George y Sherrington 1984) y un mejor entendimiento de los procesos de embriogénesis de las plantas (Neumann 1999). Muchas son las especies y tipos de explantes que generan embriones somáticos (Williams y Maheswaran 1986, George y Sherrington 1984). Los explantes más utilizados por su eficiencia embriogénica son tejidos de embriones zigóticos como carióspsides (Marousky y West 1990) y cotiledones (Mandal *et al.* 1995, Canhoto y Cruz 1996), además son usados tejidos jóvenes como inflorescencias (Chen *et al.* 1985) y en algunos casos se utilizan tejidos maduros como rizomas (Lee *et al.* 1997) y hojas (Trigiano *et al.* 1989).

En comparación con la embriogénesis somática, la organogénesis involucra el desarrollo de brotes apicales o radicales a partir de los explantes directamente o de callos. La función básica de la mitosis en la organogénesis es la formación de un número definido de células en división activa, las cuales son capaces de responder a señales de desarrollo. Estas células en división o meristemoides se asemejan a meristemas reales y tienen uniones vasculares con el callo o el tejido contiguo. Bajo condiciones adecuadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias. Casos exitosos de organogénesis se pueden encontrar en una gran cantidad de cultivos,

algunos de ellos son: peras (Lane *et al.* 1998), abetos (Rumary *et al.* 1986), tabaco (Maeda y Thorpe 1979) y muchos otros (Hicks 1980).

El estudio de plantas medicinales *i.e* *Psychotria acuminata*, es un objetivo prioritario en zonas de alta diversidad biológica como los bosques tropicales de Costa Rica.

El conocimiento de la variabilidad genética de plantas con uso medicinal, al igual que plantas utilizadas con otros fines, permitiría realizar un mejor aprovechamiento de los recursos fitogenéticos (Palevitch 1991). Skorupa y Assis (1998) reconocen la importancia de los estudios sobre la variabilidad genética de poblaciones naturales y los factores que influyen en la productividad de los metabolitos. Asimismo, advierten sobre la falta de investigaciones que permitirían determinar los genotipos de plantas con mayor potencial para la producción de compuestos de interés, tales como los alcaloides ya mencionados. En este sentido ya se han realizado trabajos para determinar los niveles de variación genética en *P. ipecacuanha* (Martins *et al.* 2000, Skorupa y Assis 1998).

Para determinar los niveles de variación genética entre organismos de una especie o entre diferentes niveles taxonómicos, se puede utilizar varios métodos de caracterización (Morell *et al.* 1995). Los marcadores moleculares generados por los RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA, en inglés) (Antoni 1997), y los generados los ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats, en inglés), conocidos también como SSR, STR o microsatélites (Vogel y Scolnik 1997), presentan ventajas comparativas respecto a métodos tales como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms, en inglés). Para la obtención de los RAPD y los ISSR no se requieren de un conocimiento previo de la secuencia del ADN en estudio; ninguno de los dos métodos utiliza sondas radiactivas; son relativamente rápidos, emplean bajas cantidades de ADN y generan numerosos polimorfismos distinguibles.

El objetivo general del presente trabajo fue la aplicación de la biotecnología a la conservación y uso de la planta medicinal *Psychotria acuminata*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

*Psychotria acuminata*, pertenece a la familia Rubiaceae y se ubica en el género *Psychotria*, el cual comprende aproximadamente 1650 especies de plantas a nivel mundial (Hamilton, 1989). Las plantas de *P. acuminata* son arbustos de 1-3 m de altura, muy ramificados, de hojas glabras, las flores son pequeñas, blancas o amarillo pálido y los frutos son lisos, hemisféricos y de color entre azul y púrpura. Son plantas de bosque lluvioso siempre verde, de tierras bajas sobre las dos vertientes, Pacífica y Caribeña de Costa Rica y se localizan desde los 0 hasta los 1000 msnm (Burger, 1993).

### AREA DE ESTUDIO

El área de estudio consistió de cuatro localidades de Costa Rica:

-La Cruz se ubica en la provincia de Guanacaste al N-NE del Volcán Orosi, cerca de la Estación de Pitilla 11° 01' 00" N y 85° 25' 00" O. Este es un bosque de transición entre seco del Pacífico y bosque húmedo del Atlántico, con una importante influencia climática del Lago de Nicaragua.

-Sarapiquí se ubica en la provincia de Heredia. El sitio de colecta está cerca de la Estación Biológica La Selva 10° 25' 52" N y 84° 00' 13" O, en un pequeño bosque al margen de un riachuelo y rodeado de grandes áreas cultivadas con piña.

-Puriscal se ubica en la provincia de San José. El sitio de colecta está en la localidad de Santa Rosa de Puriscal, en la Reserva Biológica La Cangreja. La zona comprende un bosque primario, en las faldas de la fila de La Cangreja, en las márgenes del Río Negro 9° 42' 52" N y 84° 23' 30" O.

-Golfito se ubica en la provincia de Puntarenas y el sitio de colecta está en el Refugio de Fauna Silvestre Golfito, en la margen de un río en el bosque a 08° 33' 00" N y 83° 06' 00" O.

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica

### MICROPROPAGACIÓN

Las secciones de plantas de *Psychotria acuminata* se colectaron en Puriscal de San José, en adelante Puriscal-2, La Cruz de Guanacaste, en adelante Guanacaste,

Sarapiquí de Heredia, en adelante Sarapiquí y Golfito de Puntarenas, en adelante Golfito. También se incluyó plantas procedentes de Puriscal, que se han mantenido *in vitro* por cuatro años, en adelante Puriscal-1.

Para la micropropagación se colectó hojas y tallos con aproximadamente cinco nudos, sin síntomas o lesiones causados por plagas y enfermedades. Los tejidos fueron esterilizados con Agrimicin y Benlate, etanol al 70% y NaOCl al 2,5% en diferentes tiempos. El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog, 1962 (MS) suplementado con 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de 6-BAP y 0,01 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de ANA, 3% de azúcar y 2 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de Phytigel. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 antes del autoclavado. El material fue colocado en un fotoperíodo de 12 horas, luz blanca a 46 μE<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> y 26 ± 1 °C.

Se cultivó entrenudos, los cuales una vez que produjeron brotes fueron seccionados para la obtención de microestacas, las hojas también fueron utilizadas como fuente de explante. Durante el proceso de multiplicación, plántulas y embrioides individualizados fueron cultivadas en un medio MS con la mitad de la concentración de las sales (MS/2) y suplementado con 6 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de AIA para promover la formación de raíces.

Plántulas de ± 5 cm de altura, enraizadas *in vitro* fueron llevadas al invernadero y sembradas en una mezcla estéril 1:1 de suelo:fibra de coco. Después de la siembra las bandejas fueron cubiertas con plástico adhesivo. Las bandejas fueron mantenidas en el invernadero y la evaluación del porcentaje de plántulas aclimatizadas se realizó a las ocho semanas. Debido a problemas con el sistema radical de las plántulas se realizó un ensayo con diferentes enraizadores: Rootone-F<sup>®</sup>, Agriroot 1 DP<sup>®</sup>, AIA, Rootone-F<sup>®</sup> + fósforo, Agriroot 1 DP<sup>®</sup> + fósforo, testigo.

## HISTOLOGÍA

En el proceso de micropropagación *in vitro* de *Psychotria acuminata*, usando microestacas, se ha observado que aquellas hojas que se encuentran en contacto con el medio de cultivo, presentan un alto potencial morfogénico. Por tal motivo, de plantas provenientes del cultivo *in vitro*, se tomó hojas de 3–3,5 cm de longitud, que no hubiesen estado en contacto con el medio de cultivo y se colocaron en el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) bajo las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente. Se evaluó dos hojas semanalmente, desde la semana cero, que fue el momento de siembra de las hojas, hasta la semana 6. La fijación, deshidratación,



infiltración y tinción se realizaron siguiendo el método descrito por Yeung y Peterson (1972). El análisis de los tejidos se realizó por microscopía de luz.

### **VARIABILIDAD GENÉTICA**

Se colectó hojas de un total de 51 accesiones de *Psychotria acuminata*, procedentes de las cuatro localidades descritas anteriormente.

La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología descrita por Agwanda *et al.* (1997). La cuantificación y calidad del ADN se determinó con un espectrofotómetro de luz UV a 260 nm y 280 nm.

Las reacciones y condiciones de amplificación se realizaron de acuerdo con Williams *et al.* (1990). Los imprimadores para el método RAPD empleados fueron los de la serie OPC (Operon Technologies Inc. Alameda, CA). También se evaluó cuatro ISSRs (inter-simple sequence repeats), identificados como #827 (AC)<sub>8</sub>G, #834 (AG)<sub>8</sub>CTT, #841 (GA)<sub>8</sub>CTC y #857 (AC)<sub>8</sub>CTG. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 2% y fueron visualizados con bromuro de etidio (0,55  $\mu\text{gml}^{-1}$ ) en un transiluminador de luz UV. El marcador de peso molecular utilizado fue Lambda DNA / EcoR I + Hind III

### **ANÁLISIS DE DATOS**

**MICROPROPAGACIÓN.** Los datos fueron analizados usando el programa SYSTAT versión 9 (SPSS Inc. 1998). Un análisis de variancia (ANDEVA) de mediciones repetidas y la prueba de Tukey fueron usadas para detectar diferencias entre los tratamientos (Compton y Mize 1999, Mize *et al.* 1999). Cada frasco se consideró como una repetición.

**HISTOLOGÍA.** Los cortes macro fueron analizados con un estereoscopio de luz y los cortes histológicos fueron analizados con un microscopio de luz. Los resultados fueron registrados con una cámara digital utilizando el programa de computadora BioVid Software 3 de LW-Scientific.

**VARIABILIDAD GENÉTICA.** Los loci se registraron en una matriz binaria de datos como presente (1) y ausente (0). La matriz de distancias genéticas entre poblaciones se

estimó con base en Nei (1978). El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ) se calculó como describe Nei (1973). Para efectos de comparación se elaboró matrices con los datos climáticos y las distancias geográficas de los sitios donde se encuentran las poblaciones. También se construyó dendrogramas. Las matrices, los dendrogramas y el coeficiente de diferenciación genética se estimaron utilizando el programa de computadora PopGene 32, versión 1.31 (© University of Alberta and Center for International Forestry Research) para marcadores dominantes, por el método unweighted pair-group using arithmetic averages (UPGMA) modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5.

Con los datos climáticos estandarizados y con las distancias geográficas se generó las matrices de distancias euclidianas para cada variable y con los datos de cada matriz se elaboró un dendrograma por el método de UPGMA utilizando el programa de computadora SYSTAT versión 9, copyright © SPSS Inc., 1998.

## RESULTADOS

### MICROPROPAGACIÓN.

Las localidades donde se recolectó las muestras fueron seleccionadas por formar parte de otro proyecto en el que se realiza una caracterización fitoquímica de los principios activos de esta especie. En adición, los sitios en mención son considerados como una muestra representativa de las poblaciones de *P. acuminata* en Costa Rica.

Con la desinfección de los explantes en NaOCl al 2,5 % por 25 minutos, luego del tratamiento con Agrimicin y Benlate, la contaminación, cuando se utilizó entrenudos como fuente de explante, fue en promedio del 50%. El medio de cultivo utilizado fue apropiado para el establecimiento de los entrenudos. La respuesta de los explantes de las cuatro localidades evaluadas al medio de cultivo fue similar.

A las seis semanas de cultivo se observó la formación de un callo amarillo claro que se inició en ambos extremos del entrenudo. A partir de la semana 16 se observó la aparición de brotes. Una vez que los brotes crecieron, estos fueron seccionados para obtener las microestacas y las hojas que se utilizaron como explantes.

En términos generales, las microestacas generaron gran cantidad de brotes a partir de las yemas axilares y de la región del tallo en contacto con el medio de cultivo. El análisis de los datos de producción de brotes, mostró diferencias ( $P \leq 0,001$ ,  $F = 42,80$ )

en el número de brotes por microestaca según su procedencia. En general, Puriscal-1 mostró ser el material más prolífico, seguido por Puriscal-2, Golfito y Guanacaste. Por su parte, las hojas respondieron con un arrollamiento, cambio de color y la formación de brotes sobre las venas media y secundarias. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias a  $P \leq 0,01$  ( $F = 64,99$ ) para el promedio de brotes por hoja. La prueba de separación de medias incluyó a Puriscal-2, Golfito y Guanacaste en un solo grupo y a Puriscal-1 en otro.

Las plántulas en el medio MS/2 suplementado con  $6 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA enraizaron en un 100 %. A las ocho semanas las raíces son abundantes, su aspecto es largo y fibroso. Sin embargo, este sistema radical no resultó funcional por lo que se procedió al uso de enraizadores, tanto el Agriroot 1 DP® como el AIA indujeron un nuevo sistema radical fibroso y abundante, con raíces cuya longitud promedio fue de 1,5 cm. Una vez que se eliminó el plástico que cubría las bandejas y la humedad relativa, se observó que con el Agriroot 1 DP® las plántulas sobrevivieron en un 80% y con el AIA un 30% comparado con 0% en los otros tratamientos.

## HISTOLOGÍA

La semana 0 es el momento en que se colectan las hojas para inocular *in vitro*, la evaluación histológica de los cortes transversales de hoja, mostró que las hojas que no estuvieron en contacto con el medio de cultivo, presentaron láminas con una anatomía en la cual se observa una capa de células de epidermis, 1 ó 2 de mesófilo de empalizada y dos de mesófilo esponjoso. En las nervaduras central y secundarias se pudo observar la disposición habitual de los tejidos vasculares y del parénquima que los rodea. En la semana 1 se produce un arrollamiento de la hoja y da inicio la proliferación de grupos de células meristemáticas en las áreas epidérmica y sub-epidérmica. Ya para la semana 2 se encontró que algunas células epidérmicas en su proceso de división dan origen a embrioides somáticos a partir de una sola célula. También fue posible identificar meristemoides cerca del haz vascular de la vena media. Semana 3, Conforme las divisiones celulares aumentan en el proembriode, la fase globular tiende a ser más evidente; también se observó la formación de embrioides en su fase globular a partir de los meristemoides en el área sub-epidérmica, lo cual indicaría que en *P. acuminata* el proceso de embriogénesis somática tiene origen unicelular y multicelular. En la semana 4 es factible observar los embrioides en su fase acorazonada, que es donde se

inicia la polarización de las zonas caulinar y radical. Los meristemoides formados cerca del tejido vascular solo muestran un crecimiento diferencial, producto de un proceso morfogénico no sincronizado. En la **semana 5** la fase acorazonada del embriode ha dado paso a la fase de torpedo. Los meristemoides formados cerca del tejido vascular continúan su crecimiento hasta ser evidente sobre la epidermis. **Semana 6**, en este momento los embrioides muestran sus polos apical y radical, además de los cotiledones. Se observa las bandas procambiales del embriode, las cuales no tienen ningún nexo con el tejido vascular del explante. Los meristemoides formados cerca del tejido vascular, crecieron hasta la formación de brotes organogénicos y al igual que en el caso de los embrioides ya el tejido vascular se ha diferenciado; sin embargo, en este caso el tejido vascular del brote si está conectado al del tejido madre, lo que indica que son brotes de origen organogénico y no embriogénico.

#### **VARIABILIDAD GENÉTICA**

Un total de 20 imprimadores para el método RAPDs y cuatro ISSRs fueron evaluados para todas las 51 accesiones. Con los decámeros se obtuvo un total de 70 loci polimórficos (95%) y con los ISSRs se obtuvo 15 loci polimórficos (83%). El tamaño de los fragmentos amplificados varió entre 100-2000 pb.

El dendrograma construido con los datos generados por los RAPDs, mostró la formación de dos grupos; Sarapiquí-Puriscal y Golfito-Guanacaste. Por su parte, el dendrograma construido con los ISSRs muestra, igualmente, la formación de dos grupos; Sarapiquí-Guanacaste y Golfito-Puriscal. Sin embargo, ambos grupos tienen una composición diferente. La determinación del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ), permitió determinar que con la información generada con los RAPDs la  $G_{st}$  fue de 0,2919 mientras que la  $G_{st}$  proveniente de los ISSRs fue de 0,3135.

Con el objetivo de determinar la relación existente entre la variabilidad genética de las cuatro poblaciones de *Psychotria acuminata* evaluadas en este estudio y los factores climáticos: precipitación, temperatura y humedad relativa o las distancias geográficas de los sitios donde se ubican las poblaciones, se procedió a elaborar las matrices y dendrogramas respectivos; el análisis de los datos arrojó resultados negativos para ambas correlaciones.

## DISCUSIÓN

### MICROPROPAGACIÓN

Para la micropropagación de *Psychotria acuminata* se seleccionó tres tipos de explante: nudos, hojas y entrenudos. Sin embargo, un 100% de contaminación en los nudos y hojas hizo que se seleccionara a los entrenudos como el explante a utilizar. Los entrenudos regularmente no se utilizan como fuente de explante, debido a la carencia de áreas de crecimiento que permitan la regeneración de plantas. Sin embargo, éstos poseen una epidermis lisa y cerosa, que reduce la acumulación de contaminantes. La alta contaminación observada con los nudos y hojas, se debe principalmente a que *Psychotria* es una planta del sotobosque, lo que hace que las condiciones ambientales sean propicias para la proliferación de hongos y bacterias, que en condiciones naturales no causan gran daño a la planta pero en condiciones *in vitro* son letales. Con el medio de cultivo utilizado, los entrenudos produjeron callos en los extremos, posiblemente inducidos a partir del cambium vascular. Como se indicó, los brotes que se formaron provenían de la sección entre el callo y el corte en el entrenudo, por lo que pareciera que el origen de los mismos es directo.

La capacidad de producción de brotes varió con a la procedencia de los materiales, esto podría indicar que genéticamente son materiales diferentes. Resultó interesante observar que aún los brotes creciendo *in vitro* pueden presentar distinto potencial morfogénico a lo largo de su tallo, desde su parte apical hasta la sección basal. Se observó que las microestacas de la parte apical y media mostraron un mayor potencial morfogénico que las de la parte basal; la literatura es concordante con este aspecto (Litz y Jarret 1991).

La multiplicación de rubiáceas a partir de hojas también ha sido reportada por Sondahl y Loh (1988), quienes trabajaron con café. La regeneración a partir de hojas en *P. acuminata* evidenció que los brotes fueron producidos por dos vías, organogénesis y embriogénesis somática, donde el proceso dominante fue la embriogénesis somática. Como el proceso de regeneración ocurrió en forma directa, tanto las plántulas producidas por organogénesis como las producidas por embriogénesis somática, se espera que sean genéticamente estables (Wawrosh y Koop 1999, Wilhelm 1999, Neumann 1999, von Arnold *et al.* 2002). Estos resultados crean nuevas expectativas no solo acerca de la multiplicación de ésta especie, sino también sobre otros posibles usos

de ésta característica. Con respecto al enraizamiento, se encontró que en *P. acuminata*, dependiendo de la vía de multiplicación, es necesaria una fase de enraizamiento. Durante el enraizamiento no se observó ningún efecto del genotipo, los brotes de todas las localidades enraizaron a la misma velocidad y la apariencia de las raíces fue la misma. Los resultados obtenidos acerca de la no funcionalidad de las raíces producidas *in vitro* y la necesidad de enraizar los brotes de *Psychotria acuminata* durante la fase de aclimatización, lleva a concluir que en términos prácticos, la fase de enraizamiento *in vitro* no es necesaria.

## HISTOLOGIA

El estudio morfológico y anatómico de *Psychotria acuminata* reveló que los eventos morfogénicos conducentes a la micropropagación de esta especie, ocurren únicamente en la superficie adaxial de las hojas.

El motivo por el cual la superficie adaxial, en este caso, es la que presenta un mayor potencial morfogénico, es todavía desconocido. Algunos autores indican que células subepidérmicas de la superficie adaxial se dividen anticlinalmente para formar el mesófilo de empalizada, el resto de las células del mesófilo casi no sufren cambios y son las que dan origen al parénquima esponjoso. Entonces bajo condiciones inductivas, como las proporcionadas por los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo, las células que deberían formar el mesófilo de empalizada continúan dividiéndose, formando así una capa de células meristemáticas (Canhoto y Cruz 1996).

Los cortes histológicos de la hoja de *P. acuminata*, demostraron la ocurrencia tanto de embriogénesis somática y de organogénesis en el mismo tejido. Una posible explicación para la ocurrencia de ambos eventos en forma simultánea, esta dada por el uso de los reguladores de crecimiento. Las auxinas son necesarias para la inducción de la embriogénesis somática; sin embargo, estas son utilizadas por los explantes en forma muy eficiente y rápida por lo que son consumidas en periodos de tiempo muy cortos. Evidentemente si el medio contiene citocininas, las cuales son consumidas más lentamente, entonces lo que sucede, una vez que las auxinas han sido consumidas, es que se promueve la formación de brotes de origen organogénico.

En determinado punto de esta investigación, fue muy difícil definir cuando se estaba en presencia de embrioides de origen multicelular y cuando ante brotes de origen organogénico. La categorización de los mismos se llevó a cabo, básicamente, bajo dos

criterios. En primera instancia la ubicación de las áreas embriogénicas, aquellas en la zona subepidérmica siempre generaron embrioides, mientras que las que se encontraban cerca del haz vascular generaron brotes de origen organogénico. El segundo criterio utilizado fue el desarrollo del tejido vascular, pues una vez que los brotes alcanzaron un mayor grado de diferenciación, se observó que el tejido vascular de los embrioides no tenía una conexión con el tejido vascular del explante, en tanto que el tejido vascular de los brotes de origen organogénico sí.

De acuerdo con nuestro conocimiento, acerca de la morfogénesis de esta especie, este es el primer reporte de embriogénesis somática directa en *P. acuminata*. Este estudio pone de manifiesto la posibilidad de utilizar la capacidad embriogénica de *P. acuminata* en trabajos de transformación genética y desde luego en generar cultivos exclusivamente de embrioides, los cuales resultan un material ideal para estudios posteriores sobre la producción y extracción de los principios activos de esta especie, productos que pueden ser utilizados con fines medicinales en la industria farmacéutica.

#### **VARIABILIDAD GENÉTICA**

La variación genética encontrada no se pudo explicar con base en correlaciones entre las distancias genéticas y las variaciones climáticas o las distancias geográficas. Sin embargo, la aplicación del índice de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_R$ ) permitió determinar que un 30,3% del total de la variabilidad observada se da entre las poblaciones, lo que implica que el restante 69,7% de la variación genética ocurre dentro de cada población.

La determinación de la variabilidad genética entre las poblaciones estudiadas tiene dos implicaciones principales. Una implicación es con respecto a la conservación de la variabilidad genética de ésta especie, donde los estudios realizados, permitan detener o prevenir la destrucción de la naturaleza. La segunda implicación es de orden práctico y debería ser considerada a la hora de iniciar la utilización de esta planta con fines medicinales, pues al ser los individuos de las cuatro poblaciones diferentes, tanto el tipo como la concentración de los alcaloides podría variar. Por tal motivo, el estudio que realiza el Centro de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica, sobre los principios químicos de las plantas de estas cuatro poblaciones, es de vital importancia para determinar la relación entre la cantidad, tipo y calidad de estos principios químicos con la estructura genética de las cuatro poblaciones estudiadas.

Así como para generar información en este campo, pues tal y como lo indican Shorupa y Assis (1998), no existen muchas técnicas relacionadas con la potencial variabilidad genética de poblaciones naturales y los factores ambientales que influyen la productividad de los metabolitos durante el cultivo.

El presente trabajo representa un avance tecnológico de gran importancia para la conservación y uso de *Psychotria acuminata*, y se espera que los resultados obtenidos sirvan para evitar algunos de los problemas que demanda una población humana en crecimiento, tal y como lo menciona Trewavas (2001).

### CONCLUSIONES

1. La micropropagación de esta especie ocurre por dos vías: embriogénesis somática y organogénesis.
2. La micropropagación clonal y masiva de esta especie se puede realizar a partir de microestacas u hojas.
3. Cuando la micropropagación es por hojas la cantidad de brotes es mayor que con las microestacas pero el tiempo para que los brotes estén listos para la fase de aclimatización es mayor.
4. El enraizamiento *in vitro* no es necesario, pues las raíces mueren durante la fase de aclimatización.
5. Para la aclimatización es necesario el uso de enraizadores *i.e.* Agriroot 1 DP®
6. Los eventos morfogénicos en la hoja ocurren de forma no sincronizada.
7. Los embriones somáticos son de origen tanto unicelular como multicelular.
8. Tanto la embriogénesis somática como la organogénesis son directas, lo que implica una mayor estabilidad genética del material producido.
9. Los RAPDs y los ISSRs son marcadores moleculares cuyas características permitieron la caracterización de las poblaciones de *Psychotria acuminata*.
10. Existen diferencias en los resultados según el método de caracterización (RAPD, ISSR).
11. El coeficiente de variabilidad genética  $G_{st}$  permitió cuantificar la magnitud de la diversidad genética entre las poblaciones.
12. Estadísticamente no fue posible correlacionar la variabilidad genética con las condiciones climáticas ni con las distancias geográficas.



13. La alta variabilidad genética entre las poblaciones en estudio podría explicar las diferentes respuestas obtenidas en el cultivo *in vitro*.

**Palabras clave (Key words):** *Psychotria acuminata*, planta medicinal, micropropagación, *in vitro*, embriogénesis somática, organogénesis, marcadores moleculares, RAPD, ISSR.

**Director de tesis.** Roberto Valverde Ph.D.

**Unidad Académica.** Escuela de Agronomía



**ARTÍCULO I**

**MICROPROPAGACIÓN DE LA PLANTA  
MEDICINAL *Psychotria acuminata***

## MICROPROPAGACION DE LA PLANTA MEDICINAL

### *Psychotria acuminata*

Alfonso Lara<sup>1</sup>, Roberto Valverde<sup>1</sup>, Luis Gomez<sup>1</sup>, Nancy Hidalgo<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. <sup>2</sup>Escuela de Ingeniería Agrícola, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

### RESUMEN

*Psychotria acuminata* es una planta medicinal de la cual se puede extraer emetina, cephaelina y psychotrina, para ser usadas como expectorantes y eméticos. Hoy día estos alcaloides son extraídos de plantas silvestres pues esta especie no ha sido domesticada. Debido al uso potencial de los principios fitoquímicos y a la escasa población de esta especie en el país, se desarrollaron métodos de cultivo de tejidos eficientes, para una reproducción clonal y masiva de plantas de *Psychotria acuminata*, provenientes de 3 diferentes localidades de Costa Rica. En un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg l<sup>-1</sup> de ANA, 3% de azúcar y 2 g l<sup>-1</sup> de phytigel, se logró la inducción de múltiples brotes a partir de las yemas axilares de microestacas, también se indujo embriones somáticos a partir de hojas, de plántulas *in vitro* de 5 cm de altura. El enraizamiento *in vitro* de los brotes fue de un 100% cuando se utilizó un MS/2 suplementado con 6 mg l<sup>-1</sup> de AIA. Debido a que el sistema radical generado *in vitro* muere una vez que las plántulas son sembradas en el sustrato en el invernadero, se utilizó Agrirroot 1 DP® para generar raíces nuevas. Después de 8 semanas fue posible aclimatizar un 80% de las plántulas. Este estudio provee evidencia adicional acerca de la importancia del genotipo para la regeneración *in vitro*, ya que se observó que la tasa de multiplicación, cuando se utilizan microestacas como explante, así como el tiempo para que ocurrieran los eventos morfogenéticos, fueron diferentes para los materiales de las 3 procedencias, lo que pareciera indicar que las plantas de cada localidad son genéticamente diferentes.

**Palabras clave:** *Psychotria acuminata*, micropropagación, planta medicinal

## ABSTRACT

**Micropropagation of the medicinal plant *Psychotria acuminata*.** *Psychotria acuminata* is a medicinal plant from which: emetine, cephaeline and psychotrine can be extracted to use them as expectorants and emetics. Nowadays, these alkaloids are extracted from wild plants because this species has not been domesticated yet. Due to the potential use of its phytochemical principles and the small population of this species in the country, efficient tissue culture methods were developed for clonal and massive propagation of plants, collected in 3 different locations of Costa Rica. Multiple shoots were induced in axillary buds from microcuttings and somatic embryos were induced from leaves, obtained from 5 cm plantlets growing *in vitro* in a Murashige & Skoog (1962) medium supplemented with 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of BAP, 0.01 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of NAA, 3% sugar and 2 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> of phytigel. *In vitro* rooting was successfully achieved (100%) in shoots separated from the proliferating shoot cultures in MS/2 plus 6 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of IAA. Since the root system generated *in vitro* dies once the plantlets are transferred to the substrate in the greenhouse, new roots were induced with Agriroot® 1 DP. After 8 weeks acclimatization of 80% of the plantlets was achieved. This study provides additional evidence on the importance of the explant genotype for *in vitro* regeneration, since the multiplication rate, when using microcuttings as explants, as well as the timing for the morphogenetic events to occur, were different for each of the 3 materials, suggesting that plants from each location have a different genetic background.

**Key words:** *Psychotria acuminata*, micropropagation, medicinal plant

## INTRODUCCION

*Psychotria acuminata* es una planta medicinal cuyo interés comercial y farmacéutico radica en su capacidad de producir los alcaloides de isoquinolina, emetina, cefaelina y psychotrina (Solis *et al.* 1993, Glinski *et al.* 1995) entre otros. Los alcaloides producidos por algunas plantas de este género son utilizados como expectorantes y eméticos en casos de envenenamiento y en el tratamiento de la disentería amébrica

severa, causada por *Entamoeba histolitica* (Skorupa y Assis 1998, Solis *et al.* 1993, Yoshimatsu y Shimomura 1991, Jha *et al.* 1988).

A pesar de los avances en la medicina y la farmacología para elaborar compuestos sintéticos, la venta mundial de productos naturales y hierbas ha mantenido un aumento constante (Saxena 1999). Sin embargo, el número de plantas curativas de uso masivo se limita a 90 especies. En Costa Rica, se registran 126 especies de plantas utilizadas con fines curativos, de las cuales 23 son importadas y 103 son producidas o extraídas de los bosques (Ammour *et al.* 1994). *Psychotria acuminata* es una planta de sotobosque no domesticada y que requiere de condiciones ambientales muy específicas para su desarrollo, por lo que las plantas utilizadas para extraer los alcaloides se obtienen de los bosques, lo que podría convertirse en una amenaza para esta especie.

Para resolver el problema de la extracción de plantas del bosque, una alternativa es la propagación asexual o vegetativa de esta planta, lo que permitiría generar un gran número de individuos con una misma identidad genética. A pesar de esto, las técnicas de propagación asexual convencionales han demostrado ser poco eficientes en la multiplicación de un gran número de especies. El cultivo *in vitro* se perfila como una solución que beneficia tanto la conservación de especies vegetales como la reproducción de especies difíciles de cultivar. Algunos investigadores señalan que la identificación de ecotipos y la regeneración *in vitro* de los mismos es el mecanismo más apropiado para obtener la mayor tasa de multiplicación. En adición, por ser plantas producidas *in vitro* se puede garantizar las características fitosanitarias y la estabilidad genética necesarias para un cultivo exitoso de las plantas medicinales (Palma e Hidalgo 1993).

En la literatura son muchos los ejemplos de cómo actualmente el cultivo de tejidos ha sido tomado como el método alternativo en la reproducción de plantas medicinales (Roussos *et al.* 1999, Gao *et al.* 1999, Mohamed *et al.* 1999). El cultivo *in vitro* como método de reproducción comprende varias etapas: el establecimiento del explante en forma aséptica, la multiplicación por alguna de las vías morfogénicas, el enraizamiento y la aclimatación en el invernadero (George y Sherrington 1984).

El establecimiento *in vitro* involucra la desinfección superficial del explante por medio de un biocida, como el hipoclorito de sodio y el crecimiento del mismo en un medio de cultivo como el medio de Murashige y Skoog (1962), el cual es comúnmente suplementado con reguladores de crecimiento. Una vez establecidos los explantes *in*

*in vitro*, se determinan las condiciones de cultivo y el medio de cultivo idóneos para la multiplicación de las plantas. En esta etapa es imprescindible determinar los reguladores de crecimiento y las concentraciones de los mismos para definir la vía morfogénica y asegurar la multiplicación del tejido vegetal. Yoshimatsu y Shimomura (1991) han reportado, con buen éxito, la formación de brotes adventicios en los internodos de *Cephaelis ipecacuanha* también conocida como *Psychotria ipecacuanha*. Más recientemente, Hidalgo *et al.* (1999) han hecho el primer reporte de brotación a partir de hojas y microestacas de *P. acuminata*. Posterior a la etapa de multiplicación, en la etapa de enraizamiento, se induce la formación de raíces y se prepara las plantas para una eficiente aclimatización a condiciones de invernadero y de campo. Palevitch (1991), indica que el cultivo de plantas medicinales bajo prácticas de cultivo modernas, es la mejor alternativa para preservar y mantener el germoplasma de plantas raras, que se encuentran en peligro de extinción o que son sobreexplotadas.

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un protocolo de micropropagación para *Psychotria acuminata*, procedente de 4 localidades de Costa Rica, como una herramienta que permita producir suficiente material de siembra para la domesticación de esta especie.

## MATERIALES Y METODOS

### Material Vegetal

Se colectó secciones de plantas de *Psychotria acuminata* (Rubiaceae) en Puriscal de San José, en adelante Puriscal-2, La Cruz de Guanacaste, en adelante Guanacaste, Sarapiquí de Heredia, en adelante Sarapiquí y Golfito de Puntarenas, en adelante Golfito (Figura 1). También se incluyó plantas procedentes de Puriscal, que se han mantenido *in vitro* por 4 años, en adelante Puriscal-1.

### Micropropagación

#### *Establecimiento*

En los sitios mencionados se colectó hojas y tallos con aproximadamente 5 nudos, sin síntomas o lesiones causados por plagas y enfermedades. Las muestras fueron envueltas en toallas de papel húmedo y transportadas al Laboratorio de

Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde se realizó éste trabajo.

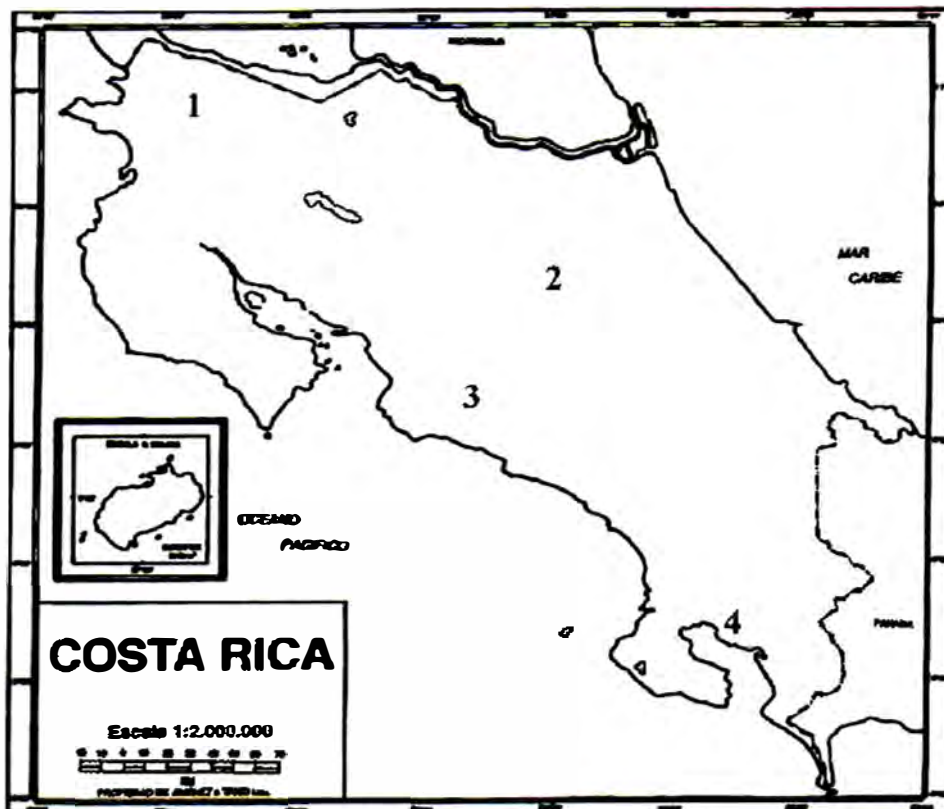


Fig. 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de la planta *Psychotria acuminata* en Costa Rica. 1-La Cruz, Guanacaste; 2-Sarapiquí, Heredia; 3-Puriscal, San José; y 4-Golfito, Puntarenas.

**Desinfección.** Una vez en el laboratorio las hojas, nudos y entrenudos procedentes del campo fueron lavados con abundante agua y luego seccionados. De las hojas fueron tomados discos de la lámina de aproximadamente 10-15 mm de diámetro. Posteriormente, las secciones fueron sumergidas en una solución del bactericida Agrimicin (i.a. sulfato de estreptomycin)  $2\text{gl}^{-1}$  y el fungicida Benlate (i.a. benomil)  $2\text{gl}^{-1}$  con agitación constante por 2 horas, luego los tejidos se pusieron 1 minuto en etanol al 70% y finalmente en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5% por 15, 25 ó 30 minutos. Finalmente, los explantes fueron lavados 3 veces con agua desionizada estéril.

Cuando la contaminación por hongos fue muy fuerte, usando hojas como fuente de explante, se adicionó al medio de cultivo el fungicida Imazalil en dosis de  $0,5\text{mg l}^{-1}$ .

**Medio de Cultivo.** El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog, (1962) (MS) suplementado con  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-bencil aminopurina (6-BAP) y  $0,01 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido naftalenacético (ANA), 3% de azúcar y  $2 \text{ g l}^{-1}$  de Phytigel. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 antes de ser autoclavado por 25 min. a  $120^{\circ}\text{C}$  y a  $2 \text{ Kg cm}^{-2}$ .

**Condiciones de cultivo.** Una vez inoculado el material en los frascos, éste fue colocado en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas, luz blanca a  $46 \mu\text{E}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$  y con una temperatura promedio de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### ***Multiplicación***

En esta etapa del estudio se utilizó el mismo medio de cultivo (MS) y las mismas condiciones *in vitro* mencionados en el establecimiento. Para determinar la tasa de multiplicación se colocaron 6 microestacas procedentes de plántulas ya establecidas *in vitro*, con un nudo cada una, en un frasco con 30 ml de medio de cultivo, para un aproximado de 100 microestacas por procedencia. Además, se comparó la producción de brotes utilizando hojas como explante. Para ello se colocaron 4 hojas por frasco de plantas previamente establecidas *in vitro*, para un total de 24 hojas por procedencia. Cada 2 semanas se cuantificó el número de brotes totales producidos por explante y se determinó un promedio para cada procedencia. La evaluación del material se realizó durante 12 semanas.

### ***Enraizamiento***

Plántulas y embrioides individualizados de  $\pm 5 \text{ cm}$  de altura, fueron cultivados en un medio MS con la mitad de la concentración de las sales (MS/2) y suplementado con  $6 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA), el resto de los componentes y condiciones de cultivo fueron idénticos a los descritos en la etapa de establecimiento.

### ***Aclimatización***

Plántulas de  $\pm 5 \text{ cm}$  de altura, enraizadas *in vitro* fueron llevadas al invernadero. Luego de remover el medio de cultivo de las raíces con suficiente agua, las plántulas fueron sembradas en bandejas con una mezcla estéril 1:1 de suelo:fibra de coco. Después de la siembra las bandejas fueron cubiertas con plástico adhesivo. Las bandejas fueron mantenidas en el invernadero y la evaluación del porcentaje de plántulas aclimatizadas se realizó a las 8 semanas.



Debido a problemas con el sistema radical de las plántulas, se llevó al invernadero un nuevo grupo de plántulas de igual tamaño al anterior. A éstas se les eliminó el sistema radical generado *in vitro* y fueron separadas en grupos de 25, para realizar 6 tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento.

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Rootone-F® (1-Naphthalenacetamide 0,067%; 2-Methyl-1-naphthalenacetic acid 0,033%; 2-Methyl-1-naphthalene acetamide 0,013%; Indol-3-butyric acid 0,057%; Thiram 4%) en polvo.
2. Agriroot I DP® (4-indol-3-butyric acid 1%) en polvo.
3. AIA 50 mg l<sup>-1</sup> líquido.
4. Rootone-F® en polvo + suelo fertilizado con 0,37 mg l<sup>-1</sup> de fósforo.
5. Agriroot I DP® en polvo + suelo fertilizado con 0,37 mg l<sup>-1</sup> de fósforo.
6. Testigo

Una vez tratadas, las plántulas fueron sembradas en bandejas con una mezcla estéril 1:1 de suelo:fibra de coco. Después de la siembra las bandejas fueron cubiertas con plástico adhesivo. Las bandejas fueron mantenidas en el invernadero. La evaluación se realizó a las 8 semanas.

#### ***Análisis de los datos***

Los datos fueron analizados usando el programa SYSTAT versión 9 (SPSS Inc. 1998). Un análisis de variancia (ANDEVA) de mediciones repetidas y la prueba de Tukey fueron usadas para detectar diferencias entre los tratamientos (Compton y Mize 1999, Mize *et al.* 1999). Cada frasco se consideró como una repetición.

## RESULTADOS

### *Recolección de las muestras*

Las localidades donde se recolectaron las muestras fueron seleccionadas por formar parte de otro proyecto en el que se realiza una caracterización fitoquímica de los principios activos de esta especie. En adición, los sitios en mención son considerados como una muestra representativa de las poblaciones de *P. acuminata* en Costa Rica.

### *Establecimiento*

Esta fase se compone de 2 pasos, el primero es la desinfección superficial de los explantes y el segundo el crecimiento en el medio de cultivo. En pruebas preliminares sobre la desinfección de los explantes (datos no mostrados) se determinó que con 2,5 % de NaOCl por 25 minutos, luego del tratamiento con Agrimicin y Benlate, la contaminación, cuando se utilizó entrenudos como fuente de explante, fue en promedio del 50%. Con el uso de nudos y secciones de la hoja la contaminación siempre sobrepasó el 80%. Concentraciones más altas de NaOCl o tiempos de exposición más prolongados, redujeron la contaminación pero también fueron letales para los tejidos, particularmente las hojas. La figura 2 A y B es un ejemplo del efecto nocivo de las altas concentraciones del desinfectante, aún en entrenudos; nótese que luego de 1 semana, los explantes se toman café o amarillentos y mueren. Estos resultados son comunes a los explantes de las 4 localidades evaluadas.

Durante el segundo paso del establecimiento, se encontró que el medio de cultivo utilizado fue apropiado para el establecimiento de los entrenudos, que fue el único tipo de explante que sobrevivió a la contaminación. En esta etapa, la respuesta al medio de cultivo de los explantes de las 4 localidades evaluadas fue similar.

A las 6 semanas de cultivo se observó las primeras manifestaciones de actividad morfogénica en los entrenudos, la formación de un callo amarillo claro se inició en ambos extremos del entrenudo (Figura 3A). A partir de la semana 16 se observó la aparición de brotes, los cuales siempre se formaron en el punto de unión entre el callo y el entrenudo (Figura 3B). Los entrenudos de la localidad de Guanacaste fueron los únicos en los que se observó, además de los callos en los extremos, la formación de pequeños callos a lo largo del entrenudo; sin embargo, éstos últimos no regeneraron plántulas.

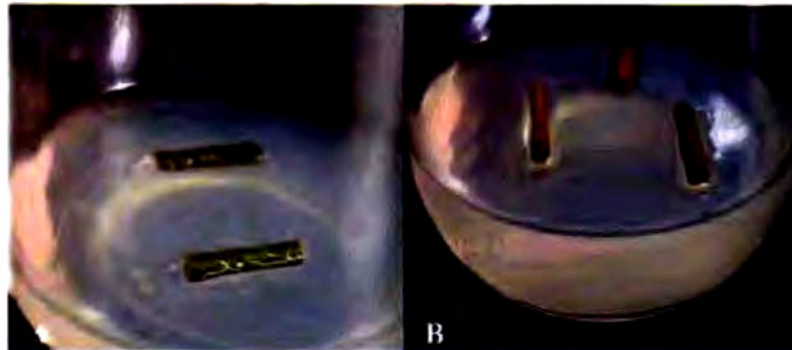


Fig. 2. Entrenados en la etapa de establecimiento. Recién inoculados (A) y con una semana de cultivo (B)

### ***Multiplicación***

Como se pudo observar durante la fase de establecimiento, los entrenados fueron el único tipo de explante que sobrevivió a la contaminación y que produjo brotes. Para la etapa de multiplicación se tomó los brotes producidos a partir de los entrenados y se cultivaron en forma independiente, en el mismo medio de cultivo de la fase anterior y bajo las mismas condiciones de luz y temperatura.

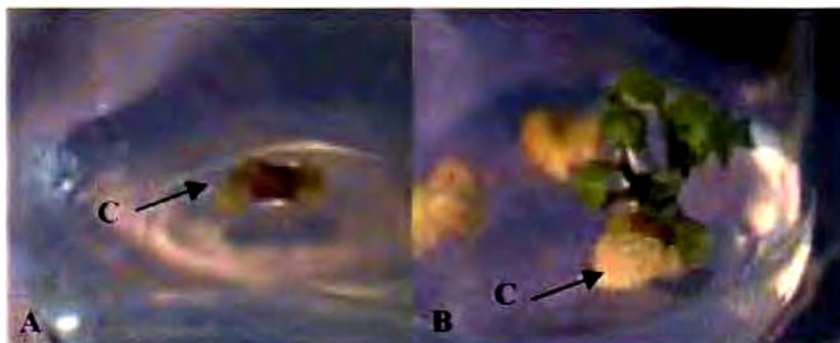


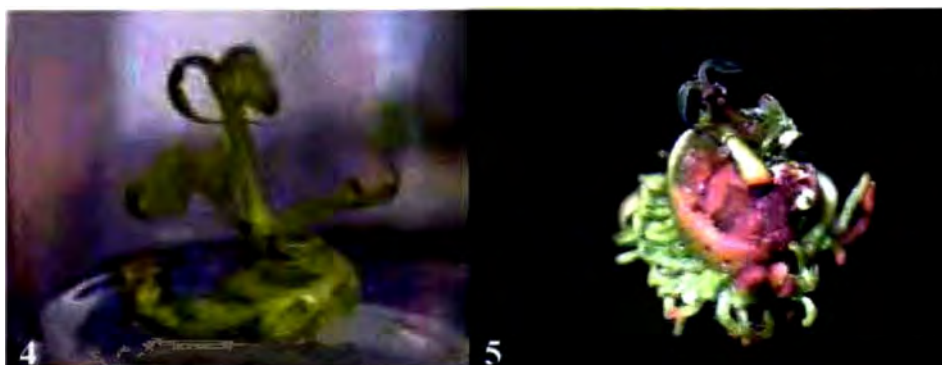
Fig. 3. Entrenado de *P. acuminata* con 8 semanas de cultivo (A), entrenado con 16 semanas (B). C = callo

Una vez que los brotes crecieron, estos fueron seccionados para obtener microestacas y así se inició el proceso de multiplicación. Además, se utilizó las hojas de los brotes recién seccionados como explantes para esta etapa.

En términos generales, las microestacas generaron gran cantidad de brotes a partir de las yemas axilares y de la región del tallo en contacto con el medio de cultivo

(Figura 4). Por su parte, las hojas respondieron con un arrollamiento, cambio de color y la formación de brotes sobre las venas media y secundarias, la figura 5 muestra algunos de estos aspectos, cabe aclarar que el origen de las plántulas formadas sobre las venas media y secundarias de las hojas, se determinó mediante un estudio histológico (Lara *et al.* 2002).

Debido a un problema de contaminación, con una bacteria endógena, los explantes provenientes de Sarapiquí, que sobrevivieron en la fase de establecimiento, se fueron muriendo gradualmente durante la etapa de multiplicación, por lo que para efectos de éste trabajo, las evaluaciones subsiguientes se realizaron únicamente con los materiales procedentes de Guanacaste, Gofito y Puriscal.



Figs. 4 y 5. Microestaca de Puriscal mostrando crecimiento y formación de un brote apical (4) y hoja también Puriscal a las 12 semanas de cultivo con arrollamiento y brotación en la vena media (5).

**Multiplicación a partir de microestacas.** Este proceso de multiplicación se evaluó cada 2 semanas hasta las 12 semanas de cultivo. A las 2 semanas de cultivo, primera evaluación, las microestacas contaban con un tamaño uniforme, color verde y un crecimiento activo, también ya se podía apreciar el inicio de formación de brotes. Estas características se mantuvieron hasta las 4 semanas, donde además de un aumento en el tamaño de los brotes se observó una mayor producción (Figura 6).

A las 6 semanas las microestacas ya mostraban diferencias entre las procedencias, respecto al número y desarrollo de brotes. Las microestacas de Puriscal-1, fueron las que mostraron el mayor número de brotes por microestaca.

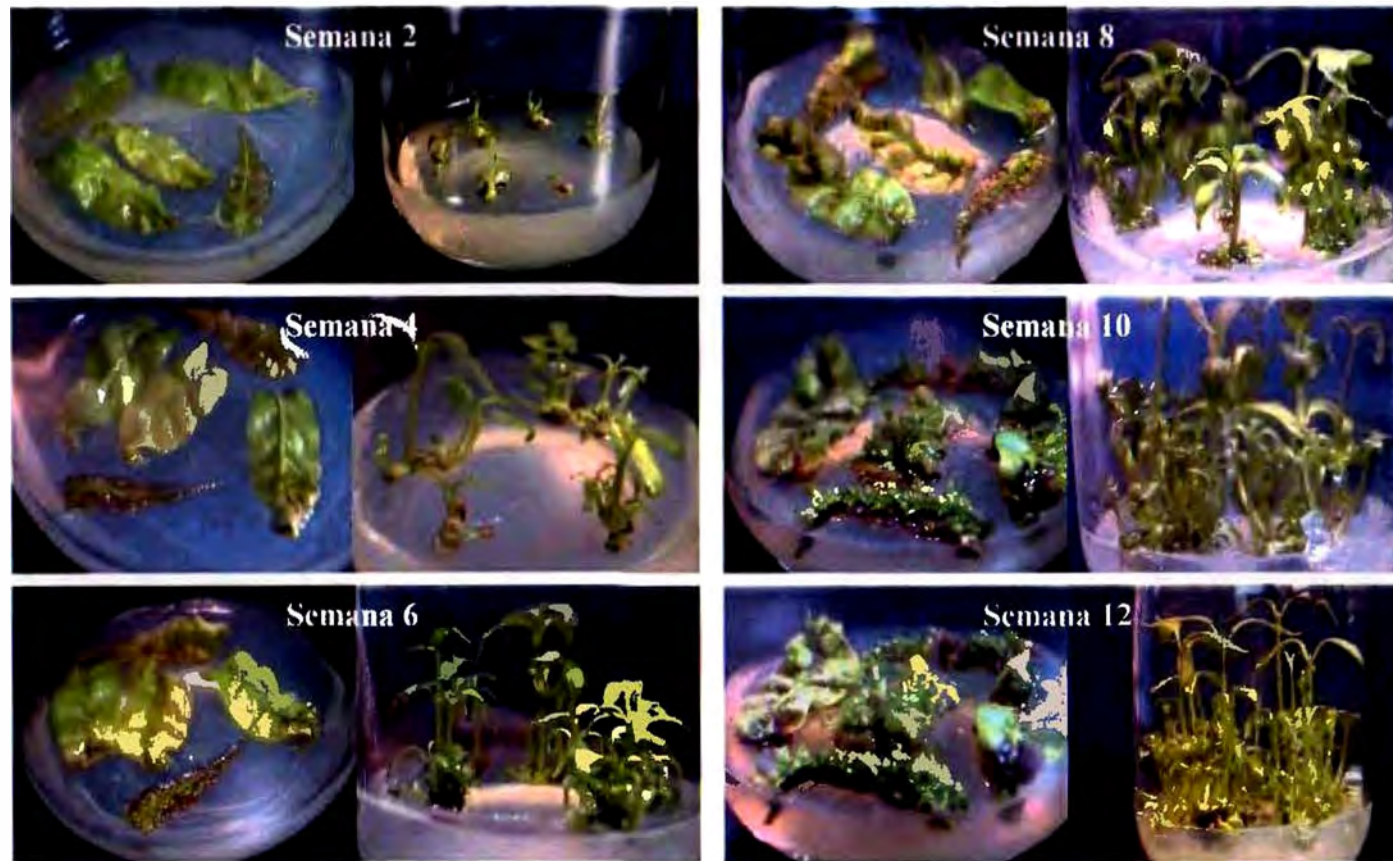


Fig. 6. Proceso de multiplicación de *Psychotria acuminata* (Puriscal-1) desde la semana 2 hasta la 12. En cada semana, la fotografía de la izquierda presenta la multiplicación a partir de hojas y la de la derecha la multiplicación a partir de microestacas.

En estos explantes fue difícil determinar el origen de los brotes entre la sección del tallo en contacto con el medio de cultivo y el nudo, ya que el potencial de brotación del nudo es sumamente alto, lo que hace que la epidermis del mismo se abra para dar paso a la emergencia de una gran cantidad de brotes (Figura 6). Por su parte los brotes producidos por Puriscal-2, son pocos en comparación con Puriscal-1 y en varios casos las microestacas no brotaron. Los brotes producidos por los explantes provenientes de Golfito presentan poco desarrollo, las hojas son delgadas y con una tendencia al enrollamiento. Las microestacas de Guanacaste, generan brotes principalmente en las yemas axilares. A partir de la semana 8 y hasta la semana 12, hubo una producción muy alta de brotes (Figura 6).

El análisis de variancia de los datos de producción de brotes, mostró diferencias ( $P < 0,001$ ) en el número promedio de brotes por microestaca según su procedencia. En general, Puriscal-1 mostró ser el material más prolífico, seguido por Puriscal-2, Golfito y Guanacaste (Figura 7).

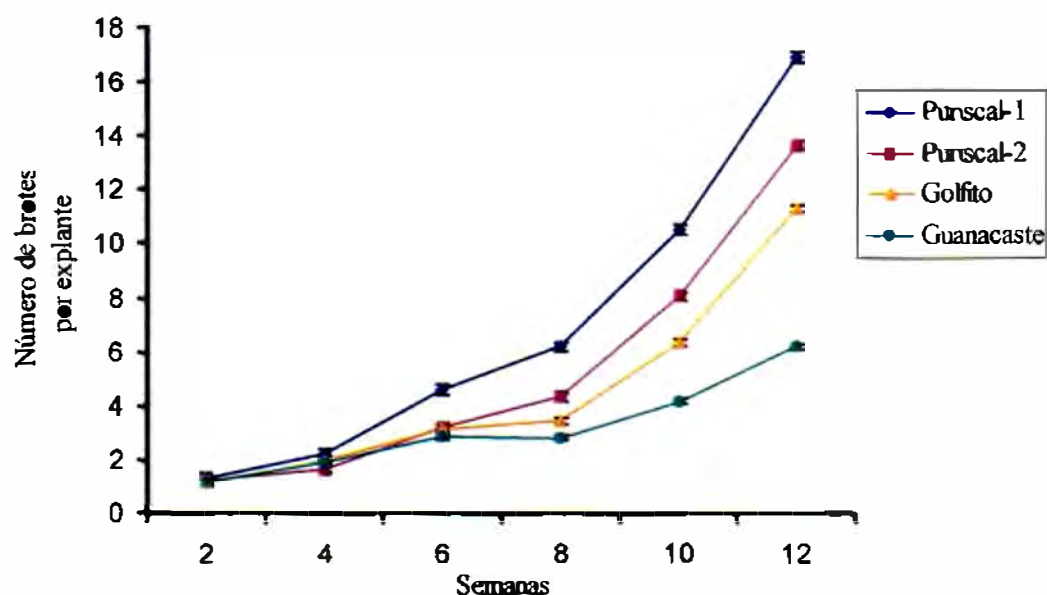


Fig. 7. Número de brotes promedio ( $\pm$  error estándar) por microestaca según su procedencia en *P. acuminata*.

El cuadro 1 muestra los resultados de multiplicación a partir de microestacas a las 12 semanas; el análisis estadístico indicó diferencias ( $P \leq 0,01$ ,  $F = 42,80$ ) en el promedio de brotes por explante según la procedencia. Al realizar la comparación entre las medias, se observó que entre Puriscal-2 y Golfito no hay diferencia para esta variable. Cuando se analizó el número de explantes brotados no se encontró diferencias ( $P > 0,05$ ) entre las procedencias.

Cuadro 1. Porcentaje de brotación y promedio de brotes por microestaca de *Psychotria acuminata*, de diferente procedencia, a las 12 semanas.

Procedencia	# Explant.	Expl. Brot. <sup>1</sup>	% Brotac.	Prom.Br./Expl. <sup>2</sup>
Puriscal-1	148	138	93	$17 \pm 0,18^a$
Puriscal-2	139	129	93	$14 \pm 0,16^b$
Golfito	88	88	100	$12 \pm 0,15^b$
Guanacaste	113	95	84	$6 \pm 0,10^c$
Total	488	450	92	12,25

<sup>1</sup>Expl. Brot. = explantes que brotaron.

<sup>2</sup>Los valores representan los promedios  $\pm$  E.E. del número de brotes por microestaca para cada procedencia. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$ , según la prueba de Tukey.

**Multiplicación a partir de hojas.** A las 2 semanas de cultivo las hojas presentan una coloración verde-amarillento con algunas pequeñas regiones café (Figura 6). Dos semanas más tarde, en las hojas de Puriscal-1, se observó algunas protuberancias en las venas media y secundarias. En la semana 6, Puriscal-2 también mostró el crecimiento de protuberancias sobre las venas media y secundarias. En las hojas de las otras procedencias, las protuberancias muestran un crecimiento diferencial. En la semana 8 hubo un mayor crecimiento de las protuberancias tanto de Puriscal-1 como de Puriscal-2 y las protuberancias en las hojas de Golfito fueron menores en número y en tamaño.

En la semana 10 se observó que un 91,3% de las hojas de Puriscal-1 (Figura 6), un 78% de las de Puriscal-2, un 43,5% de las de Golfito y un 62,5 % de las de Guanacaste se encontraban en el proceso de brotación. Cabe aclarar que la brotación no fue sincronizada entre las diferentes procedencias ni entre las hojas de cada

procedencia, por lo que en algunas hojas el proceso morfológico hacia la formación de brotes fue más rápido y evidente que en otras.

A las 12 semanas, todas las hojas de Puriscal-1 y un 89% de las de Puriscal-2 habían iniciado un proceso de brotación. Más aún, algunos de los brotes ya habían completado su desarrollo hasta la formación de plántulas. En Golfito y Guanacaste el número de hojas que inició el proceso de brotación, aumento a un 56% y un 67%, respectivamente. La figura 8 muestra el número de brotes por explante a las 10 y 12 semanas. Puede observarse la gran capacidad de Puriscal-1, en comparación con los otros materiales.

El cuadro 2 muestra los resultados de brotación de las hojas según la procedencia a las 12 semanas, el análisis estadístico de los datos mostró diferencias a  $P \leq 0,01$  ( $F = 64,99$ ) para la variable promedio de brotes por hoja; sin embargo, la prueba de separación de medias incluyó a Puriscal-2, Golfito y Guanacaste en un solo grupo y a Puriscal-1 en otro. No se detectó diferencias ( $P > 0,05$ ) en el número de hojas brotadas.

Después de las 12 semanas no se observó ningún incremento en el número de hojas brotadas, básicamente todas las hojas con brotes, sin importar la procedencia, siguieron el mismo patrón morfológico (datos no mostrados).

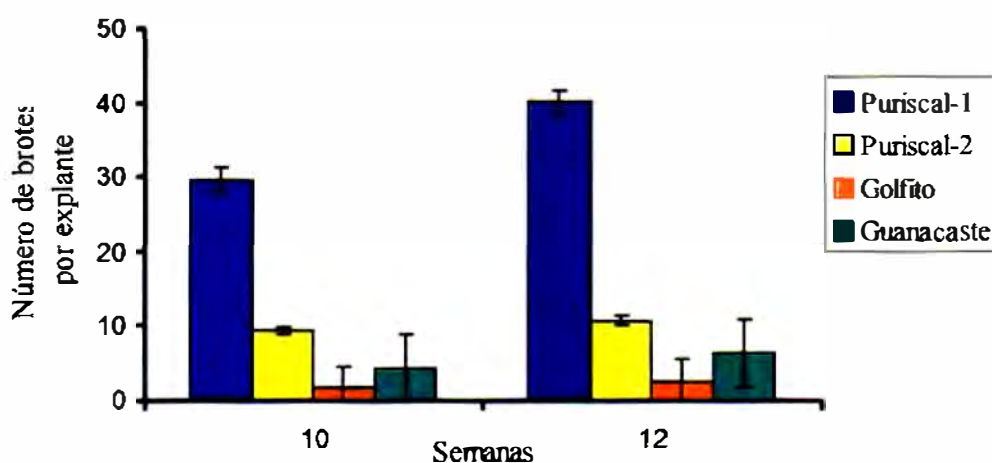


Fig. 8. Promedio de brotes a partir de hojas según su procedencia. Las barras indican el error estándar.



Cuadro 2. Porcentaje de brotación y promedio de brotes por hoja de *Psychotria acuminata*, de diferente procedencia, a las 12 semanas.

Procedencia	# Explant.	Expl. Brot <sup>1</sup>	% Brotac.	Prom. Br./Expl. <sup>2</sup>
Puriscal-1	23	23	100	40 ± 1,67 <sup>a</sup>
Puriscal-2	9	8	89	12 ± 0,60 <sup>b</sup>
Golfito	23	13	56	4 ± 2,90 <sup>b</sup>
Guanacaste	24	16	67	10 ± 4,54 <sup>b</sup>
Total	58	60	78	16,5

<sup>1</sup>Expl. Brot. = explantes que brotaron.

<sup>2</sup>Los valores representan los promedios ± E.E. del número de brotes por hoja para cada procedencia. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$ , según la prueba de Tukey.

Al final de las 12 semanas de cultivo, en ambos tipos de explante, es factible inferir (Cuadros 1 y 2), que los explantes que proceden de Puriscal son los que muestran mayor producción de brotes bajo las condiciones dadas y en mayor grado Puriscal-1. El promedio general de brotación, de las 4 procedencias, en las microestacas fue de 92% y el promedio de brotes por explante de 12,25. Las hojas tienen un promedio de brotación de 78% con 16,5 brotes por hoja. A pesar de esto, en la figura 6 se puede observar que la diferencia de tamaño entre los brotes provenientes de las hojas y los de las microestacas es muy marcada en la semana 12. Mientras que los brotes de las microestacas pueden ser subcultivados separadamente a las 12 semanas, los brotes de las hojas están aún en una etapa muy incipiente de crecimiento.

### **Enraizamiento**

Las plántulas de *Psychotria acuminata* en el medio MS/2 suplementado con  $6 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA enraizaron en un 100 %. El crecimiento de las raíces se empieza a observar luego de una semana en el medio de enraizamiento. A las 8 semanas las raíces son abundantes, su aspecto es largo y fibroso (Figura 9 A y B)

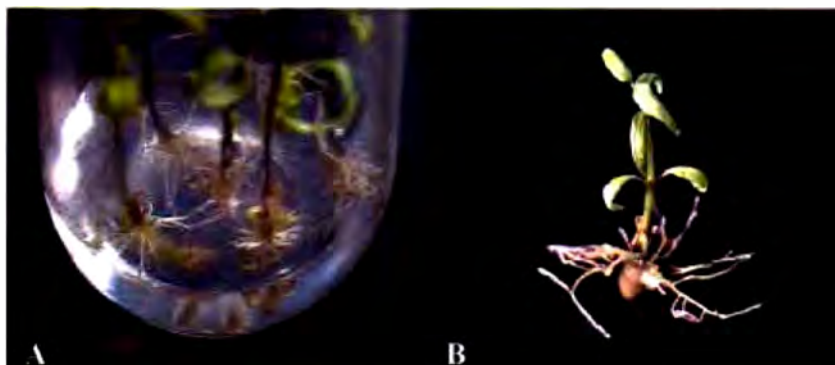


Fig. 9. Enraizamiento de plántulas de *P. acuminata* con 4 semanas (A) y 12 semanas (B) de cultivo en un medio con  $6 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA.

### *Aclimatización*

Ocho semanas después de la siembra en el invernadero, se observó que el tratamiento con Agrirroot 1 DP<sup>®</sup> indujo un nuevo sistema radical fibroso y abundante, con raíces cuya longitud promedio fue de 1,5 cm. Con la utilización de Rootone-F<sup>®</sup> el crecimiento de raíces nuevas fue pobre; el AIA indujo la formación de algunas raíces, las cuales fueron poco abundantes. Cuando las plántulas fueron tratadas con Rootone-F<sup>®</sup> o Agrirroot 1 DP<sup>®</sup> y sembradas en un suelo fertilizado con fósforo, el tratamiento con Rootone-F<sup>®</sup> propició algún enraizamiento, mientras que con Agrirroot 1 DP<sup>®</sup> no hubo diferencia entre las plántulas con y sin fertilización fosforada. Una vez que se eliminó el plástico que cubría las bandejas y la humedad relativa fue menor, se observó que en el tratamiento con Agrirroot 1 DP<sup>®</sup> las plántulas sobrevivieron en un 80% y con el AIA un 30% comparado con 0% obtenido en los otros tratamientos. La figura 10 muestra el aspecto del sistema radical de las plántulas en cada tratamiento a las 8 semanas.



Fig. 10. Desarrollo de raíces en plantas de *P. acuminata* después de 8 semanas de aclimatización. (A) Control, (B) Agrirroot 1 DP<sup>®</sup>, (C) Rootone-F<sup>®</sup> y (D) AIA 50 mg l<sup>-1</sup>

## DISCUSION

### *Establecimiento*

Para la micropropagación de *Psychotria acuminata* se seleccionaron 3 tipos de explante: nudos, hojas y entrenudos. Los nudos se consideran un buen explante debido a la presencia de meristema lateral en la base de la hoja, por lo que la inducción de respuestas morfogénicas mediante el uso de reguladores de crecimiento no debería ser un proceso difícil. Sin embargo, la morfología de la yema resulta propicia para la acumulación de hongos y bacterias, en este caso, la alta contaminación no permitió el establecimiento de nudos.

Las hojas fueron escogidas como una posible fuente de explante debido a que trabajos en café indican que las hojas de esta planta son un tipo de explante que ha dado muy buenos resultados por el alto potencial morfogénico de las mismas. Siendo *Psychotria*, al igual que el café, una Rubiácea, uno de nuestros objetivos era lograr el establecimiento *in vitro* de esta especie, a través de hojas. Sin embargo, con la metodología utilizada, los resultados no fueron satisfactorios del todo, por lo que se decidió incorporar el fungicida Imazalil (0,5 mg l<sup>-1</sup>) al medio de cultivo, nuevamente los resultados fueron negativos. Sabemos que el fungicida no afectó la habilidad de los tejidos para crecer, pues el testigo que se utilizó fue hojas de una planta que se encontraban *in vitro* y éstas continuaron su desarrollo morfogénico sin ningún

problema, en tanto que la hoja traída del campo no mostró ningún cambio. Esta falta de respuesta, aún cuando el tejido se encontraba vivo, se pudo deber al estado fisiológico de la hoja, el cual es sabido tiene gran influencia en la inducción de respuestas morfogenéticas (De Fossard 1986, Mroginski y Roca 1991).

Los entrenudos regularmente no se utilizan como fuente de explante, debido a la carencia de áreas de crecimiento que permitan la regeneración de plantas. En *Psychotria acuminata*, por las limitaciones en el suministro de tejido vegetal, causado por la distancia entre los sitios de recolección y el laboratorio y las restricciones legales en la cantidad de materiales a coleccionar, se decidió utilizar los entrenudos, los cuales además poseen una epidermis lisa y cerosa, que reduce la acumulación de contaminantes.

Para que una fase de establecimiento sea considerada exitosa, deben darse 2 condiciones, la primera es que el tejido vegetal pueda ser introducido *in vitro* libre de contaminantes y la segunda es que el medio de cultivo sea apropiado para el crecimiento y regeneración del explante. El sistema de establecimiento sugerido por Palma e Hidalgo (1993), fue eficiente en la introducción *in vitro* de entrenudos, pero cuando se trató de nudos u hojas, la contaminación, causada principalmente por hongos, no pudo ser controlada y hubo una pérdida prácticamente total de los explantes. Estos investigadores lograron un mayor porcentaje de establecimiento; el cual fue posible gracias al uso del cloruro de mercurio como desinfectante. En el presente estudio los porcentajes de establecimiento fueron menores, pero sin el riesgo asociado al uso de productos tan tóxicos para la salud humana como el cloruro de mercurio.

Tratamientos más fuertes de desinfección con los productos utilizados siempre resultaron en un control total de la contaminación, pero asociado a ello ocurrió la muerte del explante, independientemente de si éste fue un nudo, un entrenudo o una hoja. También, la alta contaminación observada se debe principalmente a que *Psychotria* es una planta del sotobosque, lo que hace que las condiciones ambientales sean propicias para la proliferación de hongos y bacterias, que en condiciones naturales no causan gran daño a la planta pero en condiciones *in vitro*, el medio nutritivo resulta ideal para su proliferación, con lo que pueden eliminar los tejidos en cuestión de horas. Aún así, los tejidos que sobrevivieron fueron suficientes para iniciar la multiplicación de esta especie, en algunas especies la respuesta de un único explante ha dado paso a la

obtención de cientos de plantas (comunicación personal con investigadores en palma aceitera).

Con el medio de cultivo utilizado, los entrenudos produjeron callos en los extremos, posiblemente inducidos a partir del cambium vascular. Como se indicó, los brotes que se formaron provenían de la sección entre el callo y el corte en el entrenudo, por lo que pareciera que el origen de los mismos es directo. De hecho, no se observó diferencias morfológicas que indicaran la presencia de algún tipo de variación somaclonal (George y Sherrington 1984).

### **Multiplicación**

En la fase de multiplicación, los resultados muestran que tanto las microestacas como las hojas son un material del cual es posible micropropagar clonal y masivamente *P. acuminata*.

**Multiplicación a partir de microestacas.** Con el crecimiento y desarrollo de los brotes obtenidos a partir de los entrenudos, se inició la fase de multiplicación utilizando las microestacas como material de propagación. Las microestacas cultivadas en el mismo medio de cultivo que se utilizó para el establecimiento, iniciaron un proceso de producción de brotes en 2 puntos principalmente, los nudos y la sección del tallo en contacto con el medio de cultivo. El potencial de producción de brotes varió con la procedencia de los materiales, esto podría indicar que genéticamente son materiales diferentes. En términos generales, Puriscal-1 fue el material más prolífico, seguido de Puriscal-2, Guanacaste y Golfito. Con respecto a Puriscal-1 es interesante notar que su potencial de multiplicación fue mayor que el de los demás materiales, esto podría ser un indicativo de que la permanencia *in vitro* ha mejorado su capacidad de reproducción, al inducir en los tejidos un estado de juvenilidad, tal y como ha sido reportado en uva (R. Litz, comunicación personal). Desde luego que también podría indicar que Puriscal, en general, es otro genotipo, el cual además tiene la característica de contar con una mayor capacidad de multiplicación. La introducción de Puriscal-1 permitió evaluar cómo periodos prolongados *in vitro* podrían afectar el potencial de multiplicación de algunos explantes o especies, al comparar su respuesta con el material de la misma localidad (Puriscal-2), suponiendo que son genéticamente idénticos. Las diferencias en el promedio de brotes por microestaca según la procedencia (Cuadro 1) también se

reflejaron en el inicio de la brotación, el cual fue más temprano en los materiales que habían permanecido por más tiempo en cultivo *in vitro* y tardío en los materiales de Guanacaste.

Algunos aspectos importantes relativos a la micropropagación de esta especie con el uso de microestacas, es que durante el proceso algunos de los brotes producidos por las microestacas también entraron en un proceso de multiplicación. Cabe aclarar que para efectos de esta investigación, los brotes producidos de esta forma no se contabilizaron como parte de los brotes producidos por explante, dado que esta característica solo se presentó en algunas microestacas y solo en Puriscal-1, lo cual podría ser efecto de su permanencia en cultivo *in vitro*. También resultó interesante observar que aún los brotes creciendo *in vitro* pueden presentar distinto potencial morfogénico a lo largo de su tallo, desde su parte apical hasta la sección basal. Esto fue evaluado en estudios paralelos (datos no mostrados) con el uso de microestacas de Puriscal-1, donde se observó que las microestacas de la parte apical y media mostraron un mayor potencial morfogénico que las de la parte basal; la literatura es concordante con este aspecto (Litz y Jarret 1991), aunque en la mayoría de los casos esto está referido a la toma de los explantes cuando se va a introducir material de campo a condiciones *in vitro* (George 1993, De Fossard 1986).

La gran capacidad de multiplicación de *Psychotria acuminata* a partir de microestacas, se puede corroborar en la figura 7, donde las curvas tienden a crecer en forma casi exponencial, lo que indica que aún luego de las 12 semanas se siguen produciendo brotes, aspecto que es de suma importancia para incrementar el número de plantas de esta especie.

**Multiplicación a partir de hojas.** Durante la etapa de establecimiento, la posibilidad de utilizar hojas como explante para la micropropagación de esta especie, fue prácticamente descartada, luego de los problemas observados durante la desinfección de las mismas; sin embargo, tal y como ya se mencionó, otras rubiaceas, como el café, han sido micropropagadas exitosamente a partir de hojas (Sondahl y Loh 1988). Con Puriscal-1, se observó que cuando hojas de las vitroplantas de *P. acuminata* entraron en contacto con el medio de cultivo, se inició un proceso morfogénico, principalmente sobre las venas media y secundarias y en menor grado en la lámina; inclusive muchas hojas todavía unidas al tallo producen brotes cuando entran en contacto con el medio de

cultivo. Esta observación fue lo que motivó el estudio del uso de hojas de plántulas creciendo *in vitro* para la micropropagación de *P. acuminata*.

El proceso de brotación en las hojas fue más evidente a partir de las 10 semanas, momento en que se inició el conteo de los brotes. La figura 8 muestra en forma gráfica, la capacidad de las plantas de distintas localidades para reproducirse a partir de este órgano. Este resultado confirma que hojas de plantas que han estado *in vitro*, por períodos de tiempo prolongados, presentan un mayor potencial morfogénico, tal es el caso de Puriscal-1. También este resultado, pareciera indicar que la brotación a partir de hojas no está influenciada por la procedencia ya que entre Puriscal-2, Guanacaste y Golfito no hubo diferencias significativas; contrario a lo que se observó en el caso de la micropropagación por microestacas (Cuadro 1), donde si hay un efecto de la procedencia sobre la brotación. A su vez el cuadro 1 es reiterativo sobre el efecto favorable que ejerce la permanencia de las microestacas en condiciones *in vitro* sobre su capacidad de multiplicación.

Luego de la última evaluación de las hojas a las 12 semanas, éstas se mantuvieron en observación, se encontró que aún después de un año las hojas se encuentran produciendo embriones somáticos, aunque la cantidad de los mismos tiende a disminuir (datos no mostrados). Esta característica de mantener un tejido produciendo embrioides en forma casi constante representa una ventaja, particularmente en una especie cuya población, en general, es muy baja pero sus posibilidades de uso, una vez domesticada, son muy altas.

La regeneración a partir de hojas evidenció que los brotes fueron producidos por 2 vías, organogénesis y embriogénesis somática, donde el proceso dominante fue la embriogénesis somática (Lara *et al.* 2002). Como el proceso de regeneración ocurrió en forma directa, tanto las plántulas producidas por organogénesis como las producidas por embriogénesis somática, se espera que sean genéticamente estables (Wawrosh y Koop 1999, Wilhelm 1999, Neumann 1999, von Arnold *et al.* 2002 ). Estos resultados crean nuevas expectativas no solo acerca de la multiplicación de ésta especie, sino también sobre otros posibles usos de ésta característica.

Sumarizando el proceso de multiplicación de *Psychotria acuminata*, la figura 6 muestra las vías morfogénicas por las cuales se puede aumentar la población de esta especie. A partir de plántulas creciendo *in vitro*, fue posible regenerar brotes adventicios y embriones somáticos en gran cantidad, los cuales aparecen en forma no

sincronizada y cuya producción a partir del tejido madre se puede mantener por períodos superiores a 1 año. En este trabajo se evidenció el efecto positivo que tiene la permanencia de tejidos de ésta especie en cultivo *in vitro*, así como un posible efecto del genotipo en la capacidad de regeneración de los explantes.

### ***Enraizamiento***

Con respecto al enraizamiento, se encontró que en *P. acuminata*, dependiendo de la vía de multiplicación, es necesaria una fase de enraizamiento. En el medio de cultivo seleccionado los brotes enraizaron en un 100% y a las 8 semanas el sistema radical parecía el adecuado para llevar las plántulas a la fase de aclimatización. Durante el enraizamiento no se observó ningún efecto del genotipo, los brotes de todas las localidades enraizaron a la misma velocidad y la apariencia de las raíces fue la misma.

### ***Aclimatización***

Establecer un protocolo para la aclimatización de esta especie no ha sido una tarea fácil, son muchos los intentos realizados que han tenido resultados negativos. En condiciones de penumbra y alta humedad relativa, las plántulas se mantienen vivas; sin embargo, cuando la humedad relativa disminuye (remoción del plástico), el 100% de las plántulas inicia un proceso de muerte descendente. Recientemente, se observó que el sistema radical de las plántulas producido *in vitro*, no es funcional y muere prácticamente desde el momento en que se iniciaba la aclimatización. Esa situación motivó la investigación que aquí se presenta, con el uso de enraizadores. Durante la evaluación se observó que las plántulas que tenían una apariencia más saludable, también tenían un mejor sistema radical. Esta característica fue evidente en el tratamiento con Agriroot 1 DP<sup>®</sup>. Una vez que se inició la disminución de la humedad relativa, también se observó que la mayor sobrevivencia de las plántulas (80%) fue en ese mismo tratamiento. Porcentajes de sobrevivencia similares a los del presente trabajo han sido reportados por Hidalgo *et al.* (1999). En el tratamiento con AIA el porcentaje de sobrevivencia fue de 30% y en el resto de los tratamientos la sobrevivencia fue de un 0%. Aún cuando la evaluación de la aclimatización se realizó solo por 8 semanas, las plántulas aclimatizadas están siendo fertilizadas con fósforo, con el objetivo de mejorar aún más el sistema radical y aumentar así las posibilidades de éxito de esta planta en el campo.



Los resultados obtenidos acerca de la no funcionalidad de las raíces producidas *in vitro* y la necesidad de enraizar los brotes de *Psychotria acuminata* durante la fase de aclimatización, lleva a concluir que en términos prácticos, la fase de enraizamiento *in vitro* no es necesaria.

Para finalizar, aunque esta planta se reproduce en la naturaleza, principalmente, en forma vegetativa, no hay estudios referentes a este tipo de propagación utilizando los métodos convencionales y la reproducción por semilla es muy limitada. De hecho, en las zonas donde se encuentra esta especie, es factible observar que la mayoría de las plantas se concentran en un área de  $\pm 250 \text{ m}^2$  y dentro de esa área en pequeños grupos, lo que sugiere que cada grupo de  $\pm 8$  plantas proviene de una sola semilla que germinó y las plantas producidas se reprodujeron a partir de rizomas. Esta situación indica que existen problemas con la reproducción vía semilla, los cuales son desconocidos, pero podría tratarse de problemas con plagas y enfermedades, baja viabilidad o condiciones ambientales poco favorables para la germinación. Ante esta serie de atenuantes, la biotecnología se presenta como una alternativa viable para reproducir clonal y masivamente *Psychotria acuminata*.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean manifestar su agradecimiento al Dr. Francisco Saborío P. del Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica por la revisión crítica del manuscrito. A los señores Marlon y Didier Arguedas B. por su colaboración durante las giras de campo y el trabajo de laboratorio.

## LITERATURA CITADA

- AMMOUR T., OCAMPO R., ROBLES G. 1994. Caracterización de los sectores asociados a la producción, comercialización y transformación de plantas medicinales en Costa Rica. Documento de Trabajo N° 3. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 14 p.
- COMPTON M.E., MIZE C.W. 1999. Statistical considerations for *in vitro* research: I- Birth of an idea to collecting data. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 35: 115-121.
- De FOSSARD R.A. 1986. Principles of plant tissue culture. *In* Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Ed. by Zimmerman R.H., Griesbach R.J., Hammerschlag F.A., Lawson R.H. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands. 371 p.
- GAO S.L, ZHU D.N, CAI Z.H, JIANG Y., XU D.R. 1999. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant - *Fritillaria unibracteata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59(3): 197-201.
- GEORGE E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The technology. Exegetics Ltd, 2<sup>nd</sup> Ed., England. 574 p.
- GEORGE E.F., SHERINGTON P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eastern Press; Great Britain. 709 p.
- GLINSKI J.A., DAVID E., WARREN T.C., HANSEN G., LEONARD S.F., PITNER P., PAV S., ARVIGO R., BALICK M.J., PANTI E., GROB P.M. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide *a*, a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochemistry and Photobiology* 62 (4): 144 -150.

- HIDALGO N., GÓMEZ L., SABORIO F. 1999. Regeneración de brotes a partir de hojas de *Psychotria acuminata*. In XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Vol II (ed) Floria Bertsch, Jaime Garcia, German Rivera, Fernando Mojica y Walter Badilla. EUNED y Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José, Costa Rica. 215 p.
- JHA S., SAHU N.P., MAHATO S.B. 1988. Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. *Planta Médica*. January, 504 - 506.
- LARA A., VALVERDE R., GOMEZ L. 2002. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. En preparación.
- LITZ R, JARRET R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In Cultivo de tejidos en agricultura. Roca W, Mroginski L. (eds). CIAT, Colombia 969 p.
- MIZE C.W., KOEHLER K.J., COMPTON M.E. 1999. Statistical considerations for *in vitro* research: II-Data to presentation. In *Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 35: 122-126.
- MOHAMED M.A-H, HARRIS P.J.C., HENDERSON J. 1999. An efficient *in vitro* regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55(3):211-215.
- MROGINSKI L., ROCA W. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. In Cultivo de tejidos en agricultura. Roca W, Mroginski L. (eds). CIAT, Colombia. 969 p.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- NEUMANN K.H. 1999. Some physiological aspects in the development of plant cell and tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35: 159-161.
- PALEVITCH D. 1991. Agronomy applied to medicinal plant conservation. *In The conservation of medicinal plants*. Ed. by Akerele O., Heywood V., Synge H. Cambridge University Press. Cambridge. p. 167-178.
- PALMA T., HIDALGO N. 1993. Micropropagación *in vitro* de raicilla *Psychotria ipecacuanha*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. 58 p.
- ROUSSOS P.A., TOLIA-MARIOLI A., PONTIKIS C.A., KOTSIAS D. 1999. Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57(2): 133-137.
- SAXENA P. 1999. Medicinal plants: identification, propagation and marketing. *In 1<sup>er</sup> Taller Costa Rica-Canadá de transferencia de tecnología, biodiversidad y biotecnología*. Costa Rica. p. 45-49.
- SKORUPA L.A., ASSIS M.C. 1998. Collecting and conserving Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. *Economic Botany* 52 (2): 209-210.
- SOLIS P.N., WRIGHT C.W., GRUPTA M.P., PHILLIPSON J.D. 1993. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. *Phytochemistry* 33 (5): 1117-1119.
- SONDAHL M.R., LOH W.H.T. 1988. Coffee biotechnology. *In Coffee*. Ed. by Clarke R.J., Macrae R. Elsevier applied science publisher. England. 262 p.
- von ARNOLD S., SABALA I., BOZHOKOV P., DYACHOK J., FILONOVA L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69 (3):233-249.

**WAWROSCH C., KOPP B.** 1999. Application of plant tissue culture in protection and domestication of rare and endangered medicinal plants. In *Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 35: 180-181.

**WILHELM E.** 1999. Tissue culture of forest trees. In *Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 35: 163-164.

**YOSHIMATSU K., SHIMOMURA K.** 1991. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* (A. Richard). *Plant Cell Reports* 9: 567-570.



**ARTÍCULO II**

**HISTOLOGIA DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y  
BROTOS ADVENTICIOS INDUCIDOS EN  
HOJAS DE *Psychotria acuminata***

## HISTOLOGIA DE EMBRIONES SOMATICOS Y BROTES ADVENTICIOS INDUCIDOS EN HOJAS DE *Psychotria acuminata*

Alfonso Lara, Roberto Valverde, Luis Gómez. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

### RESUMEN

Embriones somáticos y brotes adventicios fueron inducidos directamente de hojas de *Psychotria acuminata* cultivadas *in vitro* en un medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de 6-BAP, 0,01 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de ANA y 2 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de phytigel. La mayor producción de ambas estructuras se observó en la superficie adaxial, principalmente, sobre las venas media y secundarias de la hoja. Un estudio histológico permitió corroborar la presencia de embriogénesis somática y organogénesis. Ambos eventos ocurrieron en forma simultánea y no sincronizada. Los embrioides fueron tanto de origen unicelular como multicelular y se observó las diferentes fases en el desarrollo de los mismos. En el caso de los brotes organogénicos, fue evidente una conexión vascular entre ellos y el tejido madre. En ningún caso se observó la formación de callo previo a los procesos morfogénicos mencionados. La confirmación del desarrollo de brotes organogénicos directos y la posibilidad de desarrollar un cultivo de embriones somáticos, son elementos clave en la implementación de otros métodos biotecnológicos para el aprovechamiento de los recursos fitoquímicos de esta planta.

**Palabras clave:** *Psychotria acuminata*, morfogénesis, embriogénesis, organogénesis, planta medicinal, histología, *in vitro*

## ABSTRACT

**Histology of somatic embryos and adventitious shoots induced from leaves of *Psychotria acuminata*.** Somatic embryos and adventitious shoots were induced from leaves of *Psychotria acuminata* taken from *in vitro* plantlets. Leaves were cultured in a Murashige & Skoog (1962) medium, supplemented with 3 mg l<sup>-1</sup> of 6-BAP, 0.01 mg l<sup>-1</sup> of NAA and 2 g l<sup>-1</sup> of phytigel. The highest production of both structures occurred all over the midrib and some sections of secondary ribs of the adaxial surface and their development was not preceded by callus growth. Somatic embryogenesis and organogenesis occurred simultaneously and in a non-synchronized way. Embryos have a single and a multiple cell origin, in both cases all the developmental stages of somatic embryogenesis formation were observed. On the other hand, the organogenic event was determined by the connection between the vascular tissue of the shoot with the one of the explant. The verification of direct organogenesis and the possibility of developing somatic embryogenic cultures, are key elements in implementing other biotechnology methods to exploit the phytochemical resources of this plant.

**Key words:** *Psychotria acuminata*, morphogenesis, embryogenesis, organogenesis, medicinal plant, histology, *in vitro*

## INTRODUCCION

*Psychotria acuminata* Benth, es una planta tropical de zonas boscosas que pertenece a la familia Rubiaceae (Burger 1993). Esta planta tiene gran importancia en el ámbito comercial ya que contiene emetina, un alcaloide de isoquinolina, además de otros compuestos de interés farmacológico y científico (Solís *et al.* 1993, Glinski *et al.* 1995). Estos alcaloides son utilizados como expectorantes, eméticos en casos de envenenamiento y para el tratamiento de la disentería amébrica severa causada por *Entamoeba histolitica* (Skorupa y Assis 1998, Solís *et al.* 1993, Veeresham *et al.* 1994).



Actualmente, existen muchos ejemplos de la utilización del cultivo *in vitro* como un método para la reproducción eficiente de plantas medicinales, tales como jojoba, *Tagetes* y *Fritillaria unibracteata* (Roussos *et al.* 1999, Gao *et al.* 1999, Mohamed *et al.* 1999). Otra ventaja del cultivo *in vitro*, en adición a las ya ampliamente conocidas y asociadas a la micropropagación, es la posibilidad de implementar técnicas de producción *in vitro* de compuestos químicos de interés, tales como flavonoides en cultivo de raíces en *Psoralea* y del compuesto secologanina en suspensiones celulares en *Catharantus roseus* (Bourgau *et al.* 1999, Contin *et al.* 1999).

En estudios realizados con *Psychotria ipecacuanha*, también conocida como *Cephaelis ipecacuanha*, Jha *et al.* (1988) reportaron la producción de emetina y cefaelina a partir de suspensiones celulares y cultivo de raíces. Posteriormente, Veeresham *et al.* (1994), trabajando con la misma planta, informan acerca de la influencia de algunos precursores sobre la producción de alcaloides de isoquinolina.

*P. acuminata* es una planta que requiere condiciones ambientales muy específicas para crecer, su reproducción es pobre y limitada al desarrollo de yemas a partir de rizomas, motivo por el cual la micropropagación se perfila como una alternativa para incrementar el número de plantas de esta especie.

La formación de embriones somáticos (embrioides) es un proceso de gran importancia en la micropropagación, manipulación genética y estudios morfogénicos de plantas, ya que permite una rápida multiplicación (Wawrosch y Kopp 1999, Wilhelm 1999, George y Sherrington 1984) y un mejor entendimiento de los procesos de embriogénesis de las plantas (Neumann 1999). Muchas son las especies y tipos de explantes que generan embriones somáticos (Williams y Maheswaran 1986, George y Sherrington 1984). Los explantes más utilizados por su eficiencia embriogénica son tejidos de embriones zigóticos como cariósides (Marousky y West 1990) y cotiledones (Mandal *et al.* 1995, Canhoto y Cruz 1996), además son usados tejidos jóvenes como inflorescencias (Chen *et al.* 1985) y en algunos casos se utilizan tejidos maduros como rizomas (Lee *et al.* 1997) y hojas (Trigiano *et al.* 1989).

En comparación con la embriogénesis somática, la organogénesis involucra el desarrollo de brotes apicales o radicales a partir de los explantes directamente o de callos.

La función básica de la mitosis en la organogénesis es la formación de un número definido de células en división activa, las cuales son capaces de responder a señales de desarrollo. Estas células en división o meristemoides se asemejan a meristemas reales y tienen uniones vasculares con el callo o el tejido contiguo. En condiciones adecuadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias. Casos exitosos de organogénesis se pueden encontrar en una gran cantidad de cultivos, algunos de ellos son: peras (Lane *et al.* 1998), abetos (Rumary *et al.* 1986), tabaco (Maeda y Thorpe 1979) y muchos otros (Hicks 1980).

Luego del establecimiento de la planta en condiciones asépticas, existe una etapa de multiplicación, en esta fase los mecanismos por los cuales se producen las nuevas plantas son muy variados; de allí que se requiera de un estudio histológico con el fin de comprender los procesos morfogénicos que están ocurriendo (Williams y Maheswaran 1986, Maeda y Thorpe 1979, Lane *et al.* 1998, Lee *et al.* 1997). Este conocimiento es fundamental para diseñar las estrategias de micropropagación, conocer la estabilidad genética de los materiales producidos y en última instancia determinar los posibles usos de los tejidos generados mediante esta técnica.

Las implicaciones asociadas a la regeneración de nuevos brotes a partir de alguna de las 2 vías morfogénicas: organogénesis o embriogénesis somática, hacen necesario el estudio histológico para dirigir los trabajos posteriores. El objetivo de este estudio fue identificar la vía morfogenética por la cual se producen las plántulas en hojas de *Psychotria acuminata*.

## MATERIALES Y METODOS

### **Material vegetal y condiciones de cultivo.**

En el proceso de micropropagación *in vitro* de *Psychotria acuminata*, usando microestacas, se ha observado que aquellas hojas que se encuentran en contacto con el medio de cultivo, presentan un alto potencial morfogénico. Por tal motivo, de plantas provenientes del cultivo *in vitro*, se tomó hojas de 3-3,5 cm de longitud, que no hubiesen estado en contacto con el medio de multiplicación. El medio de multiplicación utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de BAP, 0,01mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de ANA y 2 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de Phytigel, dispensado en frascos de vidrio, con 25 ml de medio cada uno. El

pH se ajustó a 5,8 antes de autoclavar (25 min. a 120 °C y 2 kg cm<sup>-2</sup>). Los cultivos fueron mantenidos en cuartos de crecimiento a 26±1 °C con un fotoperíodo de 12 horas, luz blanca 46 μE<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>. En cada frasco fueron cultivadas 3 hojas, colocadas con los peciolo sumergidos en el medio y la superficie abaxial en contacto con el mismo. Las hojas se mantuvieron en el mismo medio de cultivo por 6 semanas sin transferencia a un medio fresco. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

### **Histología**

Se tomó 2 hojas semanalmente, desde la semana cero, que fue el momento de siembra de las hojas, hasta la semana 6. Las hojas fueron fijadas en FAA (Formalina - Acido acético - Alcohol etílico 60° al 5%, 5%, 90% v/v respectivamente) a 4°C por una noche. Una vez fijado, el tejido fue deshidratado en concentraciones crecientes (50, 70, 85, 95 y 100 %) de terbutanol a 4°C. Luego las hojas, fueron embebidas en Paraplast® (Monoject of Sherwood Medical) a 60°C. Cortes seriales de 8 μm de grosor fueron realizados usando un micrótopo (Reichter HistoStat 820). Los cortes fueron teñidos con safranina 0,5%, fucsina básica 0,2%, cristal violeta 0,2% contrastado con fast green 0,2% (Yeung y Peterson 1972). El análisis de los tejidos se realizó por microscopía de luz.

A las 12 semanas de cultivo se realizó un análisis macro de los brotes, para ello se utilizó un estereoscopio y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital BioVid Software 3 de LW-Scientific adaptada al microscopio y el estereoscopio para cada caso.

## RESULTADOS

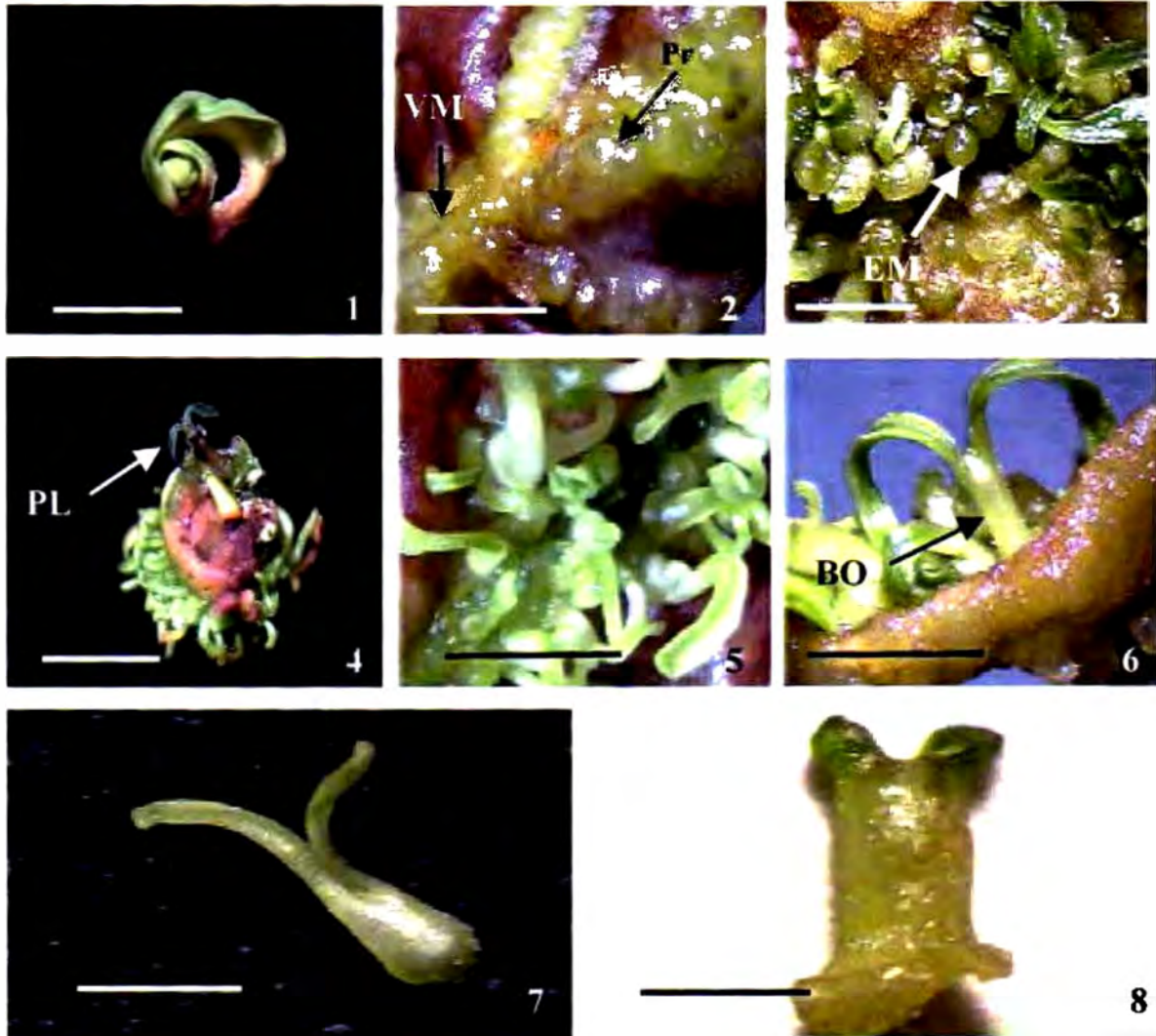
### Observaciones

Al finalizar la primera semana de cultivo, se observó un arrollamiento desde el ápice hasta el peciolo de la hoja por la superficie abaxial (Figura 1). Casi en forma simultánea al arrollamiento, la lámina de la mayoría de las hojas empezó a tornarse de color café. A las 4 semanas de cultivo se observó protuberancias en la superficie adaxial, principalmente, a todo lo largo de la vena media y en menor grado sobre las venas secundarias. A las 5 semanas algunas de estas protuberancias mostraban una coloración verde, que indicó la formación de brotes. La figura 2 muestra una sección de la hoja a las 5 semanas, donde se observa las protuberancias que se empezaron a formar desde la semana 4 y el crecimiento de algunas de ellas. Este proceso morfogénico ocurre sin la formación de callo y en ninguno de los explantes analizados se detectó la formación de protuberancias en la superficie abaxial.

A las 6 semanas resulta evidente la formación de gran cantidad de estructuras globulares similares a la fase inicial de la formación de embriones somáticos (Figura 3). La evaluación a las 9 semanas mostró que las estructuras globulares observadas en la semana 6 habían dado paso a la formación de gran cantidad de brotes.

Doce semanas después de iniciar el cultivo, se observó hojas produciendo brotes (Figura 4) que presentaban diferentes estados de desarrollo y su apariencia era diferente. La figura 5 muestra brotes con una forma muy similar a la de un embriode, mientras que simultáneamente se encontró brotes con una forma similar a la de una plántula, sin que se observara la presencia de cotiledones (Figura 6). También en la semana 12 se inició la separación de los brotes del explante, se encontró que aquellas estructuras con apariencia de estructura independiente, similar a un embriode, se separaron sin mayor esfuerzo (Figura 7), en tanto que otras se encontraban totalmente dependientes del tejido madre (Figura 8). La presencia de estos 2 tipos de brote hizo suponer la ocurrencia simultánea tanto de embriogénesis somática como de organogénesis en el mismo explante.

(Figura 8). La presencia de estos 2 tipos de brote hizo suponer la ocurrencia simultánea tanto de embriogénesis somática como de organogénesis en el mismo explante.



Figs.1-8. 1. Hoja de *P. acuminata* con un claro arrollamiento a los 8 días de cultivo (barra = 1 cm). 2. Inicio de brotes en el lado adaxial de las nervaduras media y secundarias de la hoja. Nótese las protuberancias (Pr) a lo largo de las venas, (VM) vena media (barra = 2 mm). 3. Brotes en diferentes estados de desarrollo, nótese los embrioides (EM) en su fase globular. (barra = 5 mm). 4. Hoja arrollada con un gran número de brotes y el desarrollo de 1 plántula (PL)(barra = 1 cm). 5. Embrioides en la fase previa a la de torpedo (barra = 5 mm). 6. Brotes en desarrollo, con un brote (BO) destacado (barra = 5 mm). 7. Plántula desarrollada (barra = 1 cm). 8. Plántula desarrollada (barra = 1 cm).

## **Estudio histológico**

### **Semana 0**

Este es el momento en que se colectan las hojas para inocular *in vitro*, la evaluación histológica de los cortes transversales de hoja, mostró que las hojas que no estuvieron en contacto con el medio de cultivo, presentaron láminas con una anatomía en la cual se observa una capa de células de epidermis, 1 ó 2 de mesófilo de empalizada y 2 de mesófilo esponjoso (Figura 9A). En las nervaduras central y secundarias se pudo observar la disposición habitual de los tejidos vasculares y del parénquima que los rodea (Figura 9B).

### **Semana 1**

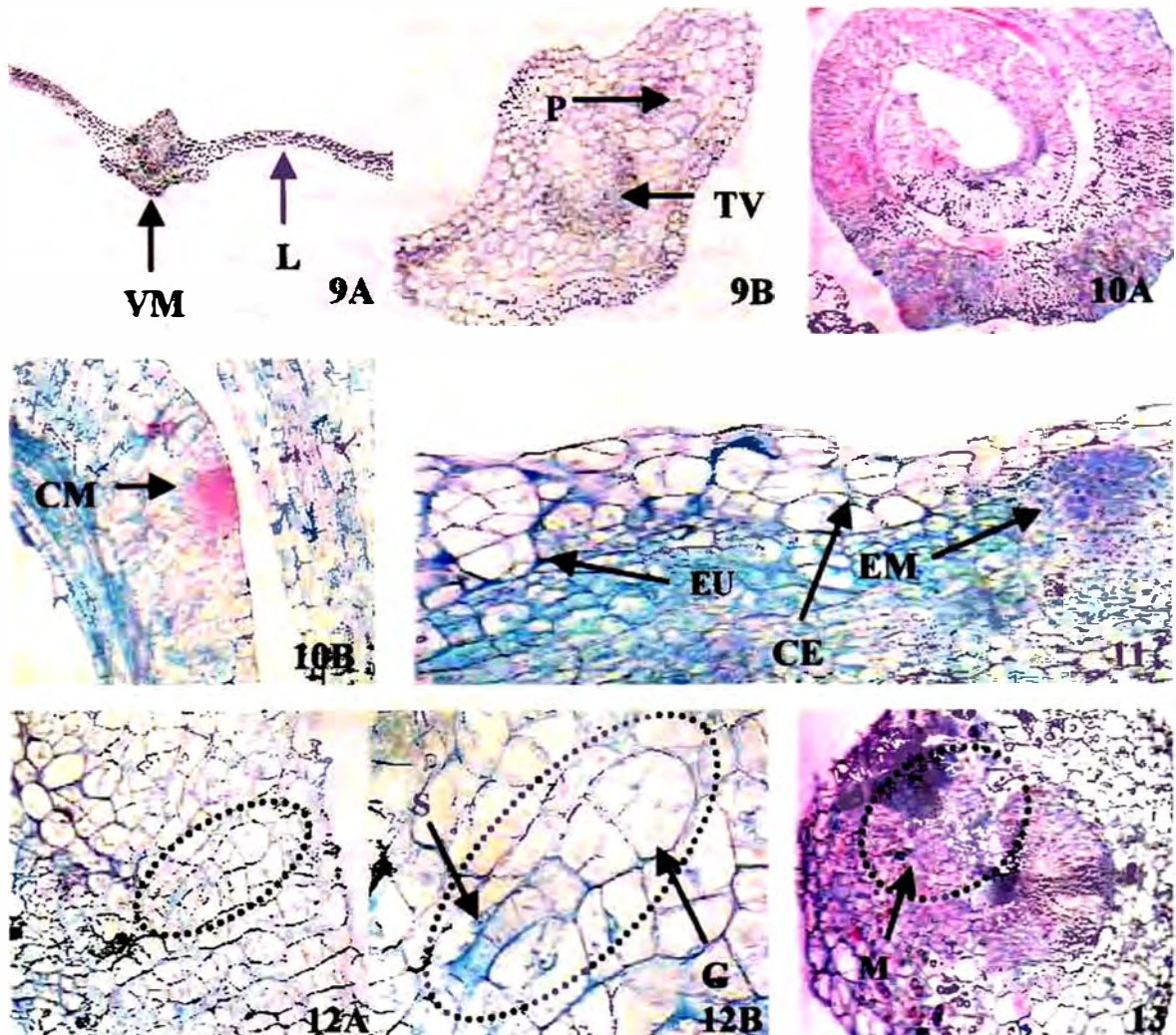
La figura 10A muestra no solo el arrollamiento de la hoja sino que se puede apreciar la dirección del mismo. Un mayor aumento de una sección de la hoja de la figura 10A, hace evidente como en algunas de las áreas cercanas a la superficie adaxial da inicio la proliferación de grupos de células meristemáticas (Figura 10B).

### **Semana 2**

La figura 11 muestra los cambios ocurridos en una de las zonas meristemáticas observada la semana anterior, es notoria la división acelerada de las células, la flecha señala un meristemoide formado a partir de células parenquimáticas. Los meristemoides son evidentes en el corte por una tinción más fuerte, normalmente en esas zonas las células son pequeñas, con núcleos grandes y citoplasma denso. También se encontró que las células epidérmicas habían entrado en un proceso de división, con divisiones periclinales, anticlinales y oblicuas.

Se encontró que algunas células en su proceso de división daban origen a embrioides somáticos a partir de una sola célula (EU). La figura 12A, muestra claramente los diferentes planos de división celular: periclinal, anticlinal y oblicuo de las células subepidérmicas; también, un embrión somático en su fase pre-globular (von Arnold *et al.* 2002).

Se encontró que algunas células en su proceso de división daban origen a embrioides somáticos a partir de una sola célula (EU). La figura 12A, muestra claramente los diferentes planos de división celular: periclinal, anticlinal y oblicuo de las células subepidérmicas; también, un embrión somático en su fase pre-globular (von Arnold *et al.* 2002).



Figs. 9-13. **9A**. Corte transversal de una hoja de *P. acuminata* en condiciones previas al contacto con el medio de cultivo, (VM) vena media, (L) lámina (40 X). **9B**. Nervadura central de la hoja, donde se observa el tejido vascular y el parénquima que lo rodea (100 X). **10A**. Corte transversal de una hoja arrollada (100 X). **10B**. Acercamiento de la figura

La figura 12B es un acercamiento de la anterior y muestra al proembriode con la estructura globular y el suspensor. Esta estructura corresponde al estado de 8 células (von Arnold *et al.* 2002) y su formación ocurrió a partir de una sola célula meristemática que se dividió periclinalmente; la célula basal dio origen al suspensor y la terminal, a la fase pre-globular del embriode.

También a las 2 semanas de cultivo, fue posible observar, que en adición a la formación de embrioides de origen unicelular en la zona epidérmica, también fue posible identificar meristemoides cerca del haz vascular de la vena media (Figura 13).

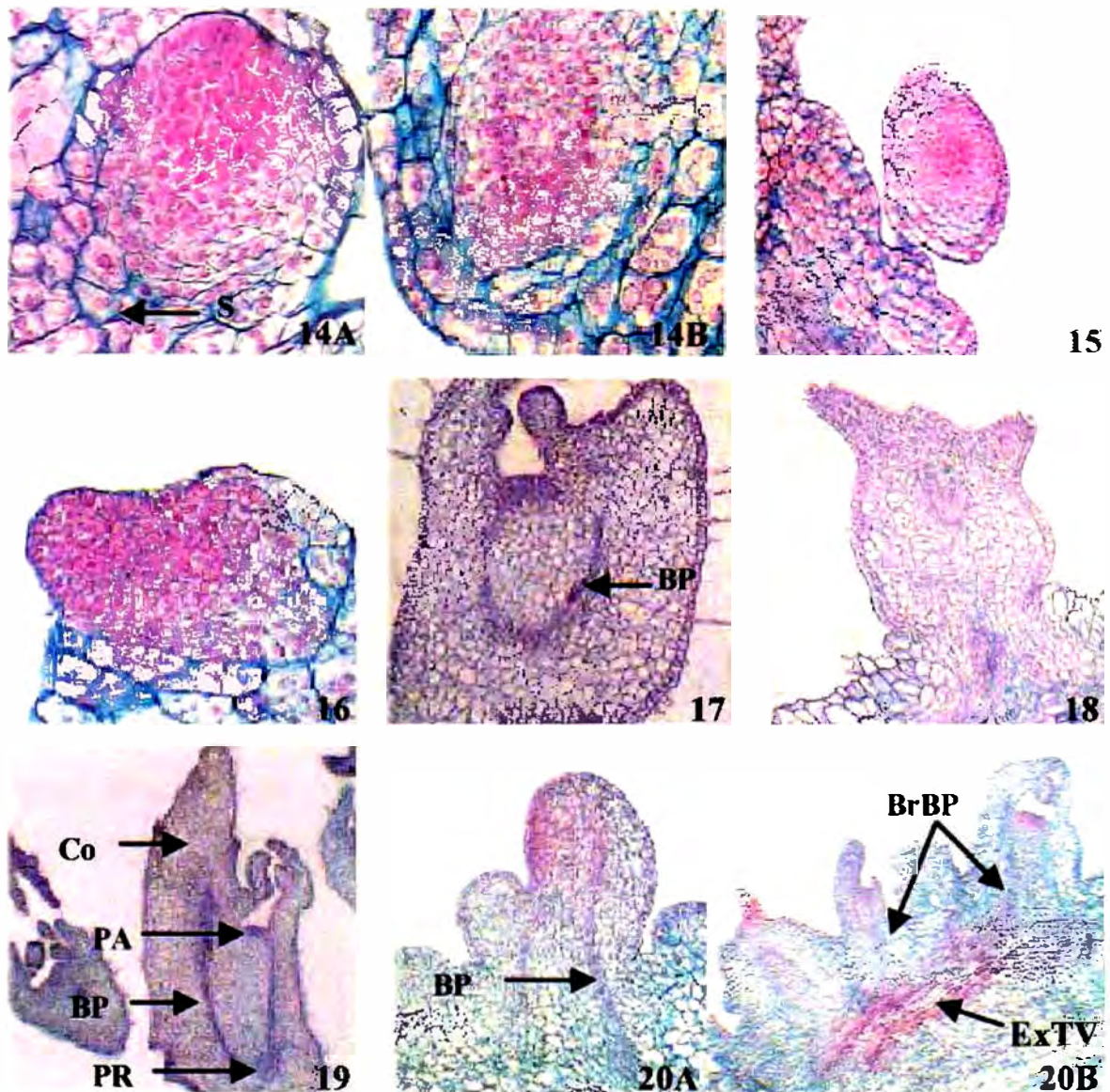
### **Semana 3**

Conforme las divisiones celulares aumentan en el proembriode originado de las células epidérmicas de la figura 12, la fase globular tiende a ser más evidente y el suspensor ya casi no se aprecia (Figura 14 A), de hecho, se observó que los meristemoides que se formaron a partir de las células parenquimáticas (CP) de la figura 11, también estaban tomando la forma de un embriode en su fase globular (Figura 14 B), lo cual indicaría que en *P. acuminata* el proceso de embriogénesis somática tiene tanto origen unicelular como multicelular. La única diferencia entre ambos tipos, fue la presencia, en los unicelulares, de una pequeña porción del suspensor; además, pareciera que los multicelulares tienen una mayor densidad de células. También en algunas secciones del corte se pudo encontrar embrioides en su fase globular que parecieran estar separados del tejido madre (Figura 15).

### **Semana 4**

Los eventos subsecuentes a la fase globular del embriode conducen a que éste tienda a aplanarse y a formar una concavidad en uno de sus lados, la que culmina con la fase conocida como acorazonada, que es donde se inicia la polarización de las zonas caulinar y radical (Figura 16). Por su parte los meristemoides formados cerca del tejido vascular solo muestran un crecimiento diferencial, producto de un proceso morfogénico no sincronizado.





**Figs.14-20.** 14A. Fase globular de un embriode de origen unicelular con restos de lo que fue el suspensor (S) (400 X) 14B. Embriode de origen multicelular desarrollándose a partir de células de parénquima de la región subepidérmica de la hoja (400 X). 15. Estructura globular del embriode (100 X). 16. Embriode en su fase acorazonada (400 X). 17. Embriode en un estado temprano de torpedo mostrando el meristema apical, el polo radical, las bandas procambiales (BP) y las hojas cotiledonales (250 X). 18. Corte de un embriode, cuya apariencia es típica de la fase de torpedo (100 X). 19. Embriode con sus polos apical (PA) y radical (PR), y los cotiledones (Co). Las bandas procambiales (PB) no se extienden fuera del embriode (100X). 20A. Brote organogénico con tejido vascular desarrollado (250 X). 20B. Brotes organogénicos que emergieron sobre la superficie adaxial, nótese la conexión directa entre su tejido vascular y el del explante (100 X), (BrBP) bandas procambiales del brote, (ExTV) tejido vascular del explante.

### Semana 5

La fase acorazonada del embriode ha dado paso a la formación completa del mismo. En esta etapa la zona meristemática apical se distingue fácilmente de las hojas cotiledonales (Figura 17). La figura 18 muestra otro corte de un embriode, cuya apariencia es típica de la fase de torpedo. Los meristemoides formados cerca del tejido vascular continúan su crecimiento hasta ser evidente sobre la epidermis.

### Semana 6

En este momento los embrioides muestran sus polos apical y radical, además de los cotiledones. En esta etapa se observa más claramente las bandas procambiales del embriode, las cuales no tienen ningún nexo con el tejido vascular del explante, sección no mostrada (Figura 19). Los meristemoides formados cerca del tejido vascular, crecieron hasta la formación de brotes organogénicos (Figura 20A) y al igual que en el caso de los embrioides ya el tejido vascular se ha diferenciado; sin embargo, en este caso el tejido vascular del brote sí está conectado al del tejido madre (Figura 20B), lo que indica que son brotes de origen organogénico y no embriogénico.

## DISCUSIÓN

El estudio morfológico y anatómico de *Psychotria acuminata* reveló que los eventos morfogénicos conducentes a la micropropagación de esta especie, ocurren únicamente en la superficie adaxial de las hojas. En trabajos realizados en otras especies como *Feijoa sellowiana* (Mirtaceae), los autores encontraron que cuando cultivaron embriones cigóticos *in vitro* ocurría la formación de embriones somáticos (embrioides) solo en la superficie adaxial de los cotiledones (Canhoto y Cruz 1996). Resultados similares reportan Mandal *et al.* (1995) de sus estudios sobre embriogénesis somática directa en (*Carthamus tinctorius*) así como Lane *et al.* (1998) en trabajos con hojas cultivadas *in vitro* de *Pyrus pyrifolia*. Chen y Chang (2002), indican que las puntas de las hojas en *Oncidium*, son los explantes con mayor potencial embriogénico, en esta especie; sin embargo, es la posición del explante

la que tiene mayor influencia en la promoción de la embriogénesis. Ellos encontraron que cuando la hoja se coloca con la superficie abaxial en contacto con el medio de cultivo, la embriogénesis es promovida en la superficial adaxial, estas observaciones son coincidentes con nuestros resultados.

El motivo por el cual la superficie adaxial, en este caso, es la que presenta un mayor potencial morfogénico, es todavía desconocido. Algunos autores indican que las células subepidérmicas de la superficie adaxial se dividen anticlinalmente para formar el mesófilo de empalizada, mientras que el resto de las células del mesófilo casi no sufren cambios y son las que dan origen al parénquima esponjoso. Entonces bajo condiciones inductivas, como las proporcionadas por los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo, las células que deberían formar el mesófilo de empalizada continúan dividiéndose, formando así una capa de células meristemáticas (Canhoto y Cruz 1996). Como se indicó, esta capa esta compuesta de células pequeñas con núcleos grandes y citoplasma denso. Estas células mitóticamente activas se tiñen más intensamente debido a una mayor cantidad tanto de ácidos nucleicos como de proteínas. En términos de lo observado en este estudio, morfológicamente esta es la capa con protuberancias, que se desarrollan mayormente, sobre las venas media y secundarias y en menor grado en la lámina de las hojas de *P. acuminata*. Vasil *et al.* (1985), sugieren que la formación de áreas meristemáticas a partir de células poco diferenciadas, como el parénquima, ocurre en algunos casos debido a la proximidad de estas últimas con tejidos meristemáticos existentes como el procambium, donde se asume que la concentración de reguladores de crecimiento es mayor. Esta hipótesis podría explicar por qué en el presente trabajo la capa de células meristemáticas se forma principalmente sobre las venas media y secundarias de la hoja, caso que también ha sido reportado por Lane *et al.* (1998).

La observación de los eventos morfológicos que ocurren a partir de la capa de células meristemáticas, hizo evidente que inicialmente se forman algunas protuberancias, de las cuales crecen 2 tipos de brotes (Figuras 5 y 6). La separación casi espontánea de algunos de ellos y su forma similar a la de un embrión cigótico, hizo suponer que se trataba de embrioides (Figura 7). Por otro lado, la difícil separación del segundo tipo de brote parecía indicar un origen organogénico (Figuras 6 y 8).

Los cortes histológicos de la hoja de *P. acuminata*, demostraron la ocurrencia tanto de embriogénesis somática y de organogénesis en el mismo tejido, esta aparición simultánea y no sincronizada también ha sido reportada en callos de *Bactris gasipaes* producidos a partir del cultivo *in vitro* de ápices caulinares (Valverde *et al.* 1992, 1987), en callos de *Xanthosoma sagittifolium* (Gómez *et al.* 1992) y en callos de *Zea mays* (McCain y Hodges 1986). Una posible explicación para la ocurrencia de ambos eventos en forma simultánea, esta dada por el uso de los reguladores de crecimiento. Las auxinas son necesarias para la inducción de la embriogénesis somática; sin embargo, estas son utilizadas por los explantes en forma muy eficiente y rápida por lo que son consumidas en períodos de tiempo muy cortos. Si los explantes son transferidos a medios frescos con frecuencia, los tejidos mantienen su potencial embriogénico, si por el contrario el medio no se renueva, da inicio el desarrollo de los embrioides (von Arnold *et al.* 2002). Evidentemente si el medio contiene citocininas, las cuales son consumidas más lentamente, entonces lo que sucede, una vez que las auxinas han sido consumidas, es que se promueve la formación de brotes de origen organogénico.

En la capa de células meristemáticas, se observó la formación de embrioides de origen unicelular y grupos de células meristemáticas tanto hacia la periferia (subepidermis de la superficie adaxial) como cerca de los haces vasculares. Los embrioides de origen unicelular (Figuras 12A y 12B), se forman a partir de divisiones periclinales de la célula terminal célula. Esta mediante divisiones al azar en los 3 planos (periclinal, anticlinal y oblicuo) da origen a la fase globular del embriode y la basal al suspensor; con resultados similares nuestras observaciones son coincidentes con el trabajo de Jones y Rost (1989), quienes además indican que la célula basal pareciera no contribuir con células al embriode. De hecho, y aunque el suspensor tiende a desaparecer, en etapas avanzadas de la fase globular del embriode aún se observa algunas células del suspensor (Figura 14 A). En *Simmondsia chinensis* durante la inducción de embriones somáticos de origen unicelular, Hamama *et al.* (2001), dieron seguimiento a los estados desde 1 hasta 6 células en la formación de un proembriode; sin embargo, aún en el estado de 6 células no fue posible observar la formación del suspensor. Esta observación no coincide con nuestros resultados, donde el suspensor fue evidente, pero pareciera que esta no es una característica *per se* de

los embrioides de origen unicelular ya que Mithila *et al.* (2001) indican que el suspensor no está presente algunas veces en embrioides creciendo en el mismo tejido.

Se consideró que los grupos de células meristemáticas que se formaron a partir de las células subepidérmicas son embrioides de origen multicelular. La amplia zona de unión de éstos al explante es una muestra del origen multicelular de los mismos y ha sido observada en procesos de embriogénesis somática en *Carthamus tinctorius* (Mandal *et al.* 1995), *Feijoa sellowiana* (Canhoto y Cruz 1996) y en *Zea mays* (Mc Cain y Hodges 1986). Otro indicativo del origen multicelular de los embrioides fue la multiplicación más acelerada de las células en la etapa de proembrioide (Lee *et al.* 1997). En cualquier caso, unicelular o multicelular, el crecimiento de los embrioides mostró las diferentes etapas ya descritas para el desarrollo de los mismos (von Arnold *et al.* 2002). Más aún, se encontró que una vez bien organizada la parte aérea, ocurre el desarrollo de la raíz. Nuestras observaciones corresponden con las de Jones y Rost (1989) en sus estudios sobre el desarrollo de embriones somáticos de *Oriza sativa* y Garin *et al.* (1997) quienes trabajaron con *Prunus avium*.

En determinado punto de esta investigación, fue muy difícil definir cuándo se estaba en presencia de embrioides de origen multicelular y cuándo ante brotes de origen organogénico. La categorización de los mismos se llevó a cabo, básicamente bajo 2 criterios. En primera instancia la ubicación de las áreas embriogénicas, aquellas en la zona subepidérmica siempre generaron embrioides, mientras que las que se encontraban cerca del haz vascular generaron brotes de origen organogénico; sin embargo, debe considerarse que son muchos los trabajos en que se demuestra, claramente, que las células subepidérmicas también dan origen a brotes de origen organogénico (Mitra y Mukherjee 2001, Valverde *et al.* 1992, Gómez *et al.* 1992). El segundo criterio utilizado fue el desarrollo del tejido vascular, pues una vez que los brotes alcanzaron un mayor grado de diferenciación, se observó que el tejido vascular de los embrioides no tenía una conexión con el tejido vascular del explante, en tanto que si la tenía el tejido vascular de los brotes de origen organogénico. De acuerdo con Rumarly *et al.* (1986), la conexión de estos brotes organogénicos con el tejido madre les permite obtener una mayor cantidad de agua y nutrimentos para un

crecimiento más rápido, esto explica el mayor crecimiento observado en algunos brotes de la figura 6, comparado con el de los embrioides (Figura 5).

La embriogénesis somática es un fenómeno que algunos autores han asociado a la presencia en el medio de altas concentraciones de citocininas (Williams y Maheswaran 1986). Sin embargo, es claro que en algunas especies es necesario el estímulo de las auxinas para la inducción de la embriogénesis somática. En el trabajo de Jones y Rost (1989) ellos encontraron que la adición exógena de 2,4-D indujo la formación de embrioides. Por su parte Komamine *et al.* (1985) y Zhang *et al.* (2000), indican que algunas citocininas, como la zeatina han mostrado un efecto promotor de la embriogénesis somática, estimulando la división celular, después de una inducción previa con una auxina. En un trabajo con *P. ipecacuanha* (Palma e Hidalgo 1993), se observó la formación de brotes adventicios en segmentos de entrenudos, cuando el medio fue suplementado con 0-0,1 mg l<sup>-1</sup> de BA y 0,1 mg l<sup>-1</sup> de Kin. No se reporta la formación de callo; sin embargo, el origen de los brotes es desconocido debido a la carencia de un análisis histológico. En *Psychotria acuminata*, planta objeto de este estudio, Hidalgo *et al.* (1999), hacen el primer reporte de inducción de brotes a partir de hojas; sin embargo, la vía morfogénica de estos brotes también es desconocida.

En general, y en concordancia con lo expuesto por von Arnold *et al.* (2002), los requerimientos de auxinas u otros reguladores de crecimiento para la iniciación de la embriogénesis somática dependerán del estado de desarrollo del explante utilizado; así, cuando se usan callos, se debe tomar en cuenta que regularmente estos se han formado bajo el efecto de auxinas. Una vez que las células embriogénicas se han formado, se inicia la proliferación de los pro-embrioides por intermedio de las auxinas; sin embargo, estas resultan inhibitorias para el desarrollo de los embrioides. De allí que el desarrollo de los embrioides ocurra en medios desprovistos o con bajos contenidos de auxinas.

En el presente estudio, inicialmente se pensó que la inducción de embriogénesis somática se pudo haber optimizado con un incremento en la concentración de ANA; sin embargo, se corría el riesgo de que también se indujera la formación de callo, tal y como ocurrió en trabajos recientes con *Pyrus communis*, realizados por Caboni *et al.* (2002), pero

de acuerdo con von Arnold *et al.* (2002), pareciera que más bien se requería un suplemento constante y no un aumento en la concentración de la auxina.

La formación de embriones somáticos, en forma directa, es un proceso importante en la micropropagación, la manipulación genética y en estudios morfogénicos de plantas, dado que permite una alta tasa de multiplicación con muy poca variabilidad somática, si éstos no han estado en la etapa de proliferación por un período prolongado ( Wawrosh y Koop 1999, Wilhelm 1999, Neumann 1999, von Arnold *et al.* 2002). Puesto que, durante la multiplicación de *P. acuminata* no se observó la formación de callo, la morfogénesis fue directa, lo cual implica que las plántulas que se generan deberían ser genéticamente más estables que aquellas que se forman a partir de callos (Hicks 1980, Rumary *et al.* 1986). De acuerdo con nuestro conocimiento, acerca de la morfogénesis de esta especie, este es el primer reporte de embriogénesis somática directa en *P. acuminata*. Este estudio pone de manifiesto la posibilidad de utilizar la capacidad embriogénica de *P. acuminata* en trabajos de transformación genética y desde luego en generar cultivos exclusivamente de embrioides, los cuales resultan un material ideal para estudios posteriores sobre la producción y extracción de los principios activos de esta especie, productos que pueden ser utilizados con fines medicinales en la industria farmacéutica.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Walter Marín M. de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica por la revisión crítica del manuscrito.

## LITERATURA CITADA

- BOURGAUD F., BOUQUE V., GUCKERT A. 1999. Production of flavonoid by *Psoralea* hair root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56 (2): 96-103.
- BURGER W. 1993. Fieldiana Botany Flora Costarricensis: Fam. Rubiaceae. N° 33, p. 232.
- CABONI E., D'ANGELI S., CHIAPPETTA A., INNOCENTI A.M., VAN ONCKLEN H., DAMIANO C. 2002. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 199-206.
- CANHOTO J.M., CRUZ, G.S. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple-guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma* 191: 34-45.
- CHEN T., LAM L., CHEN S. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4 : 51-54.
- CHEN J-T., CHANG W-C. 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* "Gower Ramsey". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69(1): 41-44.
- CONTIN A., van der HELJDEN R., VERPOORTE R. 1999. Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in *Catharantus roseus* cell suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56 (2): 111-119.
- GAO S.L., ZHU D.N., CAI Z.H., JIANG Y., XU D.R. 1999. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant - *Fritillaria unibracteata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59 (3): 197-201.



- GARIN E., GRENIER E., GRENIER-DE MARCH G. 1997. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 83-91.
- GEORGE E.F., SHERINGTON P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Eastern Press, Great Britain. 709 p.
- GLINSKI J.A., DAVID E., WARREN T.C., HANSEN G., LEONARD S.F., PITNER P., PAV S., ARVIGO R., BALICK M.J., PANTJ E., GROB P.M. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide  $\alpha$ , a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochemistry and Photobiology* 62 (4): 144 -150.
- GOMEZ L., VALVERDE R., ARIAS O., THORPE T. 1992. Regeneración de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*) por embriogénesis somática. *Agronomía Costarricense* 16 (2): 219-223.
- HAMAMA L., BAAZIZ M., LETOUZE R. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65
- HICKS G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review* 46 (1): 1-23.
- HIDALGO N., GÓMEZ L., SABORIO F. 1999. Regeneración de brotes a partir de hojas de *Psychotria acuminata*. In: XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. vol II (ed) Floria Bertsch, Jaime Garcia, German Rivera, Fernando Mojica y Walter Badilla. EUNED y Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José, Costa Rica. 215 p.
- JHA S., SAHU N.P., MAHATO S.B. 1988. Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. *Planta Médica*, January: 504 - 506.

- JONES T.J., ROST T.L. 1989. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Bot. Gaz.* 150 (1): 41-49.
- KOMAMINE A., MATSUMO M., TSUKAHARA M., FUJIWARA A., KAWAHARA R., ITO M., SMITH J., NOMURA K., FUJIMURA T. 1985. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures- physiology, biochemistry and molecular biology. *In Tissue culture in forestry and agriculture*. Ed. By R. Henke and K. Hughes, M. Constatin, A. Holloender. Plenum Press USA. p. 307-313.
- LANE W.D., IKETANI H., HAYASHI T. 1998. Shoot regeneration from cultured leaves of japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 9-14.
- LEE K.S., ZAPATA-ARIAS F.J., BRUNNER H., AFZA R. 1997. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 1-8.
- MAEDA E., THORPE T.A. 1979. Shoot histogenesis in tobacco callus cultures. *In Vitro* 15 (6): 415-424
- MANDAL A.K.A., CHATTERJI A.K., GUPTA S.D. 1995. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledonary leaves of safflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 287-289.
- MAROUSKY F.J., WEST S.H. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured mature caryopses of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 125-129.
- McCAIN J.W., HODGES T.K. 1986. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures. *Bot. Gaz.* 147 (4): 453-460.

- MITHILA J., MURCH S.J., KRISHNARAJ S., SAXENA P. 2001. Recent advances in *Pelargonium in vitro* regeneration systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67 (1):1-9.
- MITRA S., MUKHERJEE K. 2001. Direct organogenesis in Indian spinach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67 (2): 191-194.
- MOHAMED M.A-H., HARRIS P.J.C., HENDERSON J. 1999. An efficient *in vitro* regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55(3):211-215.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NEUMANN K.H. 1999. Some physiological aspects in the development of plant cell and tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plan* 35: 159-161.
- PALMA T., HIDALGO N. 1993. Micropropagación *in vitro* de raicilla *Psychotria ipecacuanha*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 58 p.
- ROUSSOS P.A., TOLIA-MARIOLI A., PONTIKIS C.A., KOTSIAS D. 1999. Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57(2): 133-137.
- RUMARY C., PATEL K.R., THORPE T.A. 1986. Plantlet formation in black and white spruce. II. Histological analysis of adventitious shoot formation *in vitro*. *Can. J. Bot.* 64: 997-1002.

- SKORUPA L.A., ASSIS M.C. 1998. Collecting and conserving Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. *Economic Botany* 52 (2): 209-210.
- SOLIS P.N., WRIGHT C.W., GRUPTA M.P., PHILLIPSON J.D. 1993. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. *Phytochemistry* 33 (5): 1117-1119.
- IRIGIANO R.N., GRAY D.J., CONGER B.V., McDANIEL J.K. 1989. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerulata*. *Bot. Gaz.* 150 (1): 72-77.
- VALVERDE R., ARIAS O., THORPE T. 1992. Estudio histológico en callos de pejibaye. *Agronomía Costarricense* 16 (2): 225-229.
- VALVERDE R., ARIAS O., THORPE T. 1987. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 149-156.
- VASIL V., LU C-Y., VASIL IK. 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma* 127: 1-8.
- VEERESHAM C., KOKATE C., VENKATESHWARLU V. 1994. Influence of precursors on production of isoquinoline alkaloids in tissue cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. *Phytochemistry* 35 (4): 947 - 949.
- von ARNOLD S., SABALA I., BOZHOKOV P., DYACHOK J., FILONOVA L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69 (3):233-249.
- WAWROSCH C., KOPP B. 1999. Application of plant tissue culture in protection and domestication of rare and endangered medicinal plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 35: 180-181.

WILHELM E. 1999. Tissue culture of forest trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35: 163-164.

WILLIAMS E.G., MAHESWARAN G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.

YEUNG E.C., PETERSON R.L. 1972. Studies on the rosette plant *Hieracium floribundum*. I. Observations related to flowering and axillary bud development. *Can J. Bot.* 50: 73-78.

ZHANG B-H., LIU F., YAO CH-B. 2000. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60 (2): 89-94.

**ARTÍCULO III**

**VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN  
GENÉTICA EN CUATRO POBLACIONES DE  
LA PLANTA MEDICINAL *Psychotria acuminata***

**VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA EN CUATRO  
POBLACIONES DE LA PLANTA MEDICINAL  
*Psychotria acuminata* EN COSTA RICA**

Alfonso Lara<sup>1</sup>, Roberto Valverde<sup>1</sup>, Oscar Rocha<sup>2</sup>, Luis Gómez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. <sup>2</sup>Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

**RESUMEN**

Un total de 51 accesiones de *Psychotria acuminata*, provenientes de 4 poblaciones en Costa Rica, fueron evaluadas con los marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat DNA). Con el uso de 16 decámeros se obtuvo 70 loci polimórficos y con 3 ISSRs 15 loci polimórficos. Ambos tipos de imprimador fueron capaces de determinar la diversidad genética entre las 4 poblaciones. Los dendrogramas basados en la distancia genética entre las poblaciones no mostraron similitud entre los RAPDs y los ISSRs; sin embargo, ambos métodos revelaron una alta variabilidad genética entre las poblaciones ( $G_{st}$  de 0,2919 y 0,3135 para los RAPDs y los ISSRs respectivamente). Estos niveles altos de diversidad genética, entre las 4 poblaciones, no pudieron ser explicados por los factores climáticos ( $r^2 = -0,302$ ,  $P = 0,560$ ) ni por las distancias geográficas ( $r^2 = -0,183$ ,  $P = 0,768$ ). Con los resultados obtenidos se concluye que las poblaciones de *Psychotria acuminata* evaluadas presentan un importante nivel de diferenciación genotípica. Como consecuencia, sería posible utilizar la diversidad genética de esta especie no solo en programas de conservación de la biodiversidad sino también para un mejor uso de sus recursos fitoquímicos.

**Palabras clave:** *Psychotria acuminata*, planta medicinal, diversidad genética, RAPD, ISSR.

## ABSTRACT

**Genetic diversity and differentiation of four populations of the medicinal plant *Psychotria acuminata* in Costa Rica.** Fifty-one *Psychotria acuminata* accessions from 4 populations in Costa Rica were evaluated for genetic diversity using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers and inter-simple sequence repeat DNA (ISSR) primers. With the use of 16 10-mer primers, 70 polymorphic DNA loci were produced. On the other hand, with the 3 different ISSR primers, 15 polymorphic loci were generated. Both primer types were able to determine the genetic diversity among the 4 populations. Dendrograms based on the genetic distances among the 4 populations did not show similarities between RAPDs and ISSRs. However both methods showed high genetic diversity among populations based on their  $G_{st}$  (0.2919) and (0.3135) respectively. Those high levels of genetic diversity, among the 4 populations, could be explained neither by the climate factor ( $r^2 = -0.302$ , P-value 0.560) nor by the geographic distance ( $r^2 = -0.183$ , P-value 0.768). From the present data it is concluded that the *P. acuminata* populations evaluated here presented an important level of genotype differentiation. As a consequence, it may be possible to utilize the genetic diversity of the species not only for biodiversity conservation programs but also for a better use of their phytochemical resources.

**Key words:** *Psychotria acuminata*, medicinal plant, genetic diversity, RAPD, ISSR.

## INTRODUCCION

*Psychotria acuminata*, pertenece a la familia Rubiaceae y se ubica en el género *Psychotria*, el cual comprende aproximadamente 1650 especies de plantas a nivel mundial (Hamilton 1989). Las plantas de *P. acuminata* son arbustos de entre 1-3 m de altura, muy ramificados, de hojas glabras, las flores son pequeñas, blancas o amarillo pálido y los frutos son lisos, hemiesféricos y de color entre azul y púrpura. Habitan en bosques lluviosos siempre verdes, de tierras bajas sobre las 2 vertientes, Pacífica y Caribeña de Costa Rica y pueden ser localizadas desde los 0 hasta los 1000 msnm (Burger 1993).



*Psychotria acuminata* es una planta medicinal, que se encuentra aún en estado no domesticado. El interés medicinal y comercial en esta planta radica en la presencia de los alcaloides derivados de isoquinolina emetina y cefalina en sus raíces, además de otros compuestos de interés científico presentes en esta especie (Itoh *et al.* 1999, Solís *et al.* 1993, Glinski *et al.* 1995, Teshima *et al.* 1990). Estos alcaloides son utilizados como expectorantes y eméticos en casos de envenenamiento y para el tratamiento de la disentería amébrica causada por *Entamoeba histolitica* (Skorupa y Assis 1998, Solís *et al.* 1993, Yoshimatsu y Shimomura 1991). Otros alcaloides encontrados son la Psychotrina y su *O*-metil éter los cuales son inhibidores selectivos de la transcriptasa reversa I del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Tan *et al.* 1991).

El estudio de plantas medicinales *i.e* *Psychotria acuminata*, es un objetivo prioritario en zonas de alta diversidad biológica como los bosques tropicales de Costa Rica. La importancia de las investigaciones sobre la variabilidad genética de las especies, radica en el impacto que pueden tener los compuestos derivados de las plantas, una vez que éstas sean domesticadas y los métodos de extracción estandarizados y por contribuir a la preservación de los bosques donde habitan.

El conocimiento de la variabilidad genética de plantas con uso medicinal, al igual que plantas utilizadas con otros fines, permitiría realizar un mejor aprovechamiento de los recursos fitogenéticos (Palevitch 1991). Skorupa y Assis (1998) reconocen la importancia de los estudios sobre la variabilidad genética de poblaciones naturales y los factores que influyen en la productividad de los metabolitos de *P. ipecacuanha*, una especie relacionada. Así mismo, advierten sobre la falta de investigaciones que permitirían determinar los genotipos de plantas con mayor potencial para la producción de compuestos de interés, tales como los alcaloides ya mencionados. En este sentido ya se han realizado trabajos para determinar los niveles de variación genética en *P. ipecacuanha* (Martins *et al.* 2000, Skorupa y Assis 1998).

Para determinar los niveles de variación genética entre organismos de una especie o entre diferentes niveles taxonómicos, se puede utilizar varios métodos de caracterización (Morell *et al.* 1995). Los marcadores moleculares generados por los RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA, en inglés) (Antoni 1997), y los generados por los ISSR (Simple Sequence Repeats, en inglés), conocidos también como SSR, STR o microsátélites (Vogel y Scolnik 1997), presentan ventajas comparativas respecto a métodos tales como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms, en

inglés). Para la obtención de los RAPDs y los ISSRs no se requiere de un conocimiento previo de la secuencia del ADN en estudio; ninguno de los 2 métodos utiliza sondas radiactivas; son relativamente rápidos; emplean bajas cantidades de ADN y generan numerosos polimorfismos distinguibles (Karp y Edwards 1997).

Los RAPDs son fragmentos amplificados con el uso de oligonucleótidos sintéticos cortos ( $\pm 10$  bases, decámeros), con una secuencia aleatoria, que evalúan el ADN total por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de polimorfismos. Por su parte los ISSR utilizan, igualmente, la técnica PCR; sin embargo, éstos tienen la capacidad de detectar diferencias aún entre individuos muy cercanos (Fang y Roose 1997). Los imprimadores del método ISSR son oligonucleótidos compuestos de una secuencia corta repetida, *i.e.* (GATA)<sub>4</sub> y en algunas ocasiones estos poseen entre 1-4 nucleótidos anclados en uno de los extremos (ASSR). Tanto las secuencias repetidas como los nucleótidos anclados son seleccionados aleatoriamente. Una característica de este método es que debido a la naturaleza de los imprimadores, estos solamente detectan variaciones en regiones que coincidan con el imprimador, las cuales son regiones no codificantes; muy abundantes en el genoma tanto de plantas como de animales y que además presentan una alta tasa de mutación (Ciofi *et al.* 1998). Conocidas las bondades de estos 2 tipos de marcador molecular, el objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de variación y diferenciación genética de *Psychotria acuminata* de 4 localidades de Costa Rica por medio de RAPDs y ISSRs.

## MATERIALES Y METODOS

### Material Vegetal

Se colectó hojas de un total de 51 accesiones de *Psychotria acuminata*, procedentes de 4 localidades de Costa Rica (Figura 1):

-La Cruz se ubica en la provincia de Guanacaste, al N-NE del Volcán Orosi, cerca de la Estación de Pitilla 11° 01' 00" N y 85° 25' 00" O. Este es un bosque de transición entre seco del pacífico y bosque húmedo del Atlántico, con una importante influencia climática del Lago de Nicaragua. Aquí se colectó un total de 13 muestras.

-Sarapiquí se ubica en la provincia de Heredia. El sitio de colecta está cerca de la Estación Biológica La Selva 10° 25' 52" N y 84° 00' 13" O, en un pequeño bosque al

margen de un riachuelo y rodeado de grandes áreas cultivadas con piña. Aquí se colectó un total de 14 muestras.

-Puriscal se ubica en la provincia de San José. El sitio de colecta está en la localidad de Santa Rosa de Puriscal, en la Reserva Biológica La Cangreja. La zona comprende un bosque primario, en las faldas de la fila de La Cangreja, en las márgenes del Río Negro  $9^{\circ} 42' 52''$  N y  $84^{\circ} 23' 30''$  O. Aquí se colectó un total de 12 muestras.

-Golfito se ubica en la provincia de Puntarenas y el sitio de colecta está en el Refugio de Fauna Silvestre Golfito, en la margen de un río en el bosque a  $08^{\circ} 33' 00''$  N y  $83^{\circ} 06' 00''$  O. Aquí se colectó un total de 12 muestras.

Las condiciones climáticas, así como la altura de cada una de las localidades evaluadas se muestran en el cuadro 1.



Fig. 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de *Psychotria acuminata* en Costa Rica 1-La Cruz, Guanacaste; 2-Sarapiquí, Heredia; 3-Puriscal, San José; y 4-Golfito, Puntarenas.

Cuadro 1. Condiciones climáticas y altura sobre el nivel del mar de los sitios de colecta de muestras de *Psychotria acuminata*.

Sitio	Prec. anual	Temp. máx.	Temp. mín.	Temp. prom.	Hum. prom.	Msum
Puriscal	2524,6	25,4	16	20,7	85 %	400
Sarapiquí	4171,25	30,75	21,64	26,2	95%	50
Guanacaste	2687,52	31,06	21,19	26,13	90%	700
Golfito	4831,5	31,5	21,3	62,4	nd	50

nd = no hubo datos

### Extracción de ADN

El material vegetal fue colectado e inmediatamente almacenado y transportado en nitrógeno líquido hasta el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez en el laboratorio el tejido foliar fue liofilizado. La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología descrita por Agwanda *et al.* (1997). Para la extracción de ADN se utilizó aproximadamente 100 mg de tejido foliar liofilizado, el cual fue macerado en un mortero con la ayuda de sílice en polvo. Al procedimiento reportado por Agwanda *et al.* (1997), se le adicionó un paso de eliminación de proteínas utilizando para ello fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1). La cuantificación y calidad del ADN se determinó con un espectrofotómetro de luz UV a 260 nm y 280 nm. La concentración final de las muestras se estandarizó a  $25 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$ .

### Reacciones PCR

Las reacciones de amplificación se prepararon de acuerdo con Williams *et al.* (1990) en volúmenes fijos de  $25\mu\text{l}$ , conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, dNTPs 0,1 mM, imprimador 0,5  $\mu\text{M}$ ,  $5 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$  de ADN y 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Promega Co. Ltd.). Los decámeros empleados fueron todos los de la serie OPC (Operon Technologies Inc. Alameda, CA). También se evaluó 4 ISSRs (inter-simple sequence repeats), identificados como #827  $(\text{AC})_8\text{G}$ , #834  $(\text{AG})_8\text{CTT}$ , #841  $(\text{GA})_8\text{CTC}$  y #857  $(\text{AC})_8\text{CTG}$ ; las secuencias de estos imprimadores fueron tomadas de Nagaoka y Ogihara (1997) y los oligos elaborados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica. Las

condiciones de amplificación empleadas, en el termociclador (GeneAmp® 9700 de Perkin Elmer), para todas las reacciones con los imprimadores OPC, fueron: una pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, seguida de 45 ciclos a 94°C por 1 min. (desnaturalización); luego 36°C por 1 min. (hibridación) y 72°C por 1 min. (extensión). También se realizó una extensión final a 72°C por 5 min. Cuando se trabajó con los ISSR, se utilizó una temperatura de 58°C por 1:30 min. en la etapa de hibridación, el resto del procedimiento fue igual al descrito para los decámeros. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con un buffer de TBE y fueron visualizados con bromuro de etidio (0,55 µgml<sup>-1</sup>) en un transiluminador de luz UV. El marcador de peso molecular utilizado fue Lambda DNA / EcoR I + Hind III y los geles fueron fotografiados con una película Polaroid 667.

### **Análisis de Datos**

Los loci encontrados se registraron en una matriz binaria de datos como presente (1) y ausente (0). La matriz de distancias genéticas entre poblaciones se estimó con base en Nei (1978). La matriz de distancias genéticas fue analizada por el método unweighted pair-group using arithmetic averages (UPGMA) modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5. El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ) se calculó como describe Nei (1973). La matriz de distancias genéticas, los dendrogramas y el coeficiente de diversidad genética se estimaron utilizando el programa de computadora PopGene 32, versión 1.31 (© University of Alberta and Center for International Forestry Research) para marcadores dominantes.

### **Datos Climáticos y Distancias Geográficas**

Con el fin de determinar la relación existente entre la variabilidad genética de las 4 poblaciones de *Psychotria acuminata* y las variables climáticas precipitación, temperatura y humedad relativa de los sitios donde se ubican las poblaciones, se procedió a coleccionar los datos de promedio anual de: precipitación, precipitaciones máximas y mínimas, temperatura, temperaturas máximas y mínimas, temperaturas promedio en las épocas de mayor y menor precipitación, temperaturas máximas y mínimas en los meses de mayor y menor precipitación, promedio anual de la humedad relativa y humedad relativa en las épocas de mayor y menor precipitación. El cuadro 1

muestra los datos para algunas de las variables consideradas en este análisis. También, con el fin de evaluar la correlación entre la separación física y las distancias genéticas de las poblaciones de *P. acuminata* se elaboró una matriz de distancias geográficas, utilizando las distancias geográficas lineales entre las 4 poblaciones.

Para evitar una influencia mayor de alguna de las variables climáticas (*i.e.* precipitación) (Cuadro 1) con respecto a las otras variables, se estandarizó los datos para las 4 poblaciones. Los datos geográficos no requirieron estandarización por tratarse de una sola variable. La estandarización de los datos, las distancias euclidianas, y los dendrogramas fueron realizados utilizando el programa de computadora SYSTAT versión 9, copyright © SPSS Inc., 1998. Con los datos climáticos estandarizados y con las distancias geográficas, se produjo una matriz para cada variable, considerando las 4 poblaciones y con cada una de éstas se elaboró un dendrograma por el método de UPGMA.

## RESULTADOS

### Amplificaciones

Un total de 20 decámeros y 4 ISSRs fueron evaluados para todas las 51 accesiones. Se excluyó 3 decámeros y 1 de secuencia repetida debido a que no se presentaron amplificaciones o los productos de amplificación fueron ambiguos. Un patrón típico de los RAPDs se observa en la figura 2. Con los decámeros se obtuvo un total de 70 loci polimórficos (95%) y 4 monomórficos, el número de loci por imprimador fue de 1-10 con 5 en promedio. El gran número de polimorfismos observado, produjo una cantidad elevada de diferentes patrones de bandas, a través de todas las accesiones evaluadas con cada imprimador del método RAPD (Cuadro 2). El número de patrones fue menor cuando se usó ISSRs (Cuadro 3). Un ejemplo de un patrón usando el método ISSR es mostrado en la (Figura 3). Con este método se obtuvo 15 loci polimórficos (83%) y 3 monomórficos, el número de loci por imprimador fue de 4-9 con un promedio de 6 (Cuadro 3). Con el uso de ambos marcadores el tamaño de los fragmentos amplificados varió entre 100-2000 pb.

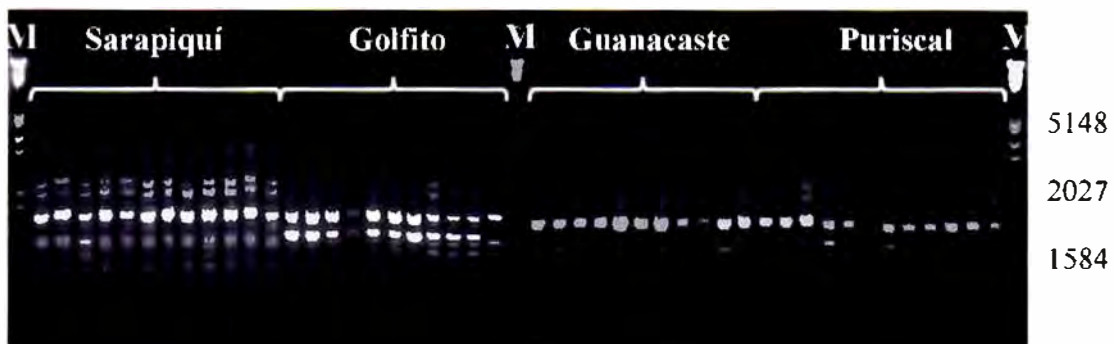


Fig. 2. Productos de amplificación de las 4 poblaciones de *P. acuminata* con el imprimador OPC-20. M=marcador de peso molecular *Lamda DNA/EcoR I + Hind III*.

Cuadro 2. Secuencias de los decámeros, con el número total de loci, el número de polimorfismos y el número de patrones producidos.

Imprimador	Secuencia (5' → 3')	Número de loci	Número de polimorfismos	Número de patrones
OPC 01	TTCGAGCCAG	5	5	8
OPC 02	GTGAGGCGTC	10	10	34
OPC 04	CCGCATCTAC	3	3	4
OPC 05	GATGACCGCC	7	6	12
OPC 06	GAACGGACTC	1	1	2
OPC 07	GTCCCGACGA	2	2	3
OPC 08	TGGACCGGTG	5	4	11
OPC 10	TGTCTGGGTG	4	4	12
OPC 11	AAAGCTGCGG	5	4	7
OPC 12	TGTCATCCCC	4	4	5
●PC 14	TCCGTGCTTG	5	5	11
●PC 15	GACGGATCAG	5	5	10
OPC 16	CACACTCCAG	3	2	4
OPC 18	TGAGTGGGTG	4	4	9
OPC 19	GTTGCCAGCC	4	4	5
OPC 20	ACTTCGCCAC	7	7	14
	<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>70</b>	<b>151</b>
	<b>Promedio</b>	<b>4.62</b>	<b>4.38</b>	<b>9.44</b>

Cuadro 3. Secuencia de los imprimadores usados para el análisis con los ISSRs, el número total de bandas, el número de polimorfismos y el número de patrones producidos.

Imprimador	Secuencia (5' → 3')	Número de loci	Número de polimorfismos	Número de patrones
827	(AC) <sub>8</sub> G	9	7	16
841	(GA) <sub>8</sub> CTC	5	4	6
857	(AC) <sub>8</sub> CTG	4	4	4
	Total	18	15	26
	Promedio	6.0	5	8.67

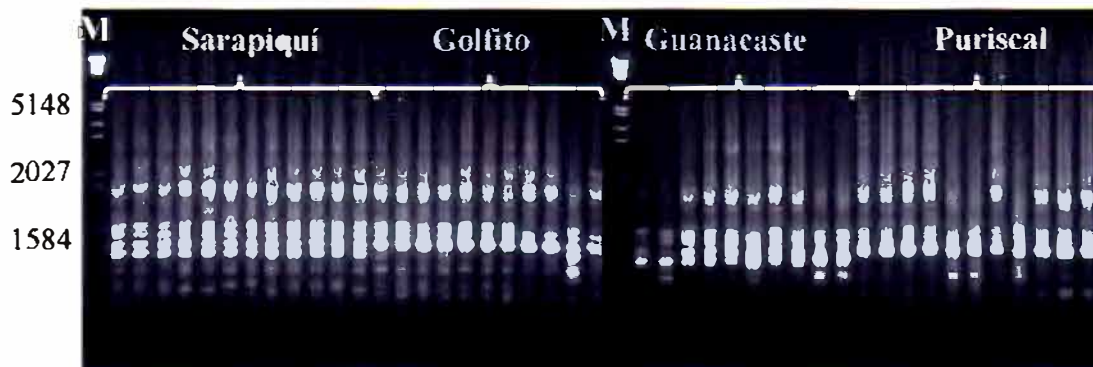


Fig. 3. Productos de amplificación en las 4 poblaciones de *P. acuminata* con el imprimador ISSR-827. M=marcador de peso molecular  $\Lambda$  DNA/*EcoR* I + *Hind* III.

### Relación entre poblaciones

El dendrograma construido con los datos generados por los RAPDs, muestra la formación de 2 grupos; Sarapiquí-Puriscal y Golfito-Guanacaste (Figura 4). En la matriz de distancias genéticas (Cuadro 4) se puede observar que las poblaciones que tienen una menor distancia genética son Sarapiquí y Puriscal (0,1356), por otro lado las poblaciones con la mayor distancia genética son Sarapiquí y Guanacaste (0,2621), Golfito se mantiene en una distancia intermedia respecto a las otras poblaciones.

La matriz de distancias genéticas obtenida con la información generada por los ISSRs (Cuadro 5) produjo un dendrograma que muestra, igualmente, la formación de 2



grupos; Sarapiquí-Guanacaste y Golfito-Puriscal (Figura 5). Sin embargo, estos grupos tienen una composición diferente a la que se obtuvo en el dendrograma elaborado con los datos generados por los RAPDs (Figura 4). En la matriz de distancias genéticas generada con los ISSRs se puede observar que las poblaciones que tienen una menor distancia genética son Sarapiquí y Guanacaste (0,0655), las poblaciones con mayor distancia genética son Guanacaste y Golfito (0,1919) y Puriscal mantiene una distancia intermedia con respecto a las otras poblaciones (Cuadro 5).

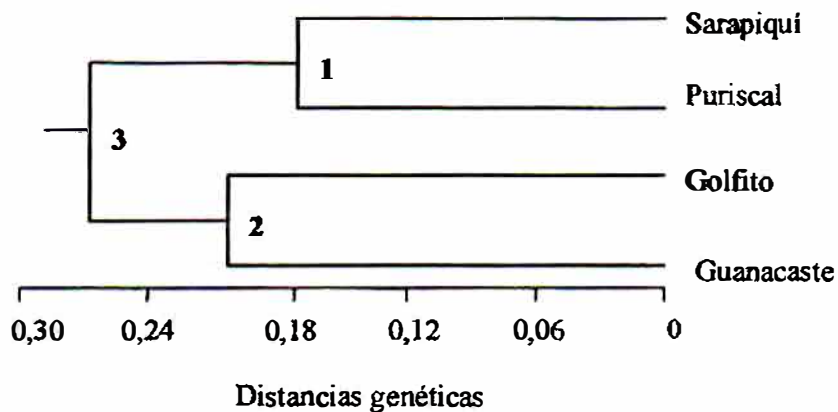


Fig. 4. Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de RAPDs. Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5

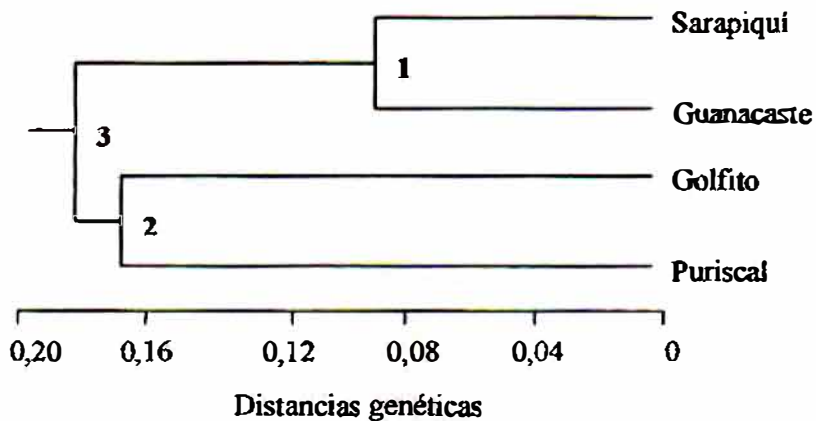


Fig. 5. Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de ISSRs. Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5

**Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los datos generados por los RAPDs (Nei 1978).**

Poblaciones	Sarapiquí	Golfito	Guanacaste	Puriscal
Sarapiquí	0,0			
Golfito	0,1770	0,0		
Guanacaste	0,2621	0,1550	0,0	
Puriscal	0,1356	0,1670	0,2077	0,0

**Cuadro 5. Matriz de distancias genéticas de los datos generados por los ISSRs (Nei 1978).**

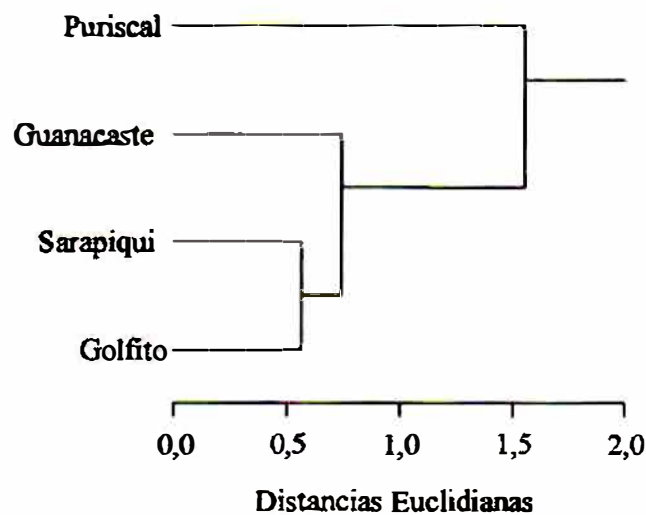
Población	Sarapiquí	Golfito	Guanacaste	Puriscal
Sarapiquí	0,0			
Golfito	0,1112	0,0		
Guanacaste	0,0655	0,1919	0,0	
Puriscal	0,1677	0,1301	0,0964	0,0

La determinación del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ), permitió establecer, con la información generada con los RAPDs, un valor de la  $G_{st}$  de 0,2919 mientras que la  $G_{st}$  proveniente de los ISSRs fue de 0,3135.

#### **Relación Variabilidad Genética y Clima**

Con el fin de determinar la relación existente entre la variabilidad genética de las 4 poblaciones de *Psychotria acuminata* evaluadas en este estudio y los factores climáticos: precipitación, temperatura y humedad relativa de los sitios donde se ubican las poblaciones, se procedió a elaborar una matriz de distancias euclidianas (datos no mostrados) y con ésta un dendrograma (Figura 6).

El dendrograma generado a partir de los datos climáticos revela la mayor afinidad climática entre los sitios de Sarapiquí y Golfito, a este grupo se une por afinidad Guanacaste y finalmente Puriscal. Al comparar este dendrograma con el generado a partir de la matriz de distancias genéticas de los RAPDs (Figura 4), se puede notar una clara diferencia, donde el grupo de mayor afinidad climática Sarapiquí y Golfito no corresponde con el grupo de menor distancia genética Sarapiquí y Puriscal. La evaluación de ambas matrices confirma la falta de correlación entre los 2 dendrogramas ( $r^2 = -0,302$ ) ( $P = 0,560$ ).



**Figura.6.** Dendrograma generado a partir de los datos climáticos: temperatura, humedad relativa y precipitación para cada una de las 4 localidades.

Comparando el dendrograma de distancias genéticas generado con los ISSRs (Figura 5) con el dendrograma para los datos climáticos, se puede apreciar, al igual que con el método de RAPDs, que no existe semejanza entre ellos y la correlación entre ambas matrices no es significativa ( $r^2 = -0,350$ ) ( $P = 0,563$ ). En este caso el grupo de menor distancia genética está formado por las poblaciones de Sarapiquí y Guanacaste, lo cual no concuerda con los sitios climáticos más afines.

### Relación Distancias Genéticas y Geográficas

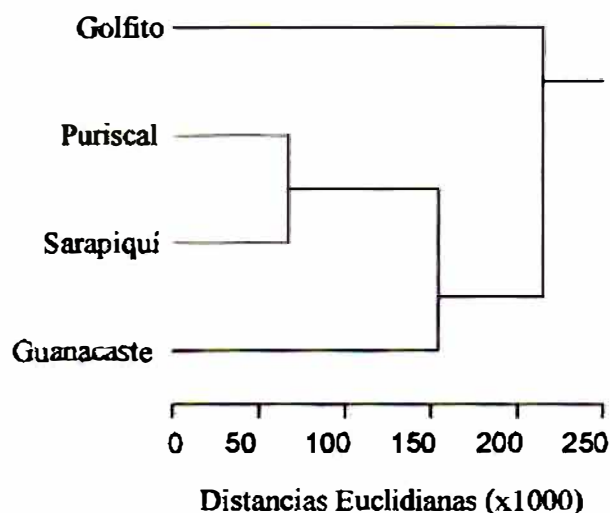
Con el fin de correlacionar las separaciones físicas y las distancias genéticas de las poblaciones de *P. acuminata*, se elaboró una matriz utilizando las distancias geográficas lineales entre las 4 poblaciones (Cuadro 6).

Al comparar el dendrograma de distancias genéticas de los RAPDs (Figura 4) y el producido con las distancias geográficas (Figura 7), se observa que las poblaciones con menor separación física coinciden con las poblaciones de menor distancia genética (Sarapiquí y Puriscal); sin embargo las poblaciones de Guanacaste y Golfito poseen la segunda menor distancia genética pero, la distancia geográfica entre ambas poblaciones es la mayor de todas. La correlación entre ambas matrices, a pesar de alguna similitud no es significativa ( $r^2 = -0,648$ ) ( $P = 0,237$ ).

El dendrograma de las distancias genéticas de los ISSRs presenta alguna similitud con el dendrograma de distancias geográficas. La mayor distancia geográfica, como se mencionó anteriormente, es entre las poblaciones de Guanacaste y Golfito, lo cual coincide con la mayor distancia genética para este caso; sin embargo, la menor distancia genética esta entre 2 poblaciones con una distancia geográfica intermedia. La correlación entre ambas matrices es igualmente no significativa ( $r^2 = -0,183$ ) ( $P = 0,768$ ).

Cuadro 6. Matriz de distancias euclidianas basadas en las distancias geográficas lineales entre los sitios donde se ubican las poblaciones.

Sitios	Puriscal	Golfito	Sarapiquí	Guanacaste
Puriscal	0,0			
Golfito	191687,7	0,0		
Sarapiquí	90024,3	230541,7	0,0	
Guanacaste	182651,2	372888,3	167582,7	0,0



7. Dendrograma generado a partir de las distancias geográficas entre las 4 localidades.

## DISCUSION

### Amplificaciones

El uso de marcadores moleculares, como los RAPDs y los ISSRs, para caracterizar especies vegetales, que no se puede o resulta difícil separar mediante el uso de marcadores morfológicos, ha resultado una herramienta muy útil por su facilidad de uso, repetitibilidad, ausencia de elementos radiactivos durante el análisis y la gran cantidad de polimorfismos que se obtienen, en comparación con RFLPs o isoenzimas (Irwin *et al.* 1998). En este estudio, la fidelidad de los marcadores utilizados se comprobó al no encontrar variaciones en el análisis de los loci provenientes de PCRs y extracciones de ADN repetidas, datos que son coincidentes con lo reportado por Prevost y Wilkinson (1999), Anthony *et al.* (2001), Irwin *et al.* (1998) y Coletta *et al.* (1998).

Estas características hacen que los RAPDs sean actualmente usados de manera más común por los fitomejoradores de plantas, para identificar la variación genética de variedades silvestres, variedades comerciales y accesiones de una especie determinada (Anthony *et al.* 2001, Morell *et al.* 1995, Forapani *et al.* 1999). En adición a las bondades de estos marcadores, ya mencionadas, su desempeño como generadores de

gran cantidad de polimorfismos, en este trabajo, ha sido muy aceptable. Más aún, en el caso de los RAPDs fue posible identificar una cantidad respetable de loci considerados como muy informativos (Cuadro 2). Nuevamente, estos datos son concordantes con lo reportado por Irwin *et al.* (1998), Coletta-Filho *et al.* (1998), Anthony *et al.* (2001), Le Corre *et al.* (1997).

### **Relación entre poblaciones**

En términos de capacidad para determinar la variabilidad genética entre las 4 poblaciones costarricenses de *Psychotria acuminata*, se realizó 3 tipos de evaluación: matrices de distancias genéticas, dendrogramas y un análisis de la proporción de la variabilidad ( $G_{st}$ ).

Las matrices mostraron la distancia genética que existe entre las 4 poblaciones, los dendrogramas, basados en las matrices de datos, señalan una alta variabilidad genética entre las poblaciones y permiten la agrupación de las mismas, por su parte la  $G_{st}$  indicó la proporción de la diferenciación genética entre las poblaciones. La  $G_{st}$  determinada tanto con los RAPDs como por los ISSRs fue en promedio 30,3%, este resultado indica niveles muy altos de diferenciación genética entre los 4 grupos en evaluación, si se considera que en promedio la diversidad entre poblaciones de plantas es de un 22,4 % ( $G_{st}=0,224$ ). La comparación anterior se realizó con la  $G_{st}$  calculada por Hamrick y Godt (1989), quienes efectuaron sus determinaciones, con base en los polimorfismos detectados con el uso de isoenzimas en un gran número de especies de plantas con características muy diversas.

En el caso del presente trabajo, la  $G_{st}$  promedio para RAPDs e ISSRs fue de 30,3%, proveniente de una  $G_{st}=0,2919$  para los RAPDs y una  $G_{st}=0,3135$  para los ISSRs. Los resultados obtenidos para cada marcador, pueden ser explicados, si se toma en cuenta que las diferencias genéticas detectadas por los RAPDs provienen de variaciones en cualquier región del ADN, donde los imprimadores encuentren una secuencia complementaria, esto incluye regiones codificantes y no-codificantes. Por esta característica de los RAPDs, el panorama bajo el que se evalúan las variaciones del ADN es más amplio que el de las isoenzimas ya que los patrones generados por éstas son más representativos de regiones conservadas del genoma. Por otro lado, los ISSRs contrario a las isoenzimas, evalúan las regiones no-codificantes del ADN también denominadas microsátélites. Estas regiones están conformadas por secuencias repetidas

de nucleótidos, las cuales presentan diferencias longitudinales y de combinaciones de nucleótidos. Por ser regiones altamente repetitivas, están expuestas a errores frecuentes de replicación, lo que las hace más polimórficas. Bajo éstas consideraciones, una  $G_{st}=30,3\%$  en esta especie, es un indicativo de una alta variabilidad genética entre las poblaciones en estudio. Un dato adicional que corrobora esta observación acerca de la variabilidad genética de las poblaciones de *Psychotria acuminata* de este estudio, es el hecho de que Bawa y Beach (1983), hayan caracterizado a *P. acuminata* como una especie autógama, ya que Hamrick y Godt (1989) indican que las especies autógamas poseen valores altos de variabilidad genética entre las poblaciones.

Si se observa los dendrogramas de distancia genética, no es muy claro por qué los 2 grupos generados con el uso de RAPDs son diferentes de los 2 grupos generados con los ISSRs. Lo que sí es claro es que con los polimorfismos generados por ambos marcadores fue posible demostrar la variabilidad genética presente entre las poblaciones y con el uso del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ) la magnitud de las diferencias entre las poblaciones.

#### **Relación Variabilidad Genética y Clima**

Con la determinación de la variabilidad genética entre las poblaciones en estudio, se inició un proceso de búsqueda de parámetros que permitieran explicar la variabilidad genética observada. Existen trabajos en los cuales la relación genotipo-ambiente ha podido explicar, en un alto porcentaje, la variabilidad genética observada. Muchos autores argumentan que la formación de ecotipos en especies de plantas, ocurre por la adaptación de las poblaciones a condiciones ambientales distintas a las originales. Así, el establecimiento de un grupo de plantas a distintas alturas, condiciones climáticas o de suelo, depende de la capacidad que tenga éste grupo para adaptarse al nuevo ambiente. En este trabajo, bajo las condiciones ambientales estudiadas, no fue posible establecer una relación entre la diversidad genética y el clima de los sitios donde se ubican las poblaciones. Las correlaciones de las distancias genéticas, generadas por los RAPDs y los ISSRs, con los datos de clima de las diferentes poblaciones, fueron negativas lo que indica que la variabilidad genética obtenida no se puede explicar por efecto de las condiciones climáticas. Posiblemente, si el estudio se hubiera realizado para evaluar una característica específica, *i.e.* algún alcaloide o proteína, la influencia de

uno o varios de los factores climáticos evaluados hubiese mostrado una correlación positiva alta (Nevo *et al.* 1986, Palevitch 1991, Vargas *et al.* 2001).

### **Relación Distancias Genéticas y Geográficas**

Las distancias genéticas obtenidas en la matriz respectiva (Cuadros 4 y 5) indican la variabilidad existente entre las 4 poblaciones objetivo de este estudio. Como el origen de dicha variabilidad es desconocido y no pudo ser explicado por los factores climáticos asociados a cada una de las regiones donde se encuentran las poblaciones en estudio, se procedió a realizar un análisis de correlación entre las distancias genéticas entre poblaciones y las distancias geográficas. Este método ha sido utilizado por diferentes investigadores (Rocha y Lobo 1996). En el presente trabajo, las correlaciones arrojaron un resultado negativo para ambos análisis (RAPDs e ISSRs), lo que indica que estadísticamente no hay relación entre las variables evaluadas. Sin embargo, los dendrogramas construidos con las distancias geográficas entre las poblaciones, mostraron alguna relación entre ambos factores, lamentablemente no hay concordancia entre los resultados. En teoría, la información obtenida de la relación entre las distancias genética y geográfica, lo que indica es una relación directamente proporcional, donde entre más corta es la distancia geográfica entre 2 grupos menor será la variabilidad genética; en contraste, entre mayor es la distancia geográfica mayor será la distancia genética. En algunos casos esta regla se ha cumplido pero en otros no, Rocha y Lobo (1996) en su trabajo con *Enterolobium cyclocarpum*, encontraron que poblaciones muy distantes genéticamente, también fueron distantes geográficamente; de la misma manera, algunas poblaciones muy cercanas geográficamente también fueron cercanas genéticamente. Sin embargo, esta relación se apartó de lo esperado, cuando 2 poblaciones muy cercanas genéticamente no resultaron tan cercanas geográficamente. Contrario a esto, Le Corre *et al.* (1997) encontraron una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas en un trabajo realizado con *Quercus petraea*.

Nuestras observaciones respecto a la variabilidad genética de *Psychotria acuminata* en 4 poblaciones de Costa Rica, indican que realmente las 4 poblaciones en estudio son genéticamente diferentes, esto se pudo determinar con el uso de los marcadores moleculares RAPD e ISSR. La variación genética encontrada no se pudo explicar con base en correlaciones entre las distancias genéticas y variaciones climáticas o las distancias geográficas. Sin embargo, la aplicación del índice de diferenciación



genética entre poblaciones ( $G_a$ ) permitió evidenciar que un 30,3% del total de la variabilidad observada se da entre las poblaciones, lo que implica que el restante 69,7% de la variación genética ocurre dentro de cada población.

La determinación de la variabilidad genética entre las poblaciones estudiadas tiene diferentes implicaciones, una con respecto a la conservación de la variabilidad genética de ésta especie, donde los estudios realizados, permitan detener o prevenir la destrucción de la naturaleza y otra de orden práctico, que debe ser considerada a la hora de iniciar la utilización de esta planta con fines medicinales, pues al ser los individuos de las 4 poblaciones diferentes tanto el tipo como la concentración de los alcaloides podría variar. Por tal motivo, el estudio que realiza el Centro de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica, sobre los principios químicos de las plantas de estas 4 poblaciones, es de vital importancia para determinar la relación entre la cantidad, tipo y calidad de estos principios químicos con la estructura genética de las 4 poblaciones estudiadas. Así como para generar información en este campo, pues tal y como lo indican Shorupa y Assis (1998), no existen muchas técnicas relacionadas con la potencial variabilidad genética de poblaciones naturales y los factores ambientales que influyen la productividad de los metabolitos durante el cultivo.

El presente trabajo representa un avance tecnológico de gran importancia para la conservación y uso de *Psychotria acuminata*, y se espera que los resultados obtenidos sirvan para evitar algunos de los problemas que demanda una población humana en crecimiento, tal y como lo menciona Trewavas (2001).

## LITERATURA CITADA

- AGWANDA C.O, LASHERMES P., TROUSLOT P., COMBES M-C., CHARRIER A. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica* 97: 241-248.
- ANTHONY F., BERTRAND B., QUIROS O., WILCHES A., LASHERMES P., BERTHAUD J., CHARRIER A. 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.
- ANTONI J. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *In* DNA markers: protocols, applications, and overviews. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. 364 p.
- BAWA K.S., BEACH J.H. 1983. Self-incompatibility system in the rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *Amer. J. Bot.* 70 (9): 1282-1288.
- BURGER W. 1993. Fieldiana Botany Flora Costarricensis: Fam. Rubiaceae. N° 33, p. 232.
- CIOFI C., FUNK S.M., COOTE T., CHEESMAN D.J., HAMMOND R.L., SACCHERI I.J., BRUFORD M.W. 1998. Genotyping with microsatellite markers. *In* Molecular tools for screening biodiversity. Ed by Karp A., Issac P.G., Ingram D. S. by Chapman & Hall. London. p. 201-204.
- COLETTA-FILHO H.D., MACHADO M.A., TARGON M.L.P.N., MOREIRA M.C.P.Q.D.G., POMPEU J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.
- FANG D.Q., ROOSE M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. appl. Genet.* 95: 408-417.

- FORAPANI S., CARBONI A., CASTELLANI E., MANDOLINO G., RANALLI P. 1999. RAPD markers for potato germplasm characterization. *J. Genet. & Breed.* 53: 143-147.
- GLINSKI J.A., DAVID E., WARREN T.C., HANSEN G., LEONARD S.F., PITNER P., PAV S., ARVIGO R., BALICK M. J., PANTI E., GROB P.M. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide "a", a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochemistry and Photobiology* 62 (4): 144 -150.
- HAMILTON C.W. 1989. Variations on a ditilous theme in Mesoamerican *Psychotria* Subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 62 - 75.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In* *Planta population genetics, breeding, and genetic resources*. Ed. by Brown H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. Sinauer Associates. EE.UU. 449 p.
- IRWIN S.V., KAUFUSI P., BANKS K., de la PEÑA R., CHO J.J. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. *Euphytica* 99: 183-189.
- ITOH A., IKUTA Y., BABA Y., TANAHASHI T., NAGAKURA N. 1999. Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*. *Phytochemistry* 52: 1169-1176.
- KARP A., EDWARDS K. 1997. DNA markers: a global overview. *In* *DNA markers: protocols, applications, and overviews*. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. p. 1-13.
- Le CORRE V., DUMOLIN-LAPÈGUE S., KREMER A. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular ecology* 6: 519-529.

- MARTINS E., OLIVEIRA L., GARCIA R., BARROS W., PEREIRA M., VIEIRA I., PEREIRA T. 2000. Conservation genetics of native populations of *Psychotria ipecacuanha* from south-eastern Brazil. *International Conference on Science and Technology for Managing Plant Genetic Diversity in the 21<sup>st</sup> Century*. K.L. Hilton International Kuala Lumpur, Malaysia. p. 69.
- MORELL M.K., PEAKALL R., APPELS R., PRESTON L.R., LLOYD H.L. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. *Australian Journal of experimental agriculture* 35:807-819.
- NAGAOKA T., OGIHARA Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597-602.
- NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEVO E., ZOHARY D., BEILES A., KAPLAN D., STORCH N. 1986. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Turkey. *Genetica* 68: 203-213.
- PALEVITCH, D. 1991. Agronomy applied to medicinal plant conservation. *In The conservation of medicinal plants*. Ed. by Akerele O., Heywood V., Syngé H. Cambridge University Press. Cambridge. p. 167-178.
- PREVOST A., WILKINSON M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.

- ROCHA O.J., LOBO J.A. 1996. Genetic variation and differentiation among five populations of the Guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.) in Costa Rica. *Int. J. Plant Sci.* 157 (2): 234-239.
- SKORUPA L.A., ASSIS M.C. 1998. Collecting and conserving Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. *Economic Botany* 52 (2): 209-210.
- SOLIS P.N., WRIGHT C.W., GRUPTA M.P., PHILLIPSON J.D. 1993. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. *Phytochemistry* 33 (5): 1117-1119.
- TAN G., KINFHORN A.D., HUGHES S.H., PEZZUTO J.M. 1991. Psychotrine and its *O*-metil ether are selective inhibitors of human immunodeficiency Virus-1 Reverse transcriptase. *The journal of biological chemistry* 226 (35): 23529-23536.
- TESHIMA D., SUZUKI A., OTSUBO K., HIGUCHI S., AOYAMA T., SHIMOZONO Y., SAITA M., NODA K. 1990. Efficacy of emetic and united state pharmacopoeia Ipecac Syrup in prevention of drug absorption. *Cham. Pharm. Bull.* 38 (8): 2242-2245.
- TREWAVAS A.J. 2001. The population/biodiversity paradox. *Agricultural efficiency to save wilderness. Plant Physiology* 125: 174-179.
- VARGAS E.M., MACAYA G., BAUDOIN J.P., ROCHA O.J. 2001. Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild populations of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 109-120.

- VOGEL J.M., SCOLNIK P.A. 1997. Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. *In* DNA markers: protocols, applications, and overviews. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. 364 p.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18: 6531-6535.
- YOSHIMATSU K., SHIMOMURA K. 1991. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* (A. Richard). *Plant Cell Reports* 9: 567-570.