

HISTOLOGÍA DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y BROTES ADVENTICIOS INDUCIDOS EN HOJAS DE *Psychotria acuminata*¹

Alfonso Lara,^{2/*} Roberto Valverde^{3/*}, Luis Gómez*

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

Keywords: *Psychotria acuminata*, morphogenesis, embryogenesis, organogenesis, medicinal plant, histology, *in vitro*.

RESUMEN

Embriones somáticos y brotes adventicios fueron inducidos directamente en hojas de *Psychotria acuminata* cultivadas *in vitro* en un medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 3 mg l⁻¹ de 6-BAP, 0,01 mg l⁻¹ de ANA y 2 g l⁻¹ 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.

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⁻¹ of 6-BAP, 0.01 mg l⁻¹ of NAA and 2 g l⁻¹ of phytigel. The highest production of both structures occurred all over the midrib and some sections of secondary ribs of the adaxial surface; their development was not preceded by callus growth. Somatic embryogenesis and organogenesis occurred simultaneously and in a non-synchronized way. Embryos had single as well as multiple cell origin, and 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.

1/ Recibido para publicación el 25 de noviembre del 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.

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

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

INTRODUCCIÓN

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 histolytica* (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* (Bourgand *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 explante 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 utiliza 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 morfogénica por la cual se producen las plántulas en hojas de *Psychotria acuminata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

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 l⁻¹ de BAP, 0,01 mg l⁻¹ de ANA y 2 g l⁻¹ 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⁻²). Los cultivos fueron mantenidos en cuartos de crecimiento a 26±1°C con un fotoperíodo de 12 h, luz blanca 46 mE⁻¹ s⁻¹ m⁻². En cada frasco fueron cultivadas 3 hojas, colocadas con los pecíolos 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 mm 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.

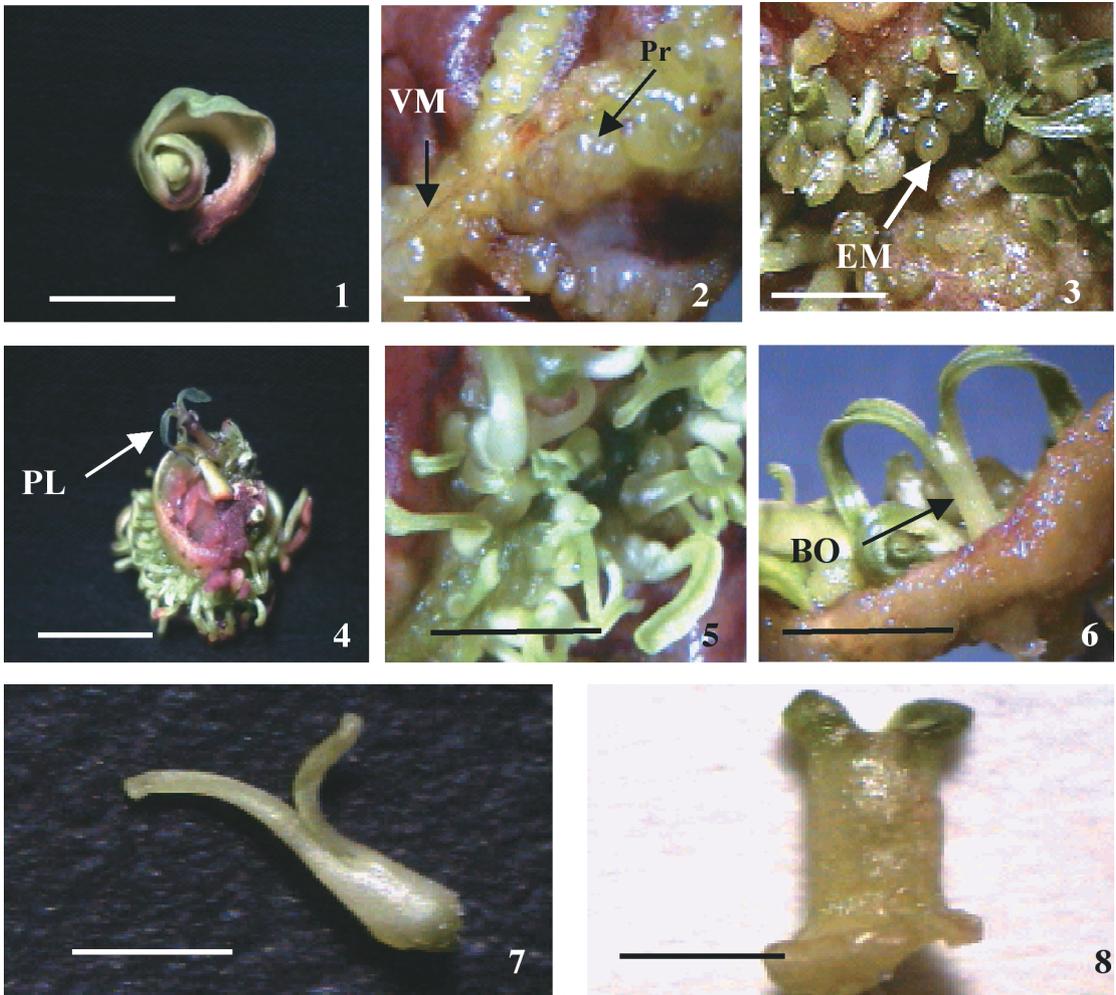
A las 12 semanas de cultivo se realizó un análisis macro de los brotes, para ello se utilizó un estereoscopio y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital BioVid Software 3 de LW-Scientific adaptada al microscopio y el estereoscopio para cada caso.

RESULTADOS

Observaciones

Al finalizar la primera semana de cultivo, se observó un arrollamiento desde el ápice hasta el pecíolo 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



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)**Brote de origen organogénico (BO). Nótese también la ausencia casi total de morfogénesis en la superficie abaxial (barra= 8 mm). **7)**Embrioides separados del tejido madre (barra= 2 mm). **8)**Brote de origen organogénico separado del tejido madre (barra= 2 mm).

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 embrioides, 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 embrioides, 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.

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 (EM). 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).

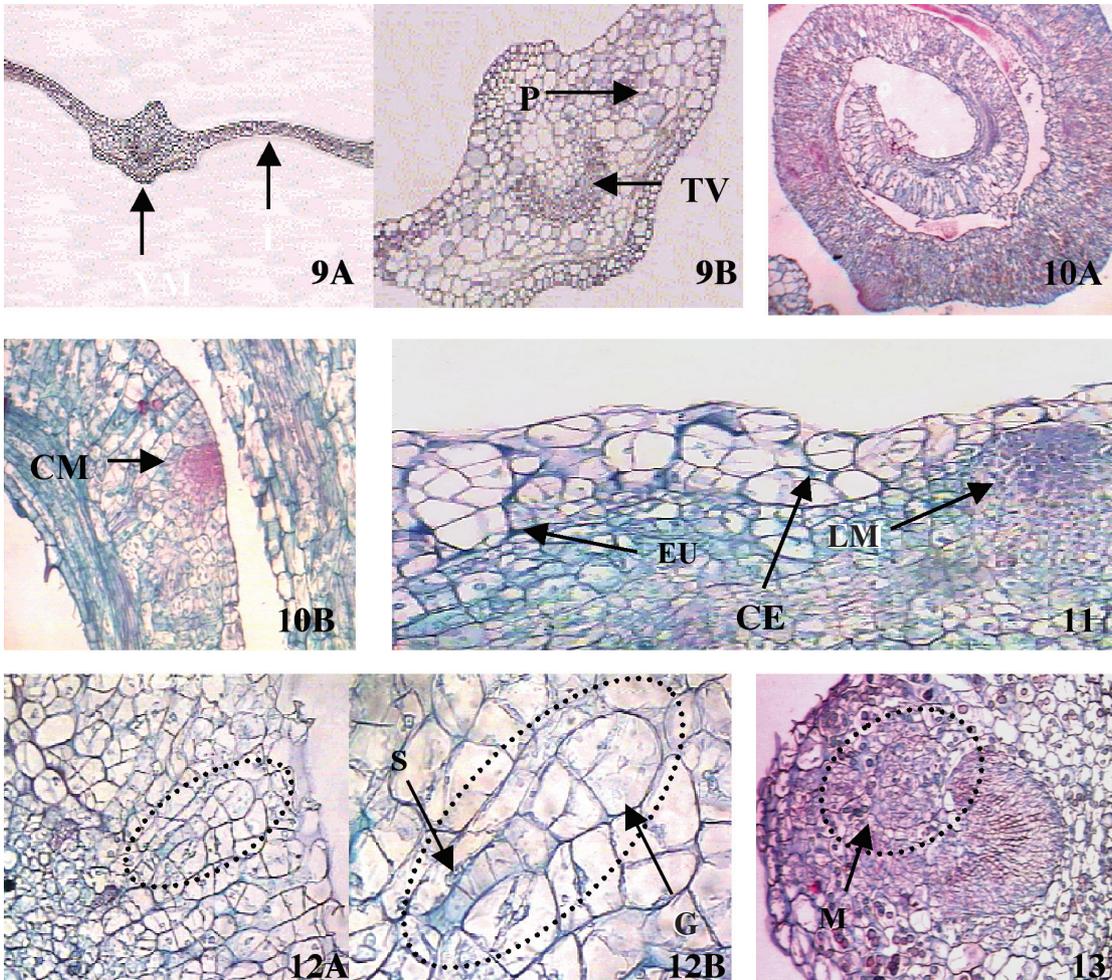
La figura 12B es un acercamiento de la anterior y muestra al proembriode con la estructura globular y el suspensor. Esta estructura corresponde al estado de 8 células (von Arnold *et al.* 2002) y su formación ocurrió a partir de una sola célula meristemática que se dividió periclinalmente; la célula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

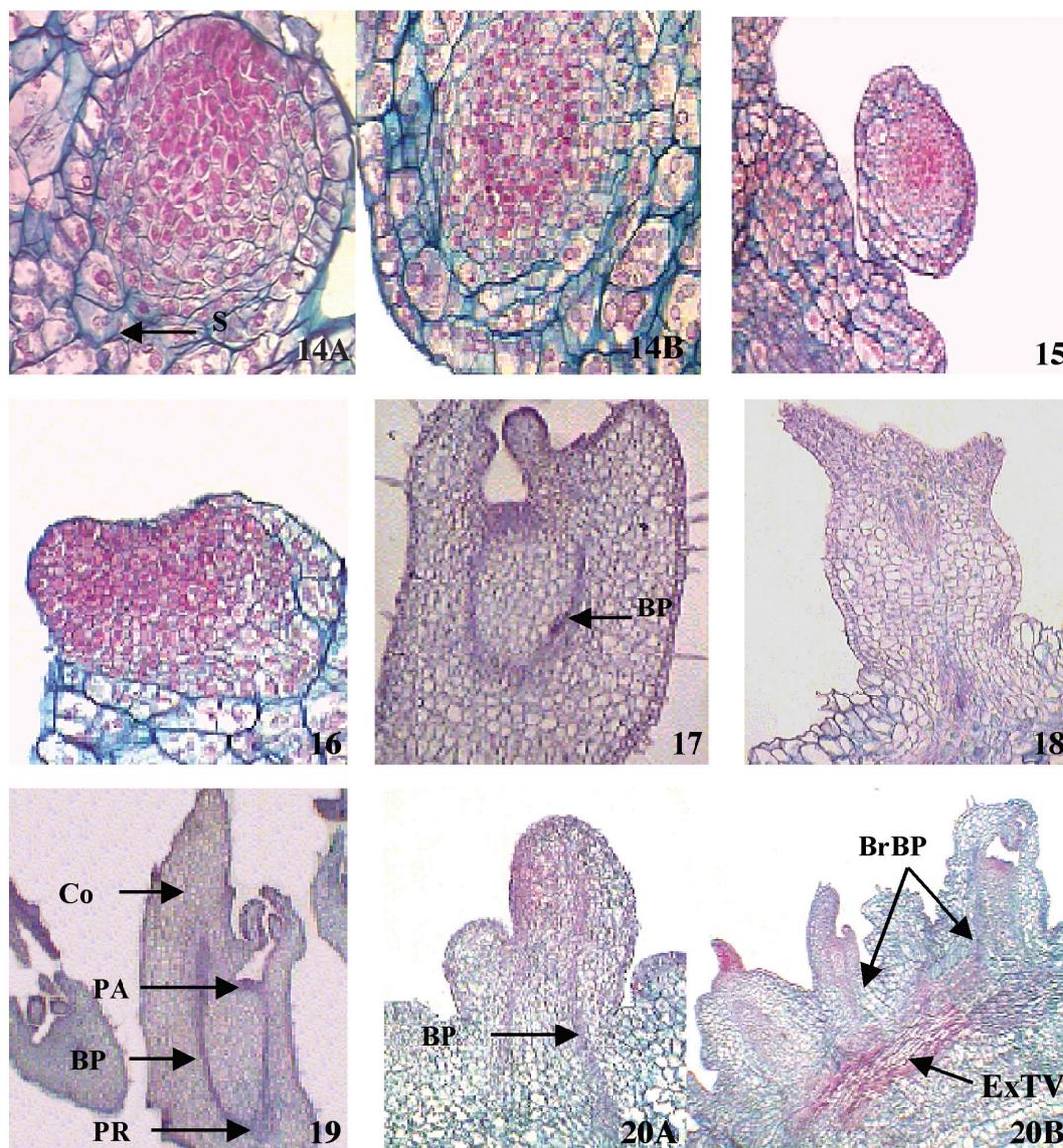
Semana 5: La fase acorazonada del embriode ha dado paso a la formación completa del



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 10A mostrando los grupos de células meristemáticas (CM) en la superficie adaxial de la hoja (250 X). **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). **12A)** Planos de división celular: periclinal, anticlinal y oblicuo de las células, formación de un embriode de origen unicelular (250 X). **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). **13)**Meristemoide (M) desarrollándose cerca de los haces vasculares de la vena media (250 X).

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



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)**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.

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 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 está 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 ésta es la capa con protuberancias, que se desarrolla 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 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. 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 14A). 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 cé-

lulas 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 proembriode (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 Rumary *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 citoquininas (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 citoquininas, 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⁻¹ de BA y 0,1 mg l⁻¹ 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 co-

rría 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 HEIJDEN 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 embriogénesis 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., 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.
- GÓMEZ 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(2): 109-113.
- 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., GOMEZ L., SABORIO F. 1999. Regeneración de brotes a partir de hojas de *Psychotria acuminata*. In: XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Ed. by 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*. Abril. p. 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 embriogénesis in cell cultures- physiology, biochemistry and molecular biology. In: *Tissue culture in forestry and agriculture*. Ed. by R. Henke, K. Hughes, M. Constatin, A. Holloender. Plenum Press. 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 organogénesis 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 carpocypses 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.-Plant* 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.
- TRIGIANO 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 pejobaye. *Agronomía Costarricense* 16(2): 225-229.
- VALVERDE R., ARIAS O., THORPE T. 1987. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 149-156.
- VASIL V., LU C.-Y., VASIL I.K. 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.
- WAWROSCHE 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.