

00381 3 252



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CULTIVO *in vitro* DE *Valeriana edulis ssp. procera* (HBK) Meyer
(VALERIANACEAE): UNA ESPECIE MEDICINAL SOBREEXPLOTADA.

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

Patricia Castillo España

Director de Tesis: Dr. Miguel Lara Flores.

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

Portada	1
INDICE	2
RESUMEN	4
1. INTRODUCCION.	6
11. ANTECEDENTES.	9
1. Características generales del género <i>Valeriana</i> sp.	9
1.1 Descripción botánica del género <i>Valeriana</i> sp.	9
1.2 Aspectos ecológicos del género <i>Valeriana</i> sp.	10
1.2.1 Distribución geográfica	10
1.2.2 Clima, suelo y vegetación.	11
1.3 Ubicación taxonómica y descripción botánica de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i>	13
2. Sinonimia y uso médico tradicional.	16
3. Características químicas.	19
4. Estudios farmacológicos.	22
5. Propagación vegetal.	25
5.1 Propagación asexual o vegetativa.	25
6. Cultivo de Tejidos Vegetales.	27
6.1 Tecnologías del Cultivo de Tejidos Vegetales.	28
6.2 Embriogénesis somática y organogénesis.	34
6.3 Factores que inducen la expresión morfogénica.	36
6.4 El cultivo de tejidos en el género <i>Valeriana</i> sp.	47
III. JUSTIFICACION.	50
IV. OBJETIVOS.	52
V. HIPOTESIS.	53
VI. MATERIALES Y METODOS.	54

Vl.1	Material biológico.	54
Vl.2	Lugar de colecta.	54
Vl.3	Métodos de desinfección de semillas.	56
Vl.4	Medios de cultivo.	57
Vl.5	Siembra <i>in vitro</i>	57
Vl.6	Regeneración de explantes <i>in vitro</i>	59
Vl.7	Estrategia experimental.	62
VII.	RESULTADOS-DISCUSSION.	63
VIII.	CONCLUSIONES.	89
IX.	BIBLIOGRAFIA.	90

FIGURAS	página
1. VALERIANACEAE <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i>	14
2. Aspecto de la cámara de germinación, donde se llevó a cabo la fase experimental.	58
3. Diversos explantes de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> cultivados <i>in vitro</i> .	60
4. Presentación de los meristemos apicales con un par de primordios foliares de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> , al inicio del cultivo <i>in vitro</i> .	65
5. Plantas completas de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i> .	70
6. Aspecto del sistema radicular desarrollado en <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> , a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i> .	84

ESQUEMAS

1. Ciclo biológico de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> .	15
11. Estructura química de los principales metabolitos secundarios, encontrados en especies del género <i>Valeriana</i> sp.	21
111. Pasos seguidos para la obtención de plantas de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> , libres de bacterias sistémicas.	61
1V. Estudio interdisciplinario de las plantas medicinales.	86

TABLA

1. Usos médicos tradicionales de especies del género <i>Valeriana</i> sp. en México.	18
---	----

MAPA

A. Ubicación geográfica de la zona de colecta de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> , en el Estado de Morelos.	55
--	----

CUADROS

página

1. Porcentaje de formación de plantas completas de *V. edulis* ssp. *procera*, a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*. 69
2. Altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*. 73
3. Altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, utilizando 6BA y K como fuente de citocinina. 76
4. Longitud radicular promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*. 79
5. Longitud radicular promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, utilizando 6BA y K como fuente de citocinina. 82

GRAFICAS

- I. Altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*. 74
11. Altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, utilizando 6BA y K como fuente de citocinina. 77
111. Longitud radicular promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*. 80
- 1V. Longitud radicular promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, utilizando 6BA y K como fuente de citocinina. 83

ABREVIATURAS UTILIZADAS

CTV.- Cultivo de tejidos vegetales

MS.- Medio basal (Murashige y skoog)

6BA.- 6-Bencil aminopurina

AIA.- Acido Indol 3-acético.

K.- Kinetina ó 6-furfuril aminopurina

ANA.- Acido 1-Naftalenacético

RESUMEN

La *Valeriana edulis* ssp. *procera* es una especie silvestre, que al igual que otras especies del mismo género, son ampliamente utilizadas en la Medicina Tradicional, por sus efectos atribuidos como: sedantes, antiespasmódicos y ansiolíticos.

El deterioro de su hábitat natural y la sobreexplotación de que ha sido objeto dada su gran demanda, ha ocasionado que sus poblaciones naturales se encuentren abatidas, por lo cuál se planteó el presente estudio con el objeto de obtener cultivos *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera*, como una contribución al estudio fitotécnico de las plantas medicinales mexicanas sobreexplotadas, mediante procedimientos de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Los objetivos particulares que se plantearon fueron:

1. Obtener plantas de *V. edulis* ssp. *procera*, libres de bacterias sistémicas, mediante el cultivo *in vitro* de meristemos apicales con par de primordios.
2. Determinar la respuesta *in vitro* de diversos explantes de *V. edulis* ssp. *procera*, en presencia de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.
3. Evaluar el efecto de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, utilizando ácido indol 3-acético (AIA), 6-bencil aminopurina (6BA o 6BAP) y 6- furfural aminopurina (K), en la regeneración de *V. edulis* ssp. *procera*, a partir del cultivo *in vitro* de meristemos apicales con un par de primordios foliares.

El material biológico utilizado, fué colectado de una población natural de *V. edulis* ssp. *procera*, localizada en la zona norte del Estado de Morelos. Se realizaron una serie de pruebas, a partir de un diseño estadístico completamente al azar, comprendiendo 20 tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Los tratamientos constaron de la combinación de una auxina (AIA) y una citocinina (6BA o K), en concentraciones de 1.0 a 7.5 mg/l. El medio de cultivo utilizado en todos los tratamientos fué el de Murashige y Skoog (MS), controlando durante el desarrollo el ambiente externo, como: la intensidad luminosa (1000 lux) , fotoperiodo (12 hrs), temperatura (21°- 22°C) y humedad (70%).

Se logró la regeneración de plantas completas libres de bacterias sistémicas. La respuesta morfogénica se presentó en los explantes provenientes de meristemas apicales con un par de primordios foliares. Los mejores resultados de la regeneración *in vitro*, se obtuvieron en los tratamientos con las concentraciones mas bajas de citocininas. El desarrollo máximo de las plantas *in vitro*, se obtuvo en la concentración de 1.0 mg/l de K y 7.5 mg/l de AIA.

I. INTRODUCCION.

La diversidad vegetal de México, es considerada como una de las mas variadas del mundo, reflejada en la presencia de practicamente todos los tipos de vegetación, como consecuencia de su ubicación latitudinal y condiciones ambientales tales como, clima, suelo y topografía, (Estrada, 1985); (Toledo, 1988).

Dentro de esta diversidad vegetal, se han registrado cerca de 3,000 especies con usos medicinales, aún cuando se calcula la existencia de 12,000 a 15,000 con este uso, (Estrada, 1985).

En estos vegetales, aportados por la medicina tradicional de muchos pueblos, se ha probado su efectividad terapéutica de manera empírica, a base de ensayo y error, careciendo en su mayoría de estudios científicos exhaustivos, (Del Amo, 1982); (Linares, 1990).

En las últimas décadas, el cambio en el uso del suelo y la sobreexplotación de los recursos naturales, han ocasionado la desaparición de numerosos ecosistemas y la disminución de poblaciones naturales de especies vegetales, de las cuáles, en muchos casos se trata de plantas endémicas de México, (Estrada, 1985); (Flores, 1988).

Con relación a la flora nativa de nuestro país, poco más de 500 especies en peligro de extinción se han registrado en la Union Internacional para la Conservacion de la Naturaleza, incluyendo algunas especies del género *Valeriana* sp. como: *V. palmeri*, *V. pratensis*, *V. robertinifolia* y *V. sorbifolia*, (Flores, 1988).

La flora medicinal, empleada de manera tradicional o bien,

como materia prima de muchos productos farmacéuticos, en su mayoría se trata de especies silvestres, (Navarrete, 1989); (Reyes, 1989).

La producción de plantas medicinales es una de las actividades agrícolas menos desarrolladas, aún cuando México tuvo una sólida tradición en la propagación y conservación de estas especies, a través del establecimiento de jardines botánicos prehispánicos, (Estrada, 1985); (Valdés, 1982).

La Biotecnología vegetal es un campo con grandes perspectivas para México, que posibilita el manejo de recursos vegetales silvestres de interés económico y/o ecológico, entre los que se encuentran las plantas medicinales, (Robert, 1985).

El uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, como parte de la Biotecnología vegetal, ha permitido un avance en el estudio y aplicaciones agrobiológicas y biotecnológicas de las plantas medicinales en varios aspectos, entre otros: 1) micropropagación de especies difíciles de regenerar por otras vías, 2) obtención de plantas libres de patógenos sistémicos, 3) preservación de material biológico silvestre o con potencial agronómico a través de la formación de bancos de germoplasma, 4) obtención de metabolitos secundarios, como pauta al inicio de investigaciones en relación con su actividad farmacológica, y 5) rescate de especies en peligro de extinción.

Dentro del grupo de plantas silvestres medicinales sobreexplotadas, se encuentra la *V. edulis* ssp. *procera*, que por sus propiedades sedantes, ansiolíticas y antiespasmódicas, al igual que otras especies del mismo género, han tenido gran demanda en la

Medicina Tradicional, en forma de tinturas a base de extractos totales y formando parte de productos farmacéuticos, ya que se emplean como base de poco más de cincuenta sustancias, (Muñoz, 1987); (Houghton, 1938).

El presente estudio es una contribución al conocimiento fitotécnico de la *V. edulis* ssp. *procera*, mediante procedimientos de cultivo de tejidos vegetales.

El establecimiento de cultivos *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera* en el laboratorio, representa una ventaja biotecnológica, ya que estos podrían servir de pauta para la obtención y caracterización de sus principios activos, e iniciar investigaciones posteriores en relación a su actividad farmacológica, así como una alternativa agrobiológica en el rescate de una especie silvestre sobreexplotada.

II. ANTECEDENTES.

1. Características generales del género *Valeriana* sp.

La familia VALERIANACEAE tiene 11 géneros y más de 370 especies. El género *Valeriana* sp. es el mejor representado por 250 a 300 especies en el mundo, (Rzedowski, 1985).

1.1 Descripción botánica del género *Valeriana* sp.

El género *Valeriana* se caracteriza por agrupar hierbas perennes o anuales, con raíces pivotantes, tuberosas, o rizomas, tallos fistulosos cilíndricos o en ocasiones cuadrangulares; hojas opuesto cruzadas, a menudo todas basales, enteras o lobadas, pinnadas o rara vez bipinnadas, margen serrado, crenado, dentado o entero, de textura membranácea o firme. Inflorescencias en forma de dicasios, tirso o cimas compuestas, más o menos escorpioides; flores hermafroditas o unisexuales; cáliz enroscado durante la floración, mas tarde en la fructificación forma a menudo un vilano plumoso, con 6 a 20 cerdas unidas en la base por una membrana transparente; corola infundibuliforme, subcampanulada o rotácea y con el tubo giboso o recto, por lo común peluda en la garganta, los 5 lóbulos iguales o subiguales; estambres 3 rara vez 4, adheridos a la garganta de la corola, anteras biloculares o tetraloculares; ovario infero, tricarpelar, unilocular, óvulo uno, péndulo, un estilo y estigma con 3 lóbulos; fruto en forma de aquenio más o menos comprimido, (Rzedowski, 1985); (Sánchez, 1979).

1.2 Aspectos Ecológicos del género *Valeriana* sp.

1.2.1 Distribución geográfica.

El género *Valeriana* sp. se encuentra distribuido en todos los continentes a excepción de Australia. La mayoría de sus especies se localizan en zonas templadas del Hemisferio Norte y en los Andes de América del Sur, (Rzedowski, 1985).

Entre las especies más conocidas en el mundo se encuentran:

<i>Valeriana officinalis</i> L.	Originaria de Europa y Asia.
<i>Valeriana wallichii</i> D.C.	Nativa del Himalaya y de las montañas de Khasia.
<i>Valeriana angustifolia</i> Tausch.	Originaria del Japón.

En la República Mexicana, se conocen más de 42 especies, (Rzedowski, 1985).

Los Estados donde se han colectado especies del género *Valeriana* sp. son:

Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, México, Michoacán, Morelos, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Distrito Federal, (Arnalde y Blanno, 1957); (Rzedowski, 1985).

1.2.2 Clima, suelo y vegetación.

Las especies de género *Valeriana* sp. crecen principalmente en zonas montañosas por arriba de los 2 000 metros de altitud, en climas templados, con abundante luz solar. También se han localizado en diversas zonas ecológicas. Algunos ejemplos de especies del género *Valeriana* sp. desarrolladas principalmente en el Valle de México, (Rzedowski, 1985); (Revisión de herbario) son:

Valeriana ceratophylla HBK. Crece en matorral xerófilo, bosque de *Juniperus*, pastizales perturbados, preferentemente en afloramientos rocosos en altitudes de 2 300 a 2700 m.s.n.m.

Valeriana clematis HBK. Se localiza en bosque mesófilo, bosque de *Pinus*, de *Cupressus* y de *Quercus*, matorral secundario y a menudo en cañadas húmedas.

Valeriana sorbifolia var. *barbareifolia* (Mart. & Gal.) F.G.Meyer. Crece en matorral xerófilo, pastizales, bosque de *Quercus*, bosque de *Pinus*, bosque de *Abies religiosa*, entre afloramientos de peñascos, en altitudes de 2 800 a 3 350 m.s.n.m.

Valeriana edulis ssp. *procera* Se localiza en bosque de

(HBK) Meyer.

encino, pino y oyamel, a veces crece como planta ruderal o invadiendo cultivos. En suelos de textura media de origen volcánico. En climas templados, a altitudes de 2 470 a 3 170 m.s.n.m

En nuestro país, las especies conocidas por sus propiedades medicinales (Houghton, 1988); (Rzedowski, 1985); (Díaz, 1976) son:

Valeriana ceratophylla
Valeriana edulis ssp. *procera*
Valeriana mexicana
Valeriana officinalis
Valeriana sorbifolia
Valeriana toluccana

De estas especies, la *V. edulis* ssp. *procera*, ha sido reportada por diversos botánicos colectores y acopiadores de plantas medicinales, como una planta sobreexplotada.

1.3 Ubicación taxonómica y descripción botánica de *V. edulis*
ssp. procera

DIVISION	-	FANEROGAMAE
SUBDIVISION	-	ANGIOSPERMAE
SUBCLASE	-	DICOTILEDONAE
ORDEN	-	RUBIALES
FAMILIA	-	VALERIANACEAE
GENERO	-	<i>Valeriana</i>
ESPECIE	-	<i>V. edulis</i>
SUBESPECIE	-	<i>procera</i>

La *V. edulis ssp. procera*, es una planta perenne, generalmente de 30 a 100 cms. de alto; con hojas basales indivisas a pinnadas; flor blanquecina hermafrodita de 2 a 3 mm de longitud, la de la flor femenina de 0.5 a 1.0 mm de largo, la garganta glabra por dentro; aquenios de 1.8 a 3 mm de longitud, (Figura I), (Rzedowski, 1985); (Martínez, 1987).

Florece en los meses de mayo y junio, fructificando de julio hasta el mes de septiembre, (Esquema I. Observaciones de campo), (Rzedowski, 1985).

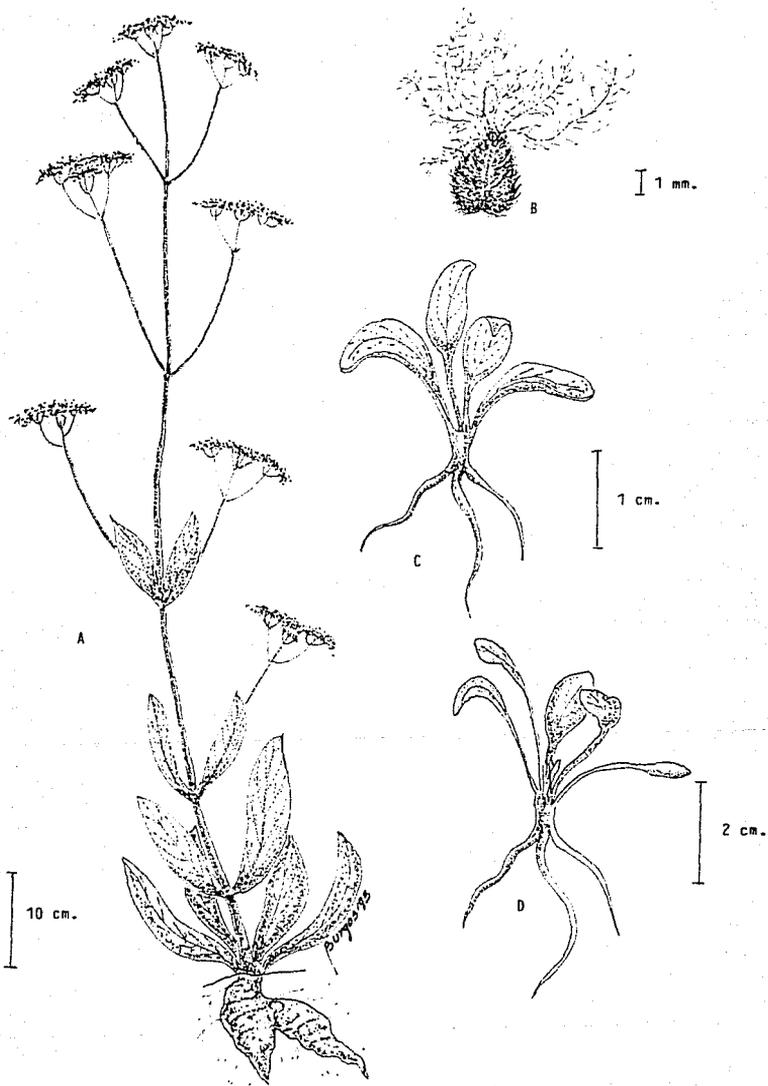


FIGURA 1. A) Planta completa de *V. edulis* ssp. *procera*, B) Detalle de una semilla
 C) Plántula de 25 días D) Plántula de 50 días .

2. Sinonimia y uso Médico tradicional

Las especies del género *Valeriana* sp. son conocidas comunmente en México con los siguientes nombres:

Especie	Nombres comunes
<i>V. ceratophylla</i>	jícama, mazatanes, raíz del gato, raíz del oso, ucuares, valeriana
<i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> (sin: <i>V. procera</i>)	hierba del gato, valeriana, valeriana de México.
<i>V. officinalis</i>	valeriana extranjera
<i>V. sorbifolia</i> var. <i>mexicana</i> (sin: <i>V. mexicana</i>)	cuitlapatli, hierba del gato, raíz del gato, valeriana de México.
<i>V. sorbifolia</i> var. <i>sorbifolia</i> (sin: <i>V. toluccana</i>)	batata, canónigos, cuatlacamotli, hierba del gato, matazetes, mazatiles, raíz del gato, ucuares, valeriana

Fuente: (Houghton, 1988; Martínez, 1987; Díaz, 1976)

Las especies del género *Valeriana* sp. han sido utilizadas desde hace más de mil años, por los antiguos griegos y romanos, así como por los pobladores del Noreste de Europa, por sus propiedades medicinales atribuidas, (Houghton, 1988).

Especies de este género, son conocidas en el mundo por sus efectos hipnóticos, antiepilépticos, antiespasmódicos y ansiolíticos. Así como también, se les ha atribuido propiedades analgésica y cicatrizante de heridas. Dentro de la medicina tradicional y galénica, han sido ampliamente prescritas para casos de histeria, insomnio, cefaleas intensas, neurosis, palpitaciones cardíacas, migraña, espasmos musculares, dismenorrea, menopausia e hipocondría, (Pedretti, 1986); (Houghton, 1988).

Su uso externo es recomendado como cicatrizante y antireumático. Sus hojas son utilizadas para tratar las varices y los rizomas como antihelmínticos, (Pedretti, 1986), (Houghton, 1988).

En general, la forma de administración es por vía oral o local, a partir de la elaboración de extractos alcohólicos o tinturas, infusiones y macerados con agua fría o alcohol, (Pedretti, 1986); (Houghton, 1988); (entrevistas etnobotánicas).

En México, son conocidas varias especies por sus efectos medicinales, (Tabla 1).

TABLA 1

USOS MEDICOS TRADICIONALES DE ESPECIES DE *Valeriana* sp. EN MEXICO.

ESPECIE	USO MEDICINAL
<i>V. ceratophylla</i>	Antiespasmódico, antitumoral, hipnótico, enfermedades de los ojos, fortalece los nervios, tifus exantemático
<i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> (sin: <i>V. procera</i>)	Antiespasmódico , antidiabético, sedante.
<i>V. officinalis</i>	Antiespasmódico , antidiabético, antiparasitario, vulnerario.
<i>V. sorbifolia</i> var. <i>mexicana</i> (sin: <i>V. mexicana</i>)	Antiespasmódico , antidiabético, sedante.
<i>V. sorbifolia</i> var. <i>sorbifolia</i> (sin: <i>V. toluccana</i>).	Afecciones renales, padecimientos hepáticos, hepatitis , diurético.

Fuente: (Martínez, 1987; Díaz, 1976)

3. Características químicas.

Los estudios sobre la composición química del género *Valeriana* sp. se han realizado principalmente en Europa desde principios del siglo pasado (Pedretti, 1986).

Las especies mejor estudiadas han sido: *V. officinalis*, *V. wallichii*, *V. mexicana* y *V. kilimandascharica*.

Los principales grupos químicos identificados en las valerianas son, los aceites esenciales y los iridoides, aunque se han encontrado también alcaloides en pequeñas proporciones, (Houghton, 1988), (Esquema 11).

Los aceites esenciales consisten de mezclas de monoterpenos y sesquiterpenos, cuyo contenido total varía entre las especies del género de 0.5 % v/p a 6.0 % v/p. Estudios sobre la composición química de los aceites esenciales de *V. officinalis* han permitido la identificación de 12 monoterpenos y 17 sesquiterpenos, dentro de éstos, el ácido valeriánico es uno de los más importantes, al cual se le ha atribuido la actividad sedante, (Houghton, 1988).

Se ha detectado la presencia de ácidos valeriánicos en extractos de raíces de *V. wallichii* y *V. edulis*, (Schimmer, 1992).

La falta de correlación entre el contenido de aceites esenciales y el efecto sedante de las valerianas, impulsó a realizar investigaciones sobre otros constituyentes, los cuales pudieran contribuir a esta actividad.

Thies, en 1966 (citado por Houghton, 1988), aisló tres iridoides en *V. wallichii*, a los cuales denominó como: valtratos, acelvaltratos y didrovaltratos, y en conjunto se les dió el nombre

de valepotriatos.

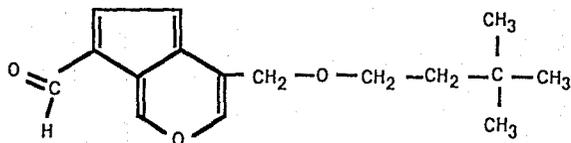
Tittel y col. (1978), realizaron un análisis químico en extractos de *V. mexicana*, en el cual detectaron un alto contenido de valepotriatos, además determinaron diferencias cuantitativas en compuestos, tales como los valtratos, entre la *V. mexicana* y otras especies.

Becker y col. (1984), determinaron que la *V. mexicana* contiene 7% v/p de valepotriatos en las raíces, mientras que *V. wallichii* contiene solo un 3% v/p y *V. officinalis* 1.2% v/p.

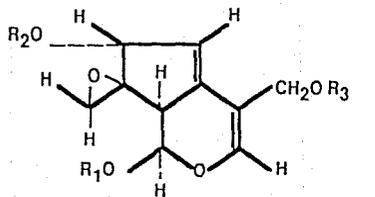
Los alcaloides son encontrados en las valerianas en menor proporción, su estructura anillada es similar a la de los iridoides presentes. Por sus bajas cantidades, se infiere que éstos compuestos no contribuyen en alguna actividad biológica, (Houghton, 1988).

ACIDO VALERIANICO $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH}$

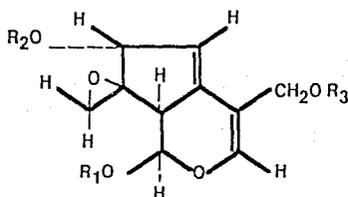
n- valerianico



VALEPOTRIATOS

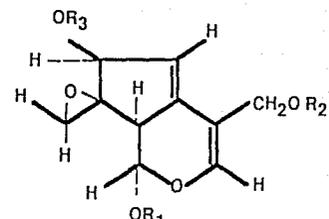


$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CO—CH}_2\text{—CH(CH}_3\text{)}_2$ acevaltrato
 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CO—CH}_2\text{—C(CH}_3\text{)}_2\text{—OOC—CH}_3$



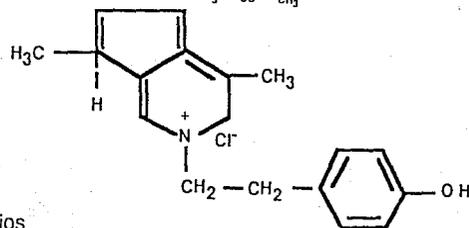
$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CO—CH}_2\text{—CH(CH}_3\text{)}_2$
 $\text{R}_3 = \text{CO—CH}_3$

valtrato



$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CO—CH}_2\text{—CH(CH}_3\text{)}_2$
 $\text{R}_3 = \text{CO—CH}_3$

didrovaltrato



ALCALOIDE "PRINCIPAL"

Esquema II. Estructura química de los principales metabolitos secundarios en contrados en especies del género *Valeriana* sp.

4. Estudios farmacológicos.

Los ensayos farmacológicos realizados en diferentes especies animales como ratas, conejos, gatos y perros, así como, los experimentos clínicos en sujetos insomnes, han confirmado que la valeriana actúa a nivel del sistema nervioso central y sobre el aparato cardiovascular, (Pedretti, 1986).

Estudios realizados en gatos, con la administración de una dosis equivalente a 50 mg/kg de extracto de valeriana mostraron un incremento del flujo en coronarias, una disminución del consumo de oxígeno y frecuencia cardiaca, además de causar una disminución pasajera de la presión sanguínea, (Houghton, 1988).

Diversas pruebas experimentales se han realizado para detectar la actividad sedante, usando extractos totales y compuestos aislados de la planta.

Durante las primeras décadas de este siglo, se determinó el efecto sedante del extracto alcohólico de las raíces de *Valeriana officinalis* y poco tiempo después se realizaron los estudios que llevaron a la identificación de varios de los compuestos químicos presentes en diferentes especies de este género.

En aquella época, se realizaron diversos modelos experimentales con varios productos presentes en el aceite esencial de valeriana. Se demostró así, el efecto sedante del sesquiterpeno llamado ácido valerianico. Posteriormente se reportó que la administración de valerianona, produce una disminución de los niveles de 5, hidroxitriptanina y noradrenalina en el cerebro de conejo, acción que es característica para algunas drogas

tranquilizantes. No obstante lo anterior, se observó que la potencia de la actividad sedante de los aceites esenciales era solo un tercio de la encontrada en el extracto integro. Se sugirió entonces la presencia de otros compuestos biologicamente activos diferentes a los aceites esenciales. De esta manera fueron aislados un gran número de compuestos iridoides, además de los productos de degradación que en algunos casos fueron más potentes que sus precursores, (Houghton, 1988).

A través de ensayos experimentales, se han detectado acciones similares de los extractos de raíces y rizomas de valerianas, con respecto a medicamentos utilizados para los mismos fines, como las benzodiacepinas, (Sakamoto, 1992).

Estudios electrofisiológicos en diferentes zonas de la corteza y subcorteza cerebral de gatos monitoreados, sugiere que la acción de los valepotriatos es a nivel de cuerpo amigdalino. Se ha detectado que el valepotriato conocido como didrovaltrato, aparentemente inhibe los impulsos eferentes a nivel del hipocampo, en forma similar a las benzodiacepinas, mostrando así propiedades tranquilizantes, (Houghton, 1988).

Después de un vasto número de experimentos en animales, se realizaron algunos trabajos clínicos en los cuales se han demostrado las cualidades terapéuticas de diferentes preparaciones de valeriana que actualmente se comercializan en Europa.

Lindhal, O. y col. (1989), realizaron un estudio doble ciego con una preparación denominada valeriana natt que contiene 400 mg de extracto de raíces de valeriana por dosis. Cuando se comparó con el placebo, se observó un efecto hipnótico significativo ($p < 0.001$). Además, 44% de los sujetos reportaron haber tenido un sueño perfecto y 89% señalaron haber tenido un mejor sueño con el preparado de valeriana natt. Todos ellos sin presentar efectos secundarios.

Leathwood, P.D. y col. (1985), realizaron también un estudio doble ciego en personas insomnes, en el cual evaluaron un extracto acuoso de raíces de valeriana (450 y 900 mg/kg.v.o) y observaron una significativa reducción en el tiempo de latencia en la inducción del sueño.

5. Propagación vegetal.

Las plantas pueden ser propagadas por mecanismos sexuales, a través de semillas, como asexuales, en forma vegetativa, (Hartmann y Kester, 1985); (Locy, 1984). La primera presenta en ocasiones inconvenientes, ya sea porque la especie no forma semillas viables, o se forman muy pocas, o las semillas pierden su capacidad germinativa rápidamente, o porque la descendencia obtenida por este tipo de reproducción es muy heterogénea debido a las características heterocigóticas de la población, (Pierick, 1990); (Warren, 1991). Por medio de la propagación vegetativa se pueden eliminar estos problemas, empleando técnicas que conducen a la clonación, es decir, las plantas provenientes por este mecanismo de reproducción son idénticas a sus progenitores, (Evans, 1983). Esta característica, es de particular importancia en el cultivo de plantas medicinales, ya que permite la obtención de una materia prima homogénea, (Muñoz, 1987).

5.1 Propagación asexual o vegetativa.

La multiplicación vegetativa *in situ*, ha jugado durante muchos años un papel muy importante en la agricultura, (Pierick, 1990). Esta se basa en la propiedad de las células vegetales de contener la información genética necesaria para regenerar un organismo completo, conocida como totipotencia, (Dodds, 1985); (Pierick, 1990). La propagación vegetativa, es de particular importancia en especies que tienen un genotipo altamente heterocigótico, ya que

las características de dichas plantas, se pierden al propagarlas por semilla, (Warren, 1991).

De acuerdo con Hartmman y Kester, (1985), los métodos de reproducción vegetativa permiten:

- a) Propagar plantas que no producen semillas viables.
- b) Evitar períodos juveniles prolongados, como el caso de algunas especies leñosas y ciertas especies perennes como las orquideas, que necesitan entre 5 y 10 años para iniciar la floración.
- c) Controlar la forma de crecimiento. Durante el período juvenil, las plantas originadas por semillas a menudo muestran características morfológicas diferentes, que puede ser evitadas, propagando la forma adulta por métodos vegetativos.
- d) Economizar, si se considera la eliminación de la fase juvenil y el acortamiento del tiempo que se requiere para llegar a la madurez reproductiva.

Los métodos clásicos de reproducción vegetativa *in vivo*, presentan a veces problemas que pueden afectar la producción de plantas, estos son, la presencia de organismos patógenos superficiales como insectos y ácaros, o por contaminación sistémica, especialmente por virus, bacterias y hongos, lo cuál implica, que si se quiere tener una población de plantas sanas es indispensable emplear procedimientos que permitan la producción de

plantas libres de patógenos y fieles al tipo, ésto es factible por técnicas englobadas en el cultivo de tejidos vegetales, (Hartmann y Kester, 1985); (Cassels, 1993).

6. Cultivo de Tejidos Vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV), es un conjunto de técnicas, basadas en los principios de la totipotencialidad celular, (Allan, 1991). Estas técnicas pueden llevar directamente a la producción de plantas idénticas o inducir variabilidad, (Evans, 1983).

El CTV ha tenido una gran diversidad de aplicaciones, en la agricultura, horticultura, industria y en algunas áreas biotecnológicas, (Locy, 1984); (Robert, 1985); (Allan, 1991); (Warren, 1991) como son:

- propagación clonal *in vitro*,
- desarrollo de plantas libres de patógenos,
- producción de variantes somaclonales,
- producción de haploides,
- producción de híbridos somáticos,
- obtención de líneas de células mutantes, y
- obtención de enzimas y metabolitos secundarios.

Las técnicas empleadas en el CTV tienen algunas limitantes, (Locy, 1984), debido a que:

- 1) si bien la multiplicación a través del CTV es rápida, el establecimiento del cultivo puede requerir mucho tiempo,
- 2) los procedimientos pueden ser costosos para algunas especies, especialmente si se compara con la propagación *in situ*,
- 3) en algunas especies el desarrollo *in vitro* es lento o difícil,
- 4) algunas técnicas de CTV pueden generar variaciones genéticas, siendo difícil mantener la identidad clonal, lo cuál es una ventaja o desventaja, dependiendo de los objetivos de la investigación.

6.1 Tecnologías del Cultivo de Tejidos Vegetales.

El CTV comprende un conjunto procedimientos como:

- a) El aislamiento y fusión de protoplastos.

Esta técnica es utilizada en la hibridación somática intraespecífica, interespecífica o intergenérica, permitiendo un avance en la tecnología de hibridación de plantas superiores, ya que ofrece la posibilidad de fusionar variedades, especies y géneros divergentes, que en condiciones naturales sería muy difícil o prácticamente imposible, (Reinert, 1977); (Diomande, 1984); (Swinathan, 1984); (Warren, 1991). Esta imposibilidad se debe a factores limitantes como, incompatibilidades precigóticas, ya sea por diferencias anatómicas, época de reproducción sexual no compatible, o por inhibición en la fertilización; y postcigóticas como la formación de embriones no viables, descendientes con estructuras sexuales anormales, o descendencia con esterilidad masculina completa (Locy, 1984); (Pierick, 1990).

La fusión de protoplastos, junto con otros métodos que inducen variación genética, permiten la producción de nuevas variedades vegetales que pueden presentar características deseables, como, la resistencia a enfermedades y la tolerancia a diferentes factores de estrés, (Evans, 1983); (Dicmande, 1984); (Locy, 1984); (Warren, 1991).

La hibridación somática presenta ciertos problemas, ya que en muchos casos se han generado productos estériles, anormales morfológicamente o inestables y por consiguiente, éstos no son viables, sobre todo en plantas que son taxonómicamente distantes, (Pierick, 1990); (Warren, 1991). Las especies que constituyen los cultivos mas importantes como las leguminosas y los cereales, han sido muy difíciles de regenerar a través de ésta tecnología, (Warren, 1991).

b) Producción de haploides.

Esta técnica involucra el cultivo de anteras, granos de polen individuales e inflorescencias, produciendo plantas haploides o con otros niveles de ploidia, (Evans, 1983); (Sondahl, 1984); (Pierick, 1990). El uso de estos procedimientos permite reducir el tiempo en la obtención de líneas homocigóticas, ya que existe una eficiencia en la producción y selección de mutantes útiles (variación gametoclinal), por otro lado, el ciclo de obtención de plantas necesario para la expresión de recombinantes, es menor que el requerido en cultivos convencionales, (Swminathan, 1984).

En los sistemas de producción de haploides, la selección de

mutantes es un procedimiento muy difícil, debido a que su frecuencia es muy baja y además los genes no siempre se expresan, (Locy, 1984); (Swminathan, 1984). Esta tecnología es potencialmente importante en los programas de desarrollo de nuevas variedades, (Evans, 1983).

c) Cultivo de células en suspensión y producción de metabolitos secundarios.

Esta técnica permite el cultivo de células o agregados celulares. Los cultivos se encuentran dispersos en un medio líquido controlado, siendo fisiológicamente más homogéneos que las plantas completas, ofrecen ventajas para la producción u obtención de metabolitos secundarios, (Locy, 1984); (Hall, 1991). Esta tecnología genera varias posibilidades de utilidad, como la producción de sustancias bioquímicas no conocidas en plantas completas y la selección de líneas celulares altamente productivas, (Evans, 1983); (Hall, 1991). Otra utilidad de estos sistemas, es la producción de enzimas y metabolitos secundarios, éstos últimos son sustancias químicas que no tienen una función aparente en el metabolismo primario de la planta, pero que parecen tener un papel ecológico, por ejemplo, como atrayentes sexuales para los insectos polinizadores, en los mecanismos de defensa contra predadores o al estrés ambiental, (Dirzo, 1984); (Hall, 1991); (Stafford, 1991). Los metabolitos secundarios se emplean en la elaboración de tintes, fragancias, pigmentos, saborizantes, edulcorantes y diversas sustancias usadas como base de medicamentos, (Diomande, 1984);

(Stafford, 1991).

La investigación de la biosíntesis de metabolitos secundarios por cultivo de células o tejidos vegetales, ha cobrado gran importancia en los últimos años, ya que las técnicas de CTV pueden ser aplicadas a muchas especies. En la actualidad, se estima que en 2 000 especies ya se han desarrollado estas tecnologías, (Stafford, 1991). Estos sistemas representan un potencial en la producción de compuestos medicamente importantes, (Robert, 1984); (Stafford, 1991). A través de estos procedimientos se han obtenido compuestos como la serpentina, obtenida a partir de *Catharanthus roseus*, la diosgenina, base para la producción de anticonceptivos, aislada de *Dioscorea deltoidea*, la codeína, empleada en la elaboración de analgésicos y antitusígenos, a partir de *Papaver somniferum*, la atropina utilizada por su efecto depresor del parasimpático, aislada de *Atropa belladonna*, y los valerianatos/valepotriatos con efectos hipnóticos y sedantes, derivados a partir de *Valeriana* spp., (Houghton, 1988); (Stafford, 1991).

d) Micropropagación.

Esta técnica ha sido empleada con gran éxito en la multiplicación de muchas especies agrícolas, (Warren, 1991). La micropropagación se basa en la capacidad de reproducción asexual de las plantas, a partir de tejidos que son cultivados en medios nutritivos artificiales, controlando las condiciones ambientales como la luz, temperatura y humedad relativa, (Flores, 1992). La

propagación por esta vía, permite el producir copias genéticamente idénticas a las plantas donadoras en un tiempo relativamente corto, proceso conocido como propagación clonal, (Locy, 1984); (Debergh, 1993).

La técnica de clonación ha jugado un papel muy importante en la propagación de especies que presentan problemas de reproducción sexual como las orquideas, o aquellas que son altamente heterocigóticas, como la papa y la fresa, así como en la formación de bancos de germoplasma, (Sondahl, 1984); (Margara, 1988); (Warren, 1991).

En la micropropagación, una línea desarrollada y de importancia en la agricultura, es la producción de plantas libres de patógenos, (Warren, 1991); (Debergh, 1993). Generalmente la superficie de las plantas son hábitats de microorganismos, que están presentes durante el crecimiento y desarrollo de estas, además, muchos microorganismos de la superficie pueden penetrar en la planta, a través de aberturas naturales o por lesiones, donde existe suficiente humedad para su desarrollo, (Cassels, 1993). La contaminación sistémica es un problema presente en una gran cantidad de plantas, reportándose en diferentes grupos taxonómicos, (Debergh, 1993). Los microorganismos presentes intra o intercelularmente en los tejidos vegetales, son capaces de desarrollarse en los medios de cultivo y, aunque algunos pueden ser inhibidos por cambios en el ph, otros pueden proliferar, causando severos daños, incluso la muerte de los explantes, ésto, debido principalmente a la competencia por nutrientes, además de que las

células bacterianas se reproducen mucho más rápido que las células vegetales en el medio de cultivo, (Warren, 1991). Los patógenos generalmente forman "halos" alrededor del explante, principalmente cuando existe la presencia de contaminación sistémica bacteriana, (Cassels, 1993). La contaminación sistémica, es un problema muy serio, sobre todo en especies que se propagan en forma vegetativa, (Hartmann y Kester, 1985); (Margara, 1988); (Warren, 1991). El cultivo *in vitro* de meristemas ha probado una elevada eficiencia en la solución de este problema, (Evans, 1983); (Swaminathan, 1984). Las zonas meristemáticas, por lo general se encuentran libres de patógenos, debido principalmente a la carencia de conexiones vasculares (floema y xilema) y a la posible ausencia de plasmodesmos, (Dodds, 1985); (Pierick, 1990); (Warren, 1991). El cultivo de meristemas consiste en desarrollar el domo apical solo o con un par de primordios, en medios asépticos, (Evans, 1983); (Warren, 1991).

Existen otros métodos de erradicación de patógenos sistémicos, como, la aplicación de agentes antivirales y antibióticos a los medios de cultivo, los primeros poco efectivos, debido fundamentalmente a que los mecanismos de interacción natural virus-planta son poco conocidos, y los segundos, en muchos casos ineficaces, ya que las concentraciones que se requieren para inhibir las poblaciones bacterianas, por lo general son fitotóxicas, (Pierick, 1990); (Warren, 1991). Otro mecanismo empleado en la eliminación de virus es el tratamiento por calor, conocido como termoterapia, que ha sido efectivo en varias especies

como la caña de azúcar y algunos frutales, aunque no es recomendable en plantas demasiado sensibles al calor, (Margara, 1988); (Pierick, 1990). El tratamiento con calor, en combinación con el cultivo de meristemas, en muchas especies ha dado buenos resultados, (Pierick, 1990).

6.2 Embriogénesis somática y organogénesis.

Existen dos vías a seguir en la micropropagación: la embriogénesis somática y la organogénesis, (Ammirato, 1983). La primera, posibilita el desencadenar el proceso embriogénico en cultivo *in vitro*, a partir de células somáticas de diversos explantes, (Margara, 1988). Los embriones somáticos provienen del cultivo de células vegetativas de plantas jóvenes y maduras, tejidos reproductivos diferentes al cigoto, hipocotilos y cotiledones de embriones, (Dodds, 1985).

La embriogénesis somática se puede inducir por dos caminos:

- 1) La embriogénesis indirecta, que es el mecanismo mejor conocido, en donde el desarrollo de un embrión se origina a partir de un grupo de células morfológicamente desorganizado denominado callo, del que sólo unas cuantas células superficiales formarán embriones, (Dodds, 1985); (Warren, 1991), y
- 2) La embriogénesis directa, en la que una célula o un grupo de células del explante comienza a desarrollarse directamente sin la formación previa de un callo, éstas células se encuentran programadas genéticamente para la diferenciación

embriogénica, (Warren, 1991). El desarrollo de éstas células, permite el origen de un embrión inicial en forma globular de escasos 0.2 mm, adquiriendo mas tarde una forma acorazonada de 0.5 mm aproximadamente y finalmente en forma de torpedo con escaso 1.0 mm de longitud, a partir de este embrión se generará una plántula, (Margara, 1988); (Warren, 1991).

La embriogénesis somática puede inducirse por la presencia de auxinas exógenas como el ANA y el 2,4-D, (Warren, 1991).

La principal desventaja de la embriogénesis somática radica en que, durante el desarrollo del callo, es frecuente un alto grado de variabilidad genética, razón por la cual esta vía de regeneración no ha sido utilizada comercialmente para la propagación clonal, excepto en muy pocos casos como en la palma de coco, (Margara, 1988); (Warren, 1991).

La otra vía denominada organogénesis, ha sido mejor explotada para propagar plantas, en una gran cantidad de especies, (Flick, 1983).

Los grupos de células meristemoides de un explante son capaces de responder a condiciones nutricionales, hormonales y ambientales dentro de un sistema para la regeneración de plantas completas, y dependiendo de estas condiciones puede iniciarse la formación de raíces o brotes, (Dodds, 1985).

El desarrollo de un explante cultivado *in vitro*, requiere de

varios factores que controlan el disparo de la expresión morfogénica.

6.3 Factores que inducen la expresión morfogénica.

1) La constitución genética de la planta donadora.

Las características genéticas de la planta donadora son determinantes en el desarrollo *in vitro* de los explantes para originar una planta, las que interaccionan con las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro*, (Flick, 1983); (Dodds, 1985); (Pierick, 1990). Es importante la selección de la planta madre, en base a características fenotípicas deseables, dependiendo de los objetivos de la micropropagación, (Debergh, 1993).

2) El origen del explante.

Se ha demostrado que los explantes mas efectivos en la regeneración de plantas, son aquellos que se obtienen a partir de tejidos que se encuentran en constante división celular y que tienen la potencialidad y plasticidad morfogénica para generar una planta, estos criterios son por lo general satisfechos en tejidos inmaduros, los cuales se encuentran en pleno desarrollo, (Dodds, 1985); (Warren, 1991). Usualmente los tejidos maduros están diferenciados y morfológicamente determinados, lo cual es un factor limitante en la regeneración de plantas, (Warren, 1991).

El tamaño y la posición del explante en la planta donadora, también afecta su crecimiento y desarrollo en cultivo. Explantes muy pequeños tienen menor probabilidad de sobrevivir, sin embargo

el cultivo de explantes mayores puede acarrear la presencia de patógenos sistémicos, (Locy, 1984); (Warren, 1991).

Se ha detectado que explantes provenientes de yemas apicales se desarrollan mejor, (Locy, 1984).

3) Composición del medio de cultivo.

El éxito de cualquier tecnología empleada para el cultivo de células, tejidos u órganos, se encuentra en relación con la presencia de componentes nutricionales y sustancias reguladoras del crecimiento vegetal en el medio. La elección del medio de cultivo depende de los objetivos del cultivo, de la tecnología que va a ser utilizada y de la especie vegetal, (Dodds, 1985), (Gamborg, 1991).

La manipulación de los medios de cultivo en sistemas de regeneración de nuevas especies generalmente son establecidos a través de pruebas por ensayo y error, (Flick, 1983); (Pierick, 1990).

Diversos medios de cultivo han sido empleados en las técnicas de CTV, entre estos hay una variabilidad tanto en el tipo como en la cantidad de sales inorgánicas. El medio propuesto por Murashige y Skoog (MS), es de los que mas se han utilizado con éxito, especialmente en la regeneración de plantas, (Murashige, 1974); (Locy, 1984); (Pierick, 1990); (Gamborg, 1991),

La mayoría de los medios de cultivo, están compuestos de los siguientes grupos:

a) Sales inorgánicas.

En general, las sales inorgánicas proveen los requerimientos de macronutrientes como el N, P, K, Ca, Mg y S y micronutrientes como el Fe, Zn, Bo, Co, Mo, I y Mn, (Dodds, 1985).

Cuando se elige una mezcla de macro y micronutrientes, se debe considerar la concentración total de estos, ya que hay plantas muy sensibles a la salinidad, (Pierick, 1990). Algunos medios como los de Knop y White, son pobres en sales inorgánicas, mientras que otros como el de Murashige y Skoog es un medio rico en sales, (Flick, 1983); (Gamborg, 1991).

El efecto de las sales en la organogénesis es muy variable, especialmente el N total, NH₄ y K ya que puede inhibirla o estimularla dependiendo de la especie, (Margara, 1988); (Gamborg, 1991).

b) Fuentes de carbono.

Todos los medios requieren de carbono como fuente de energía, este puede afectar el metabolismo primario y la diferenciación, así como el crecimiento del callo y su morfología, (Locy, 1984); (Dodds, 1985); (Hall, 1991). Los azúcares son componentes importantes en cualquier medio de cultivo, debido a que el crecimiento y desarrollo *in vitro* tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis, (un tejido cultivado *in vitro* en general es heterótrofo), o incluso en obscuridad, (Margara, 1988); (Pierick, 1990). La principal fuente de carbono es la sacarosa, esta es utilizada en concentraciones de 1 a 5 %, aunque la cantidad requerida depende del tipo y estado de desarrollo del

material vegetal, (Dodds, 1985); (Pierick, 1990). Generalmente el crecimiento y desarrollo aumenta con la concentración de azúcar, hasta alcanzar un óptimo, disminuyendo en concentraciones demasiado elevadas, (Flick, 1983); (Pierick, 1990). La sacarosa puede ser reemplazada por la glucosa o la fructosa, (Dodds, 1984); (Flick, 1983); (Gamborg, 1991).

El mio-inositol es añadido a los medios de cultivo en concentraciones de 1%, y al parecer no es esencial, pero se ha detectado su influencia en el crecimiento de callo, (Dodds, 1985).

c) Vitaminas.

Las vitaminas que se utilizan en la elaboración de los medios de cultivo son principalmente aquellas que pertenecen al llamado complejo B. La tiamina es la única vitamina que se considera como esencial y que participa en la estimulación del desarrollo vegetal, (Flick, 1983); (Margara, 1988). Vitaminas como el ac. nicotínico, la piridoxina y la riboflavina, al parecer tienen efectos favorables en algunos cultivos, pero la biotina, ac. fólico y el pantotenato de calcio, entre otros, no se consideran como elementos limitantes en el crecimiento vegetal, (Dodds, 1985); (Margara, 1988).

4) Aminoácidos y suplementos orgánicos.

Los aminoácidos se utilizan principalmente para proveer una fuente rápida de nitrógeno. Con excepción de la glicina, la cual es un componente de varios medios de cultivo, los aminoácidos no se

consideran como esenciales. Algunas veces son añadidos a los medios de cultivo aminoácidos como, el ac. aspártico, la asparagina, el ac. glutámico, la glutamina y la arginina, (Dodds, 1985). Ocasionalmente la metionina es añadida en pequeñas concentraciones, participando al parecer en la biosíntesis del etileno, además tiene un efecto en la estimulación de la xilogénesis. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos de sinergia, estimulando fuertemente la proliferación de células y la organogénesis en algunas especies, (Margara, 1988). Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos son muy variables, de acuerdo con la especie y el tipo de morfogénesis estudiada, por lo que no es posible establecer una regla general, (Flick, 1983), (Margara, 1988).

Otros componentes del medio de cultivo son los llamados suplementos orgánicos, formados por numerosos productos o extractos naturales de composición poco definida y variable, (Margara, 1988). Estos suplementos frecuentemente tienen efectos positivos en el desarrollo de los explantes. Los complementos orgánicos más usados son: el extracto de levadura, hidrolizado de caseína, leche de coco, jugos de frutas (naranja, piña, plátano, uva y jitomate), entre otros, (Dodds, 1985). La tendencia actual es tratar de evitar su uso, ya que al ser compuestos químicamente poco definidos, los resultados se vuelven azarosos y poco repetitivos, (Margara, 1988); (Pierick, 1990).

5) Sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, (SRCV).

Las SRCV son compuestos orgánicos, que tienen diferentes efectos en el crecimiento y la coordinación del desarrollo en las plantas, actuando generalmente en lugares diferentes a donde son producidas, (Dodds, 1985). Son activas a bajas concentraciones, (Pierick, 1990). Estas sustancias comprenden a las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido absicico y etileno. Entre estos compuestos, los dos primeros son los mas utilizados en el CTV, ya que se ha demostrado que el balance en la formación de raices y brotes, está influenciado por el equilibrio endógeno y/o exógeno de auxinas y citocininas, (Dodds, 1985); (Warren, 1991).

Debido a que estas sustancias se producen en células específicas, son transportadas a los sitios de acción, por lo cual, la mayoría de los tejidos vegetales cuando se excisan durante el cultivo de tejidos *in vitro*, requieren de suministro exógeno, (Dodds, 1985).

En general, si a un medio de cultivo se le debe añadir una auxina o una citocinina, para conseguir la expansión y/o desarrollo morfogénico, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal, (Dodds, 1985); (Pierick, 1990); (Warren, 1991).

Las auxinas son compuestos que en general participan estimulando la elongación celular y el enraizamiento, (Pierick, 1990). En el CTV se han empleado auxinas naturales como el ácido indol 3-acético (AIA), el cual es muy sensible a la degradación biológica por enzimas oxidasas y peroxidasas y a la luz, (Dodds, 1985). Otros compuestos sintéticos que tienen actividad auxínica y

que han sido ampliamente utilizados al igual que el AIA en el CTV son, el ácido 1-naftalenacético (ANA), el ácido indol-butírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), (Jacobsen, 1983); (Dodds, 1985). El 2,4-D es utilizado en la producción de callo, en la inducción celular y en la represión de la morfogénesis, (Locy, 1984); (Warren,1991). Las auxinas son utilizadas generalmente en concentraciones de 0.01 a 10.0 mg/l y en ocasiones en concentraciones superiores, (Dodds, 1985). Las auxinas tienen diferente capacidad de inducir una respuesta en las células vegetales, por lo que se les ha clasificado como débiles o fuertes en base a la concentración que se debe usar para causar la misma reacción, por ejemplo el AIA , se utiliza normalmente en concentraciones mas altas en comparación con las auxinas sintéticas como el 2,4-D, ANA y AIB, las cuales son relativamente mas activas, (Pierick, 1990).

En general, los principales efectos de las auxinas (Jacobsen, 1983); (Dodds, 1985); (Rojas, 1987); (Jankiewicz, 1989); (Pierick, 1991), son:

- a) Estimulación del alargamiento celular o su represión dependiendo de la concentración.
- b) Participan en la expansión de los tejidos y formación de raíces adventicias.
- c) En interacción con otras SRCV, ejercen un efecto característico sobre la diferenciación celular, promoviendo la formación de órganos adventicios.
- d) En algunos casos, altas concentraciones promueven la

Las citocininas son sustancias que en forma natural son producidas en las raíces principalmente, (Dodds, 1985). Estas sustancias son derivadas de las adeninas (aminopurinas), (Gamborg, 1991).

Las citocininas naturales empleadas en el CTV son, la 2-isopentil-adenina (2-IP) y la zeatina (Z). Las citocininas sintéticas utilizadas con mayor frecuencia son la 6-benciladenina (6BA) y la 6-furfuriladenina o kinetina (K), ambas se utilizan normalmente en concentraciones similares, (Jacobsen, 1983).

Los principales efectos de las citocininas en las plantas, (Dodds, 1985); (Jankiewicz, 1989); (Pierick, 1990), son los siguientes:

- a) Estimulan la división celular y por lo tanto la proliferación de los tejidos en cultivo, en compañía de auxinas. Esta función es un proceso natural *in vivo*.
- b) Promueven la formación de vástagos axilares, ya que disminuyen la dominancia apical.
- c) Son promotoras de la germinación y formadoras de órganos.
- d) Detienen la caída foliar.
- e) En concentraciones elevadas pueden inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, se puede inhibir la formación de raíces.
- f) Son retardadoras de la senescencia.

Método general de la micropropagación.

En los sistemas de micropropagación se reconocen varios estados secuenciales para la obtención de plantas completas a partir de explantes cultivados *in vitro*, (Debergh, 1993), estos son:

Estado 0. Selección de la planta madre.

En el manejo de las plantas madre se deben considerar dos aspectos importantes:

- a) el control de las condiciones fisiológicas de la planta, en general estas deben estar sanas y en crecimiento activo y
- b) la eliminación de microorganismos patógenos. En el caso de las plantas silvestres y sobre todo aquellas que se encuentran sobreexplotadas o en peligro de extinción, esta etapa es de particular importancia ya que sólo se trabaja con el material disponible.

Estado I. Establecimiento del cultivo aséptico.

En esta etapa se considera el establecimiento del explante en el medio de cultivo. Existen varios factores que afectan el éxito de esta etapa, estos son:

- a) La selección de la planta madre. Este factor se encuentra en relación con el estado 0, ya que en algunos casos es difícil contar con plantas donadoras que reúnan las condiciones requeridas, (calidad y sanidad).
- b) La contaminación. Durante el estado I, muchas especies

empiezan a mostrar serios problemas de contaminación que no pueden ser controlados por métodos convencionales de desinfección, particularmente la presencia de patógenos sistémicos, haciéndose necesario el desarrollo de estrategias metodológicas para controlar este problema.

- c) Las condiciones nutricionales y ambientales. Son aspectos de particular importancia en el control morfogénico.

Estado II. Multiplicación de plántulas o propágulos *in vitro*.

La meta de esta etapa es incrementar el número de plántulas para su posterior enraizamiento. El éxito de la multiplicación radica en que se produzcan plantas uniformes, del tamaño apropiado, que se recuperen con prontitud después de su transferencia a suelo y que empiecen a crecer de inmediato.

Estado III. Preparación para la transferencia de las plántulas a suelo.

Durante esta etapa, las plántulas se preparan para su transferencia a suelo. El enraizamiento juega un papel muy importante, ya que este determinará el éxito de la etapa posterior, (Preece, 1993). Cuando las plántulas no generan raíces en el medio de cultivo, es necesario subcultivarlas en medios enraizadores con presencia de auxinas.

Estado IV. Transferencia al medio natural.

La etapa de trasplante abarca la transferencia de las plántulas del medio aséptico de cultivo, al ambiente natural a nivel invernadero y posteriormente la introducción a su sitio final.

Durante esta etapa el proceso de aclimatación es el punto central que en muchas ocasiones genera un verdadero problema, ya que las plantas durante el proceso, pueden presentar pérdida excesiva de humedad por la falta de una cubierta cerosa cuticular en sus hojas, esto se debe a que se han desarrollado en ambientes prácticamente saturados de humedad; por otro lado, las plantas deben pasar de ser heterótrofas a autótrofas, condiciones que influyen la tasa de sobrevivencia de las plantas producidas *in vitro*.

6.4 El cultivo de tejidos en el género *Valeriana* sp.

Los estudios en cultivo de tejidos de especies del género *Valeriana* sp. han estado restringidos por muchos años a la extracción de valepotriatos, a través del cultivo de callos y células en suspensión, (Mathur, 1988).

Becker, y col. (1984), aislaron a partir del cultivo de callos de *V. wallichii*, y ocho especies más del mismo género, algunos valepotriatos, entre otros, valtratos, didrovaltratos y acelvaltratos, detectándolos también en tejido diferenciado de raíz y tallo.

En 1985, cultivando tejidos *in vitro* de *V. wallichii* tratados con colchicina, Becker y col. encontraron que estos medios de cultivo favorecen la producción de valepotriatos como los homovaltratos, isovaltratos, valtratos y acelvaltratos, identificando en total nueve valepotriatos y dos productos de degradación.

Violon, y col. (1984), realizaron un estudio comparativo del contenido de valepotriatos en varias especies del género *Valeriana* sp. en cultivos de callo y tejido diferenciado *in vitro*, determinando que las especies contenían estos compuestos químicos en proporciones similares.

Mathur, y col. (1988), estudiaron la propagación *in vitro* de *V. wallichii*, utilizando meristemas apicales y axilares de dos poblaciones naturales, teniendo como medio basal en todos sus experimentos el medio MS y empleando SRCV como la K, 6BA y AIA en concentraciones de 1.0 a 5.0 mg/l. Las respuestas óptimas en el desarrollo de plantas completas, en tamaño y longitud de raíz se obtuvieron al añadir a los medios K en combinación con AIA, en concentraciones de 5.0 y 1.0 mg/l respectivamente. En la combinación de 6BA y AIA obtuvieron plántulas en menor proporción y menos vigorosas con respecto a la combinación de K y AIA.

Finalmente, en relación a *V. edulis* ssp. *procera*, Sánchez (1991), realizó un estudio en *V. edulis* ssp. *procera* con la

finalidad de establecer una técnica de propagación *in vitro* y producir callo para la obtención de aceites esenciales, utilizando explantes de hoja, rizoma, tallo, peciolo y semillas. Durante el desarrollo del trabajo se detectó en los tejidos vegetales, la presencia de una contaminación sistémica por bacterias y una elevada oxidación. El autor, seleccionó algunos antibióticos para encontrar la concentración mínima inhibitoria de las poblaciones bacterianas, además de establecer un método para el control de la oxidación, utilizando soluciones como el ácido ascórbico y el ácido cítrico entre otras. En esta investigación no se lograron establecer cultivos *in vitro* debido a que no se pudo controlar la contaminación sistémica, ya que con el empleo de altas concentraciones de estreptomycin disminuyeron las poblaciones bacterianas, pero resultó sumamente tóxica para los tejidos vegetales.

III. JUSTIFICACION.

Bajo el panorama anterior, se planteó el presente trabajo, tomando como referencia las siguientes consideraciones:

1. México, por ser uno de los países mas ricos en diversidad genética del mundo, cuenta con gran cantidad de especies medicinales autóctonas, las cuales, por presiones ecológicas y socioeconómicas estan siendo fuertemente perturbadas, al grado de que sus poblaciones naturales en muchos casos se encuentran sobreexplotadas y/o en peligro de extinción.
2. Las plantas medicinales mexicanas tienen una importancia bipolar, es decir, como un recurso natural de nuestra cultura, y como base de muchos medicamentos, lo que ha generado en la actualidad, una demanda de producción, hasta ahora insatisfecha ya que el cultivo de plantas medicinales se realiza principalmente en huertos familiares, para autoconsumo.
3. La carencia de conocimiento sistematizado de la flora medicinal mexicana y sobretodo la escasez de estudios fitotécnicos que lleven al cultivo especies que hasta ahora solo se colectan de los ecosistemas naturales, requiere el realizar estudios al respecto que coadyuven a la preservación de nuestros recursos naturales.

4. La *V. edulis* ssp. *procera* es una planta silvestre, ubicada en el marco anterior, conocida y utilizada por sus efectos terapéuticos, en la actualidad sobreexplotada por su gran demanda, por lo que el presente trabajo pretende:

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Obtener cultivos *in vitro* de *V.edulis* ssp. *procera*, como una contribución al estudio fitotécnico de las plantas medicinales mexicanas sobreexplotadas, mediante procedimientos de Cultivo de Tejidos Vegetales.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Obtener plantas de *V.edulis* ssp. *procera* libres de bacterias sistémicas, a partir de meristemos apicales con un par de primordios.
2. Determinar la respuesta *in vitro* de diversos explantes de *V. edulis* ssp. *procera*, en presencia de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.
3. Evaluar el efecto de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, utilizando ácido indol 3-acético (AIA), 6-bencil aminopurina (6BA o 6BAP) y 6-furfuril aminopurina (K), en la regeneración *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera*, a partir de meristemos apicales con un par de primordios.

V. HIPOTESIS.

1. La obtención de plantas de *V. edulis* ssp. *procera* libres de bacterias sistémicas depende del tipo de explante cultivado *in vitro*.
2. La formación de plantas completas de *V. edulis* ssp. *procera* cultivada *in vitro*, está en relación con el tipo de explante empleado.
3. La respuesta morfogénica de *V. edulis* ssp. *procera* cultivada *in vitro*, no se ve modificada con el empleo de diferentes concentraciones de fitohormonas.

Para aceptar o rechazar las hipótesis planteadas, se evaluaron 20 tratamientos, los cuales se establecieron en 2 ensayos. Utilizando un diseño completamente, y a través de un análisis de varianza, se determinó si existían diferencias significativas entre las variables de respuesta: tamaño de la plántula y longitud de raíz.

VI. MATERIALES Y METODOS.

La investigación experimental se realizó en el Departamento de Biología Molecular de plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, ubicado en la Cd. de Cuernavaca, Morelos, bajo la dirección del Dr. Miguel Lara Flores.

VI.1 Material biológico.

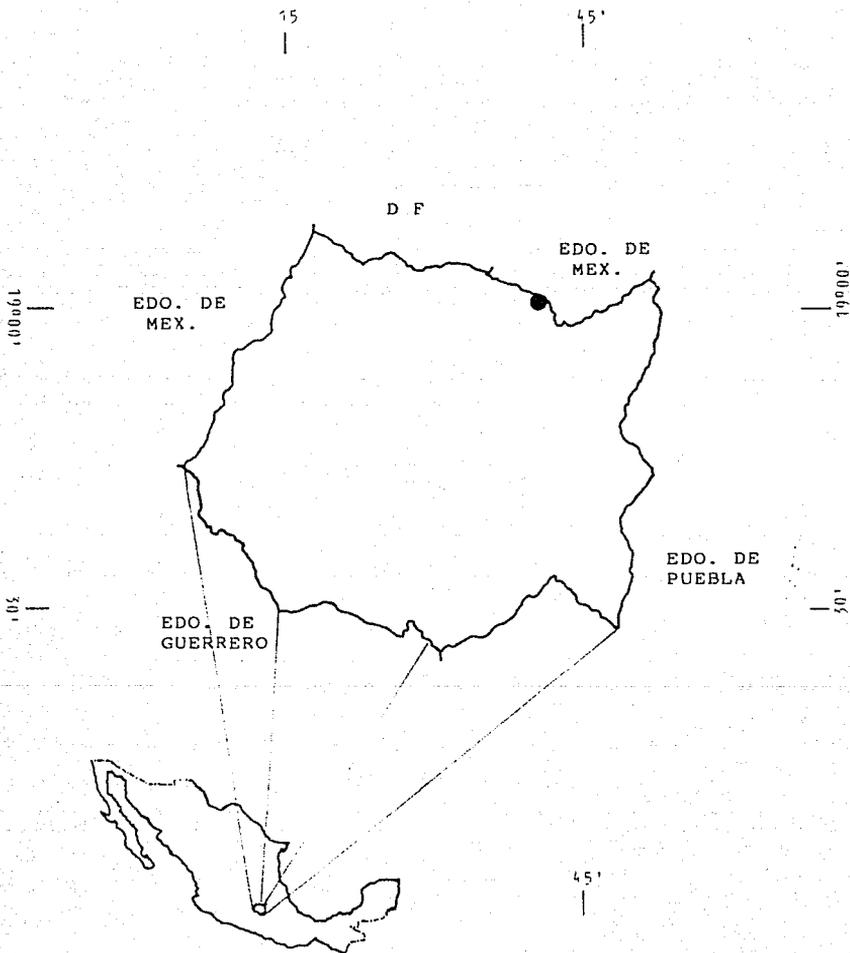
El material biológico utilizado en este trabajo fueron semillas y plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, provenientes de una población natural y los 5 explantes utilizados fueron, radículas, hojas, meristemas apicales con un par de primordios, hipocotilos y peciolo obtenidos de la germinación *in vitro* de semillas.

VI.2 Lugar de colecta.

La zona de colecta del material biológico silvestre se encuentra ubicada al norte del Estado de Morelos, en los límites con el Estado de México, dentro de las coordenadas 19° 02' de latitud norte y 98° 57' de longitud oeste, con una altitud que va de 2 500 a 2 700 metros sobre el nivel del mar, (mapa A).

MAPA A

Ubicación geográfica de la zona de colecta de *Valeriana edulis* ssp. *procera* en el Estado de Morelos.



● Zona de Colecta

De acuerdo con Garcia, (1982), la zona de colecta presenta un clima, C (w2) (w) (b'), es decir, corresponde al grupo de los templados, con una temperatura del mes mas frío entre - 3° y 18° C y del mes mas caliente entre 6.5° y 22° C, siendo el mas húmedo de los templados subhúmedos.

El tipo de vegetación, de acuerdo a la clasificación de Rzedowski, (1985), corresponde a un relicto de bosque de coníferas, encinar y pinar en algunas partes, vegetación secundaria, representada por pastizales y áreas ruderales.

VI.3 Métodos de desinfección de semillas.

Antes de promover la germinación de semillas de *V. edulis* ssp. procera *in vitro*, se procedió a eliminar los microorganismos superficiales de manera convencional, a través de los siguientes pasos:

- a) Lavado de las semillas con agua corriente y detergente líquido, (extrán).
- b) Enjuague con agua corriente.
- c) Inmersión en alcohol etílico (etanol) al 70% durante 30-60 segundos.
- d) Inmersión en hipoclorito de sodio, al 15% durante 30 minutos. Las semillas se enjuagaron con agua esterilizada previamente en autoclave a 120 C, durante 20 minutos. El enjuague se efectuó dentro de una campana de flujo laminar desinfectada previamente con etanol absoluto.

Vl.4 Medios de cultivo.

El medio de cultivo utilizado fué el de Murashige y Skoog (MS). Se empleó sacarosa como fuente de carbono, en una concentración de 1.5 % para la germinación *in vitro*, y de 3.0 % en las pruebas de regeneración *in vitro*.

Se utilizó un medio sólido, por la adición de agar a una concentración de 0.8 %.

Las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal fueron: auxinas (AIA) y citocininas (6BA y K), las que se incorporaron a los medios de cultivo en concentraciones de 1.0 a 7.5 mg/l. El medio fue ajustado a un pH de 5.6 ± 1 .

Vl.5 Siembra *in vitro*.

Después de concluir los pasos de desinfección superficial de las semillas, se procedió a su siembra en frascos gerber previamente esterilizados, los que contenían de 25 a 30 ml de medio nutritivo (MS), sin SRCV, suplementado con sacarosa al 1.5 % y con agar al 0.8 %. Este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar, en presencia de un mechero. En cada frasco se colocaron 10 semillas y se mantuvieron en condiciones ambientales controladas. La temperatura para la germinación de semillas y desarrollo de explantes fué de 21°- 22° C. La germinación y morfogénesis de *V. edulis* ssp. *procera* se desarrolló en un fotoperiodo de 12 hrs., con una intensidad luminosa de 1 000 lux. y una humedad relativa mayor del 70 %.



Figura 2. - Aspecto de la cámara de germinación donde se llevó a cabo la fase experimental.

Vl.6 Regeneración de explantes *in vitro*.

- a) Los explantes se obtuvieron de plántulas germinadas *in vitro*, cuando estas alcanzaron un tamaño de 5 cms. (50 días aproximadamente). Dentro de una campana de flujo laminar, se disectaron explantes de meristemos apicales con un par de primordios foliares, hipocotilos, radículas, hojas y peciolo, (Figura 3).

Los explantes se colocaron en frascos gerber que contenían el medio de cultivo descrito en el punto Vl.4 y en condiciones ambientales descritas en el punto Vl.5.

- b) El procedimiento para la obtención de plantas libres de bacterias sistémicas se describe en el esquema 111.

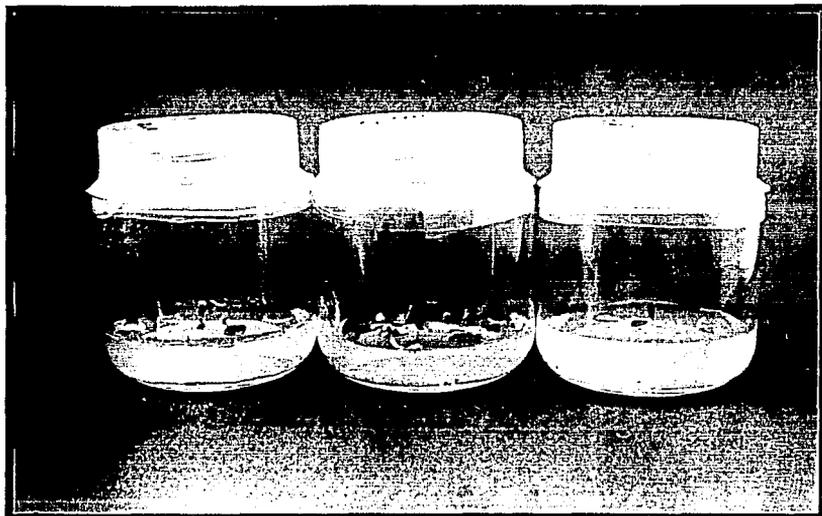
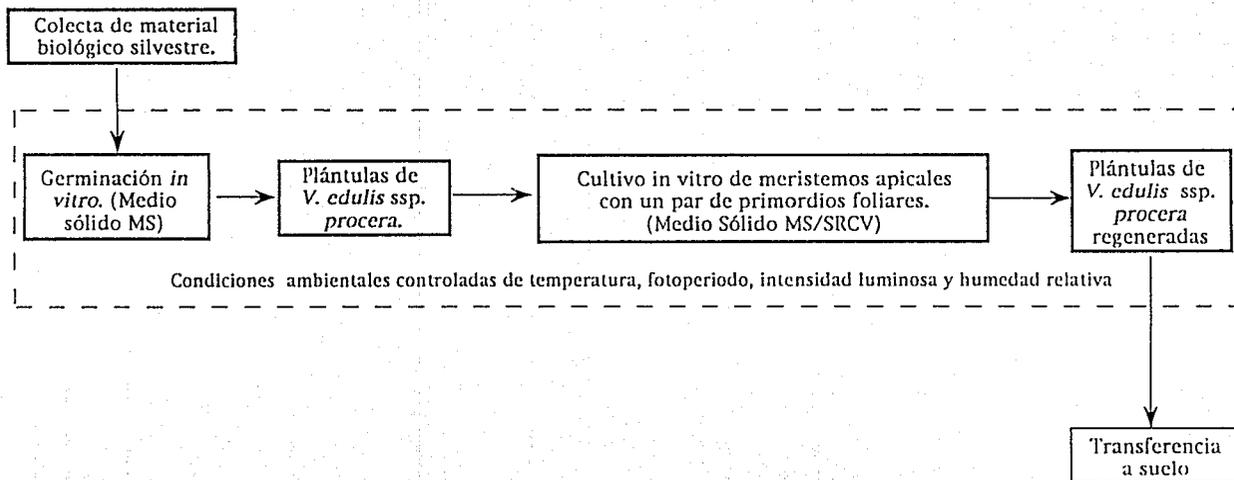


Figura 3.- Diversos explantes de *V. edulis ssp. procera* cultivados *in vitro*, en medio MS, con diferentes combinaciones.

ESQUEMA III

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS PASOS SEGUIDOS PARA LA OBTENCION DE PLANTAS DE *Valeriana edulis* ssp. *procera* , LIBRES DE BACTERIAS SISTEMICAS.



Vl.7 Estrategia experimental.

Para aceptar o rechazar las hipótesis planteadas, se establecieron 20 tratamientos, los cuales se analizaron en base a un diseño estadístico completamente al azar, para cada variable de respuesta.

Para evaluar las variables de respuesta de los tratamientos, se aplicaron análisis de varianza y factorial en dos fases:

En un primer análisis, los tratamientos evaluados fueron el resultado de las combinaciones de 4 niveles de citocinina y 4 niveles de auxina (4×4), dando como resultado 16 tratamientos.

En una segunda fase, se analizaron 2 tipos de citocininas y 4 concentraciones de auxinas (2×4), dando como resultado 8 tratamientos. El experimento constó de 20 tratamientos, debido a que, en la segunda fase se repitieron los 4 tratamientos donde se obtuvieron las mejores respuestas.

El experimento constó de 20 tratamientos (combinaciones hormonales).

1 tipo de tejido (meristemas apicales con un par de primordios foliares)

1 tipo de medio ambiente

La unidad de observación fué un frasco de cultivo

Los caracteres evaluados fueron:

Porcentaje de respuesta morfogénica, (expresada en la formación de plantas completas), a los 30, 60 y 90 días.

Altura de los brotes a los 30, 60 y 90 días en mm.

Longitud de raíz a los 30 60 y 90 días en mm.

VII. RESULTADOS-DISCUSSION.

1. Regeneración *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera* libre de bacterias sistémicas.

Se cultivaron *in vitro* explantes de hoja, tallo, peciolo y raíz, provenientes de plántulas silvestres de *V. edulis* ssp. *procera*; al segundo día de cultivo empezaron a aparecer colonias bacterianas rodeando los explantes.

Se sabe que la presencia de microorganismos patógenos en los medios de cultivo se debe a dos factores:

- 1) a una manipulación inadecuada del material utilizado durante el proceso de esterilización y
- 2) a la contaminación sistémica de los tejidos vegetales, formando "halos" alrededor de los explantes, principalmente por las bacterias, estos resultados confirmaron lo citado por Cassels, (1993) y Sánchez, (1991).

Una de las vías para la obtención de plantas libres de bacterias sistémicas es el cultivo del domo apical solo o con un par de primordios en condiciones asépticas, (Evans, 1983); (Warren, 1991). Retomando la estrategia anterior, se logró en este trabajo la regeneración de plántulas de *V. edulis* ssp. *procera* libres de bacterias sistémicas, a partir del cultivo *in vitro* de meristemos apicales con un par de primordios foliares, en el medio MS adicionado con SRCV, 6BA o K / AIA, bajo condiciones ambientales controladas.

De acuerdo con Pierick, (1990), la producción de plantas libres de patógenos sistémicos, (principalmente virus y bacterias), a partir del cultivo *in vitro* de meristemos, se debe, entre otras causas, a la ausencia de plasmodesmos y de elementos vasculares en las zonas meristemáticas.

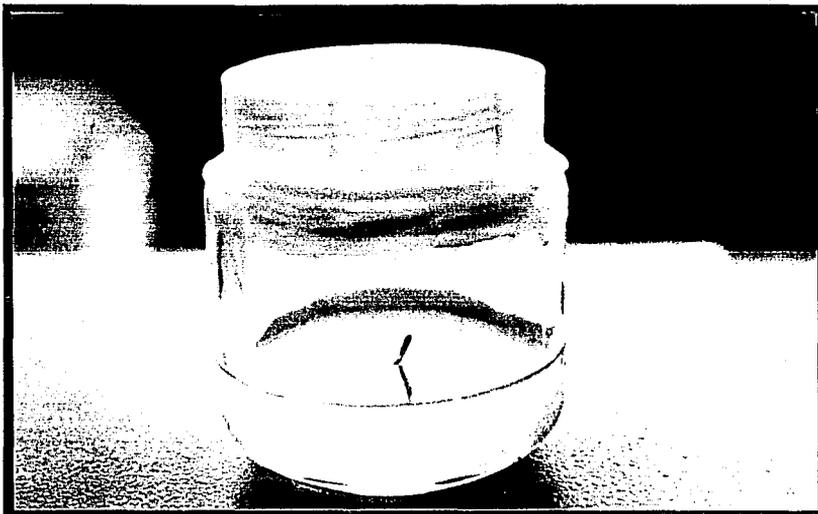


Figura 4.- Presentación de los meristemas apicales de un par de primordios foliares de *V. edulis* ssp. *procera*, al inicio del cultivo *in vitro*.

2. Respuesta morfogénica *in vitro* de diversos explantes de *V. edulis* ssp. *procera*.

Se cultivaron *in vitro* explantes de meristemos apicales con un par de primordios foliares, radículas, hipocotilos, hojas y peciolas, provenientes de plantas germinadas *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera*. El medio de cultivo empleado para todos los explantes fue el MS, adicionado con diversas combinaciones y concentraciones hormonales, bajo condiciones ambientales controladas. Los explantes que tuvieron una respuesta morfogénica durante el cultivo *in vitro*, fueron los meristemos apicales con un par de primordios foliares. El tipo de explante es uno de los factores que intervienen en el disparo de la expresión morfogénica. Se ha demostrado que los explantes mas efectivos son los provenientes de tejidos meristemáticos, ya que son capaces de responder a factores exógenos nutricionales y ambientales, encontrándose en constante división celular, con la capacidad para generar una planta completa. Los resultados del presente trabajo confirman lo anteriormente descrito, resultados que coinciden con el trabajo de Mathur y col. (1988), al cultivar *in vitro* explantes provenientes de meristemos apicales y yemas axilares de *V. wallichii*.

3. Efecto de las SRCV (auxina/AIA, citocininas/ 6BA - K), en la regeneración *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera*, a partir de meristemos apicales con un par de primordios foliares, en el medio sólido MS.

a) Formación de plantas completas.

En el cuadro 1 se observan los porcentajes obtenidos a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*, de plantas con raíz de *V. edulis* ssp. *procera*. Al comparar los tratamientos donde se utilizó la misma fuente de citocinina (6BA) y auxina (AIA), en diferentes combinaciones y concentraciones, se observa que los porcentajes de respuesta morfogénica máxima en los tres periodos evaluados, se obtuvieron en los tratamientos 1,2,3 y 4, correspondiendo a la concentración más baja de citocinina (6BA) 1.0 mg/l, el porcentaje de formación de plantas completas fué disminuyendo a medida que se aumentaron las concentraciones. Los resultados antes descritos sugieren que la *V. edulis* ssp. *procera* pudiera tener una síntesis de citocininas suficiente para su desarrollo morfogénico, requiriendo de concentraciones bajas de citocininas exógenas. Respecto a la auxina (AIA) empleada en los tratamientos, se observa que la concentración exógena no es un factor limitante en la respuesta morfogénica, ya que en las cuatro concentraciones probadas (1.0, 2.5, 5.0 y 7.5 mg/l) se formaron plantas completas, sin embargo hay una tendencia hacia una mejor respuesta en la concentración máxima de auxina (7.5 mg/l), como se observa en el cuadro 1, ya que a los 30 días se obtuvo la respuesta mas alta y

esta se mantuvo en los tratamientos 8 y 12, si se comparan con los tratamientos que tienen las mismas concentraciones de 6BA.

Al compararse los tratamientos donde se emplearon 6BA o K como fuente de citocinina en concentraciones similares (1.0 mg/l) y AIA en concentraciones de 1.0 a 7.5 mg/l, (trats.1 al 4 y 17 al 20) se observa que el porcentaje de formación de plantas con raíz fue similar. Esto indica que si se quiere producir plantas completas de *V. edulis* ssp. *procera*, se pueden utilizar 6BA o K como fuente de citocinina, en presencia de AIA (auxina).

Mathur y col. (1988), en su trabajo sobre propagación de *V. wallichii*, regeneraron plantas con raíz al emplear K o 6BA en presencia de AIA. De acuerdo con sus resultados, la respuesta morfogénica fue menor cuando utilizaron 6BA como fuente de citocinina. Las diferencias detectadas entre *V. wallichii* y *V. edulis* ssp. *procera* pueden deberse a que la relación entre la expresión morfogénica y la concentración y/o tipo hormonal exógeno requerido, dependen de la especie.

Concentraciones hormonales (mg/l)			% plantas completas D I A S		
Trat.	6BA	AIA	30	60	90
1	1.0	1.0	70	90	100
2	1.0	2.5	70	90	100
3	1.0	5.0	30	90	100
4	1.0	7.5	80	90	100
5	2.5	1.0	0	30	20
6	2.5	2.5	0	40	30
7	2.5	5.0	0	10	30
8	2.5	7.5	20	20	20
9	5.0	1.0	0	20	20
10	5.0	2.5	0	20	20
11	5.0	5.0	10	10	10
12	5.0	7.5	10	10	10
13	7.5	1.0	0	0	10
14	7.5	2.5	10	10	0
15	7.5	5.0	0	0	0
16	7.5	7.5	0	0	0
	K	AIA			
17	1.0	1.0	70	90	100
18	1.0	2.5	80	90	100
19	1.0	5.0	80	90	100
20	1.0	7.5	80	100	100

Cuadro 1. Porcentaje de formación de plantas completas (planta + raíz) a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*, en el medio MS, con diferentes combinaciones hormonales; a partir de meristemas apicales con un par de primordios foliares.

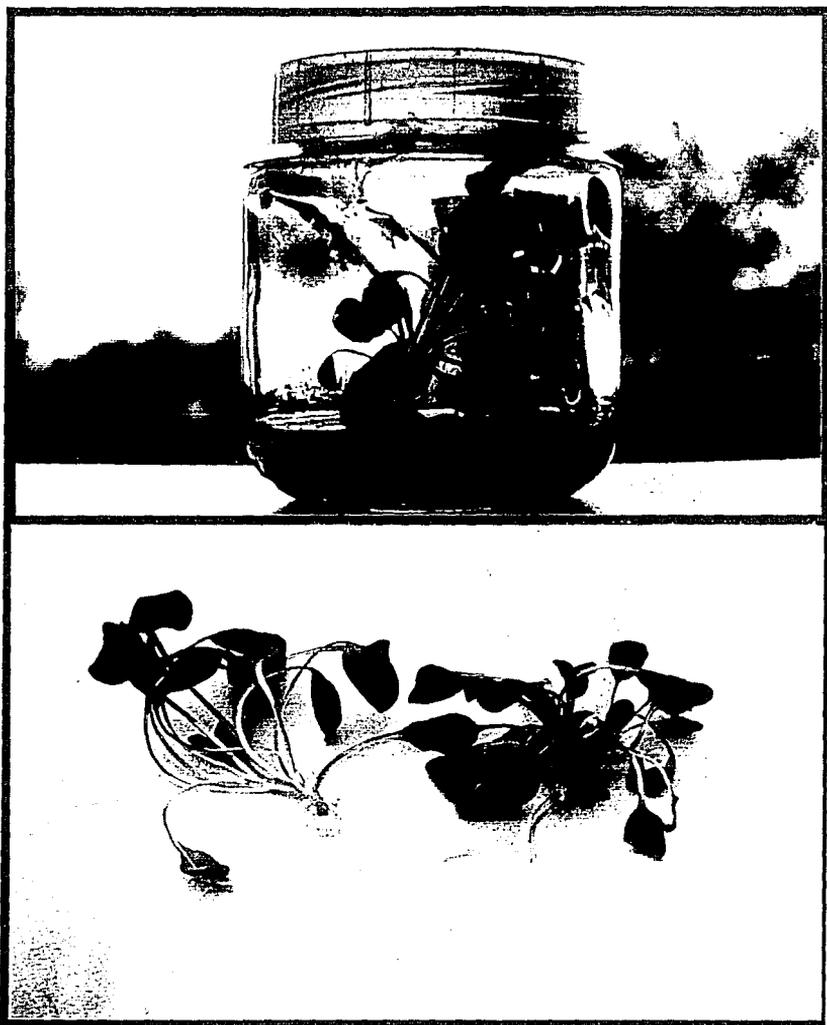


Figura 5.- Plantas completas de *V. edulis* ssp. *procera* a los 60 días de cultivo *in vitro*, a partir de meristemas apicales con un par de primordios foliares.

- b) Efecto de las SRCV, en la altura de las plantas de *V.edulis* ssp. *procera* cultivadas *in vitro*.

En el cuadro 2 se muestra la altura promedio alcanzada por las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera* cultivadas *in vitro*, a los 30, 60 y 90 días, en el medio (MS) adicionado con diferentes concentraciones hormonales de citocinina (6BA) y auxina (AIA), a partir de meristemos apicales con un par de primordios foliares.

Los resultados del análisis estadístico indican lo siguiente:

De acuerdo al análisis de varianza existen diferencias altamente significativas entre las medias de los 16 tratamientos en los tres periodos evaluados.

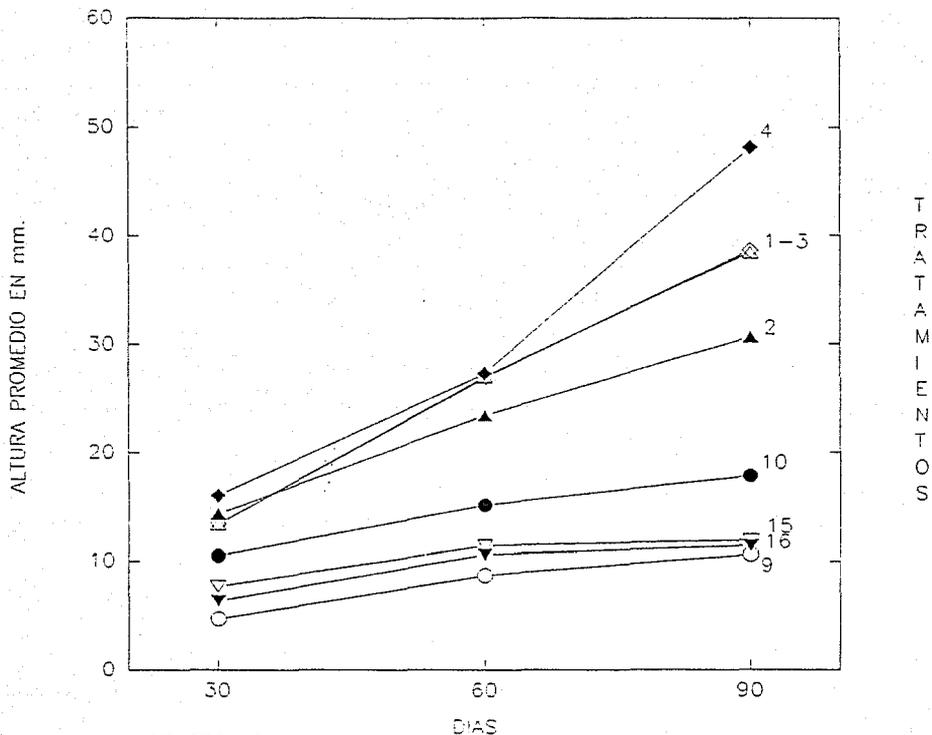
Los resultados del análisis factorial muestran que las diferencias altamente significativas estuvieron en relación con el factor A (citocinina), en los tres periodos evaluados. En la gráfica I se observa que las alturas promedio máximas alcanzadas a los 30, 60 y 90 días evaluados, se presentaron en los niveles más bajos de 6BA (1.0 mg/l) y a medida que se aumentó la concentración de esta hormona en el medio, la altura promedio fué disminuyendo, lo que significa que posiblemente los explantes empleados de *V. edulis* spp. *procera* tienen una biosíntesis de citocininas suficiente para lograr su desarrollo morfogénico, obteniendo las mejores respuestas al utilizar las concentraciones más bajas de citocininas exógenas, por lo que el aumento de la concentración de este fitoregulador, tuvo un efecto negativo en el crecimiento de la

plántula.

De acuerdo con el análisis factorial, la auxina (AIA), en las concentraciones empleadas, no tuvo un efecto significativo, ya que las alturas promedio máximas de las plántulas, alcanzadas en los días evaluados se lograron al añadir a los medios de cultivo 1.0 mg/l de 6BA en combinación con cualquiera de las cuatro concentraciones, (1.0 a 7.5 mg/l) de AIA, no obstante, se observa una tendencia hacia una mayor altura en la concentración mas elevada, esto pudiera deberse a que aun cuando el AIA no actúa directamente en la promoción del crecimiento de las plántulas, ya que su función principal es el inducir la formación de raíces, esta se refleja en el crecimiento vegetal.

Combinación hormonal en mg/l citocinina auxina			Altura promedio en mm. d i a s		
Trat.	6BA	AIA	30	60	90
1	1.0	1.0	13.60	27.00	38.40
2	1.0	2.5	14.30	23.40	30.60
3	1.0	5.0	13.40	26.90	38.60
4	1.0	7.5	16.00	27.30	48.10
5	2.5	1.0	9.40	16.50	21.20
6	2.5	2.5	9.40	15.80	22.80
7	2.5	5.0	9.20	15.20	22.10
8	2.5	7.5	6.10	11.60	14.00
9	5.0	1.0	4.70	8.70	10.60
10	5.0	2.5	10.50	15.10	17.80
11	5.0	5.0	7.50	12.80	14.60
12	5.0	7.5	6.20	13.40	14.40
13	7.5	1.0	7.90	11.50	12.40
14	7.5	2.5	7.70	11.80	12.60
15	7.5	5.0	7.70	11.40	11.90
16	7.5	7.5	6.40	10.60	11.40
ANALISIS DE VARIANZA Fcal.			5.49**	8.02**	12.93*
CME.			20.20	49.95	103.76
ANALISIS FACTORIAL					
Factor A (Citocinina) Fcal			22.21**	36.96**	57.27*
Factor B (Auxina)			1.27NS	0.15NS	0.16N
Factor AB(Interaccion)			1.32NS	1.00NS	2.41N

Cuadro 2. Altura promedio de las plantulas de *Valeriana edulis* ssp. *procera* alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo in vitro, en el medio MS suplementado con diferentes combinaciones hormonales.



GRAFICA I.

Altura promedio de las plantulas de *V. edulis* ssp. *procera* alcanzada a los 30, 60 y 90 dias de cultivo *in vitro*.

No. TRAT. COMBINACION HORMONAL No. TRAT. COMBINACION HORMONAL
(mg/lt.)

1	1.0 6BA - 1.0 AIA	9	5.0 6BA - 1.0 AIA
2	1.0 6BA - 2.5 AIA	10	5.0 6BA - 2.5 AIA
3	1.0 6BA - 5.0 AIA	15	7.5 6BA - 5.0 AIA
4	1.0 6BA - 7.5 AIA	16	7.5 6BA - 7.5 AIA

En el cuadro 3, se observan los resultados comparativos de la altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera* alcanzada a los 30, 60 y 90 días evaluados, utilizando 6BA o K como fuente de citocinina en una concentración de 1.0 mg/l, en combinación con AIA como fuente de auxina en diferentes concentraciones.

De acuerdo con el análisis de varianza, existen diferencias altamente significativas entre las alturas promedio de los tratamientos.

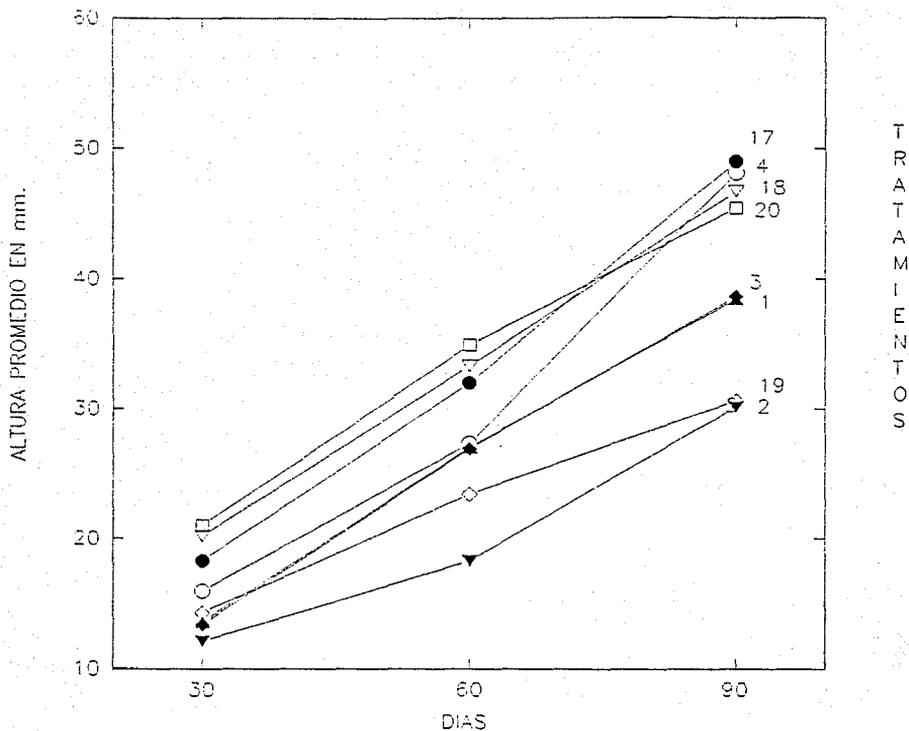
Los resultados del análisis factorial indican que a los 60 y 90 días evaluados hubo significancia en el factor AB, es decir, que la combinación de 6BA + AIA del primer nivel, produce efectos diferentes a la combinación k + AIA del segundo nivel, como se observa en la gráfica II. Las respuestas máximas de altura se obtuvieron en las combinaciones K + AIA en diferentes concentraciones, en comparación con la combinación de 6BA + AIA. Por otra parte, aunque no hubo diferencias significativas al emplear diversas concentraciones de AIA se observó una mejor respuesta al emplear concentraciones de 7.5 mg/l de AIA.

En general los resultados indican que para obtener las respuestas máximas de altura de las plantulas de *V. edulis* ssp. *procera* se deben añadir a los medios de cultivo 1.0 mg/l de K y 7.5 mg/l de AIA. Estos resultados difieren con los de Mathur y col., (1983), ya que ellos encontraron que la dosis óptima para el desarrollo morfogénico de *V. wallichii* fué de 5.0 mg/l de K y 1.0

mg/l de AIA, lo que sugiere, que las estas valerianas, aún perteneciendo al mismo grupo genérico, requieren de concentraciones hormonales únicas de auxinas y citocininas con respuestas específicas para cada especie.

Comb.horm. (mg/l)				Altura promedio mm. (días)			
trat.	citocinina	auxina		30	60	90	
1	6BA	1.0	AIA 1.0	13.60	27.00	38.40	
2	6BA	1.0	AIA 2.5	14.30	23.40	30.60	
3	6BA	1.0	AIA 5.0	13.40	26.90	38.60	
4	6BA	1.0	AIA 7.5	16.00	27.30	48.10	
17	KIN	1.0	AIA 1.0	18.30	32.00	49.00	
18	KIN	1.0	AIA 2.5	20.20	33.30	46.70	
19	KIN	1.0	AIA 5.0	12.10	18.30	30.10	
20	KIN	1.0	AIA 7.5	21.00	34.90	45.40	
ANALISIS DE VARIANZA				Fcal.	4.13**	3.91**	3.14**
				CME.	27.13	76.62	184.77
ANALISIS FACTORIAL							
Factor A (Citocinina)				Fcal.	9.42**	3.15**	1.63NS
Factor B (Auxina)					4.50**	3.58*	3.25*
Factor AB (Interaccion)					1.99NS	4.49**	3.53*

Cuadro 3. Altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera*, cultivadas en el medio MS, y suplementado con diferentes combinaciones hormonales.



GRAFICA II.

Altura promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera* alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro*, utilizando 6BA y K como fuente de citoquinina.

No. TRAT.	COMBINACION HORMONAL	No. TRAT.	COMBINACION HORMONAL
(mg/lit.)			
1	1.0 6BA - 1.0 AIA	17	1.0 K - 1.0 AIA
2	1.0 6BA - 2.5 AIA	18	1.0 K - 2.5 AIA
3	1.0 6BA - 5.0 AIA	19	1.0 K - 5.0 AIA
4	1.0 6BA - 7.5 AIA	20	1.0 K - 7.5 AIA

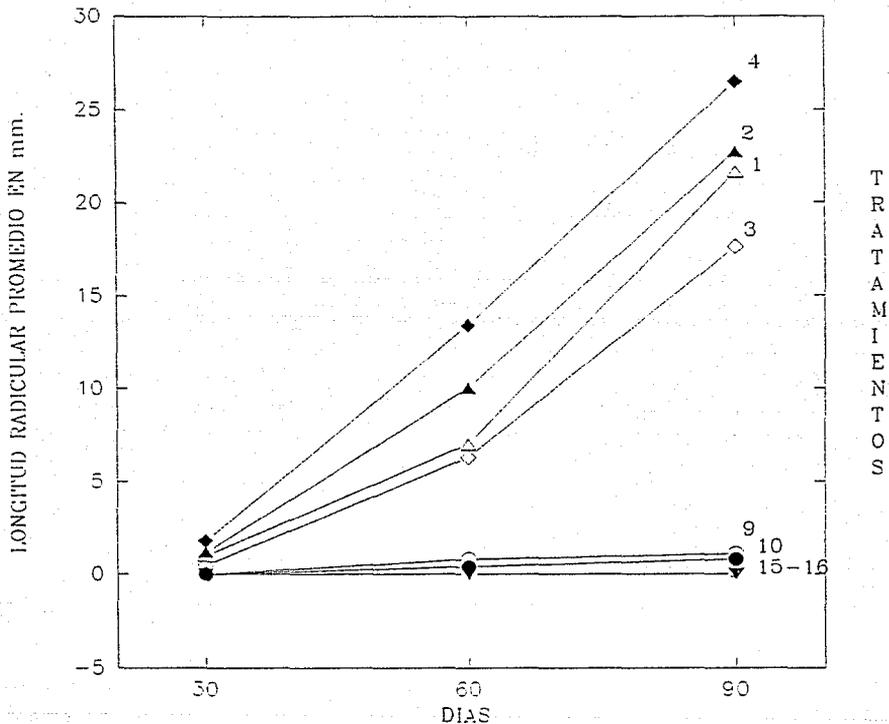
- c) Efecto de las SRCV en la longitud radicular de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera* cultivadas *in vitro*.

En el cuadro 4 se muestran las longitudes radiculares promedio alcanzadas a los 30, 60 y 90 días evaluados de *V. edulis* ssp. *procera*, utilizando diferentes concentraciones y combinaciones de 65A y AIA.

Los resultados del análisis de varianza aplicado indicaron que, existen diferencias altamente significativas entre las medias de los 16 tratamientos en los tres periodos de evaluación. En el análisis factorial mostró que el efecto altamente significativo estuvo en relación con el factor A (citocinina), mientras el factor B y AB fueron no significativos en los 60 y 90 días evaluados. El factor A, tuvo un efecto importante en la formación de plantas completas y altura de las plántulas e indirectamente en la longitud radicular, ya que las concentraciones mayores de 1.0 mg/l empleadas, tuvieron un efecto negativo en el desarrollo morfológico, como se observa en la gráfica III.

Combinacion hormonal en mg/l citocinina auxina			Long.radicular promedio en mm. d i a s			
Trat.	6BA	AIA	30	60	90	
1	1.0	1.0	1.00	7.00	21.60	
2	1.0	2.5	1.20	10.00	22.70	
3	1.0	5.0	0.50	6.30	17.60	
4	1.0	7.5	1.80	13.40	26.50	
5	2.5	1.0	0.00	1.40	2.50	
6	2.5	2.5	0.20	1.90	3.80	
7	2.5	5.0	0.00	0.40	2.90	
8	2.5	7.5	0.20	1.50	1.60	
9	5.0	1.0	0.00	0.80	1.10	
10	5.0	2.5	0.00	0.40	0.80	
11	5.0	5.0	0.10	0.20	0.20	
12	5.0	7.5	0.00	0.40	1.10	
13	7.5	1.0	0.00	0.00	0.70	
14	7.5	2.5	0.10	0.50	0.00	
15	7.5	5.0	0.00	0.00	0.00	
16	7.5	7.5	0.00	0.00	0.00	
ANALISIS DE VARIANZA			Fcal.	10.39**	9.87**	18.46**
			CME.	0.28	17.24	49.28
ANALISIS FACTORIAL						
Factor A (citocinina)			Fcal.	41.06**	42.96**	89.37**
Factor B (auxina)				3.27**	2.02NS	0.67NS
Factor AB(interaccion)				2.54*	1.46NS	0.76NS

Cuadro 4. Longitud radicular promedio de las plántulas de *V.edulis* ssp. *procera*, alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo *in vitro* en el medio MS suplementado con diferentes combinaciones hormonales.



GRAFICA III.
Longitud radicular promedio de las plantulas de *V. edulis* ssp. *procera*, alcanzada a los 30, 60 y 90 dias de cultivo *in vitro*.

No. TRAT.. COMBINACION HORMONAL No. TRAT. COMBINACION HORMONAL
(mg/lt.)

1	1.0 6BA - 1.0 AIA	9	5.0 6BA - 1.0 AIA
2	1.0 6BA - 2.5 AIA	10	5.0 6BA - 2.5 AIA
3	1.0 6BA - 5.0 AIA	15	7.5 6BA - 5.0 AIA
4	1.0 6BA - 7.5 AIA	16	7.5 6BA - 7.5 AIA

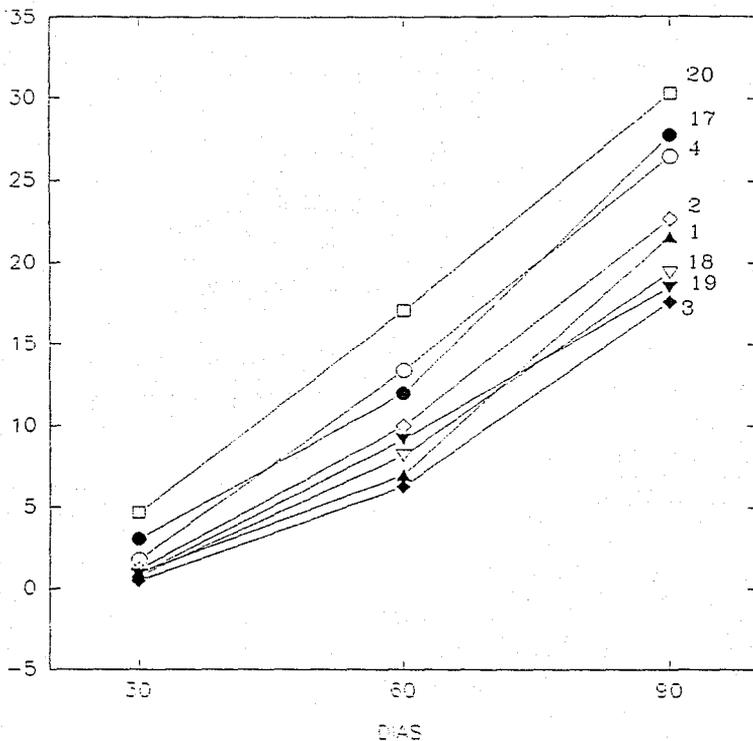
Los resultados de la comparación de medias entre los tratamientos que tenían la misma concentración de citocininas (6BA o K) en el medio, combinadas con AIA en diferentes concentraciones, indicaron que, de acuerdo al análisis de varianza, hay diferencias altamente significativas en los 30 y 60 días evaluados, mientras que a los 90 días hay diferencias significativas.

El resultado del análisis factorial muestra, como se observa en el cuadro 5, el efecto del factor B (AIA) en la longitud radicular, mostrando significancias en los tres periodos evaluados. Como se observa en la gráfica 4, las mejores respuestas de longitud radicular promedio alcanzada, se obtuvieron al adicionar a los medios la combinación K + AIA (trats. 20 y 17). Las longitudes radiculares máximas, de las dos combinaciones, 6BA + AIA y K + AIA, se obtuvieron al emplear 1.0 mg/l de 6BA 0 K y 7.5 mg/l de AIA; estos resultados se deben posiblemente al efecto de las auxinas en la formación de raíces durante el desarrollo morfogénico.

Combinacion hormonal en mg/l citocinina auxina			Long.radicular promedio en mm d i a s		
Trat.	6BA	AIA	30	60	90
1	1.0	1.0	1.00	7.00	21.60
2	1.0	2.5	1.20	10.00	22.70
3	1.0	5.0	0.50	6.30	17.60
4	1.0	7.5	1.80	13.40	26.50
17	1.0	1.0	3.10	12.00	27.80
18	1.0	2.5	0.80	8.20	19.40
19	1.0	5.0	0.90	9.20	18.50
20	1.0	7.5	4.70	17.10	30.30
ANALISIS DE VARIANZA Fcal.			4.98**	2.91**	1.91NS
CME			4.18	44.84	114.33
ANALISIS FACTORIAL					
Factor A(citocinina) Fcal.			7.47**	2.68NS	0.63NS
Factor B (auxina)			6.38**	4.91*	3.52*
Factor AB(interaccion)			2.75*	0.98NS	0.73NS

Cuadro 5. Longitud radicular promedio de las plántulas de *V. edulis* ssp. *procera* alcanzada a los 30, 60 y 90 días de cultivo en el medio MS, y suplementado con 6BA o K como fuente de citocinina y AIA como fuente de auxina.

LONGITUD RADICULAR PROMEDIO EN mm.



T R A T A M I E N T O S

GRAFICA IV.

Longitud radicular promedio de las plantulas de *V. edulis* ssp. *procera*, alcanzada a los 30, 60 y 90 dias de cultivo *in vitro*, utilizando 6BA y K como fuente de citoquinina.

No. TRAT.	COMBINACION HORMONAL (mg/lt.)	No. TRAT.	COMBINACION HORMONAL
1	1.0 6BA - 1.0 AIA	17	1.0 K - 1.0 AIA
2	1.0 6BA - 2.5 AIA	18	1.0 K - 2.5 AIA
3	1.0 6BA - 5.0 AIA	19	1.0 K - 5.0 AIA
4	1.0 6BA - 7.5 AIA	20	1.0 K - 7.5 AIA

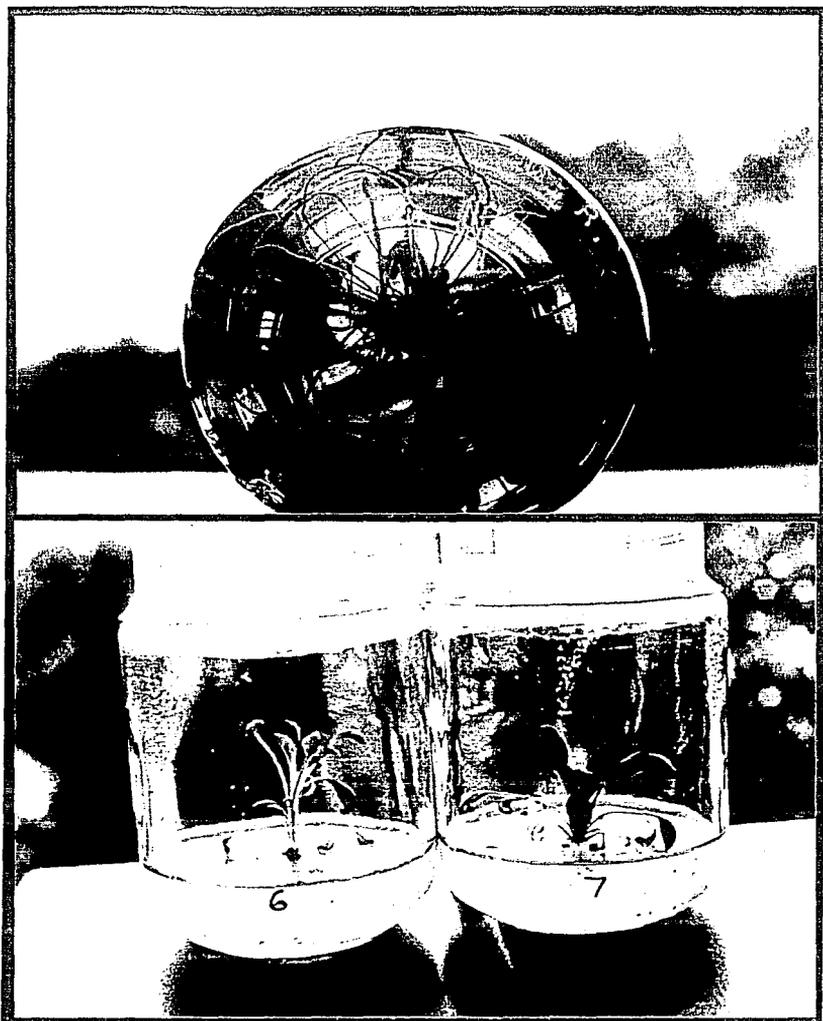


Figura 6.- a) Desarrollo del sistema radicular a los 60 días del cultivo *in vitro* (tratamiento 4). b) Aspecto de las plantas que no lograron desarrollar sistema radicular a los 60 días del cultivo *in vitro* (tratamiento 6 y 7).

La regeneración *in vitro* de *V. edulis* ssp. *procera* se basó fundamentalmente en las estrategias seguidas por Mathur y col. (1966), para la propagación *in vitro* de *V. wallichii*.

Las aportaciones del presente trabajo son las siguientes:

1. El establecimiento de una técnica para la desinfección superficial de las semillas de *V. edulis* ssp. *procera*, ya que generalmente, el material biológico silvestre acarrea en su superficie una gran cantidad de microorganismos, los cuales pueden proliferar rápidamente al entrar en contacto con un medio nutritivo.
2. Otro logro importante del trabajo fué la obtención de plantas libres de bacterias sistémicas, a partir del cultivo *in vitro* de meristemos apicales con un par de primordios foliares, ya que este es un serio problema que se presenta en la propagación por CTV.
3. La demostración de respuesta morfogénica de *V. edulis* ssp. *procera*, es decir, la capacidad de desarrollar brotes y raíces, que conducen a obtener plántulas viables. Este como un primer requisito de la metodología de CTV.

El trabajo presentó un factor crítico, que ha sido el cuello de botella en muchos trabajos de CTV, esto es, el establecimiento

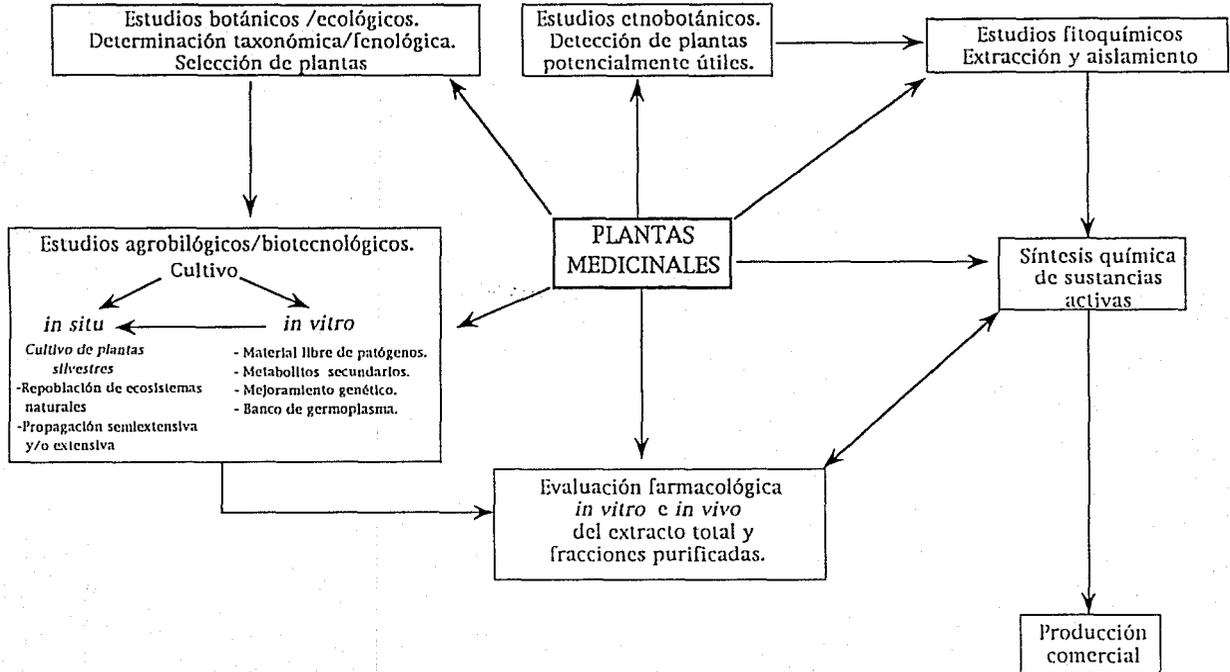
de las plántulas a la fase de establecimiento a suelo. Lo anterior pudiera deberse a que el sistema radicular desarrollado *in vitro* por *V. edulis* ssp. *procera* no sea suficientemente funcional para mantener en condiciones de crecimiento y desarrollo a las plántulas. Esto, ha llevado a plantear la necesidad de realizar múltiples experimentos, con un intervalo mayor de condiciones para el enraizamiento.

Una vez desarrollado el rizoma y sistema radicular de las plantas de *V. edulis* ssp. *procera*, zonas donde se localiza la mayor concentración de principios activos, y retomando algunas consideraciones de Estrada, (1987) y Madueño, (1973), quienes que mencionan que la introducción de una especie silvestre a cultivo, involucra una serie de modificaciones fenotípicas o genotípicas, que frecuentemente se dan en ambientes artificiales para la planta, por lo cual, es importante cotejar la persistencia de sus principios activos a través del proceso. En base a los anterior, se plantea lo siguiente:

1. Confirmar la presencia de metabolitos secundarios (valerianatos/valepctriatos), en las plantas de *V. edulis* ssp. *procera*, obtenidas a partir de su cultivo *in vitro*.
2. Cotejar la efectividad terapéutica de los metabolitos antes mencionados, a través del establecimiento de pruebas biológicas.

Es importante señalar que la tendencia actual, en el estudio de las plantas medicinales, seguida por varios investigadores, es el realizar estudios interdisciplinarios, como se propone en el siguiente esquema (IV), que proporcionen un conocimiento integral de estos recursos, y así contar con elementos para su manejo y aprovechamiento eficiente.

ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES



Esquema IV. Los estudios interdisciplinarios de las plantas medicinales , permiten un conocimiento integral de estas, para su uso eficiente.

VIII. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los explantes para lograr una respuesta morfogénica *in vitro* en *V. edulis* ssp. *procera*, son los meristemas apicales con un par de primordios foliares, y a partir de estos, es posible obtener plantas libres de bacterias sistémicas.
2. Al emplear diversas combinaciones y concentraciones de fitohormonas, hubo diferencias significativas en la respuesta morfogénica, en las variables de respuesta, formación de plantas completas, altura de la plántula y longitud de la raíz.
3. La mejor combinación hormonal para la obtención de plántulas completas de *V. edulis* ssp. *procera* fué el empleo de 1.0 mg/l de $k + 7.5$ mg/l de AIA.

IX . BIBLIOGRAFIA.

Allan, E. 1991. Plant cell culture. in: Plant cell and tissue culture. ed: A, Stafford, and G, Warren. Open University Press. pp. 1-23.

Ammirato.V. 1983. Embryogenesis, in: Handbook of plant cell culture. Vol. I pp.82-121. ed. D,A. Evans, W.R. Sharp, P.V.Ammirato, and Yamada. New York. Mcmillan.

Arnalde y Blanno, M.P., 1957. Extracción y analisis del aceite esencial de la raiz de *Valeriana procera typica*. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Becker, H. et al., 1984. The structure of new valepotriates from tissue cultures of *Valeriana wallichii*. *Planta Médica*. Vol.50 (3):245-248.

Becker, H. et al. 1985. Valepotriates production of normal and colchicine treated cell suspension cultures of *Valeriana wallichii*. *Journal of Natural Products*. Vol.48 (1):17-21.

Cassels,A.C. 1993. Problems in tissue culture: culture contamination, in: *Micropropagation: Technology and application*. ed. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. Kluwer Academic Publishers. pp.31-44.

Debergh, P.C. and Read, P.E. 1993. Micropagation, in: Micropropagation: technology and application. ed. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers pp. 1-14.

Del Amo R.S. y Anaya, A.L. 1982. La importancia de la sistematización de la información sobre las plantas medicinales. Biotica. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Vol 7 No. 2:293-304.

Díaz, J.L. 1976. Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías científicas I. Instituto mexicano para el estudio de las plantas medicinales, A.C. México, D.F.

Díaz, J.L. 1976. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto mexicano para el estudio de las plantas medicinales, A.C. México, D.F.

Diamond, M. 1984. The promising of cell and tissue culture for the production of primary and secondary metabolites, in: Tissue culture technology and development. ATAS Bulletin. Centre for science and technology for development united nations, New York.

Dirzo, R. 1985. Metabolitos secundarios en las plantas. Ciencia 36:137-145.

Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1985. Experiments in plant tissue

culture. 2a. ed. Cambridge University Press. 232 p.

Estrada, L.E. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales "Maximino Martínez". ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Estrada, L.E. 1987. Mantenimiento de plantas medicinales vivas. La herbolaria en México. Cuadernos de Extensión Universitaria. NO. 36. ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Evans, D.A. 1983. In Handbook of plant cell culture. eds: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada. Vol 1 : 291-321. Macmillan, New, York.

Flick, C.E. 1983. Organogenesis. In Handbook of plant cell culture. eds: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada. Vol. 1 : 13-81 Macmillan, New York.

Flores, D.F. 1992. Manual de micropropagación. SEP. SEIT. DGETA. México, D.F.

Flores, O. y Perez, P. 1988. Conservación en México: Síntesis sobre vertebrados terrestres, vegetación y uso del suelo. INIREB. México, D.F.

García, E. 1982. Modificaciones al sistema de clasificación de

Koppen. 2a. ed. Instituto de Geografía, UNAM. México, D.F.

Gamberg, O.L. 1991. Media preparation, in: Plant tissue culture manual: Fundamentals and applications. ed. K. Lindsey. Kluwer Academic Publishers, London. A1: 1-

Hall, R.D. 1991. The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures, in: Plant tissue culture manual: Fundamentals and applications. ed. K. Lindsey. Kluwer Academic Publishers, London. A3: 1-21.

Hartmann, K et al. 1985. Propagación de plantas: Principios y Prácticas. CECSA. México, D.F.

Houghton, P. 1988. The biological activity of Valerian and related plants. Journal of ethnopharmacology. Vol. 22: 121-142.

Jankiewicz, L. 1989. Desarrollo vegetal. Sustancias reguladoras. Universidad Autónoma de Chapingo. México, D.F. p. 121.

Jacobsen, H.J. 1983. Biochemical mechanisms of plant hormone activity. in: Handbook of plant cell culture. ed: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato y Y. Yamada. Vol. 1 pp. 672-695. MacMillan. New York.

Leathwood, P.D. and Chauffard, F. 1985. Aqueous extract of valerian

reduces latency to fall asleep in man. *Planta Médica* V:144-148.

Linares, et al. 1990. Tés curativos de México. Cuadernos 7. Inst.de Biología de la Universidad Autónoma de México. México,D.F. p. 140

Lindahl, O. and Lindwall, L. 1989. Doble blind study of a valerian preparation. *Pharmacology biochemistry and behavior*. V. 32:1065-1066.

Locy, R.D. 1984. Plant cell, tissue and organ culture principles and application, in: *Tissue culture technology and development*. ATAS Bulletin. Centre for science and technology for development united nations, New York.

Madueño, M. 1973. Consideraciones técnicas sobre el cultivo de plantas medicinales. *Cultivo de plantas medicinales*. Ministerio de Agricultura. 2a. Edición. España.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Edit. Mundi-Prensa, Madrid. p.365.

Martínez, M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. ed. Fondo de Cultura Económica. 2a. reimpresión. México, D.F.

Mathur, J. et al. 1988. *In vitro* propagation of *Valeriana wallichii*

dC. Planta Medica. pp. 82-83.

Muñoz, E. 1987. Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. Edit. Mundi-Prensa, Madrid. p 364.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann rev. Plant Physiol. 25:135-166.

Navarrete, A. 1989. Evaluación farmacológica de plantas medicinales en: Plantas medicinales de México. ed. E. Estrada. Universidad Autónoma de Chapingo, México, D.F.

Pedretti, M. 1986. La valeriana. Ergoristeria Domani, Maggic. Roma, Italia. 114-120.

Pierick, 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. L. Mateo-Sagasta. Edit. Mundi-Prensa, Madrid.

Preece, J.E. and Sutter, E.G. 1993. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, in: Micropropagation: Technology and application. ed. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers pp.31-44.

Reinert, J. et al. 1977. Aspects of organization: organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation, in: Plant tissue and cell culture. ed. H.E. Street. 2a. edic. Oxford, Blackwell Scientific

Publications. pp.389-427.

Reyes, B. 1989. Plantas medicinales y Fitoquímica en: Plantas medicinales de México. ed. Estrada, L.E. Universidad Autónoma de Chapingo. México, D.F.

Robert, M.L. and Loyola, V.M. 1984. Plant tissue culture in Mexico, in: Tissue culture technology and development. ATAS BULLETIN. Centre for science and technology for development united nations, New York. USA.

Robert, M.L. y Loyola, V.M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. ed. CICY. 1a. edición. México, D.F.

Rojas, G. M. y Ramírez, R.H. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. 1a. ed. edit. Limusa. México.

Rzedowski, J. et al. 1985. Flora fanerógama del Valle de México. Esc. Nal. de Ciencias Biológicas. IPN. México, D.F.

Rojas, et al. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. ed. Limusa. México, D.F. p. 239.

Sakamoto, et al. 1992. Psychotropic effects of Japanese valerian root extract. Chem. Pharmacology. Vol 40(3):758-761.

Sánchez, O. 1979. La flora del Valle de México. edit. Herrero. México, D.F.

Sánchez, M. 1991. Cultivo *in vitro* de *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Valerianaceae) y estudio sobre la obtención de aceites esenciales a partir de algunas especies de Umbelíferas. Universidad Autónoma del Edo. de Morelos. Cuernavaca, Mor.

Schimmer, 1992. Valerianic acids in commercial plant drugs and extracts prepared from the roots of *Valeriana officinalis* L. PZ. Wiss Vol. 5 (1):31-36.

Sondahl, M.R. Sharp, W.R. and Evans, D.A. 1984. Biotechnology for agriculture of third world countries, in: Tissue culture technology and development. ATAS Bulletin. Centre for science and technology for development united nations, New York.

Stafford, A. 1991. Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. in: Plant cell and tissue culture. ed: A. Stafford and G. Warren. Open University Press.

Swaminathan, M.S. 1984. Tissue culture technology and development. ATAS Bulletin. Centre for science and technology for development united nations, New York.

Tittel, V. et al. 1978. Analyse von Valeriana mexicana. *Planta Médica*. Vol. 34:305-310.

Toledo, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XIV No. 81 : 17-30. México.

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

Valdés, J. 1982. Los jardines botánicos y las plantas medicinales del México Antiguo en: *Memorias del Simposio de Etnobotanica*. Inst. Nal. de Antropología e Historia, Mexico, D.F.

Violon, C. et al. 1984. Relation between valepotriates content and differentiation level in various tissues from Valerianaceas. *Journal of Natural Products*. Vol.47:934-940.