

MICROPROPAGACIÓN DE LA PLANTA MEDICINAL *Psychotria acuminata*^{1/2/}

Alfonso Lara*, Roberto Valverde^{3/*}, Luis Gómez*, Nancy Hidalgo**

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

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

RESUMEN

Psychotria acuminata es una planta medicinal que produce los alcaloides emetina, cephaelina y psychotrina, usados 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 desarrolló métodos de cultivo de tejidos para la reproducción clonal y masiva de esta planta. El material vegetal fue recolectado en 4 localidades de Costa Rica. En un medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con 3 mg l⁻¹ de BAP, 0,01 mg l⁻¹ de ANA, 3% de azúcar y 2 g l⁻¹ de phytigel, se logró la inducción de múltiples brotes a partir de las yemas axilares de microestacas (segmentos nodales de 1 cm de largo) y de hojas provenientes de plántulas de 5 cm establecidas *in vitro* para 3 localidades. La formación de los brotes en las hojas ocurrió mediante organogénesis y embriogénesis. El enraizamiento *in vitro* de los brotes fue de un 100% cuando se utilizó un MS/2 suplementado con 6 mg l⁻¹ 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. La tasa de multiplicación, cuando

1/ Recibido para su publicación el 25 de noviembre de 2002

2/ Este trabajo es parte de la tesis de M.Sc. del primer autor. Programa de Estudios de Posgrado en Biología, Universidad de Costa Rica.

ABSTRACT

Micropropagation of the medicinal plant *Psychotria acuminata*. *Psychotria acuminata* is a medicinal plant from which emetine, cephaeline, and psychotrine are extracted, to be used as expectorants and emetics. Nowadays, these alkaloids are extracted from wild plants because this species has not been domesticated as 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 four different locations of Costa Rica. Multiple shoots were induced from axillary bud 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 l⁻¹ of BAP, 0.01 mg l⁻¹ of NAA, 3% sugar and 2 g l⁻¹ of phytigel. *In vitro* rooting was successfully achieved (100%) in shoots separated from the proliferating shoot cultures in MS/2 plus 6 mg l⁻¹ 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 Agrirroot® 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

3/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

** Escuela de Ingeniería Agrícola, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

se utiliza microestacas como explante, así como el tiempo para que ocurrieran los eventos morfogenéticos, fueron diferentes para los materiales de las 3 procedencias, lo que indica que las plantas de cada localidad son genéticamente diferentes.

INTRODUCCIÓN

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 histolítica* (Jha *et al.* 1988, Yoshimatsu y Shimomura 1991, Solis *et al.* 1993, Skorupa y Assis 1998).

A pesar de los avances en la medicina y la farmacología para elaborar compuestos sintéticos, la venta mundial de productos naturales y hierbas medicinales 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 registra 126 especies de plantas utilizadas con fines curativos, de las cuales 23 son importadas y 103 son producidas o extraídas de los bosques locales (Ammour *et al.* 1994). *P. 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 conducir a la extinción de esta especie en su habitat natural.

Para resolver el problema de la extracción de plantas del bosque, una alternativa es la propagación asexual o vegetativa de esta especie, lo que permitiría generar un gran número de individuos con la 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* es una alternativa para la reproducción y conservación de especies difíciles de

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 sources of material, suggesting that plants from each location have a different genetic background.

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 (Palma e Hidalgo 1993).

En la literatura son muchos los ejemplos del uso del cultivo de tejidos como método alternativo para 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).

Con respecto al género *Psychotria*, Yoshimatsu y Shimomura (1991) lograron la formación de brotes adventicios en los internodos de *Cephaelis ipecacuanha* también conocida como *Psychotria ipecacuanha*. Recientemente, Hidalgo *et al.* (1999) presentaron datos preliminares sobre la producción de brotes a partir de hojas y microestacas de *P. acuminata*.

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un protocolo para la micropropagación de *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 MÉTODOS

Material vegetal

Se colectó hojas y tallos de *Psychotria acuminata* (Rubiaceae) con aproximadamente 5

nudos, sin síntomas ni lesiones causadas por plagas y enfermedades en 4 localidades de Costa Rica: 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). 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. También se incluyó plantas procedentes de Puriscal, que se han mantenido *in vitro* por 4 años, en adelante Puriscal-1.

agitación constante por 2 horas, después los tejidos se colocaron por 1 minuto en etanol al 70%, y luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5% por 25 minutos. Finalmente, los explantes fueron lavados 3 veces con agua desionizada estéril.

Cuando la contaminación por hongos fue muy fuerte, particularmente con el uso de hojas como fuente de explante, se adicionó al medio de cultivo el fungicida Imazalil en dosis de 0,5 mg l⁻¹.

Medio de Cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog, (MS, 1962),

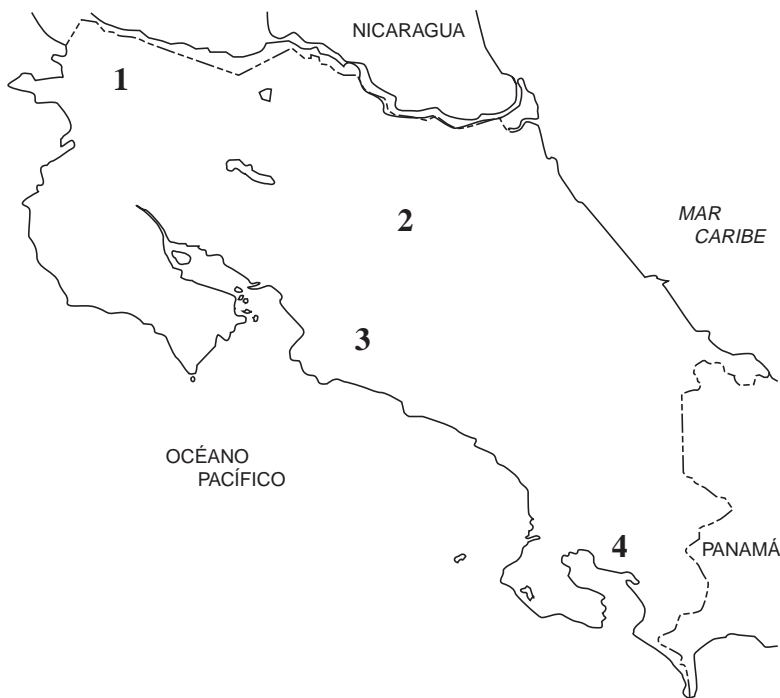


Fig. 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta *P. acuminata* en Costa Rica. 1-La Cruz, Guanacaste; 2-Sarapiquí, Heredia; 3-Puriscal, San José; y 4-Golfito, Puntarenas.

Establecimiento

Desinfección. Una vez en el laboratorio las hojas, los nudos y los entrenudos procedentes del campo fueron lavados con abundante agua y luego seccionados. De las hojas se tomó 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 g l⁻¹ y el fungicida Benlate (i.a. benomil) 2 g l⁻¹ con

suplementado con 3 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0,01 mg l⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), 3% de azúcar y 2 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°C y a 2 kg cm⁻².

Condiciones de cultivo. Una vez introducido el material vegetal en los frascos, éste fue colocado en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas, luz blanca a 46μEm⁻²s⁻¹ y con una temperatura promedio de 26 ± 1°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, y como explantes microestacas (segmentos nodales de aprox. 1 cm) y hojas de las plantas establecidas *in vitro* de 3 localidades. Para determinar la tasa de multiplicación se empleó 6 microestacas por frasco con 30 ml de medio de cultivo y aproximadamente 100 microestacas por procedencia. Cuando se comparó la producción de brotes utilizando hojas como explante, se colocó 4 hojas por frasco para un total de 24 hojas por procedencia. Cada 2 semanas se cuantificó el número total de brotes producidos por explante y se determinó un promedio para cada procedencia. La evaluación del material se realizó durante 12 semanas.

Enraizamiento

Plántulas de ± 5 cm de altura fueron cultivadas en un medio MS con la mitad de la concentración de las sales (MS/2) suplementado con 6 mg l⁻¹ de ácido indolacético (AIA), el resto de los componentes y condiciones de cultivo fueron idénticas a los descritos en la etapa de establecimiento.

Aclimatización

Plántulas de ± 5 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 transplantadas a bandejas con una mezcla estéril de suelo:fibra de coco (1:1). Después del trasplante, 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-naphthalenetic acid 0,033%; 2-Methyl-1-naphthalene acetamide 0,013%; Indol-3-butyric acid 0,057%; Thiram 4%) en polvo.
2. Agriroot 1 DP® (4-indol-3-butyric acid 1%) en polvo.
3. AIA 50 mg l⁻¹ líquido.
4. Rootone-F® en polvo + suelo fertilizado con 0,37 mg l⁻¹ de fósforo.
5. Agriroot 1 DP® en polvo + suelo fertilizado con 0,37 mg l⁻¹ de fósforo.
6. Testigo

Una vez tratadas, las plántulas fueron transplantadas a bandejas con una mezcla estéril de suelo:fibra de coco (1:1). Después del trasplante 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 fueron recolectadas 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. La contaminación fue en promedio del 50%, cuando se utilizó entrenudos como fuente de explante. 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. Las figuras 2 A y B muestran el efecto nocivo de las altas concentraciones del desinfectante, aún en entrenudos; nótese que luego de 1 semana, los explantes se tornan café o amarillentos y mueren. Estos

resultados fueron comunes para 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 con el que se obtuvo cultivos asépticos. 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 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). En los entrenudos de la

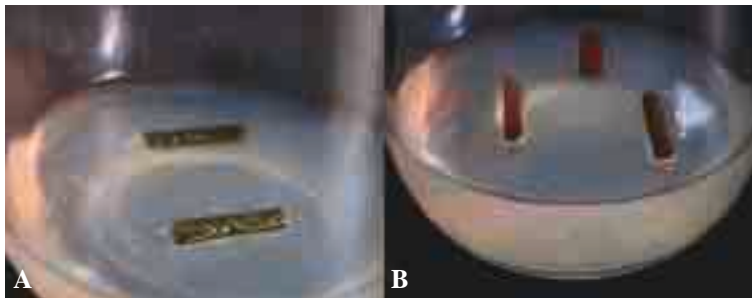


Fig. 2. Entrenudos de *P. acuminata* en la etapa de establecimiento. Recién inoculados (A) y con una semana de cultivo (B).

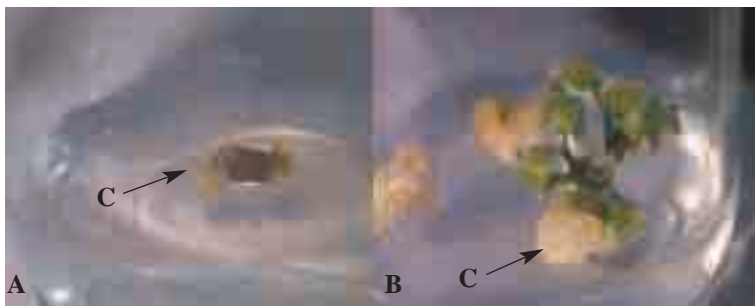


Fig. 3. Entrenudo de *P. acuminata* con 8 semanas de cultivo (A), entrenudo con 16 semanas (B). C = callo.

localidad de Guanacaste también 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.

Multiplicación

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 (datos no mostrados). Por su parte, las hojas respondieron con un arrollamiento, cambio de color y la formación de brotes sobre las venas media y secundarias (Figura 4). Los brotes formados sobre las venas media y secundarias de las hojas se originaron mediante organogénesis y embriogénesis (Lara *et al.* 2003).



Fig. 4. Hoja de *P. acuminata*, proveniente de Puriscal, a las 12 semanas de cultivo con arrollamiento y brotación en la vena media.

Debido a la contaminación con una bacteria endógena, los explantes provenientes de Sarapiquí, que sobrevivieron en la fase de establecimiento, murieron gradualmente durante la etapa de multiplicación, por lo que las evaluaciones subsiguientes se realizaron únicamente con los materiales procedentes de Guanacaste, Golfito y Puriscal.

Multiplicación a partir de microestacas. El proceso de multiplicación se evaluó cada 2 semanas por un período de 12 semanas de cultivo. La primera evaluación se realizó a las 2 semanas de cultivo. En este momento, las microestacas

contaban con un tamaño uniforme, color verde y un crecimiento activo, también ya se podía apreciar el inicio de la 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 5).

A las 6 semanas, las microestacas ya mostraban diferencias entre las procedencias, respecto al número y desarrollo de los brotes. Las microestacas de Puriscal-1, fueron las que mostraron el mayor número de brotes por microestaca (Figura 6). 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 5). 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 presentaron poco desarrollo, hojas delgadas y con una tendencia al enrollamiento. Las microestacas de Guanacaste, produjeron brotes principalmente en las yemas axilares. A partir de la semana 8 y hasta la semana 12 aumentó la producción de brotes para todas las localidades (Figura 6).

El análisis de variancia del número promedio de brotes por microestaca según su procedencia mostró diferencias significativas ($P \leq 0,001$). Puriscal-1 fue el material más prolífico, seguido por Puriscal-2, Golfito y Guanacaste (Figura 6). El número de brotes por microestaca aumentó conforme transcurrió el tiempo de cultivo para los explantes de todas las procedencias (Figura 6).

El cuadro 1 muestra los resultados de multiplicación a partir de microestacas a las 12 semanas de cultivo. 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.

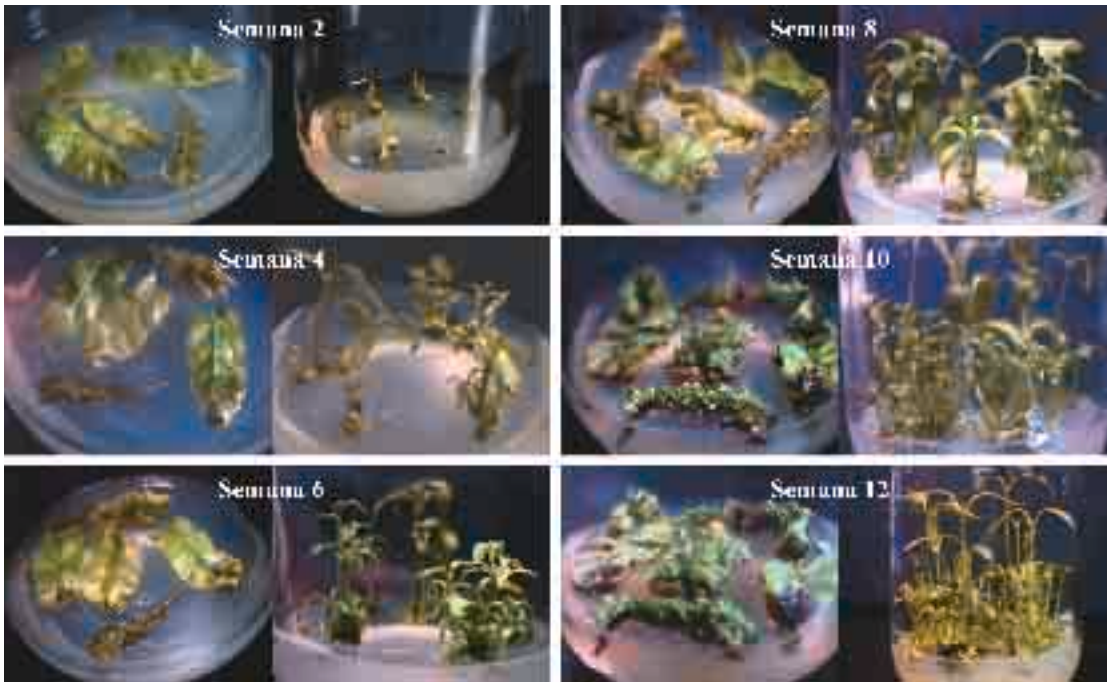


Fig. 5. Proceso de multiplicación de *Psychotria acuminata* (Puriscal-1) desde la semana 2 hasta la 12. En cada semana, la fotografía de la izquierda presenta la multiplicación a partir de hojas y la de la derecha la multiplicación a partir de microestacas.

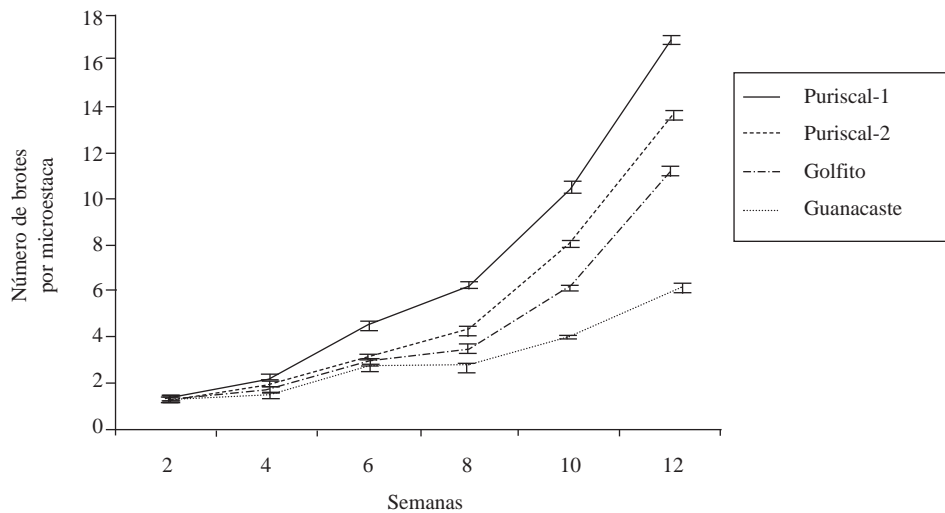


Fig. 6. Número de brotes promedio (\pm error estándar) por microestaca según su procedencia en *P. acuminata*.

Cuadro 1. Porcentaje de brotación y promedio de brotes por microestaca de *Psychotria acuminata*, a las 12 semanas de cultivo según la localidad.

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

¹ Expl. Brot. = explantes que brotaron.

² Los valores representan los promedios ± 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 presentaron una coloración verde-amarillenta con algunas pequeñas regiones color café (Figura 5). 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 en Puriscal-1 como en Puriscal-2; 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 5), 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 morfogénico 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, aumentó a un 56% y un 67%, respectivamente. La figura 7 muestra el número de brotes por explante a las 10 y 12 semanas de cultivo. Los explantes de Puriscal-1 mostraron una mayor brotación que los de las otras localidades.

El cuadro 2 muestra los resultados de la brotación de las hojas, según la procedencia a las 12 semanas de cultivo. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias a $P \leq 0,01$ ($F = 64,99$)

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

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

¹ Expl. Brot. = explantes que brotaron.

² 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.

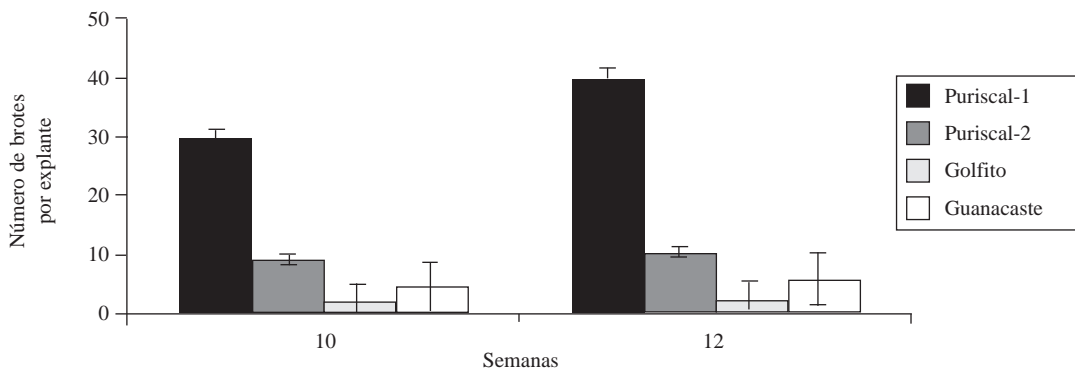


Fig. 7. Promedio de brotes a partir de hojas según su procedencia en *P. acuminata*. Las barras indican el error estándar.

en el número 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).

A las 12 semanas de cultivo, en ambos tipos de explante (Cuadros 1 y 2), los explantes que proceden de Puriscal mostraron la mayor producción de brotes, especialmente los de Puriscal-1. El promedio de brotación de las 3 procedencias fue de 92% para microestacas con un promedio de 12,25 brotes por microestaca. Para las hojas el promedio de brotación fue de 78% con 16,5 brotes por hoja. A pesar de esto, en la figura 5 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 incipiente de crecimiento.

Enraizamiento

Las plántulas de *P. acuminata* en el medio MS/2 suplementado con 6 mg l⁻¹ de AIA enraizaron

en un 100%. El crecimiento de las raíces se empezó a observar luego de una semana en el medio de enraizamiento. A las 8 semanas las raíces fueron abundantes, de aspecto largo y fibroso (Figura 8 A y B)

Aclimatización

Ocho semanas después del trasplante al invernadero, se observó que el tratamiento con Agrirroot 1 DP® indujo un nuevo sistema radical fibroso y abundante, con raíces cuya longitud promedio fue de 1,5 cm. Con la utilización de Rootone-F® 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® o Agrirroot 1 DP® y sembradas en un suelo fertilizado con fósforo, el tratamiento con Rootone-F® propició algún enraizamiento, mientras que con Agrirroot 1 DP® 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® las plántulas sobrevivieron en un 80% y con el AIA un 30%, comparado con 0% obtenido en los otros tratamientos. La figura 9 muestra el aspecto del sistema radical de las plántulas en cada tratamiento a las 8 semanas.

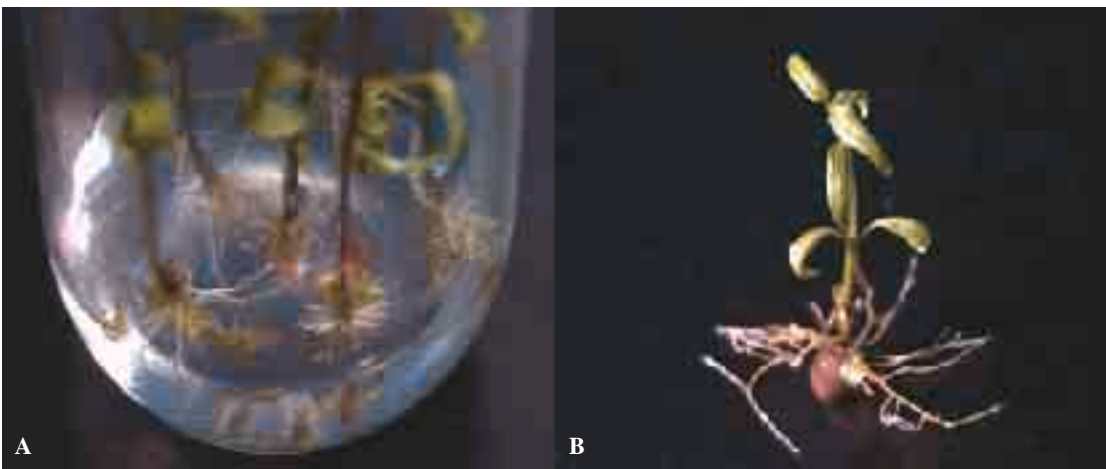


Fig. 8. Enraizamiento de plántulas de *P. acuminata* con 4 semanas (A) y 12 semanas (B) de cultivo en un medio MS/2 con 6 mg l⁻¹ de AIA.

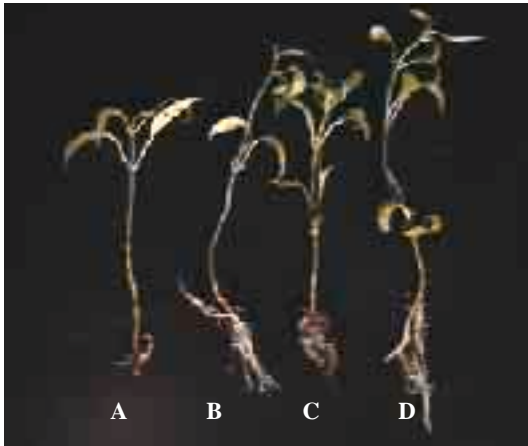


Fig. 9. Desarrollo de raíces en plantas de *P. acuminata* después de 8 semanas de aclimatización. (A) Control, (B) Agrirroot 1 DP®, (C) Rootone-F® y (D) AIA 50 mg l⁻¹

DISCUSIÓN

Establecimiento

Para la micropropagación de *Psychotria acuminata* se seleccionó 3 tipos de explante: nudos, hojas y entrenudos. Los nudos se consideran un buen explante debido a la presencia de un meristema lateral en la base de la hoja, por lo que la inducción de respuestas morfológicas 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, y la alta contaminación no permitió el establecimiento *in vitro* 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 morfológico de las mismas. Siendo *Psychotria*, al igual que el café, una Rubiácea, se intentó el establecimiento *in vitro* de esta especie, a través de hojas. Sin embargo, con la metodología utilizada, los resultados de contaminación no fueron satisfactorios del todo, por lo que se decidió incorporar el fungicida Imazalil (0,5 mg l⁻¹) al medio de cultivo, nuevamente los resultados fueron negativos. El fungicida no afectó la habilidad de los tejidos para crecer, pues para el tratamiento control se utilizó hojas de una

planta que se encontraba *in vitro* y éstas continuaron su desarrollo morfológico 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 morfológicas (De Fossard 1986, Mroginski y Roca 1991).

Los entrenudos regularmente no se utilizan como fuente de explante. En *P. 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 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 altamente 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 con la muerte del explante, independientemente del tipo de explante: nudo, entrenudo u 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. 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 se ha observado 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 períodos 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 fueron reflejadas en el inicio de la brotación, el cual fue más temprano en Puriscal-1 (material que ha permanecido por más tiempo en cultivo *in vitro*) y tardó en los otros materiales de reciente introducción, particularmente Guanacaste.

Durante la micropropagación de esta especie con el uso de microestacas, se observó que 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 microestaca, dado que esta característica solo se presentó en algunas microestacas y solo en Puriscal-1, lo cual podría ser efecto de su larga permanencia en cultivo *in vitro*. También, las microestacas presentaron distinto potencial morfogénico dependiendo de su ubicación a lo largo del tallo, desde su parte apical hasta la sección basal. Estudios paralelos (datos no mostrados) con el uso de microestacas de Puriscal-1, mostraron que las microestacas de la parte apical y media poseen un mayor potencial morfogénico que las de la parte basal; resultado concordante con otros estudios en diferentes plantas (Litz y Jarret 1991), aunque en la mayoría de estos otros casos se refiere a la toma de los explantes cuando se va a introducir el material de campo a condiciones *in vitro* (De Fossard 1986, George 1993) y no cuando se toma de plantas ya establecidas *in vitro*.

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 7 muestra la capacidad de las plantas de distintas localidades para reproducirse a partir de hojas. Este resultado confirma que hojas de plantas que han estado *in vitro*, por períodos prolongados, presentan un mayor potencial morfogénico (Puriscal-1). Sin embargo, 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 sí hay un efecto de la procedencia sobre la brotación.

La regeneración de brotes a partir de hojas ocurrió por 2 vías, organogénesis y embriogénesis somática, el proceso dominante fue la embriogénesis somática (Lara *et al.* 2003). Como el proceso de regeneración ocurrió en forma directa, se espera que tanto las plántulas producidas por organogénesis como las producidas por embriogénesis somática, 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.

Luego de la última evaluación de las hojas a las 12 semanas, éstas se mantuvieron en observación, se encontró que aún después de 1 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.

Sumarizando el proceso de multiplicación de *Psychotria acuminata*, la figura 5 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 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

La aclimatización de esta especie no fue fácil. En condiciones de penumbra y alta humedad relativa (simulación del sotobosque), 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. El sistema radical de las plántulas producido *in vitro*, no es funcional y muere prácticamente desde el momento en que se

inicia la aclimatización. Esto hizo necesario el uso de enraizadores en la etapa de aclimatización. En general 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®. 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 las plántulas no sobrevivieron.

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.

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, 2nd 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 García, 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 ippecacuanha*. *Planta Médica*. January, 504- 506.
- LARA A., VALVERDE R., GOMEZ L. 2003. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(1): 37-48.
- 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., Syngé 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 jobo 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: 1er 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 publisher. England. 262 p.
- von ARNOLD S., SABALA I., BOZHKO V., 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.