

00551  
7  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios de Posgrado

EMBRIOGENESIS SOMATICA Y ORGANOGENESIS  
INDIRECTA DE Valeriana edulis ssp. procera  
(Kunth) Meyer (VALERIANACEAE); SUBESPECIE  
MEXICANA DE INTERES FARMACOLOGICO.

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

presenta

M. en C. PATRICIA CASTILLO ESPAÑA

Directora de Tesis. Dra. Georgina Hernández Delgado

México D. F.

1999

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN

273029



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS**

*A mi mamá Aurora<sup>t</sup> por la fortuna de haber sido su hija y por el ejemplo de lucha constante en la vida.*

*A mi papá don Adán, por tantos recuerdos gratos de mi infancia, por su amor y apoyo para realizar mis metas.*

*A mi esposo, por los momentos de alegría y tristeza que compartimos.*

*A mis hijas con todo mi amor, esperando que este trabajo sea un estímulo en sus vidas.*

*Toño, Ali y Anita, reconozco lo valioso de su comprensión y paciencia para concluir esta etapa de mi vida, muchísimas gracias.*

## AGRADECIMIENTOS:

*A la Dra. Georgina Hernández Delgado, por haber aceptado dirigir esta tesis y por el apoyo brindado.*

*Al Dr. Miguel Lara Flores, por la co-dirección de la tesis y por haberme aceptado en su grupo de trabajo, muchas gracias.*

*A los Srs. Sinodales, Doctores Georgina Hernández, Judith Márquez, Miguel Lara, Abraham Rubluo, Victor Manuel Chávez, Guillermo Laguna y Marco Antonio Villanueva, por la revisión, críticas y sugerencias al escrito final.*

*A los compañeros integrantes del laboratorio 4 del CFNI, Sonia, Lulú, Elia, Ara, Alberto, Alex, Svieta, Jesús, Eli, Mario, Sara y Ramón por todo lo que aprendí de ustedes, por el apoyo y colaboración cuando lo necesité.*

*Especialmente a mis compañeros los Drs. Sonia Silvente y Alberto Camas, por su apoyo en todo momento y por su gran amistad.*

*Ara, agradezco en lo que vale su colaboración técnica para la realización de este trabajo y también por el gusto que le dio cuando vió las primeras plántulas de valeriana, recuerda?*

*Mi especial reconocimiento a la Dra. Judith Márquez por haber aceptado dirigir la parte histológica de este trabajo, pero lo mas importante, por inyectarme parte de esa energía radiante que la caracteriza, motivándome a concluir este trabajo y darme una palabra de aliento en los momentos críticos de mi vida, maestra muchas gracias por su amistad.*

*A la Dra. Silvia del laboratorio de Desarrollo Vegetal de la Fac. de Ciencias de la UNAM, por su asesoría en algunas técnicas histológicas.*

*A la Biol. Lorena López de la unidad de microscopía del IBT, por su paciencia al enseñarme algunas técnicas histológicas, por su colaboración en el procesamiento del material histológico y por el interés y entusiasmo que siempre mostró para desarrollar el trabajo.*

*A los maestros Alejandro Mena y Anabel del laboratorio de microcine de la Fac. de Ciencia de la UNAM, por su colaboración en la toma de fotografías de las preparaciones histológicas, así como del material biológico en estudio.*

*Al Dr. Eduardo Aranda del Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, por su asesoría en la interpretación estadística de los resultados del trabajo.*

*A las autoridades académicas y administrativas de la Universidad Autónoma de Morelos, especialmente al maestro Gerardo Avila García, y a los Drs. Cesar Barona y Rodolfo Quintero por el apoyo brindado para realizar los estudios de posgrado.*

*Al Dr. Oscar Rodríguez Comas, director nacional de beca SUPERA-SEP por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de posgrado.*

***EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE Valeriana edulis ssp. procera (Kunth) Meyer (VALERIANACEAE); SUBESPECIE MEXICANA DE INTERÉS FARMACOLÓGICO.***

# ÍNDICE

## ÍNDICE

### ABREVIACIONES

### RESÚMEN

### ABSTRACT

## I. INTRODUCCIÓN

## II. ANTECEDENTES

*II.1 Aspectos fitoquímicos y farmacológicos de las valerianas.*

*II.2 Micropropagación.*

*II.3 Embriogénesis somática.*

*II.4 Sistemas de propagación masiva por embriogénesis somática.*

*II.5 Organogénesis.*

*II.6 Morfogénesis in vitro del género Valeriana.*

## III. JUSTIFICACIÓN

## IV. OBJETIVOS

## V. HIPÓTESIS

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

*VI.1 Material vegetal.*

*VI.2 Medio y condiciones de cultivo.*

*VI.3 Desarrollo de brotes y enraizamiento.*

*VI.4 Desarrollo de embriones.*

*VI.5 Diseño experimental y análisis estadístico.*

*VI.6 Análisis ontogénico de embriones somáticos y brotes.*

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*VII.1 Tipo de explante y reguladores del crecimiento en la inducción de callos morfogénicos.*

*VII.2 Regeneración de V. edulis ssp. procera vía embriogénesis somática y organogénesis*

*VII.3 Ontogenesis de V. edulis ssp. procera bajo condiciones de cultivo in vitro: una aproximación.*

*VII.3a Análisis histológico de la formación de callos morfogénicos a partir de explantes de hoja.*

*VII.3b Desarrollo embriones somáticos y brotes unipolares.*

## **VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

## **ABREVIACIONES:**

*CTV: cultivo de tejidos vegetales*

*2,4-D: ácido 2,4-dichlorofenoxyacético*

*ANA: ácido 1-naftalenacético*

*Picloran: ácido 4-amino-3,4,6-trichloropicolinico*

*Kin: cinetina, 6-furfuril aminopurina*

*BAP: 6-bencil aminopurina*

*AIA: ácido indol 3-acético*

*MS: medio basal de Murashige y Skoog*

*B5: vitaminas de Gamborg*

*PEMs: masas proembriogénicas*

## RESÚMEN:

*Embriogénesis somática y organogénesis indirecta de Valeriana edulis ssp. procera (Kunth) Meyer (Valerianaceae); subespecie mexicana de interés farmacológico.*

*El interés del presente trabajo se centró en la posibilidad de establecer las condiciones experimentales para la regeneración masiva de V. edulis ssp. procera, a través del cultivo in vitro.*

*Existen pocos estudios que documenten la citodiferenciación de cultivos in vitro y particularmente de la ontogénesis a nivel de embriogénesis experimental, en este trabajo se estudió el desarrollo ontogénico de embriones somáticos y brotes.*

*La inducción a callogénesis se logró mediante el cultivo de segmentos de hoja en el medio basal de Murashige y Skoog adicionado con 2,4-D y kin en diferentes concentraciones. Callos morfogénicos fueron observados después de 6-8 semanas.*

*La regeneración de V. edulis ssp. procera se logró via embriogénesis somática y organogénesis indirecta bajo las mismas condiciones experimentales. Además se evaluó la eficiencia de regeneración en cultivos provenientes de medios semisólidos y líquidos, observando las mejores respuestas en cultivos en suspensión. El protocolo desarrollado representa un procedimiento factible para la propagación masiva de esta subespecie sobreexplotada.*

*El estudio ontogénico permitió demostrar y comparar los procesos de embriogénesis somática y organogénesis, así como discutir el posible origen y desarrollo de embriones somáticos y brotes.*

## **ABSTRACT:**

***Somatic embryogenesis and indirect organogenesis of Valeriana edulis ssp. procera (Kunth) Meyer (Valerianaceae); mexican subspecies of pharmacological interest.***

*The interest of this experiment was centred on the possibility of establishing the optimal experimental conditions for mass regeneration of V. edulis ssp. procera through of tissue cultures.*

*Due to the fact that there are few studies documenting to the cytodifferentiation of cultures in vitro, particularly with ontogenesis at the level of experimental embryogenesis, the ontogenetic development of somatic embryos and buds was also looked at.*

*The callogenesis induction was actived using a culture of leaf segments in a basal medium of Murashige and Skoog with 2,4-D and kin in different concentration levels. The morphogenics calli were observed after the 6<sup>th</sup> - 8<sup>th</sup> week.*

*The regeneration of V. edulis ssp. procera was obtained via somatic embryogenesis and indirect organogenesis under the same experimental conditions. The efficiency of regeneration in resulting cultures in semisolid and liquid mediums were also evaluated, observing the best response in suspension cultures.*

*The protocol developed represents a feasible process for the massive propagation of this overexploited and consequently threatened subspecies.*

*The ontogenetic study allowed us to demonstrate and compare the somatic embryogenesis and organogenesis process. A discussion on the possible origin and development of somatic embryos and buds is also presented.*

## I. INTRODUCCIÓN:

*La pérdida acelerada de la biodiversidad aunada al incremento de la población humana, principalmente en los países de las zonas tropicales, ha llamado la atención de la comunidad científica, así como del sector gubernamental, hacia la búsqueda de alternativas para la conservación de los recursos genéticos, particularmente aquellos que tengan una utilidad actual o potencial y que se encuentren en vías de extinción (Hamann, 1991; Principe, 1991).*

*En el caso de las plantas medicinales, de acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población de países en vías de desarrollo recurren principalmente a la medicina tradicional para el cuidado de sus necesidades primarias de salud, de la cual la mayor proporción involucra el uso de extractos de plantas o sus principios activos; además, la demanda de sustancias químicas de origen vegetal, de interés para la industria farmacéutica ha ido en aumento conforme la población mundial se multiplica (Farnsworth y Soejarto, 1991). Por otro lado, la mayor parte de la flora medicinal empleada de manera tradicional o bien como materia prima de muchos productos farmacéuticos, es recolectada de los diversos ecosistemas naturales, ya que la producción de plantas medicinales en nuestro país es una de las actividades agrícolas menos desarrolladas (Estrada, 1985; Flores, 1988, Navarrete 1989).*

*La biotecnología vegetal constituye una serie de metodologías de desarrollo reciente que incluyen entre otras, el cultivo de tejidos vegetales (ctv), cuyas tecnologías han tenido un impacto no solamente en una serie de áreas del conocimiento, sino además han dado un impulso renovador a la investigación con fines de aplicación, particularmente permitiendo un avance en el estudio y aplicaciones en varios aspectos como la micropropagación de especies difíciles de regenerar por otras vías, la obtención de plantas libres de patógenos sistémicos, la obtención de metabolitos secundarios como pauta al inicio de investigaciones en relación con su actividad farmacológica y la regeneración de especies en vías de extinción, contribuyendo de esta manera a su preservación.*

*La regeneración de plantas por ctv es posible generalmente a través de dos caminos morfológica y anatómicamente diferentes: a) la embriogénesis somática y b) la organogénesis.*

*Mediante la embriogénesis somática células haploides o somáticas diploides pueden comportarse como cigotos bajo ciertas condiciones experimentales y fielmente volver a desarrollar el programa que conduce a la producción de embrioides o embriones somáticos; este proceso provee la más clara demostración de que todas las células vegetales excepto aquellas que han experimentado diferenciación irreversible son totipotentes y conservan el desarrollo potencial para proliferar en una planta adulta (Raghavan, 1997). Por medio de esta vía de reproducción vegetativa se pueden potencialmente propagar de manera masiva especies de interés socio-económico y ecológico.*

*Por otro lado, la organogénesis conduce a la formación de raíces o brotes adventicios unipolares, conectados con el tejido parental a través del sistema vascular; esta forma de propagación genera una menor cantidad de plantas comparativamente con la embriogénesis somática, no obstante ha sido la mas desarrollada y la que más aplicación ha tenido sobre todo en plantas ornamentales (Debergh et al., 1990).*

*Estudios por ctv han demostrado que el género *Valeriana* tiene potencial morfogénico vía organogénesis. Se ha reportado la regeneración de *V. wallichii* a partir de yemas apicales y axilares, de callos derivados de peciolo, así también se han obtenido plántulas de estructuras como embriones en cultivos en suspensión ( Mathur, et al., 1988; Mathur y Ahuja, 1991; Mathur, 1992).*

*Valeriana edulis, es una especie silvestre originaria de Norte América, localizada en bosques de pino y encino, en zonas de clima templado a mas de 2 400 metros de altitud; la subespecie Valeriana edulis ssp. procera es una planta silvestre endémica de México, distribuida principalmente en la zona central del país (Meyer, 1951).*

*V. edulis ssp. procera* igual que varias especies del mismo género ha sido utilizada desde épocas antiguas en la medicina tradicional y en la industria farmacéutica por sus efectos sedantes, antiespasmódicos y ansiolíticos, atribuidos principalmente a un grupo de compuestos iridoides conocidos como valepotriatos (Becker y Schrall, 1980; Houghton, 1988; Hiller y Zetler, 1996; Argueta et al., 1996). El establecimiento de sistemas de regeneración masiva en esta planta representa una alternativa para el manejo del recurso.

Por otro lado, los estudios de citodiferenciación de cultivos *in vitro* y particularmente de la ontogenésis de embriones somáticos y brotes unipolares permitirá no solamente demostrar los eventos de morfogénesis, sino además dilucidar su posible origen y evolución histológica, lo cual es de relevancia, considerando que este conocimiento permitirá un criterio importante para garantizar el proceso de clonación y en consecuencia ser aplicado a plantas élite que requieran este sistema para mejorar su productividad y calidad.

## II. ANTECEDENTES:

### *II.1 Aspectos fitoquímicos y farmacológicos de las valerianas*

*Los principales grupos químicos identificados en las valerianas son los aceites esenciales y los iridoides (Houghton, 1988; Argueta et al., 1994). El ácido valeriánico es uno de los aceites esenciales más importantes; este se ha detectado en extractos de *V. wallichii* y *V. edulis* (Houghton, 1988; Schimmer, 1992). Algunos iridoides, también conocidos como valepotriatos se les ha atribuido la actividad sedante al igual que al ácido valeriánico, los cuáles se han detectado en mayores proporciones en especies como *V. mexicana* comparativamente con especies que se comercializan en Europa como *V. officinalis* y *V. wallichii* (Tittel et al., 1978; Becker et al., 1984; Violon, 1984).*

*Dentro de la medicina tradicional, algunas especies del género *Valeriana* se han utilizado por sus efectos sedantes, antiespasmódicos y ansiolíticos (Pedretti, 1986; Houghton, 1988). En general, la forma de administración es por vía oral o local, a partir de la elaboración de extractos alcohólicos, tinturas o infusiones y macerados con agua fría o alcohol (Pedretti, 1986; Houghton, 1988; Argueta et al., 1994).*

*Diversas pruebas experimentales se han realizado para detectar la actividad sedante usando extractos totales y compuestos aislados de la planta. Los ensayos farmacológicos efectuados en diferentes especies animales como ratas, conejos, gatos y perros, así como experimentos clínicos en sujetos insomnes, han confirmado que la valeriana actúa a nivel de sistema nervioso central y del aparato cardiovascular (Pedretti, 1986; Houghton, 1988). A través de ensayos experimentales se han detectado acciones similares de los extractos de raíces y rizomas de las valerianas, con respecto a medicamentos utilizados para los mismos fines como las benzodiazepinas (Sakamoto, 1992). Se ha detectado que el valepotriato conocido como didrovaltrato aparentemente inhibe los impulsos eferentes a nivel de hipocampo, en forma similar a las benzodiazepinas, mostrando así propiedades tranquilizantes (Houghton, 1988).*

## II.2 Micropropagación

*La multiplicación vegetativa in situ durante muchos años ha jugado un papel muy importante en la agricultura, sobre todo en especies que no forman semillas viables, que forman muy pocas semillas o que pierden su capacidad germinativa rápidamente y aquellas que requieren varios años para su desarrollo; esta se basa en la propiedad de las células vegetales de contener la información genética necesaria para regenerar un organismo completo y funcional, conocida como totipotencia (Allan, 1985; Pierick, 1990; Warren, 1991).*

*Los métodos clásicos de reproducción vegetativa in vivo, presentan a veces problemas que pueden afectar la producción de plantas, como por ejemplo la presencia de patógenos superficiales o contaminantes sistémicos, lo que ha llevado a la implementación de metodologías biotecnológicas por ctv como la micropropagación o propagación clonal, utilizando meristemas mediante la cual se pueden obtener plantas libres de plagas, conservando su actividad fisiológica, su homogeneidad genética y dado que estas metodologías permiten una producción masiva de plantas, son de suma importancia sobre todo en aquellas especies en vías de extinción (Cassels, 1993; Villarreal, 1993).*

*La micropropagación se basa en la totipotencia celular y en la capacidad de regeneración asexual de los vegetales; consiste en producir plantas completas a partir de células o tejidos cultivados asépticamente en un tubo de ensaye o en otro recipiente en el que se puedan controlar rigurosamente las condiciones ambientales como luz, temperatura y humedad, bajo condiciones nutricionales artificiales (Dodds y Roberts 1985; Flores, 1992).*

*Existen dos mecanismos de regeneración de plantas, morfológica y anatómicamente diferentes: a) la embriogénesis somática y b) la organogénesis. Ambas rutas pueden desarrollarse directamente de tejidos (estructura organizada) tales como: segmentos de tallo, hoja y embriones cigóticos, o indirectamente a partir del cultivo de callos, suspensiones celulares o protoplastos (Williams y Maheswaran, 1986).*

### **II.3 Embriogénesis somática**

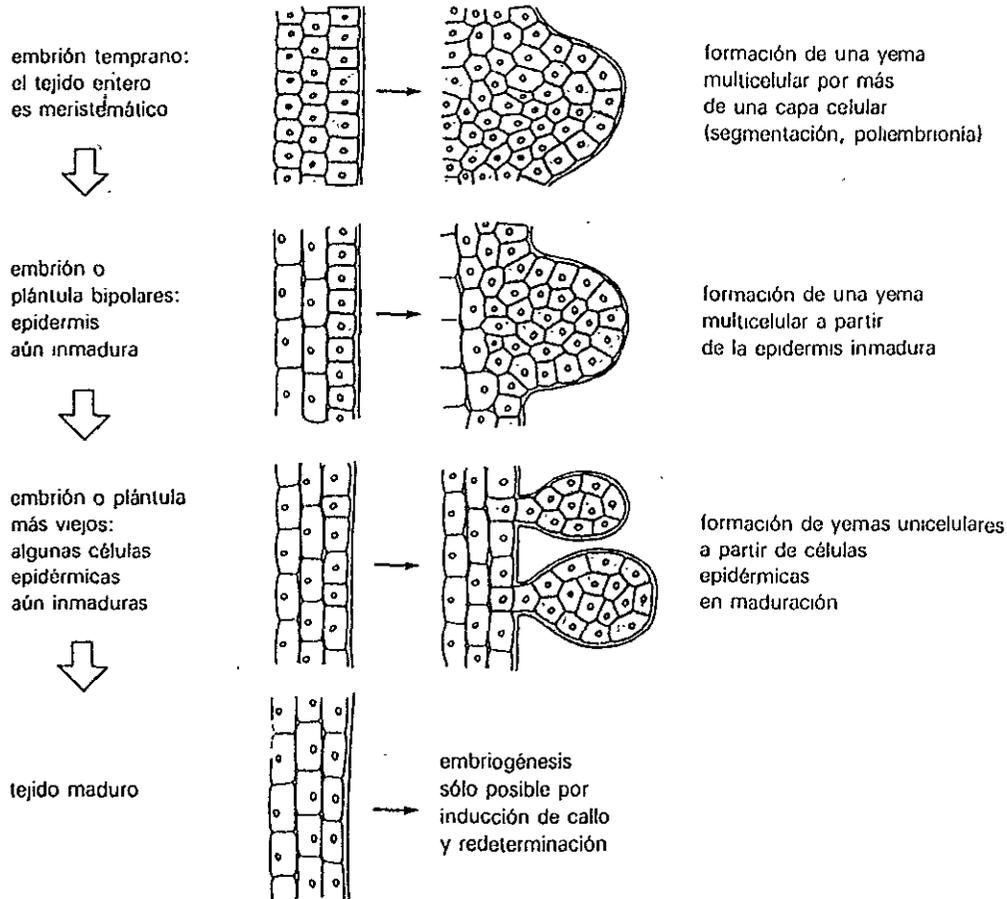
*La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual células haploides o somáticas diploides se transforman en plantas diferenciadas a través de estadios embriológicos característicos sin fusión de gametos (George, 1993; Schumann et al., 1995; Stephen y Howell, 1998). Las características más distintivas de un embrión somático son las siguientes: constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (formación de meristemo brote-raíz), con un sistema provascular cerrado entre los ápices y con autonomía frente al tejido generador, protegido normalmente por una epidermis (Williams y Maheswaran, 1986; Escalant et al., 1994; Schumann et al., 1995).*

*Las investigaciones dirigidas al conocimiento de los procesos del desarrollo morfogénico de embriones somáticos, desde hace algunos años se han orientado a dilucidar el origen unicelular o multicelular de estos, al papel de algunas formas de aislamiento físico y fisiológico de las células iniciales de los tejidos que les rodean, a las diferencias y semejanzas entre embriones somáticos y cigóticos a niveles molecular, fisiológico y morfológico, así como al papel que desempeñan algunos factores externos durante el cultivo in vitro para la inducción del proceso.*

*Existen modelos hipotéticos con relación a la manera de como algunas células somáticas tienden a comportarse como cigotos bajo ciertas condiciones ambientales, como los propuestos por Sharp et al (1980) y Evans et al (1981), sugiriendo que el origen de un embrión somático a partir de una estructura organizada como tallos, hojas o embriones cigóticos sin la formación previa de un callo conocida como **embriogénesis somática directa**, procede de células las cuáles estuvieron ya determinadas para el desarrollo embriogénico previamente al cultivo; estas células preembriogénicas determinadas requieren solo de ciertas moléculas señal, estímulos en el medio o de condiciones favorables para permitir el disparo de la división celular y la expresión de la embriogénesis, o incluso no requieren de estímulos externos para desencadenar el proceso.*

*El tipo y estado de desarrollo del explante es de suma importancia para iniciar el proceso, ya que se ha demostrado que en segmentos de embriones o embriones completos*

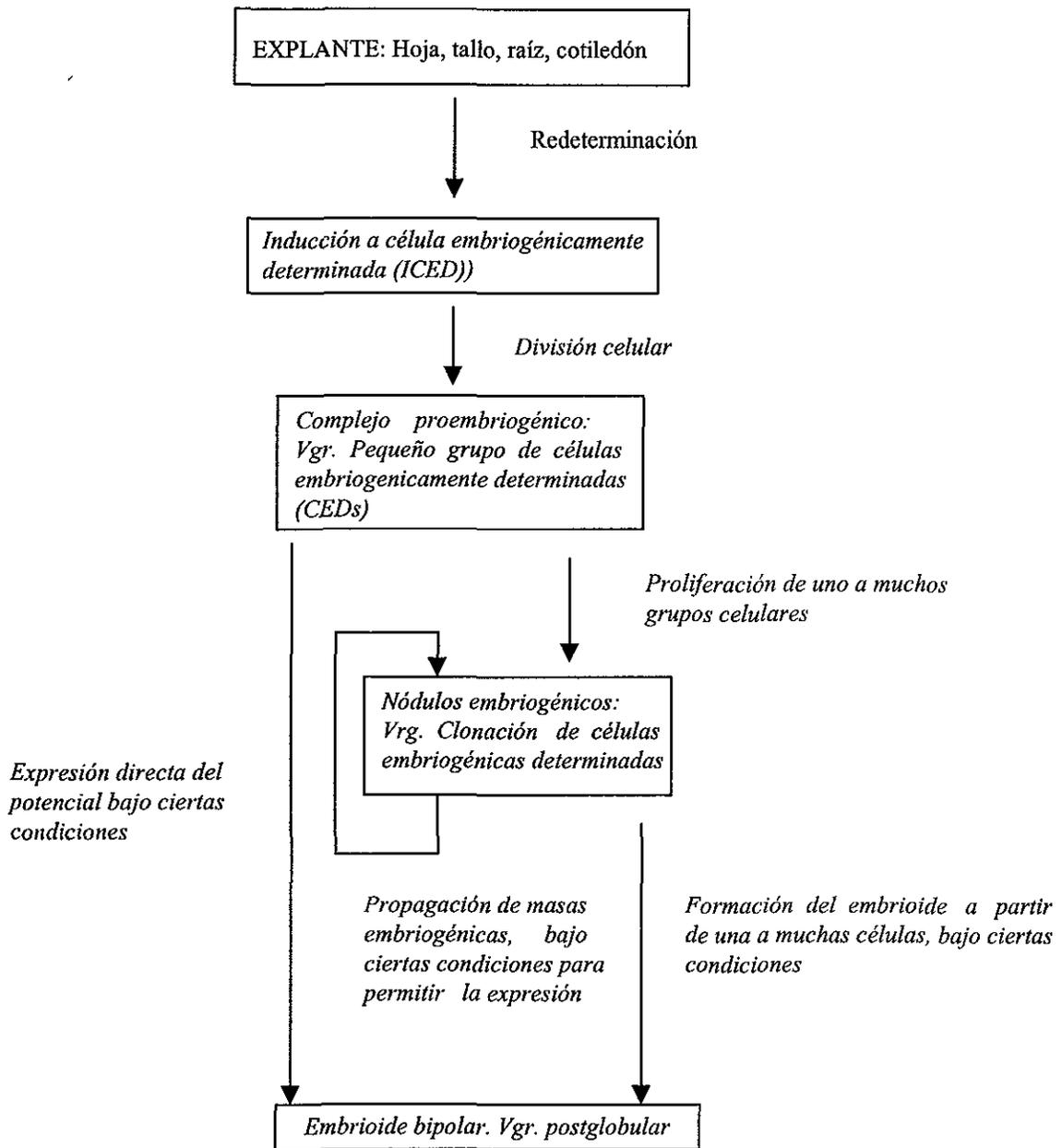
usados como explantes, así como aquellos mas cercanos al estado embrionario (tejidos de plántulas jóvenes), potencialmente grupos de células pueden cooperar y formar un meristemo nuevo; en contraste con los tejidos maduros donde en la mayoría de los casos la embriogénesis solo es posible después que se ha inducido un callo para permitir la transición de célula somática a embriogénica (Williams y Maheswaren, 1986; Salisbury y Ross, 1992; Dodeman et al., 1997) (fig. 1).



**Figura 1. Probables relaciones entre patrones de inicio unicelular o multicelular y la edad del explante en la embriogénesis somática directa. (Adaptado de Williams y Maheswaren, 1986).**

*Por otro lado, el proceso mediante el cual un tejido diferenciado forma callos, suspensiones celulares o protoplastos por divisiones celulares mitóticas previo a la formación de embriones somáticos conocido como **embriogénesis somática indirecta**, requiere la redeterminación de células diferenciadas, proliferación de callo y el desarrollo del estado embriogenicamente determinado, es decir, deberá ocurrir una rediferenciación al estado embriológico (Maheswaran y Williams, 1985; Williams y Maheswaran, 1986) (fig.2).*

*Se ha demostrado que es mucho mas probable la formación de un callo morfogénico si proviene de tejidos reproductivos, incluyendo yemas florales, óvulos, embriones maduros o inmaduros y cotiledones, que de tallos, primordios foliares y radicales (Salisbury y Ross, 1992). Una vez que la inducción de células embriogénicas determinadas ha sido activada, al parecer no hay diferencias fundamentales entre la embriogénesis somática directa e indirecta (Van Holst et al. 1994, citados por Toonen y De Vries, 1995).*



**Figura 2. Síntesis esquemática de los procesos que se han reportado que ocurren en la embriogénesis somática indirecta. Inducción a células embriogénicamente determinadas (ICED); células embriogénicamente determinadas (CEDs). Establecimiento y mantenimiento de un grupo celular proembriogénico para la formación de embrioides bipolares y su desarrollo normal. La pérdida del control integrado permite que células únicas o en grupos de ellas escapen y reinicien a estados proembrioides más tempranos. ( Adaptado de Williams y Maheswaran, 1986).**

Respecto a los cuestionamientos sobre el origen unicelular o multicelular de embriones somáticos, al parecer están directamente relacionados con el desarrollo único o coordinado de células vecinas como un grupo morfogénico; si la célula está sola en un estado de preparación para iniciar la morfogénesis, puede actuar independientemente y expresar su potencial embriogénico (en este caso la célula somática actuará como un cigoto) y cuando la célula es rodeada por células vecinas en el mismo estado de inducción, el grupo en conjunto puede desarrollarse como una unidad de células embriogénicas (Williams y Maheswaran, 1986; Toonen y De Vries, 1995). En general, un origen multicelular al parecer produce embrioides fusionados con el tejido materno sobre una amplia área del polo radicular o región del eje, mientras que en un origen unicelular es más probable formar embrioides unidos por un angosto órgano como-suspensor (Maheswaran y Williams, 1985; Williams y Maheswaran, 1986).

Algunos reportes que señalan el origen unicelular son los estudios detallados de Lu y Vasil (1985) quienes demostraron que los embriones somáticos de Panicum maximum se originaron de células únicas, con un patrón de desarrollo similar a embriones cigóticos y los trabajos de Konar et al (1972), Guedira et al (1989) y Fransz y Schel (1991) con Cinchorum, Ranunculus sceleratus y Zea mays en los cuales el origen unicelular de los embrioides también fue demostrado.

Por otro lado, trabajos como los de Halperin y Wethrell (1965), Wernicke et al (1982) y Schwendiman et al (1988) entre otros, han demostrado el origen multicelular en embrioides de Daucus, Sorghum bicolor y Elaeis guineensis respectivamente.

En la embriogénesis somática indirecta vía callos o cultivos en suspensión, el origen multicelular parecía ser la forma universal, originándose un grupo compacto de células embriogénicas, el "complejo proembrional" del cual se desarrollarían de uno a muchos embrioides, sin embargo, grupos de células proembriogénicas han sido reportadas tener origen unicelular, las cuales al parecer experimentan un evento de redeterminación seguido por una gran división; de estos eventos hay muy poca documentación debido a que la formación de embriones somáticos a partir de células únicas producidos vía una fase

*intermedia de callo embriogénico, es más compleja de interpretar en términos de comportamiento de células individuales. (Williams y Maheswaren, 1986; Toonen y De Vries, 1995).*

*En cuanto al aislamiento de las células embriogénicas con relación a sus células vecinas, las células embriogénicas parecen estar en contacto normal con el resto del tejido hasta que un embrión de unas cuantas células se forma; presentándose posteriormente un engrosamiento de la pared celular al exterior del embrión, asociado a una cauterización de plasmodesmos y posiblemente una cutinización de la célula embriogénica o del embrión en estadios muy tempranos (Steward, 1958 a y b; Lowe et al., 1985; Williams y Maheswaren 1986; Toonen y De Vries 1995; Pedroso y Pais, 1995). Sin embargo no existe consenso en la idea de que el aislamiento es un prerrequisito para que la célula sea embriogénica o si es un efecto secundario durante el proceso de formación del embrión.*

*En todos los sistemas donde se observa la formación de embriones somáticos o embrioides, las células que los originan parecen tener rasgos comunes que son característicos de células meristemáticas en activa división, como: tamaño pequeño, núcleos grandes con nucleolos prominentes y vacuolas pequeñas (Maheswaren y Williams, 1985; Williams y Maheswaren, 1986; Jones and Rost, 1989; Schumann et al., 1995).*

*Los embriones cigóticos y somáticos comparten características morfológicas y poseen el mismo potencial morfogenético (Raghavan, 1997).*

*El primer estado reconocible en la embriogénesis típica de una planta dicotiledónea es el globular, generalmente hay un crecimiento de un cluster de células pequeñas seleccionadas para embriogénesis somática. En algunos casos un pequeño suspensor puede ser visto, esto es más fácil visualizarlo en medios sólidos que en cultivos líquidos (Halperin and Wetherell, 1965; Meinke, 1995); sin embargo también han sido observados muchos embriones sin apéndices o accesorios como el suspensor (Toonen y De Vries, 1995); después de unos días de crecimiento isodiamétrico, el estado globular es seguido por un estado oblongo, con un cambio de crecimiento isodiamétrico a simétrico*

bilateralmente, comenzando el estado acorazonado (Meinke, 1995). La transición globular-acorazonada es claramente marcada por el crecimiento de los dos cotiledones, la elongación del hipocotilo y el inicio del desarrollo de la radícula; estos procesos continúan hasta los estados de torpedo y plántula (Dineshkumar et al., 1995). Las plántulas pueden ser identificadas por contener cotiledones verdes, hipocotilos elongados y desarrollo de radículas con pelos radiculares claramente diferenciados y pueden continuar su crecimiento en cultivo líquido, o pueden ser transferidas en medios sólidos para la regeneración de la planta completa (Dineshkumar et al., 1995; Zimmerman, 1993).

El proceso de embriogénesis somática ocurre en forma natural en muchas especies o puede ser inducido *in vitro* (Salisbury y Ross, 1992), por lo cual es posible que dicho evento este regulado por mecanismos represivos, la ausencia de los cuales podría determinar su manifestación (Doebley y Lukens, 1998). Aunque no se conoce con claridad como se induce el disparo y desarrollo del proceso de embriogénesis, existen reportes que documentan la participación de factores como el tipo y estado fisiológico del explante, las fuentes de carbono, el metabolismo nitrogenado y los reguladores del crecimiento, los cuales son importantes en alguna etapa de la morfogénesis o en los procesos de desdiferenciación y diferenciación *in vitro* (Ammirato, 1989; George, 1993; Jeannin G et al., 1995; Higashi et al., 1996).

De acuerdo con Rhagavan (1997), dos hechos esenciales acerca de la embriogénesis somática que han resistido la prueba del tiempo muy bien son: que la desdiferenciación y división de la célula por una auxina fuerte, como por ejemplo el 2,4 D, es el primer paso invariante en el proceso y que el desarrollo embriogénico es iniciado en ausencia de la auxina o en presencia de una concentración reducida de la auxina.

Al parecer las auxinas solas o en combinación con citocininas juegan un papel importante en la inducción de la embriogénesis, ya que se ha detectado que en presencia continua de estos reguladores, las masas proembriogénicas (PEMs) del cultivo *in vitro* sintetizan todos los productos de los genes (mRNAs) necesarios para iniciar el estado globular temprano de la embriogénesis y bajo la presencia continua de auxinas las PEMs

contienen muchos otros mRNAs y proteínas, que generalmente inhiben la elaboración del programa de embriogénesis, por lo cuál a remoción de estos reguladores después de iniciado el proceso, resulta en la inactivación de un número de genes tal, que el programa de la embriogénesis puede ahora continuar, sugiriendo además que nuevos productos de genes son necesarios para la transición a estado acorazonado y que estos son sintetizados solo cuando la auxina exógena es removida ( Halperin y Wetherell, 1965; Meinke 1995; Rhagavan, 1997).

Algunas investigaciones que han registrado el empleo de las auxinas solas o en combinación con citocininas para inducir la formación de embriones somáticos de células del explante son los que se efectuaron en Cocos nucifera (Chan et al., 1998), Ceratozamia euryphyllidia (Chavez et al., 1998), Cucumis melo (Tabei et al., 1991), Saccharum officinarum (Ho and Vasil, 1983), Pennisetum americanum (Vasil and Vasil, 1982), y Sorghum bicolor (Wernicke and Brettell, 1982).

Tambien se ha demostrado que dependiendo de los cambios en el radio de auxina/citocinina en cultivos in vitro se puede inducir el proceso de embriogénesis o de organogénesis (formación de yemas o raíces adventicias), como los trabajos reportados por Charrière y Hahne (1998) con Helianthus annuus, Tabei et al (1991) con Cucumis melo y Barwele et al (1986) con Glycine max.

La ocurrencia simultanea de la embriogénesis somática y organogénesis indirecta, bajo las mismas condiciones experimentales de regeneración es raro, debido a los particulares requerimientos para la expresión de los eventos (Marconi y Radice, 1997).

#### **11.4 Sistemas de propagación masiva por embriogénesis somática.**

*Desde la descripción inicial de la producción de embriones somáticos hace más de 40 años por Steward et al (1958) a partir de callos de zanahoria, este proceso ha sido reconocido como una importante vía para la regeneración masiva de plantas, (no obstante que la inducción exitosa de los embriones somáticos y su siguiente conversión en plantas viables no ha sido una rutina de laboratorio o eficiente en la mayoría de las especies) y reconocida como un modelo potencial para el estudio de eventos tempranos de regulación y morfogenéticos de la embriogénesis vegetal (Zimmerman, 1993; Parrot, et al 1996).*

*Comparando el número limitado de embriones originados de la fusión gamética y la dificultad de su extracción de los confines del óvulo, el enorme número de células somáticas potencialmente capaces de desarrollo embriogénico asegura la disponibilidad de un asombroso número de embriones somáticos por simples manipulaciones experimentales (Raghavan, 1997).*

*Por otro lado, el uso potencial de la micropropagación, para la multiplicación clonal de genotipos con alto valor para la forestería (particularmente a través de embriogénesis somática), así como un medio para garantizar la sobrevivencia de especies en vías de extinción ha generado un gran interés (Gupta et al., 1993; Raghavan, 1997).*

*Compañías como la Weyerhaeuser, han desarrollado tecnologías para la producción masiva de embriones en diferentes estados de desarrollo, por ejemplo, de 50 a 100 embriones cotiledonarios por ml de ciertas coníferas en 6 semanas, lo que equivale a 50 000-100 000 embriones por litro de cultivo en suspensión (Gupta et al., 1993).*

*La producción a gran escala representa una alternativa para los millones de embriones somáticos que serán necesarios para reforestación y los bioreactores pueden ser usados para producir las células vegetales necesarias a gran escala (Gupta et al., 1993).*

*Los progresos tecnológicos en estos sistemas han permitido: 1) iniciación de masas embriogénicas, formación de embriones y su germinación en gran número de especies, a partir de varios explantes obtenidos de plántulas e individuos maduros y semillas, 2) mantenimiento de masas embriogénicas en medios líquidos y sólidos, 3) mantenimiento de masas embriogénicas en nitrógeno líquido, con regeneración de plántulas normales de las masas embriogénicas crioadmacenadas, 4) plántulas establecidas en suelo, 5) obtención de embriones en varios estados en matraces de 1-2 L y en bioreactores de varias especies, 6) clasificación de embriones mecánicamente ( por tamices, sobre todo en herbáceas como zanahoria, alfalfa, apio etc.) o por gradientes de centrifugación, 7) liberación de semillas artificiales a nivel laboratorio 8) transferencia de genes a través de mecanismos biológicos como el sistema Agrobacterium o por biobalística, obteniendo plántulas transformadas (Gupta et al., 1993; Chávez y Rubluo 1995; Kriebel, 1995).*

*Sin embargo, la propagación clonal por esta vía presenta varios factores que han limitado su avance, entre otros: los productos del desarrollo de embriones no son uniformes (pueden variar en estado, tamaño y morfología); la asincronía del desarrollo causa otro problema en el establecimiento del sistema, ya que muchos embriones están unidos al suspensor, por lo que la separación y selección de estos es una labor muy intensa; la pobre respuesta de germinación y por lo tanto de plantas maduras; la heterogeneidad de rangos de enraizamiento entre genotipos y a menudo el desarrollo plagiotrópico de especies arbóreas después de un tiempo (incluso años) de enraizamiento (Gupta et al., 1993; Pâques et al., 1995). Otros factores limitantes en la estrategia clonal son como mantener el material seleccionado en buenas condiciones de enraizamiento durante las pruebas clonales y en una cantidad suficiente, además del escaso conocimiento de las variantes genéticas entre las poblaciones o especie (que en muchos casos no se tiene) para permitir una propagación a gran escala si los resultados son positivos (Kriebel, 1995; Pâques et al., 1995).*

*Lo anterior, y el escaso conocimiento de los factores que controlan la expresión morfogenética, son responsables de su reducida aplicación y han sido las fuerzas fundamentales de la investigación en las últimas décadas (Pedroso y País, 1995).*

## *II.5 Organogénesis*

*Esta vía de regeneración conduce a la formación de órganos (raíces o brotes) adventicios unipolares directamente sin desarrollo embriogénico, conectados con el tejido parental a través del sistema vascular (Howell 1998; Schumann et al., 1995; Williams y Maheswaran, 1986). De acuerdo con George (1993), un tercer camino para la inducción de plantas completas puede ser activado, a partir de yemas o primordios (meristemos preexistentes), los cuales son estimulados para crecer y proliferar. El brote joven está conectado vía haces procambiales con los haces vasculares preexistentes del tejido madre.*

*La organogénesis directa, como método de producción masiva plantas es inefectiva comparativamente con la embriogénesis somática, sin embargo, es el método mas empleado para producir plantas sanas, uniformes y de alta calidad (Dodds y Roberts 1985; George, 1993).*

*En general, la producción de plantas con menores variantes genéticas se ha asociado con el cultivo de estructuras organizadas como yemas apicales y axilares , hojas, embriones, tallos, etc. las cuales son mas estables geneticamente, mientras que la regeneración de plantas indirectamente a partir de tejidos desorganizados como callos, suspensiones celulares y protoplastos se ha relacionado con inestabilidad genética (mayor número de variantes somaclonales) (Evans et al., 1983; George 1993).*

## II.6 Morfogénesis in vitro del género *Valeriana*

Son pocos los estudios tendientes a la regeneración de especies de este género, debido principalmente a que los trabajos en cultivo de tejidos vegetales han estado dirigidos durante muchos años a establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión con fines de extracción de metabolitos secundarios de interés farmacológico, sin embargo, aquellos que han sido realizados, han demostrado la capacidad de regeneración de algunas especies por organogénesis, como los siguientes:

*Mathur et al (1988)* realizaron la propagación de *V. wallichii* via organogénesis directa, a partir de meristemos apicales y axilares, utilizado el medio basal MS en todos sus experimentos, suplementado con kin, BAP y AIA, en concentraciones de 1.0 a 5 mg l<sup>-1</sup>. En combinación de kin y AIA se obtuvieron plántulas más vigorosas con respecto a la combinación BAP y AIA.

*Viola y Fritz (1991)*, establecieron un método de clonación in vitro de *V. wallichii* utilizando diferentes reguladores del crecimiento. La mejor proliferación de plántulas fue lograda en el medio basal MS, suplementado con BAP (5.0 mg l<sup>-1</sup>); además un buen enraizamiento de los brotes con ANA (0.01-1.0 mg l<sup>-1</sup>).

En 1991, *Mathur y Ahuja* regeneraron plantas a partir de callos de *V. wallichii* provenientes de peciolo. La formación óptima de callos fue observada en el medio MS adicionado con 3.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA y 0.25 mg l<sup>-1</sup> de kin. La regeneración de los brotes fue activada transfiriendo los callos al medio que contenía 1.0 mg l<sup>-1</sup> de kin en combinación con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de ANA

La regeneración de plántulas de *V. wallichii* fue obtenida por *Mathur (1992)*, al emplear explantes provenientes de peciolo. Cultivos en suspensión fueron iniciados en el medio MS conteniendo 16.1 mM de ANA y 0.93 mM de kin. A las 2-3 semanas, agregados celulares mostraron rizogénesis. Raíces aisladas desarrollaron callos verdes o estructuras como hojas aplanadas. Cada estructura bipolar cuando fue transferida a un

medio sólido MS con 0-89-2.22  $\mu\text{M}$  de BAP o 0.93-4.60  $\mu\text{M}$  de kin desarrolló un brote y creció como plántula. Un máximo de 28 brotes se desarrollaron por 1 gr de peso fresco de tejido.

Enciso-Rodríguez (1997) estableció un método para la micropropagación de *V. edulis* ssp. *procera*. Las plántulas germinadas asepticamente formaron brotes adventicios al ser cultivadas en un medio B5 con 5.0  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP y 0.2  $\text{mg l}^{-1}$  de AIA, con un promedio de 2.8 brotes por explante. El enraizamiento fue inducido en el medio B5 con 0.4  $\text{mg l}^{-1}$  de AIA.

### III. JUSTIFICACIÓN

*La República Mexicana, por ser uno de los países más ricos en diversidad genética del mundo, cuenta con una gran cantidad de especies autóctonas. Muchas de estas especies debido a presiones ecológicas y socioeconómicas se encuentran seriamente perturbadas, al grado de que sus poblaciones naturales se encuentran sobreexplotadas y/o en vías de extinción.*

*Por otro lado, existen muy pocos estudios fitotécnicos y biotecnológicos que lleven al establecimiento de sistemas de propagación masiva de especies medicinales silvestres y que por lo tanto coadyuven a la preservación de nuestros recursos naturales, ya que hasta ahora, la mayoría de las plantas utilizadas tanto en la medicina tradicional o empleadas como base de muchos medicamentos son recolectadas y la propagación de algunas de ellas se lleva a cabo solamente en huertos familiares; algunas otras especies son importadas, generalmente en forma de materia seca molida o como extracto total.*

*Durante varias décadas *V. edulis* ssp. *procera* ha sido sobrecolectada y en la actualidad sus poblaciones están seriamente reducidas. Además, debido a que es el rizoma la parte aprovechable de la planta, pocas veces esta llega a su madurez sexual y por lo tanto a producir semillas; cuando se logra la obtención de semillas, pocas germinan y su período de viabilidad es corto ( 2 a 3 meses ), aún conservadas a bajas temperaturas, es decir probablemente sean semillas recalcitrantes, lo cual las hace candidatas obligadas a establecer un sistema eficiente de micropropagación para la preservación de su germoplasma.*

*Hasta donde sabemos solo existe un reporte de la micropropagación de esta subespecie, pero la frecuencia de regeneración fue baja.*

*Por lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:*

#### **IV. OBJETIVO GENERAL:**

*Establecer las condiciones experimentales para la regeneración de Valeriana edulis ssp. procera, a través de embriogénesis somática y/u organogénesis indirecta, así como contribuir en su conocimiento ontogénico a nivel de morfogénesis experimental.*

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- 1.- Determinar el tipo de explante apropiado y algunos reguladores del crecimiento vegetal para la inducción de callos morfogénicos de V. edulis ssp. procera.*
- 2.- Evaluar el efecto de algunos reguladores del crecimiento vegetal y medio de cultivo (semisólido/líquido) en la regeneración de V. edulis ssp. procera, vía embriogénesis somática y/u organogénesis.*
- 3.- Documentar el proceso de ontogénesis de embriones somáticos y brotes unipolares con estudios histológicos.*

#### **V. HIPOTESIS:**

- 1.- La inducción de callos morfogénicos depende del tipo de explante, regulador del crecimiento y su concentración utilizados en el medio de cultivo.*
- 2.- La respuesta regenerativa de V. edulis ssp. procera, expresada en No. de embriones germinados, brotes unipolares o múltiples y su conversión a plántulas está en relación con las condiciones del medio de cultivo utilizadas (semisólido/líquido).*
- 3.- A través de estudios histológicos se pueden dilucidar el posible origen y el proceso de desarrollo embriológico u organogénico de las estructuras en estudio.*

#### **IV. OBJETIVO GENERAL:**

*Establecer las condiciones experimentales para la regeneración de Valeriana edulis ssp. procera, a través de embriogénesis somática y/u organogénesis indirecta, así como contribuir en su conocimiento ontogénico a nivel de morfogénesis experimental.*

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- 1.- Determinar el tipo de explante apropiado y algunos reguladores del crecimiento vegetal para la inducción de callos morfogénicos de V. edulis ssp. procera.*
- 2.- Evaluar el efecto de algunos reguladores del crecimiento vegetal y medio de cultivo (semisólido/líquido) en la regeneración de V. edulis ssp. procera, vía embriogénesis somática y/u organogénesis.*
- 3.- Documentar el proceso de ontogenesis de embriones somáticos y brotes unipolares con estudios histológicos.*

#### **V. HIPOTESIS:**

- 1.- La inducción de callos morfogénicos depende del tipo de explante, regulador del crecimiento y su concentración utilizados en el medio de cultivo.*
- 2.- La respuesta regenerativa de V. edulis ssp. procera, expresada en No. de embriones germinados, brotes unipolares o múltiples y su conversión a plántulas está en relación con las condiciones del medio de cultivo utilizadas (semisólido/líquido).*
- 3.- A través de estudios histológicos se pueden dilucidar el posible origen y el proceso de desarrollo embriológico u organogénico de las estructuras en estudio.*

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

*La investigación experimental se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología en una primera fase y posteriormente en el Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno de la UNAM, bajo la dirección de los Drs. Georgina Hernández Delgado y Miguel Lara Flores.*

*El estudio ontogénico se realizó en la unidad de microscopía del Instituto de Biotecnología y el laboratorio de Citología de la Fac. de Ciencias de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Judith Márquez Guzmán.*

### **VI.1 Material vegetal.**

*Las semillas de V. edulis ssp. procera fueron colectadas de una población silvestre localizada en la zona norte del estado de Morelos. Las plantas fueron determinadas taxonomicamente en el herbario del Dpto. de Fitotecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo y depositadas en el herbario MORE de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente, sumergiéndolas en etanol al 70% por 1 min, enjuagándolas dos veces en agua estéril y subsecuentemente colocadas en una solución de blanqueador comercial al 10% (6% de cloro activo) conteniendo tween-20 (2 gotas por 100 ml<sup>1</sup>), en agitación durante 15 min.*

*Posteriormente, las semillas fueron enjuagadas cuatro veces con agua destilada estéril y germinadas asépticamente en medio basal MS semisólido al 50% (Murashige y Skoog 1962), conteniendo 3.8 g l<sup>1</sup> de phytigel, vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968) y 15 g l<sup>1</sup> de sacarosa, bajo un fotoperiodo de 16 h, provisto por lámparas de luz blanca fluorescente (25-40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Estas condiciones ambientales controladas fueron usadas en todos los experimentos. Hojas (8 mm<sup>2</sup> aprox.), peciolo (10 mm), yemas apicales (5 mm), tallos (10 mm), cotiledones y raíces (10 mm) obtenidos de plántulas de 40-45 días de edad fueron usados como explantes.*

## **VI.2 Medio y condiciones de cultivo.**

*Los explantes fueron cultivados en el medio semisólido MS suplementado con vitaminas B5, 3.8 g l<sup>-1</sup> de phytigel, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y picloram, 2,4-D o ANA (1-2 mg l<sup>-1</sup>) o en combinación con kin (0, 0.10, 0.15 mg l<sup>-1</sup>). El pH del medio fue ajustado a 5.6 ± 0.1 antes de autoclaviar durante 20 min a 120°C. Los callos desarrollados fueron subcultivados en medio fresco con la misma formulación cada dos semanas. Después de doce semanas, la mitad de los callos formados fueron transferidos a medio líquido y la otra mitad continuó su crecimiento en el medio semisólido (Fig. 3). Ambos medios líquido y semisólido consistieron de sales de MS, vitaminas B5, 20 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores del crecimiento y 3.8 g l<sup>-1</sup> de phytigel fue añadido para el medio semisólido. Los cultivos líquidos fueron agitados a 60 rpm en frascos Erlenmeyer de 250 ml. Subcultivos se efectuaron cada 10 días. Después de cuatro semanas, fue evaluado el peso fresco de los callos y cultivos en suspensión. En este momento, brotes adventicios y embriones somáticos tempranos fueron claramente distinguidos por observaciones bajo un microscopio estereoscópico (magnificación 20X).*

## **VI.3 Desarrollo de brotes y enraizamiento.**

*Los brotes simples y múltiples desarrollados en medio líquido y semisólido fueron transferidos individualmente a frascos gerber con 20 ml de medio semisólido MS con ANA solo o en combinación con kin (medio de enraizamiento). Las plántulas (3-5 cm de longitud del brote) fueron transferidas a macetas cubiertas por plástico transparente conteniendo peat-moss:vermiculita (2:1). Después de un período de adaptación de 30-40 días, las plántulas enraizadas fueron transferidas al invernadero.*

## **VI.4 Desarrollo de embriones.**

*La germinación de embriones somáticos fue activada por su transferencia a medio semisólido MS mas 20 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con kin y ANA o sin reguladores del crecimiento(Fig. 1). El número de embriones germinados fue registrado después de 4*

semanas y el número de plántulas formadas después de 8 semanas. La germinación fué definida como desarrollo de embriones en plántulas con sistemas de brote y raíz bien definido (Dineshkumar et al., 1995). Las plántulas (3-5 cm de longitud del brote) fueron adaptadas y transferidas a invernadero como se mencionó anteriormente.

#### **VI.5 Diseño experimental y análisis estadístico.**

Los experimentos fueron organizados de acuerdo a un diseño factorial y repetidos tres veces por separado. Se compararon los resultados entre tratamientos, por lo que se trabajó con una hipótesis nula ( $H_0$ ), en la que se estableció que no había diferencias entre los tratamientos respecto a las variables de respuesta evaluadas y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) donde se estableció que si había un efecto de los tratamientos respecto a las variables de respuesta evaluadas. Para aceptar o rechazar las hipótesis, los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza y prueba de Tukey para la primera variable de respuesta, con un nivel de significancia de 0.05 (Norusis, 1990). La unidad de observación fue un explante y los caracteres evaluados fueron:

*Peso fresco de callos y cultivos en suspensión (grs)*

*No. de embriones formados*

*No. de plántulas regeneradas vía embriogénesis y organogénesis indirecta (brotes únicos y múltiples).*

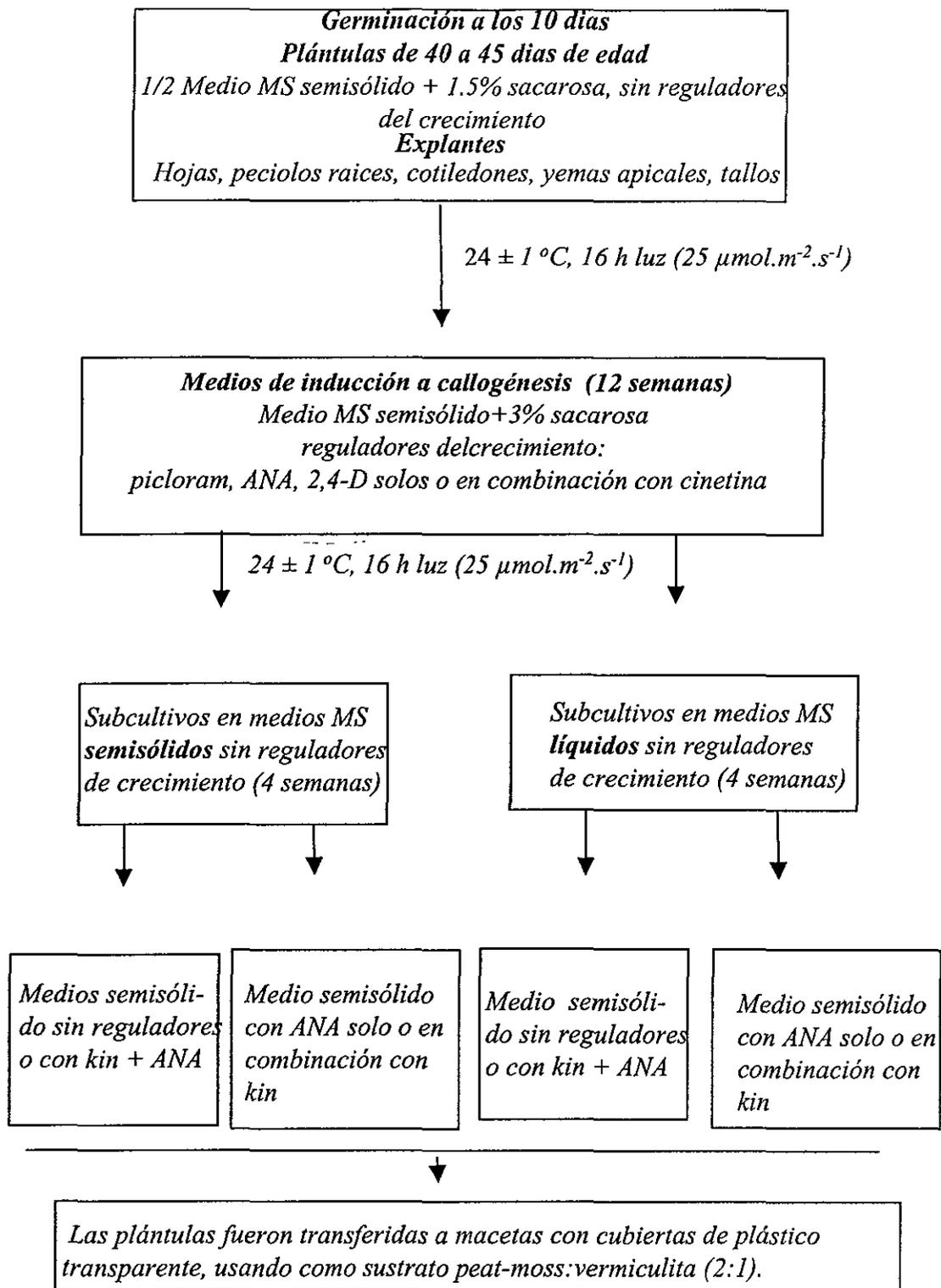
#### **VI.6 Análisis ontogénico de embriones somáticos y brotes.**

Hojas provenientes de plántulas germinadas *in vitro* de 40-45 días de edad fueron segmentadas ( $8\text{mm}^2$  aprox.) y colocadas en posición abaxial en un medio semisólido MS con 2,4-D ( $2.0\text{ mg l}^{-1}$ ) y kin ( $0.15\text{ mg l}^{-1}$ ) durante 12 semanas, con subcultivos periódicos. Los callos formados fueron transferidos al medio basal MS semisólido sin reguladores de crecimiento durante las 8 semanas siguientes.

*Tejidos de hoja y callo morfogénico fueron fijados después de 0, 2, 4, 6 y 8 días, así como a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 semanas en fosfato buffer (pH 7.2) conteniendo glutaraldehído (3.0 %) y paraformaldehído (1.5 %), durante 24 horas.*

*Posteriormente se procedió a la deshidratación en series de alcohol durante 10 min cada cambio (30, 50, 70, 85, 96 y 100%), series de xilol/alcohol 100% (relaciones 1:3, 2:2 y 3:1) durante 30 min cada cambio, y xilol/paraplast (relaciones 3:1, 2:2:, 1:3) con cambios cada hora y embebidas en paraplast puro. Secciones de 8-10  $\mu$ m de parafina secuenciales fueron cortadas en microtomo, colocadas en portaobjetos para ser teñidas con azul de toluidina durante 15-30 segundos y montadas con polymount.*

*Algunas muestrās fueron posfijadas con tetróxido de osmio al 1% durante dos horas, deshidratadas en series de alcohol e incluidas en resina LR White y polimerizadas a 55°C durante 12 horas o en resina JB4 (kit JB4 Polysciences Inc.) . Secciones de 800-1000 nm fueron cortadas en ultramicrotomo, colocadas en portaobjetos para su tinción con azul de toluidina y montadas con polymount. Las observaciones y fotografías tomadas se efectuaron bajo un microscopio óptico.*



**Figura 3. Representación diagramática de la regeneración de *V. edulis* ssp. *procera* a partir de explantes de hoja, por embriogénesis somática y organogénesis indirecta.**

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

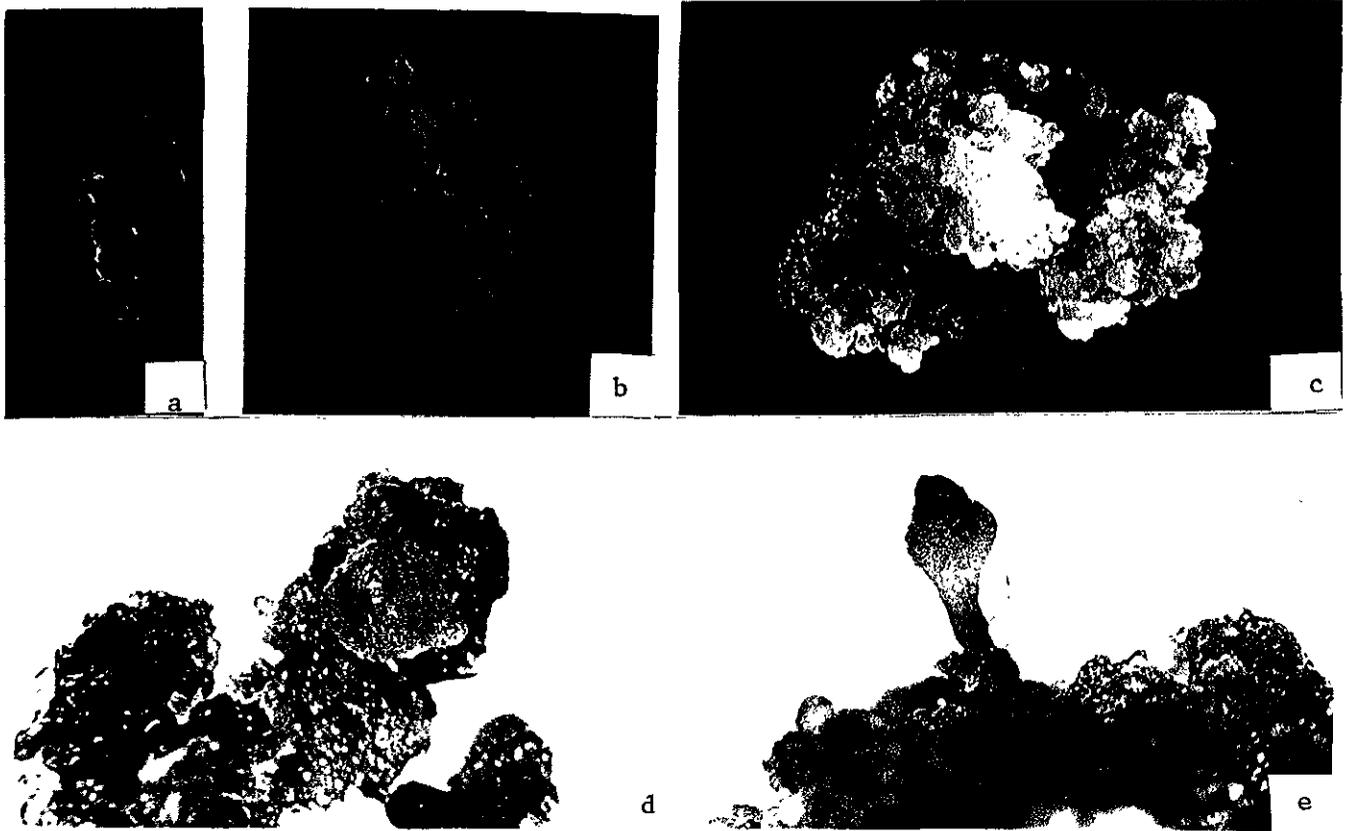
### *VII.1 Tipo de explante y reguladores del crecimiento en la inducción de callos morfogénicos.*

*Seis tipos de explantes (segmentos de tallos, cotiledones, raíces, yemas apicales, peciolo y hojas), provenientes de plántulas germinadas in vitro fueron evaluados. Los segmentos de raíz, cotiledon y tallo no formaron callos en ninguno de los medios de cultivo, tornandose de color café y muriendo después de 5-7 dias de siembra (datos no mostrados).*

*Callos pequeños compactos y de tipo nodular no morfogénicos fueron observados después de 6 semanas de cultivo in vitro derivados de explantes de hojas, peciolo y yemas apicales en presencia de picloram solo o en combinación con kin, los cuales se tornaron de color café y rápidamente murieron (Fig. 4a).*

*Cuando se empleó ANA solo o con kin, callos de color blanco amarillento fueron desarrollados a las 6-8 semanas de siembra, iniciandose inmediatamente después el proceso de rizogénesis, predominantemente en explantes de hoja (Fig.4b), y en peciolo y yemas apicales en menor proporción (tabla1).*

*Al utilizar en los medios de cultivo 2,4-D solo o en combinación con kin, se observaron callos friables con algunas zonas mas o menos compactas de color crema después de 6 semanas de siembra (Fig. 4c); posteriormente, en estos callos aparecieron zonas de color verdosas, las cuales fueron observadas bajo un microscopio esteroscópico, detectando que estas eran de tipo morfogénico. Los procesos morfológicos iniciales de embriogénesis y organogénesis en el mismo cultivo se observaron aproximadamente después de 11- 12 semanas de siembra (Figs. 4d y 4e). Los resultados anteriores fueron registrados en mayor proporción en explantes de hoja que en peciolo y yemas apicales (tabla 1).*



**Figura 4.** Callos derivados de segmentos de hoja, inducidos al utilizar picloram, ANA y 2,4-D ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) en combinación con kin ( $0.15 \text{ mg l}^{-1}$ ).

- 4a. Callo compacto observado a las 6 semanas de siembra en un medio con picloram y kin.
- 4b. Callo rizogénico inducido en un medio con ANA y kin.
- 4c. Callo friable cultivado en 2,4-D y kin, observado a las 8 semanas de cultivo.
- 4d. Callo morfogénico proveniente de un medio adicionado con 2,4-D y kin, observado a las 12 semanas (a) brote unipolar unido al callo (b) embrión temprano sin estructura de adhesión al callo (como-suspensor)
- 4e. Detalle de un brote originado vía organogénesis, con el ápice de color verde, a las 14 semanas de cultivo en un medio adicionado con 2,4-D y kin.

La respuesta a la inducción de callos morfogénicos o no morfogénicos de los explantes de *V. edulis* ssp. *procera* en los medios que contenían diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y cinetina se resume en la tabla: 1

**Tabla1. Efecto de picloram, ANA o 2,4-D solos o en combinación con cinetina en la repuesta morfogénica de *V. edulis* ssp. *procera* en explantes cultivados en medio MS. (% de respuesta morfogénica).**

(mg l <sup>-1</sup> )		Respuesta	Explantes		
Picloram / cinetina	Hoja		Peciolo	yema apical	
1.0-2.0	0	Callo no morfogénico	26	33	35
		Embriones somáticos/brotos	-	-	-
		Raíces	-	-	-
1.0-2.0	0.10	Callo no morfogénico	44	35	27
		Embriones somáticos/brotos	-	-	-
		Raíces	-	-	-
1.0-2.0	0.15	Callo no morfogénico	38	65	29
		Embriones somáticos/brotos	-	-	-
		Raíces	-	-	-
<b>ANA / cinetina</b>					
1.0-2.0	0	Callo no morfogénico	-	-	-
		Embriones somáticos/brotos	-	-	-
		Raíces	72	38	-
1.0-2.0	0.10	Callo no morfogénico	-	-	-
		Embriones somáticos/brotos	-	-	-
		Raíces	82	20	25
1.0-2.0	0.15	Callo no morfogénico	-	-	-
		Embriones somáticos/brotos	-	-	-
		Raíces	60	25	16
<b>2,4-D / cinetina</b>					
1.0-2.0	0	Callo no morfogénico	-	-	5
		Embriones somáticos/brotos	68	45	25
		Raíces	-	-	-
1.0-2.0	0.10	Callo no morfogénico	-	-	-
		Embriones somáticos/brotos	80	56	18
		Raíces	-	-	-
1.0-2.0	0.15	Callo no morfogénico	-	-	-
		Embriones somáticos/brotos	87	42	20
		Raíces	-	-	-

Los datos están basados en el promedio de tres experimentos por separado. Se utilizaron 75 explantes por cada tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos, al utilizar 1.0, 1.5 y 2.0 de 2,4-D, por los resultados que se presentan son el promedio de los tres.

Las auxinas picloram, ANA y 2,4-D en combinación con kin, son ampliamente utilizadas para inducir callogénesis y embriogénesis somática (Dineskumar et al., 1995; George y Eapen, 1994; Tiwari et al., 1998).

En este trabajo, la mejor respuesta (68 a 87% de callos morfogénicos) fue obtenida a partir de explantes de hoja en presencia de 2,4-D (1-2 mg l<sup>-1</sup>) y kin (0.1-0.15 mg l<sup>-1</sup>) (Tabla 1), resultados similares a los reportados por George y Eapen (1994) quienes registraron una respuesta mas favorable al utilizar 2,4-D comparativamente con ANA y picloram en la inducción a la embriogénesis somática de Cajanus cajan.

En V. edulis ssp. procera, picloram promovió una pobre respuesta de callos no morfogénicos en los explantes probados (Tabla 1); en contraste, Dineshkumar et al (1995) reportaron que esta análoga de auxina fue una potente inductora de callogénesis y embriogénesis somática en Cicer arietinum.

Como los explantes provenientes de yemas apicales y peciolas mostraron un bajo porcentaje de desarrollo de callos morfogénicos (Tabla 1), estos dos explantes fueron eliminados de los experimentos posteriores.

Después de 12 semanas, los callos morfogénicos desarrollados de explantes de hoja en 2,4-D (1-2 mg l<sup>-1</sup>) y kin (0.1-0.15 mg l<sup>-1</sup>), fueron transferidos al medio MS liquido o semisólido sin reguladores del crecimiento (Fig. 3). Cuatro semanas mas tarde fue registrado su crecimiento, resumiendose en la siguiente tabla:

Tabla 2. Efecto de 2,4-D y cinetina en el crecimiento de los callos y cultivos en suspensión de *V. edulis ssp. procera*.

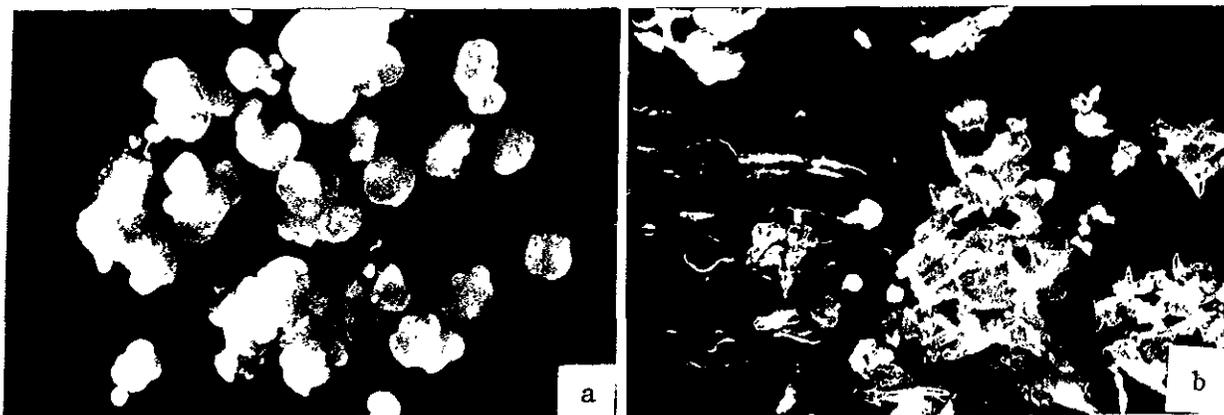
Reguladores (mg l <sup>-1</sup> )		Callos	Peso fresco (g) Cultivos en suspensión
2,4-D	cinetina		
1.0	0.10	1.33±0.11 A	1.19±0.14 A
1.0	0.15	1.48±0.28 B	1.93±0.25 B
1.5	0.10	1.94±0.12 C	1.98±0.10 B
1.5	0.15	2.56±0.31 D	2.68±0.28 C
2.0	0.10	3.10±0.30 F	2.99±0.12 D
2.0	0.15	3.00±0.11 E	3.02±0.13 D

16 semanas después de cultivo. Los datos están basados en 50 explantes por tratamiento  $\pm$  SD. Los tratamientos para cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a Tukey.

Al comparar el peso fresco de los callos y cultivos en suspensión se observó que estos fueron similares, es decir, estadísticamente no hubo diferencias significativas. Cuando se compararon los diferentes tratamientos en donde se emplearon tres concentraciones de 2,4-D y dos concentraciones de kin, se observó que el peso fresco de los callos y cultivos en suspensión se incrementó proporcionalmente con la concentración de 2,4-D en el medio de inducción, con una mejor respuesta al utilizar 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.10-0.15 mg l<sup>-1</sup> de kin (Tabla 2).

Después de 2-4 semanas de subcultivo en medios líquido y semisólido sin reguladores del crecimiento, brotes simples y múltiples, así como embriones somáticos fueron distinguidos claramente por observación bajo un microscopio estereoscópico (magnificación 20X) (figs. 4e y 5a y 5b).

Los cultivos semisólidos y líquidos desarrollaron agregados celulares verdes y estructuras globulares. Estas estructuras fueron observadas solamente en la superficie del callo (figs. 4d y 4e), mientras que en los cultivos en suspensión estuvieron distribuidas en todo el tejido (fig. 5 a). Los cultivos fueron asincrónicos, por lo cual diferentes estados de la embriogénesis somática como globular, forma acorazonada y torpedo fueron observados en el mismo cultivo (figs. 5a, 5b, 6a y 6b). Los cultivos asincrónicos han sido reportados en muchas especies como en *Trifolium repens* (Maheswaren y Willians, 1985). La asincronía en el desarrollo de los embriones (estado fisiológico, tamaño o morfología) es una de las causas principales que dificultan el establecimiento de sistemas embriogénicos a gran escala, ya que muchos embriones maduros están unidos a un suspensor y mezclados con embriones en etapas mas tempranas, provocando que la separación y selección de embriones individuales sea una labor muy intensa (Gupta et al., 1993); por lo que trabajos posteriores en torno al establecimiento de cultivos sincrónicos y mejoramiento en la calidad de los embriones serán indispensables si se desea aplicar esta tecnología a nivel masivo.



**Figura 5. Panorama de los cultivos en suspensión asincrónicos de *V. edulis* ssp. *procera*; en estos se observan diversos estadios de la morfogénesis a las 14 (5a) y 16 (5b) semanas de cultivo *in vitro*.**

## VII.2 Regeneración de *V. edulis ssp. procera* vía embriogénesis somática y organogénesis.

Los embriones somáticos fueron transferidos al medio MS semisólido con o sin reguladores del crecimiento para su germinación y desarrollo a plántulas. Al reducir las auxinas o eliminar los reguladores del crecimiento de los medios de cultivo, el proceso de desarrollo embriogénico de *V. edulis ssp. procera* continuó (figs. 6a- 6d), resultados que han sido registrados en otras especies bajo condiciones similares como en *Cajanus cajan* (George y Eapen, 1994), *Bacopa minniera* (Tiwari et al., 1998) y *Avena sativa* (Gless et al., 1998).

Los brotes unipolares aislados de cultivos en suspensión y callos (Fig.6) fueron transferidos a un medio MS adicionado con diferentes niveles de kin (0-2.0 mg l<sup>-1</sup>) y ANA (0.5 mg l<sup>-1</sup>) (fig.6f). La figura 4e muestra el desarrollo de un brote individual adherido a un callo y la figura 6e muestra el aspecto de un brote múltiple en desarrollo.

El número de brotes unipolares (simples/múltiples) y embriones somáticos promedio de los tratamientos, formados por gramo de peso fresco en medio líquido (cultivos en suspensión) y en medio semisólido (callos) fueron evaluados cuatro semanas después y se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 3. Número embriones somáticos y brotes derivados de explantes de hoja por gramo de peso fresco de *V. edulis ssp. procera* cultivados en medios semisólidos y líquidos.**

Semisólido (por gramo de peso fresco)		Líquido (por gramo de peso fresco)	
Embriones	Brotes	Embriones	Brotes
15.7±3.1	9.6±3.8	75.1±7.1	18.9±3.7

Los datos están basados en el promedio de 75 explantes de los tratamientos ± SD

Cuatro semanas después se evaluó la eficiencia de la regeneración de *V. edulis ssp. procera* expresada como la conversión de embriones y brotes en plantas y se resume en la siguiente tabla:

Tabla 4. Eficiencia de regeneración de *V. edulis ssp. procera*. Porcentaje de plantas formadas de embriones somáticos y brotes.

	cinetina/ANA (mg/l <sup>1</sup> )					
	líquido			semisólido		
	0/0	1.5/0.25	2.0/0.25	0/0	1.5/0.25	2.0/0.25
Embriones/pfg	75.1±7.1	74.4±6.1	76.5±5.9	15.7±3.1	17.1±1.4	15.9±3.5
%embriones for mando plantas	36	57	50	35	45	57
Plantas/pfg	27.6±4.7	43±3.0	38±6.4	5.6±1.5	7.8±1.3	9.1±1.7
	0/0.5	1.5/0.5	2.0/0.5	0/0.5	1.5/0.5	2.0/0.5
Brotes/pfg	18.9±3.7	22.5±4.6	22.4±4.5	9.6±3.8	9.9±3.4	10.2±3.9
%brotes formando plantas	80	75	75	70	80	85
Plantas/pfg	15.1±	16.9±	16.8±	6.7±	7.9±	8.6±

Pfg-peso fresco en gramos

Al comparar las respuestas en la formación de embriones somáticos y brotes adventicios en los dos medios de cultivo (semisólido/líquido), se observó que hubo diferencias significativas entre los medios utilizados; el número de embriones originados en medios líquidos fue 4.7 veces mayor y el número de brotes fue 1.9 mayor que aquellos formados en cultivos semisólidos respectivamente (tabla3). Se ha establecido que el cultivo en medio líquido favorece el contacto de la masa celular totalmente con los reguladores del crecimiento, promoviendo la inducción de embriones somáticos y brotes adventicios. En este trabajo, los cultivos en suspensión formaron aproximadamente 5 veces más embriones somáticos que los cultivos derivados de callos y un promedio de 75 embriones somáticos y 35 plantas por gramo de peso fresco de callo fueron obtenidos de explantes de hoja de *V. edulis ssp. procera* (Tabla 3 y 4). Cuando se compararon los resultados de los tratamientos al emplear o no reguladores del crecimiento en la formación de embriones y su conversión a plantas se observó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, es decir los embriones somáticos de *V. edulis ssp. procera* no requieren de reguladores del crecimiento para la germinación y posterior desarrollo a plántulas, no obstante, se observó que las plántulas provenientes de los medios que contenían Kin-ANA crecieron más vigorosas (datos no registrados).

Al comparar los resultados de los tratamientos al usar dos concentraciones de kin en combinación con ANA en la formación de plantas completas a partir de brotes unipolares, se observó que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones empleadas.

Como se muestra en la tabla 4, del 70 a 85% de los brotes individuales o múltiples derivados de cultivos en suspensión y callos desarrollaron en plántulas, mientras que en presencia de kin y ANA de 35 a 57% de los embriones derivados de cultivos en suspensión y de callo germinaron y formaron plántulas. El porcentaje de embriones que se desarrollaron a plántulas fue mas bajo que el porcentaje de brotes unipolares que formaron plántulas (Tabla 4); estos resultados posiblemente pudieron deberse a varios factores como la asincronia de los cultivos mencionada anteriormente y por otro lado a que muchos embriones no se encontraban completamente maduros . Se ha demostrado que los estados fisiológico y morfológico de los embriones son muy importantes para la maduración, germinación y su conversión a plántulas vigorosas; por ejemplo, el tamaño acorazonado en la fase temprana del embrión es importante para el desarrollo del estado cotiledonar, embriones más pequeños en estado temprano, a menudo no desarrollan embriones cotiledonarios o muchos embriones del estado temprano desarrollarán acorazonados pequeños y esto eventualmente conducirá a la formación de embriones cotiledonarios anormales o incluso a no continuar el desarrollo (Gupta et al., 1993). La mayoría de los embriones somáticos que derivaron plántulas fueron morfológicamente normales.

Estudios previos con *V. officinalis*, *V. wallichii* y *V. officinalis* var. *diliana* demostraron que los explantes provenientes de tallo, peciolo y hoja tratados con ANA sola o en combinación con kin indujeron la regeneración de plantas en cultivos de callos y suspensión (Mathur et al., 1988; Mathur y Ahuja 1991; Mathur, 1992); sin embargo, tratamientos similares con explantes de *V. edulis* ssp. *procera* no desarrollaron callos morfogénicos apropiados, promoviendo principalmente rizogénesis (Tabla 1). Mientras Mathur y Ahuja (1991) y Mathur (1992) mostraron que el número de plántulas regeneradas a partir de callos y cultivos en suspensión derivados de peciolo fueron similares, nuestros resultados mostraron que el número de brotes organogénicos derivados de cultivos en suspensión fue casi dos veces mas alto que aquellos derivados de callos (Tabla 3; además, el número de brotes por gramo de peso fresco obtenidos de cultivos en suspensión de *V. edulis* ssp. *procera* fue similar al reportado por Mathur (1992) en *V. wallichii*.

En general, la mejor respuesta organogénica y embriogénica de *V. edulis* ssp. *procera* fue obtenida en presencia de 2,4-D en combinación con kin. Nuestros resultados difieren con

los reportados por Mathur y Ahuja (1991) con *V. wallichii*, quienes reportaron la inducción de callos moderadamente en medios que contenían 1.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D solo o en combinación con 0.2-1.0 mg l<sup>-1</sup> de kin y en medios que contenían 2.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D con 2.0 mg l<sup>-1</sup> de kin. Estos resultados establecen las respuestas diferentes en especies del género *Valeriana* para los mismos niveles y combinaciones de reguladores del crecimiento y enfatizan la necesidad de optimizar el procedimiento de regeneración para cada especie y variedad. Además corroboran los reportes que han demostrado que el potencial y eficiencia de regeneración de los sistemas *in vitro* son genotipo-dependientes (Gless et al., 1998).



*Figura 6. Aspectos morfológicos de la embriogénesis somática y organogénesis indirecta de V. edulis ssp. procera.*

**Figura 6. Aspectos morfológicos de la embriogénesis somática y organogénesis indirecta de *V. edulis* ssp. *procera*.**

- 6a. *Embriones somáticos en estados globular y precotiledonar, inducidos a partir de explantes de hoja, encontrándose libremente en la superficie de los callos o en cultivos en suspensión, sin observarse la presencia de una estructura como-suspensor.*
- 6b. *Embrión hipolar con una clara diferencia entre el futuro brote con una coloración verdosa (región superior) y la futura radícula de color pardo (región inferior).*
- 6c. *Germinación de embriones somáticos con desarrollo de sistemas de raíz y brote bien definidos, en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.*
- 6d. *Plántula de *V. edulis* ssp. *procera*, obtenida a partir de la germinación de un embrión somático con raíz y brote normales.*
- 6e. *Apariencia de los brotes múltiples en desarrollo, inducidos bajo las mismas condiciones experimentales de los embriones somáticos.*
- 6f. *Aspecto de los brotes (simples y múltiples) individualizados para su enraizamiento; similar apariencia de las plántulas generadas vía embriogénesis somática.*
- 6g-h. *Plantas de *V. edulis* ssp. *procera* crecidas en invernadero después de seis meses, con apariencia normal y con desarrollo de un rizoma subterráneo, los cuales al secarlos se percibía el olor característico de los valepotriatos y valerianatos.*

*La embriogénesis somática y la organogénesis son dos caminos para la propagación de plantas a través del cultivo de tejidos vegetales. Las diferentes condiciones de cultivo requeridas para la organogénesis y embriogénesis somática aun no están delimitadas debido a que existen muy pocos ejemplos donde ocurren ambos procesos (Tabei et al., 1991); no obstante, al parecer la inducción de brotes adventicios o embriones somáticos en el medio de cultivo depende de factores como el tipo de regulador del crecimiento y su concentración en el medio de cultivo (Barwale et al., 1986; Tabei et al., 1991; Charrière y Hahne, 1998) o del tejido vegetal usado como explante (Tabei et al., 1991). La aparición simultánea de ambas vías bajo las mismas condiciones experimentales es raro, debido a que los requerimientos para la regeneración a través de cada ruta son diferentes y aún no están bien definidas (Tabei et al., 1991; Marconi y Radice, 1997). En este trabajo, ambos procesos ocurrieron bajo las mismas condiciones experimentales para explantes de hoja de *V. edulis* ssp. *procera*, resultados similares a los reportados por Marconi y Radice (1997), quienes obtuvieron brotes adventicios y embriones somáticos en las mismas condiciones, a partir del cultivo de explantes de hoja de *Codiaeum variegatum*; en contraste, Tabei et al (1991) reportaron que la regulación en la formación de brotes adventicios o embriones somáticos dependía del tipo de explante, el regulador y su concentración en el medio de cultivo en *Cucumis melo* y George y Eapen (1994) quienes mostraron el potencial organogénico o embriogénico en varios explantes de *Cajanus cajan*, utilizando diferentes reguladores y concentraciones.*

*Las plantas de *V. edulis* ssp. *procera* obtenidas fueron establecidas en invernadero y la mayoría presentaron características fenotípicas similares a las plantas originales (figuras 6 g y 6 h), (datos no registrados).*

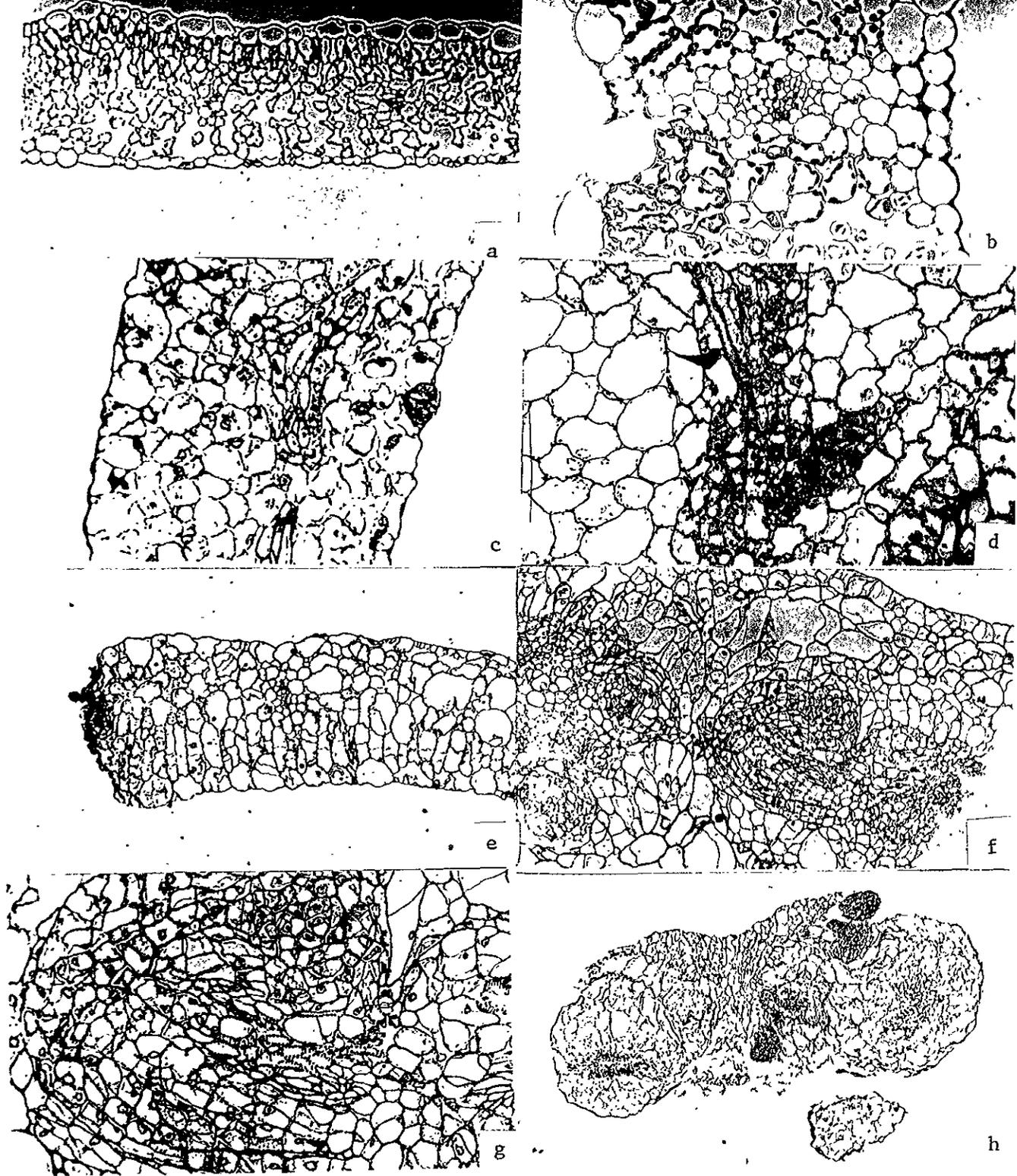
*Este es el primer reporte de la regeneración de *Valeriana edulis* ssp. *procera* vía embriogénesis somática y organogénesis indirecta a partir de callos y cultivos en suspensión derivados de hoja. La embriogénesis somática y la organogénesis indirecta representan una importante estrategia para la propagación masiva y conservación de germoplasma de esta planta mexicana en vías de extinción*

Después de cuatro semanas de cultivo *in vitro* se observó un proceso de vascularización "de novo", iniciándose a partir del centro de la zona de meristemización (figs. 7g y 8f); estos resultados confirman los reportes de Vasil y Vasil (1982), quienes registraron la presencia de una extensa red vascular durante la formación de callos embriogénicos de *Pennisetum americanum* y Michaux-Ferrière et al (1992) quienes reportaron la presencia de tejido parenquimatoso abundantemente vascularizado al estudiar la embriogénesis somática indirecta de *Hevea brasilensis*.

A las seis semanas de cultivo *in vitro* se distinguió claramente la formación de callos, constituidos por células parenquimatosas y clusters de células tipo meristemático (fig. 7h), observaciones similares a las reportadas por Berthouly y Michaux-Ferrière (1996), quienes confirmaron la presencia de estos tipos celulares cuando los callos emergieron de explantes de *Coffea canephora*. Dos semanas más tarde se registró la permanencia de la red vascular antes mencionada, las células de tipo parenquimático y meristemático (fig. 8g), además de observar que los callos eran heterogéneos, es decir constituidos por diversas células con inclusiones no identificadas (fig. 8h)

De acuerdo con la clasificación sobre tipos de callos propuesta por Schumann (1987) y Hoffmann et al., (1990) citados por Schumann et al (1995), basándose en su estructura interna, morfología y respuesta morfogenética, *V. edulis* ssp. *procera* formó callos con regiones de tipo I, caracterizados por presentar formaciones globulares, consistente de células pequeñas isodiamétricas con zonas compactas y una extensa red vascular (fig. 7h, 9c) y regiones tipo II, con formación de tejidos más dispersos de consistencia friable, generalmente de color paja (fig. 4c), ambas con potencial morfogénico.

Cuando se presentan los procesos de embriogénesis somática y organogénesis en el mismo callo, es difícil distinguir los estados tempranos de desarrollo de embriones y brotes unipolares (Schumann et al., 1995).

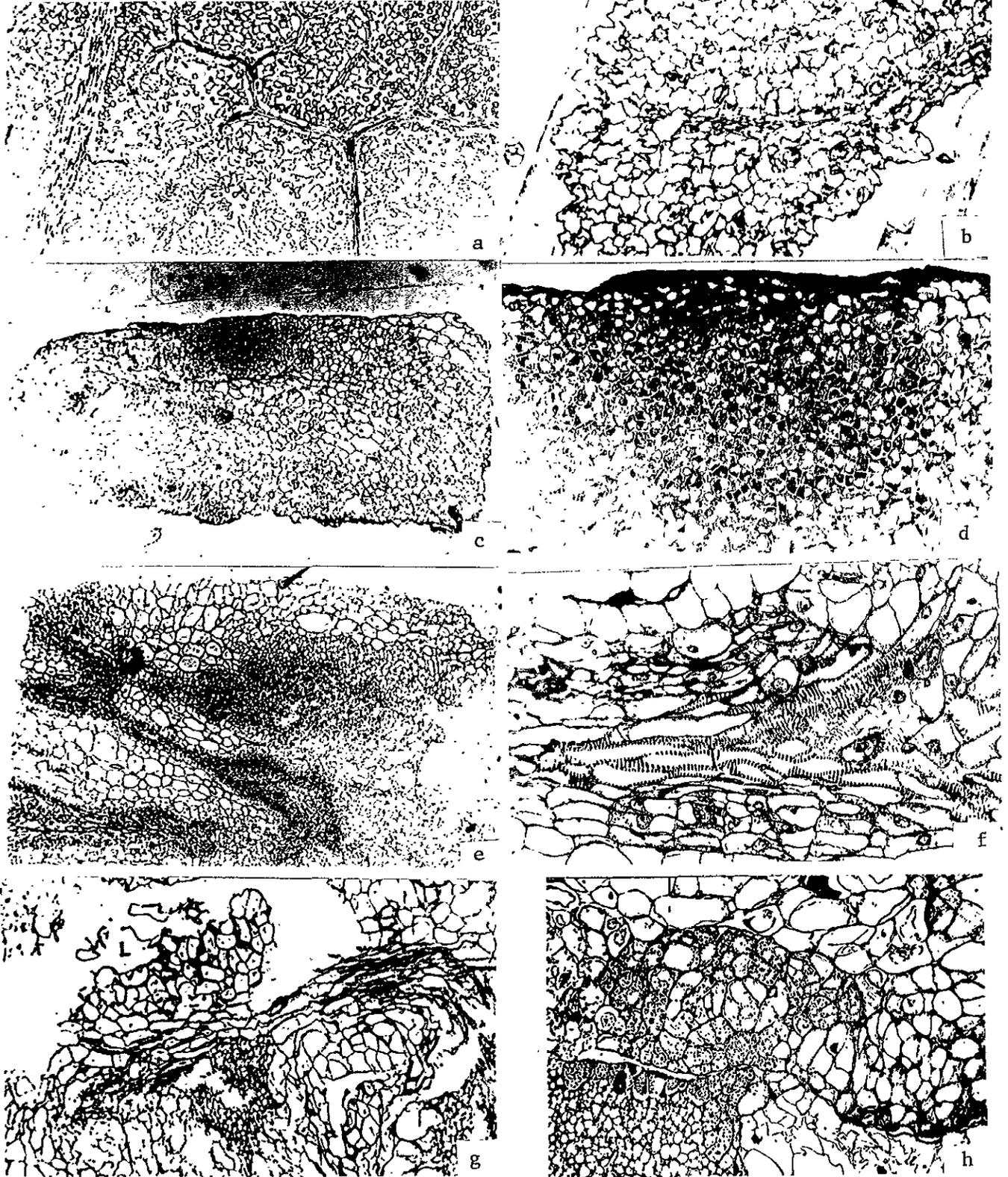


**Figura 7. Etapa inicial de la dediferenciación celular y formación del callo, a partir de explantes de hoja de *V. edulis* ssp. *procera***

**Figura 7. Etapa inicial de la dediferenciación celular y formación del callo, a partir de explantes de hoja de *V. edulis* ssp. *procera*, bajo condiciones experimentales (2.0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.15mg/l<sup>-1</sup> de kin).**

- 7a. Sección transversal de un segmento de hoja, proveniente de una plántula de 40 días de *V. edulis* ssp. *procera* en la fase inicial del experimento (control); (e) epidermis adaxial, (pa) parénquima en empalizada, (pe) parénquima esponjoso, (ea) epidermis abaxial (magnificación 40X).
- 7b. Detalle de una sección transversal de hoja inicial mostrando claramente la apariencia y disposición de los haces vasculares (hv) y la abundancia de plastidios (pl), principalmente en la zona adaxial (100x).
- 7c. Sección transversal de un segmento de hoja a los 6 días de cultivo *in vitro*, mostrando el inicio de la actividad mitótica (dediferenciación celular), a nivel de las células perivasculares (40X).
- 7d. Detalle de los centros de división celular después de 8 días de cultivo, mostrando los haces vasculares (hv) y las células en división (cd) con apariencia meristemática (sección oblicua 40X).
- 7e. Sección transversal de hoja a los 14 días (dos semanas), en donde se observan algunas regiones del inicio de la división celular, generalmente a la orilla del corte del explante, pero no siempre; además, nótese que la hoja ya no conserva su estructura interna típica. La hoja adquiere una coloración amarillenta, posiblemente por la disminución de plastidios (25X).
- 7f. Sección transversal de un segmento de hoja después de 28 días (cuatro semanas) de cultivo, mostrando como la actividad mitótica se empieza a extender hacia la zona adaxial y abaxial de la hoja, la estructura interna a perdido completamente su apariencia típica (25X).

- 7g. *Detalle de la zona de intensa división celular (cd), iniciando una "re-vascularización" (haces vasculares hv) a los 28 días de cultivo in vitro (64X).*
- 7h. *Emergencia de un callo de V. edulis ssp. procera a partir de un explante de hoja después de 6 semanas de cultivo in vitro, formado por células de tipo meristemático (cm) y células parenquimáticas (cp) (10 X).*



**Figura 8.** Cambios de la estructura interna en disposición paradermal (figs.8a-f), ocurridos desde la fase inicial del experimento hasta la formación de un callo

**Figura 8. Cambios de la estructura interna en disposición paradermal (figs.8a-f), ocurridos desde la fase inicial del experimento hasta la formación de un callo, a partir de un explante de hoja de *V. edulis* ssp *procera*.**

- 8a. *Panorama general de la estructura interna típica de un segmento de hoja en el momento 0 del experimento; nervaduras primaria y secundaria formadas por los haces vasculares (hv) y disposición de las células de parénquima (cp) ( 25X).*
- 8b. *Inicio de la división celular, a partir de las células de parénquima (cp) que rodean los haces vasculares, después de 6 días de cultivo in vitro (16X).*
- 8c. *Extensión de la dediferenciación celular, principalmente a partir de la orilla del corte del explante después de 14 días (12.8 X).*
- 8d. *Detalle de las células en activa división mitótica a los 14 días de cultivo, con las características típicas de las células meristemáticas (nucleo prominente, citoplasma denso, paredes delgadas) (64X).*
- 8e. *Expansión de la dediferenciación celular casi totalmente en la lamina del segmento de hoja, modificando su apariencia interna con respecto al segmento control después de 4 semanas (10X).*
- 8f. *Detalle de la vascularización "de novo" (haces vasculares hv) durante el proceso de dediferenciación celular y formación del callo después de 4 semanas de cultivo (100 X).*
- 8g-h. *Después de 8 semanas del cultivo fueron observados una extensa red constituida por haces vasculares (hv), así como células de parénquima (cp) y células de tipo meristemático (cm) ( fig.8g 25X); además, algunas zonas del callo presentaban células de características heterogéneas, algunas con una gran cantidad de inclusiones, aún no identificadas (fig. 8h 40X).*

### *VII.3b Desarrollo de embriones somáticos y brotes unipolares.*

*Los análisis histológicos documentaron la presencia del proceso de embriogénesis somática y organogénesis en los callos de V. edulis ssp. procera (figs. 9 a-i. y 10 a-i).*

*Pequeños clusters celulares fueron observados después de 6-8 semanas de cultivo, principalmente en las regiones friables de los callos (figs. 9a-c). Estos grupos generalmente estuvieron situados en la superficie de los callos (fig. 9a). La presencia de grupos discretos de dos o pocas células sugieren que los embriones somáticos en desarrollo posiblemente se hayan originado de células únicas (fig. 9b); observaciones similares previas en estudios de la citodiferenciación durante el desarrollo de callos embriogénicos de Zea mays (Franz y Schel, 1991) y durante el estudio de la ontogenesis de embriones somáticos en Hevea brasiliensis (Michaux-Ferrière et al., 1992) sugirieron un posible origen unicelular.*

*Grupos de células proembriogénicas han sido reportadas tener origen unicelular, las cuales al parecer experimentan un evento de redeterminación seguido por una gran división (Williams y Maheswaren, 1986); en muchos reportes la pregunta del origen unicelular versus pluricelular es discutido. Ambos conceptos están soportados por evidencias histológicas; además, se ha registrado que al parecer las condiciones de cultivo influyen el modo uni o pluricelular de la embriogénesis. Esto es soportado por observaciones en callos de Eloi (Schwendimun et al., 1988, citado por Schumann et al., 1995) y Hevea (Michaux-Ferrière et al., 1992) en los cuales los dos orígenes embriogénicos fueron inducidos.*

*En todos los sistemas donde se ha observado la formación de embriones somáticos, las células que los originan parecen tener rasgos comunes que son característicos de células meristemáticas en activa división, observaciones que fueron confirmadas en este trabajo (figs. 9c y 9d);*

*Las características meristemáticas y la gran actividad de división de estas células, las hacen análogas a las células embriogénicas observadas durante el desarrollo del cigoto en el embrión globular (Jones and Rost, 1989).*

Los proembrioides con dos, cuatro o más células continuaron dividiéndose (fig. 9c) para formar proembrioides globulares (figs. 9c y 9d). Algunas observaciones histológicas confirmaron la presencia de una protodermis (fig. 9d). El aislamiento de las células embriogénicas ha sido reportado en trabajos como los de Ho y Vasil (1983) y Maheswaran y Williams (1985); sin embargo, como se ha señalado no es claro si el aislamiento del resto de células vecinas sea un prerrequisito o un efecto secundario en la ocurrencia de la embriogénesis.

Los proembrioides y embrioides se encontraban libremente en la superficie del callo, sin observar en ningún estado la presencia de una estructura como-suspensor (figs. 9e y 9f).

El posterior desarrollo de proembrioides globulares (figs. 9c y 9d) dió origen a estados similares a la embriogénesis cigótica después de 12 semanas de cultivo *in vitro* (figs. 9e-i). Debido a que los cultivos no fueron sincrónicos, estados globulares tempranos pudieron ser vistos con estados más tardíos de la embriogénesis en semanas posteriores.

Un patrón general de la estructura y desarrollo de los embriones somáticos han sido descritos en trabajos como los de Dubois et al (1991), Dhanalakshmi y Lakshmanan (1992) y Michaux-Ferrière et al (1992).

A través de las observaciones histológicas se confirmaron en este trabajo, las características distintivas de un embrión somático, como un individuo con estructura bipolar (formación de meristemo brote-raíz (fig. 9f)), con un sistema provascular cerrado (fig. 9g) y aislado del tejido parental (fig. 9i) (Williams y Maheswaran, 1986; Escalant et al., 1984; Schumann et al., 1995).

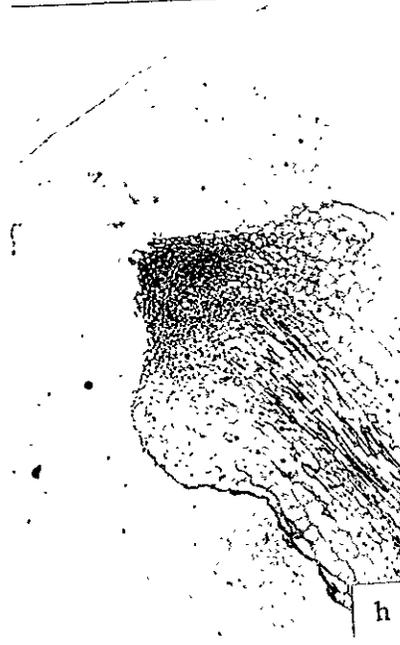
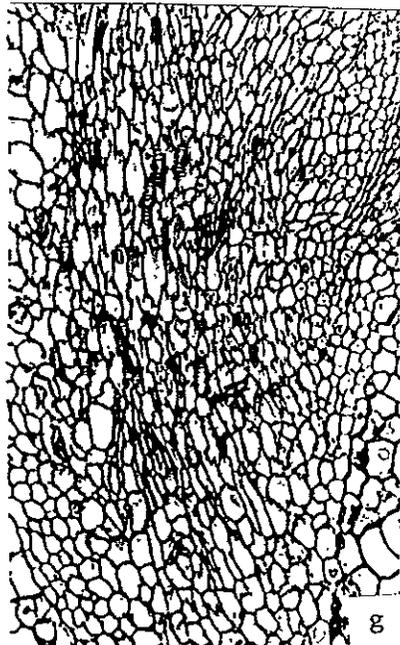
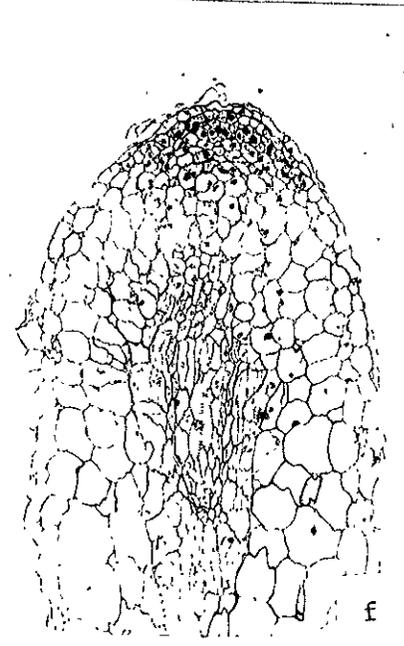
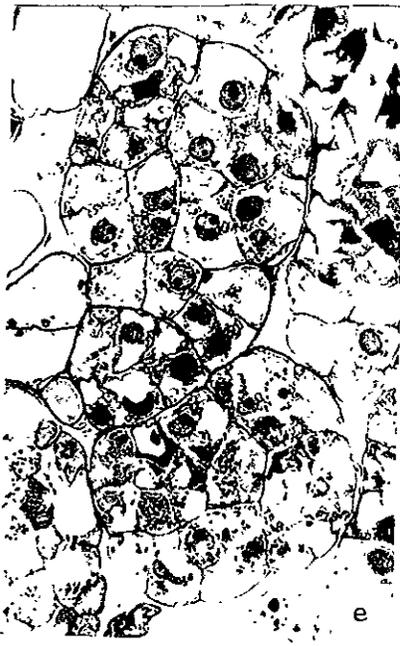
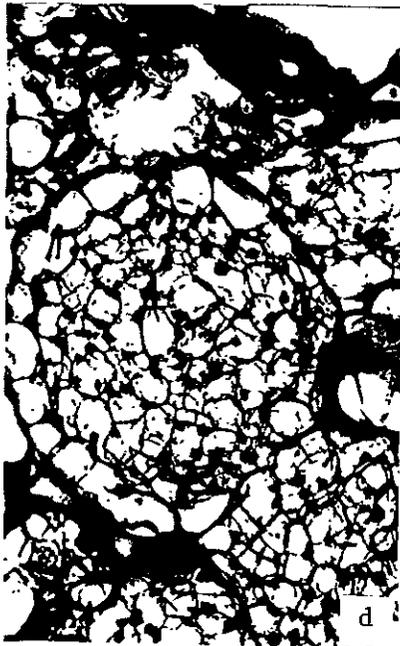
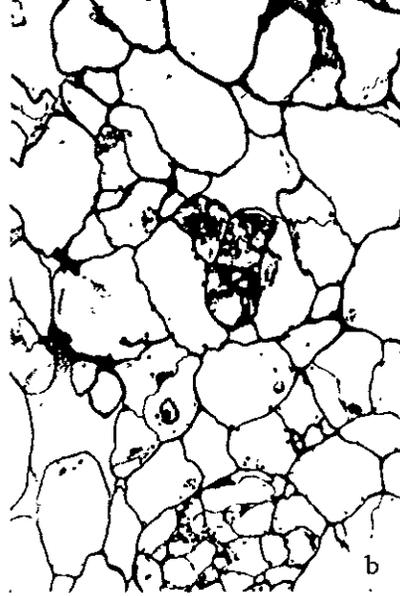
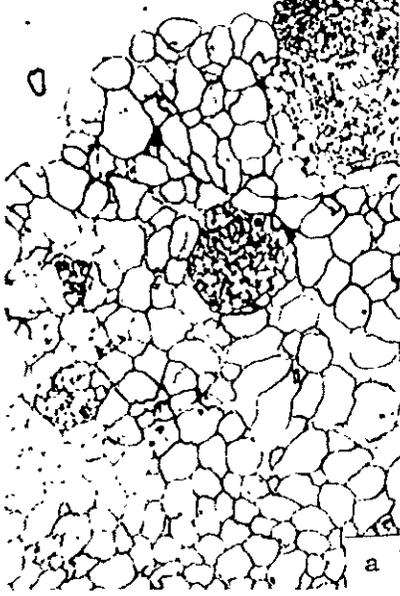


Figura. 9.

**Figura. 9. Algunas etapas del desarrollo de los embriones somáticos de *V. edulis* ssp. *procera*.**

- 9a. Sección transversal de un callo, mostrando la formación de clusters de células meristemáticas (cm), principalmente en la periferia, después de 6-8 semanas de cultivo *in vitro* (16X).
- 9b. Observación de pequeños clusters celulares tipo meristemático (cm), de 2, 4 o más células, sugiriendo un origen unicelular (40X).
- 9c. Zona superficial de un callo mostrando una región embriogénica después de 12 semanas de cultivo *in vitro* (25 X).
- 9d. Observación de un proembrión aislado por la presencia de una protodermis (pd) (40X).
- 9e. Embriode bipolar en proceso de desarrollo en ausencia de reguladores del crecimiento, a las 12-14 semanas de cultivo. Nótese la diferencia en organización celular entre el embriode (em) y el callo (ca).
- 9f. Embriode bipolar tardío mostrando la presencia del meristemo apical del brote (ma), sistema vascular cerrado (sv) y epidermis (ep)(40X).
- 9g. Detalle de un embriode mostrando la presencia de haces vasculares (hv) (64X).
- 9h. Embrión somático precotiledonar en desarrollo, con un domo apical del brote formado por células meristemáticas (da) entre los futuros cotiledones y desarrollo de sistema vascular (sv) (40X).
- 9i. Embrión somático con cotiledones bien desarrollados (co) después de 14-16 semanas (40X).

*En contraste, grupos de células con división celular activa, localizadas en las zonas del callo de aspecto mas o menos compacto fueron observadas despues de 8-10 semanas de cultivo in vitro. (fig. 10a).*

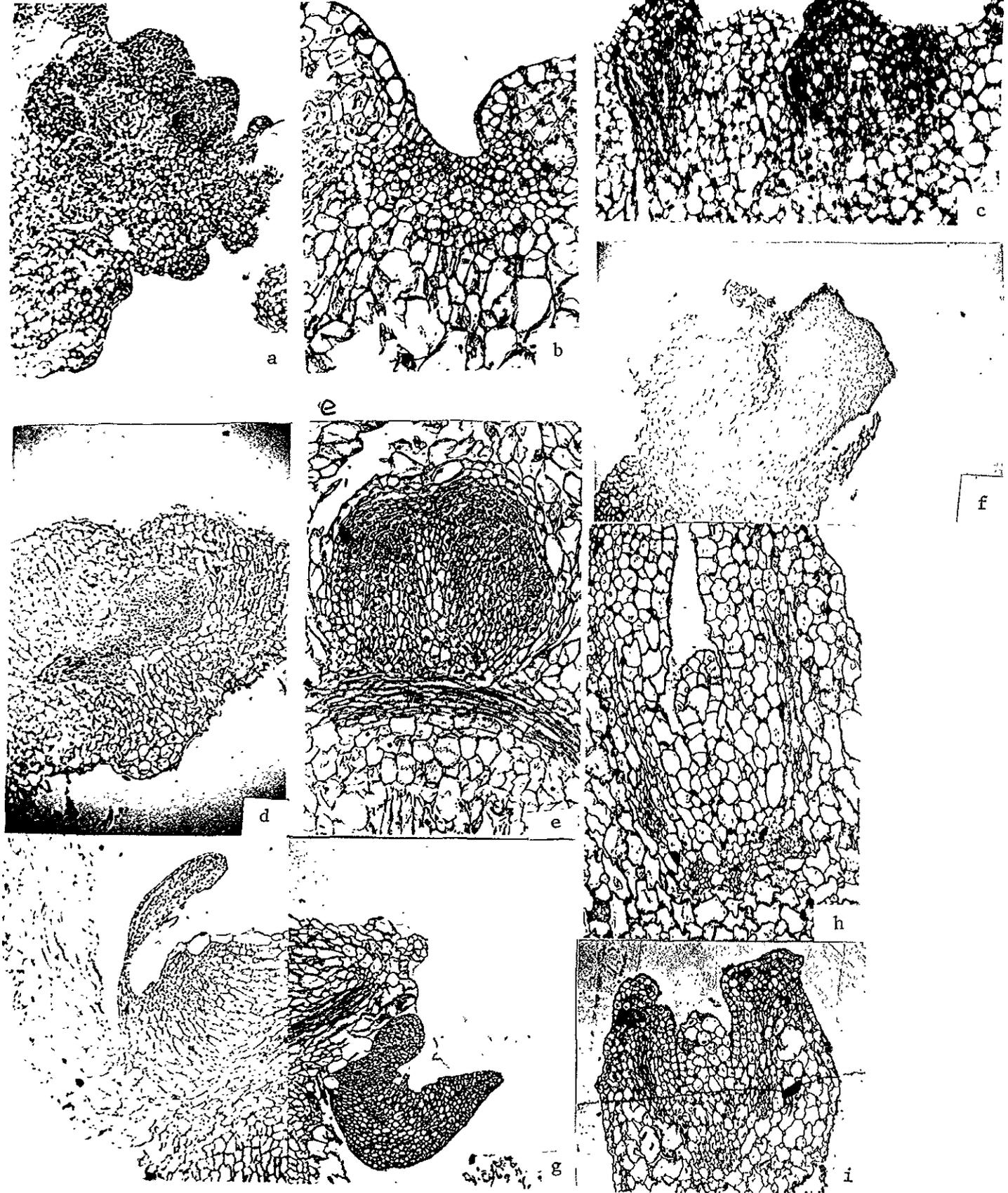
*Observaciones histológicas revelaron dos patrones de formación de los brotes adventicios: a partir de las zonas cercanas a la superficie del callo (fig. 10b), o formados muy por debajo de la superficie del callo, emergiendo a la superficie durante el proceso de diferenciación (fig. 10c y 10d).*

*El primer patrón de iniciación de meristemoides, ha sido reportado principalmente en morfogénesis directa (Malik y Saxena, 1992), mientras que el segundo al parecer es común en morfogénesis indirecta (Schumann et al., 1995).*

*Es evidente que los meristemoides originados de novo de tejido calloso proliferando tengan origen multicelular (D' Amato 1985), observaciones que aparentemente fueron confirmadas en este trabajo.*

*Un origen multicelular produjo meristemoides fusionados con el tejido materno sobre una amplia área del polo radicular (fig.10f). Los brotes adventicios unipolares, conectados con el tejido parental a través del sistema vascular (figs. 10 e-h) han sido reportadas en varias especies como en Phaseolus ssp. (Malik y Saxena, 1992) y Bacopa monniera (Tiwari et al., 1998).*

*Los brotes unipolares en desarrollo mostraron una epidermis bien desarrollada (fig. 10 i). El análisis histológico de una zona del callo organogénico mostró la presencia de brotes adventicios unipolares simples o múltiples conectados por un sistema de haces vasculares (figs. 10f y 10g).*



*Figura 10. Algunas etapas del desarrollo de brotes adventicios unipolares vía organogénesis indirecta.*

**Figura 10. Algunas etapas del proceso de desarrollo de los brotes adventicios unipolares, vía organogénesis indirecta**

- 10a.** *Sección longitudinal del callo mostrando una región organogénica constituida por células de tipo meristemático (cm) y células de parénquima (cp), después de 10 semanas de cultivo (25X).*
- 10b.** *Formación del brote a partir de grupos de células meristemáticas (cm) de la superficie del callo (40X).*
- 10c.** *Desarrollo típico de brotes unipolares, originados muy por debajo de la superficie del callo (40X).*
- 10d.** *Sección transversal de callo, mostrando el desarrollo de un brote adventicio unipolar (bu), originándose en la región interna del callo (25X).*
- 10e.** *Detalle de un brote adventicio unipolar en desarrollo (bu), mostrando su unión al callo por el sistema vascular (haces vasculares hv) (64X).*
- 10f.** *Brote unipolar (bu) adherido al callo (ca) por el polo "radicular" (25X).*
- 10g-h.** *Brotos unipolares múltiples en desarrollo (bm), conectados al tejido parental por el sistema vascular (hv) (g-40X) (h-64X).*
- 10i.** *brotos unipolares con una epidermis (e) bien desarrollada (25X).*

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

*Con base a los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones.*

*El potencial en la inducción de callos morfogénicos de V. edulis ssp. procera, depende del tipo de explante y de los reguladores del crecimiento empleados en el medio de cultivo.*

*Los explantes de hoja provenientes de plántulas de V. edulis ssp. procera, germinadas in vitro de 40-45 días, son los mas apropiados para la inducción de callos morfogénicos.*

*Bajo las mismas condiciones experimentales, es posible la inducción de embriones somáticos y brotes unipolares.*

*La mejor respuesta organogénica y embriogénica de V. edulis ssp. procera fue obtenida en presencia de 2,4-D (2.0 mg l<sup>-1</sup>) en combinación con kin (0.15 mg l<sup>-1</sup>).*

*La embriogénesis somática ofrece una mejor alternativa comparativamente con la organogénesis indirecta para la propagación masiva de esta subespecie.*

*Los análisis histológicos documentaron la presencia del proceso de embriogénesis somática y organogénesis en los callos de V. edulis ssp. procera*

*Mediante observaciones histológicas se pueden dilucidar el posible origen y desarrollo ontogénico de embriones somáticos y brotes adventicios unipolares de V. edulis ssp. procera.*

*Las aportaciones y perspectivas de este trabajo son las siguientes:*

- 1.- Se estableció un sistema de regeneración masiva de plantas de V. edulis ssp. procera, por medio de procedimientos de cultivo de tejidos vegetales.*
- 2.- Se demostró la capacidad morfogénica de V. edulis ssp. procera por vías que no se habían reportado anteriormente, la embriogénesis somática y la organogénesis indirecta.*
- 3.- Se contribuyó en el conocimiento de la morfogénesis experimental de esta subespecie, ya que hasta donde sabemos es el primer reporte sobre la ontogenesis de embriones somáticos y brotes adventicios unipolares.*

*El trabajo presentó factores críticos (si se desea establecer esta tecnología para propagación masiva con otros fines) que han sido reportados para otras especies, estos son: la asincronia de los cultivos, la falta de maduración de muchos embriones y la falta de vigor de muchos embriones germinados, originando que no se desarrollaran a nivel de plántula y/o planta adulta. Además, la ocurrencia de la embriogénesis somática y organogénesis en el mismo cultivo provocó que el manejo de los cultivos fuera una labor complicada, ya que las condiciones de desarrollo de embriones y unipolares son diferentes. Lo anterior, lleva a plantear la necesidad de continuar con experimentos en donde se manejen diferentes condiciones de cultivos tratando de establecer patrones de expresión para uno u otro proceso.*

*Por otro lado, se ha señalado que la introducción de una especie a cultivo involucra una serie de modificaciones fenotípicas o genotípicas que frecuentemente se dan en ambientes artificiales para la planta, por lo que es importante cotejar la persistencia de sus principios activos a través del proceso; además, son pocos los trabajos que se han realizado comparando el contenido de los metabolitos secundarios de interés farmacológico, de plantas provenientes de tecnologías de cultivo de tejidos vegetales y plantas silvestres en sus diferentes etapas de desarrollo, por lo que sería importante continuar el trabajo, evaluando el contenido de valepotriatos en plantas de V. edulis ssp. procera a dos niveles: a) relacionando la citodiferenciación y el contenido de valepotriatos y*

b) comparando el contenido de valepotriatos de plantas regeneradas por ctv y las plantas silvestres.

Respecto a las contribuciones en el conocimiento de la morfogénesis de *V. edulis ssp. procera*, sería interesante continuar documentando el proceso de ontogenesis de esta subespecie, comparando los patrones de desarrollo de la embriogénesis somática y la embriogénesis cigótica.

Progresos importantes en el conocimiento de la ontogenesis de embriones somáticos y brotes adventicios unipolares se han efectuado, a partir de estudios histológicos y morfológicos en diferentes especies de varias familias vegetales . La inducción al desarrollo del embrioides ha sido el mejor paso en la embriogénesis somática, sin embargo las datos disponibles son aún insuficientes.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Allan E. (1985) Plant Cell in: Plant Cell and Tissue culture. Stafford A. y Warren G. eds. Open University Press. pp.1-24.
- Ammirato, PV (1989) Embryogénesis en: Handbook of plant cell culture. DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato y Y Yamada eds. Vol II. MacMillan, New York pp. 82-123.
- Argueta A, Cano L, Rodarte M (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo III Edit. Instituto Nacional Indigenista. P. 1372.
- Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.
- Becker H, Schrall R (1980) Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants. *Journal of Natural Products* 43:721-723
- Becker H, Chavadej S, Thies P, Finner E (1984) The structure of new valepotriates from tissue culture of *Valeriana wallichii*. *Planta Medica*. pp. 245-248.
- Berthouly M, Michaux-Ferriere NM (1996) High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 44(2):169-176.
- Cassels AC. (1993) Problems in tissue culture: culture contamination, in: Micropropagation: technology and application PC. Debergh and RH Zimmerman eds. Kluwer Academic Publishers. pp. 31-44.
- Chan JL, Saénz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C (1998) Regeneration of (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17:515-521.
- Charrière F, Hahne G (1998) Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Science* 137:63-71.
- Chavez VM, Litz RE, Monroy M, Moon PA, Vovides AM (1998) Regeneration of *Ceratozamia ewryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees. *Plant Cell Reports* 17:612-616.
- Chávez VM y Rubluo A (1995) El cultivo de tejidos vegetales en la conservación en: Conservación de plantas en peligro de extinción. E. Linares, P Dávila, F Chiang, R Bye y T Elias (eds) Instituto de Biología UNAM pp.123-131.
- D'Amato F (1985) Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC Crit. Rev. Plant Science* 3:73-112.

- Debergh P, Roggemans J, Standaert-De Metsenaere R (1990) Tissue culture in relation to ornamental plants. In: Bhojwani SS (ed) Plant tissue culture, applications and limitations. Elsevier, Amsterdam, pp.161-189.
- Dineshkumar V, Kirti PB, Sachan JKS, Chopra VL (1995) Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant Science 109(2):207-213.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany 58 (313):1493-1509.
- Dodds JH, Roberts LW (1985) Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press.
- Doebley J, Lukens L (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. The Plant Cell. 10:1075-1082.
- Dhanalakshmi S, Lakshmanan K (1992) In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Clitoria ternatea*. Journal of Experimental Botany 43 (247):213-219.
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. Protoplasma 162:120-127.
- Enciso-Rodríguez R (1997) Micropropagación of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. Planta Medica 63:274-275.
- Esau K (1959) Anatomía vegetal. Ed. Omega. Barcelona pp. 427-436.
- Estrada LE (1985) Jardín botánico de plantas medicinales "Maximino Martínez". ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Escalant JV; Teisson C, Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). In vitro Cell Biol. 30(4):181-186.
- Evans DA, Sharp WR, Flick CE (1981) Growth and behavior of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis. Pp.45-113. In: Plant tissue culture: methods and applications in agriculture, ed. TA Thorpe, 379 pp. Academic Press, New York
- Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (1983) Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1. Techniques for propagation and Breeding. Macmillan Publishing Co. New York, London.
- Farnsworth NR, Soejarto OD (1991) Global importance of medicinal plants. Pp.25-51. In: Conservation of medicinal plants, ed. O Akerele, V Heywood, H Synge. 362 pp. Cambridge University Press.
- Flores O, Pérez P (1988) Conservación en México: Síntesis sobre vertebrados terrestres, vegetación y uso del suelo. Instituto Nacional de Investigación para el estudio sobre Recursos Bióticos (INIREB) México.
- Flores F (1992) Manual de micropropagación SEP. SEIT DGETA. México, DF.

- Fransz PF, Schel JHN (1991) Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*) Can. J. Bot. 69:26-33.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Edington, Wits.
- George L, Eapen S (1994) Organogenesis and embryogenesis from diverse explants in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Plant Cell Reports 13:417-420.
- Gless C, Lörz H, Jähne-Gärtner (1998) Establishment of a highly efficient regeneration system from leaf base segments of oat (*Avena sativa* L.) Plant Cell Reports 17:441-445.
- Gupta PK, Pullman G, Timmis R, Kreitinger M, Carlson WC, Grob J, Welty E (1993) Forestry in the 21 st century: The biotechnology of somatic embryogenesis. Biotechnology Vol 11 pp.454-459.
- Guedira M, Dubois-Tylski T, Vasseur J, Dubois J (1989) Embryogenèse somatique á partir de cultures d'anthères du Cichorium (Asteraceae). Can. J. Bot. 67:970-976.
- Halperin W, Wetherell (1965) Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. Science 147:756-758.
- Hamann O (1991) The joint IUCN-WWF plants conservation programme and its interest in medicinal plants in: Conservation of medicinal plants. O Akerele, V. Heywood y H. Synge eds. Cambridge University Press. pp. 13-24.
- Higashi K, Kamada H, Harada H (1996) The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetasa activity is involved in the development of embryos in carrot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45:109-114.
- Hiller KO, Zetler G (1996) Neuropharmacological studies in ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.:behavioural and anticonvulsant properties. Phytother Res 10:145-151.
- Ho W, Vasil I (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma 118:169-180.
- Houghton P (1988) The biological activity of valerian and related plants. J. Ethnopharmacol 22:121-142.
- Howell S (1998) Molecular genetics of plant development. Cambridge University Press. P.365.
- Jeannin G, Bronner R, Hahne G (1995) Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.).Plant Cell Reports 15:200-204.

- Jones TJ, Rost TL (1989) Histochemistry and ultrastructure of rice (*Oriza sativa*) zygotic embryogenesis. *Am. J. Bot.* 76:504-520.
- Konar RN, Thomas E, Street HE (1972) Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L. *J. Cell Sci.* 11:77-93.
- Kriebel H (1995) Introduction in: Somatic embryogenesis in woody plants. SM Jain, PK Gupta and R Newton (eds) Kluwer Academic Publishers pp. 1-8.
- Lowe K, Taylor B, Ryan P, Paterson KE (1985) Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B 73. *Plant Science* 41:125-132.
- Lu C, Vasil I (1985) Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximun* (Guinea grass). *Amer. J. Bot.* 72(12) 1908-1913.
- Maheswaran G, Williams E (1985) Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* in vitro. *Annals of Botany* 56:619-630.
- Malik KA, Saxena PK (1992) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedlings of *Phaseolus acutifolius* A., *P. aureus* (L.) Wilczek, *P. coccineus* L., and *P. wrightii* L. *Plant Cell Reports* 11:163-168.
- Marconi L, Radice S (1997) Organogénesis and somatic embryogenesis in *Codiaeum variegatum* (L.) Blume CV "Corazón de oro". *In Vitro Cell Dev Biol (Plant)* 33:258-262.
- MathurJ, Ahuja PS, Mathur A, Kukreja AK, Sha HNC (1988) *In vitro* propagation of *Valeriana wallichii*. *Planta Med* 54:82-83.
- Mathur J, Ahuja PS (1991) Plant regeneration from callus cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Cell Rep* 9:523-525.
- Mathur J (1992) Plantlet regeneration from suspension cultures of *Valeriana Wallichii* DC. *Plant Sci* 81:11-116.
- Meinke D (1995) Molecular genetics of plant embryogenesis. *Plant Mol.Biol.* . 46:369-394.
- Meyer FG (1951) *Valeriana* in North America and the west Indies Antillas. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 38:377-503.
- Michaux-Ferrière N, Grout H, Carron MP (1992) Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 79(2):174-180.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol.Plant* 15:473-479.
- Navarrete A (1989) Evaluación farmacológica de plantas medicinales en: Plantas medicinales de México. E Estrada ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

- Norusis M (1990) Statical package for social sciences (SPSS,statical data analysis) SPSS, Inc.USA.
- Pâques M, Bercetche J, Palada M (1995) Prospects and limits of somatic embryogenesis of *Picea abies*, in: Somatic embryogenesis in woody plants. SM Jain, PK Gupta and R Newton (eds) Kluwer Academic Publishers pp. 399-414.
- Parrot W 1988 Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell Dev. Biol.* 24:817-820.
- Pedretti M 1986 La valeriana. Ergoristeria Domani, Maggic.Roma, Italia pp.114-120.
- Pedroso MC, Pais MS (1995) Factors controling somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43:147-154.
- Pierick, (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa ed.
- Principe PP (1991) Valuing the Biodiversity of Medicinal Plants in: Conservation of Medicinal Plants. O. Akerele, V Heywood , H Synge eds. Cambridge University Press. Pp. 79-124.
- Raghavan. V. (1997) Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press, pp.467-499.
- Sakamoto (1992) Psychotropic effects of japonese valerian root extract. *Chem. Pharmacology* 40(3):758-761.
- Salisbury F, Ross C (1992) Plant Physiology. Fourth edition. Wadsworth Publishing, California. P 759.
- Schimmer A (1992) Valerianic acids in commercial plant drugs and extracts prepared from the roots of *Valeriana officinalis* L. *PZ. Wiss.* 5(1):31-36.
- Schumann G, Ryschka V, Schulze J, Klocke E (1995) Anatomy of somatic embryogenesis, in: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. VPS Bajaj (Ed) 30:71-86.
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SB (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis en: Horticultural Reviews Vol. 2. Purdue University, A. Publishing Co. Westport. Pp. 268-310.
- Stephen H. Howell (1998) Embryogenesis in: Molecular genetics of plant development. Cambridge University press. pp. 55-81.
- Steward F, Mapes M, Mears K(1958a) Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45: 705-708.

Steward, F (1958b) Growth and organized development of cultured cells, III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *American Journal of Botany* 45: 709-713.

Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N (1988) Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 62:43-52.

Tabei Y, Kanno T, Nishio T (1991) Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports* (1991) 10:225-229.

Tittel G, Chari VM, Wagner H (1978) HPLC-analyse von *Valeriana mexicana* Extrakten. *Planta Medica* 34(3):305-310.

Tiwari V, Singh B, Tiwari KN (1998) Shoot regeneration and somatic embryogenesis from different explants of Brahmi (*Bacopa monniera* (L.) Wettst.) *Plant Cell Reports* 17:538-543.

Toonen, MAJ, De Vries SC. (1995) Initiation of somatic embryos from single cells. Cap. 11. Pp.173-189.

Vasil V, Vasil I (1982) The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos. *Bot.Gaz.* 143(4):454-465.

Villarreal, M. (1993) Actualidad de la biotecnología vegetal con plantas medicinales mexicanas, en: *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. Secretaría de Salud, México, DF. pp.171-176.

Viola V, Fritz D (1991) In vitro propagation of *Valeriana wallichii* DC. In different growing media. *Gartenbauwissenschaft* 56 (1):21-25.

Violon C (1984) Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues from valerianaeae. *Journal of Natural Products* 47(6):934-940.

Warren, G. (1991) The regeneration of plants from cultured cells and tissues, in: *Plant cell and tissue culture*. A. Stafford and G. Warren (eds). Open University Press.

Wernicke W, Potrykus I, Thomas E (1982) Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*-morphogenetic pathways. *Protoplasma* 111:53-62.

Williams EG, Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57:443-462.

Zimmerman J L (1993) Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The plant Cell* 5: 1411-1423.