



00570 lej. 1
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**OBTENCION DE THEVETOSIDOS A PARTIR DE CULTIVO
DE TEJIDOS VEGETALES DE Thevetia thevetioides**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(Farmacia - Químico Farmacéutico)

P R E S E N T A :
MA. GUADALUPE ESPARZA SAUCEDO
Director: Dra. Carmen Giral Barnes

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1986



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.

RESUMEN

La fuente de obtención a nivel mundial de los glucósidos cardíacos es a partir de las hojas de Digitalis, actualmente, a pesar de encontrarse en bajas concentraciones, resulta más rentable obtenerlos de esta manera que a partir de métodos sintéticos ya que éstos son generalmente complejos y costosos.

Sin embargo, el abastecimiento normal de estos productos naturales se enfrenta a graves problemas, como son:

- explotación incontrolada,
- disturbios del medio ambiente.
- cambios de clima,
- presencia de plagas, etc.,

La Biotecnología Vegetal surge como una alternativa en la solución de tales problemas.

La digitoxina es una estructura estratégica en la actividad cardiotónica, por ello que se considera un intermediario importante en la producción de nuevos glucósidos cardíacos.

México cuenta con una alternativa en la producción de digitoxina a partir de semillas de Thevetia, género ampliamente distribuido en el país.

En este proyecto se propone implementar un cultivo vegetal de Thevetia thevetioides con el fin de establecer los factores involucrados en la inducción de tejido calloso y el contenido de thevetósidos.

Cuando se desea producir metabolitos secundarios es importante la selección del explante, el cual, debe de contener al producto específico para lograr un mayor éxito en su producción. Para ello se evaluó el contenido de thevetósidos de varios tejidos de la semilla de Thevetia, encontrando que el embrión y el cotiledón son los que mayor contenido poseen.

Para la inducción de tejido calloso se trabajó con los explantes antes mencionados, encontrando que el más adecuado es el cotiledón, por lo tanto, se eligió este explante para realizar los estudios de velocidad de crecimiento y su correlación con la presencia de thevetósidos.

El efecto del balance hormonal auxina/citocinina juega un papel importante en la producción de productos secundarios así como en la velocidad de crecimiento. Para este estudio se utilizó AIA/C, encontrando que para el crecimiento las condiciones más adecuadas son para un balance hormonal de 2.5/1 y para el contenido de thevetósidos es de 1/1. De ahí, concluimos que los requerimientos hormonales para el crecimiento son diferentes a los que necesita para la presencia de thevetósidos.

También se ha observado que el tipo de auxina influye en la producción de metabolitos secundarios. Para este estudio se utilizó 2,4 D y AIA/Cinetina, encontrando que la más adecuada tanto para el crecimiento como para un mayor contenido de thevetósidos era el AIA/C.

En relación a factores físicos se evaluaron las fotocondiciones (luz-obscuridad-fotoperíodo) respecto a su efecto sobre el crecimiento y contenido de thevetósidos, encontrando que la luz y obscuridad no presentan un efecto significativo para estas variables de respuesta a diferencia del fotoperíodo que sí lo presenta.

El modelo experimental planteado respecto a la inducción de tejido calloso de Thevetia cumplió su objetivo en el conocimiento y adaptación de esta nueva Biotecnología Vegetal, de gran importancia para la Industria Farmacéutica, siendo esta información extrapolable a otros cultivos vegetales productores potencialmente de glucósidos cardíacos.

S U M M A R Y

Cardiac glycosides are obtained from Digitalis leaves in which they are found in low levels. Nevertheless, it is the less expensive method than other synthetic ways, that are more complex and obviously more expensive. So, it has been recognized as the main source of cardiac glycosides.

Actually, these natural products faces diverse troubles as

- Uncontrolled exploitation,
- Changes in the natural environment,
- Changes in the weather,
- Plagues presence,

among others.

In order to improve their production and to solve the - majority of these problems, Plant Biotechnology represent a good alternative.

Digitoxin is considered as a strategic structure in cardiotonic activity, so it represents the main intermediate in new cardiac glycosides production.

Mexico has a natural source in the digitoxin production. It is obtained from Thevetia seeds, whose plant is broadly distributed in the whole country.

In this project, it is proposed to improve plant tissue cultures from Thevetia thevetioides, and to study the - variables that may affect the callus tissue induction - and its thevetosides content.

The explant choice, is the more important thing to do in order to achieve the best production of secondary metabolites. This must contain the target product which one's mind is interested on.

To do this, thevetosides levels were analyzed from various tissue parts of Thevetia seed. Results showed that cotyledon and embryo pieces has the major thevetoside content.

For callus tissue induction purposes, these parts were - studied. It was found that cotyledon is the best explant

for studying grown velocity and its correlation with thevetosides presence.

In addition, auxin /cytokinin hormonal balance effect has an important role in the enhancement of secondary products achievement as well as in grown velocity.

In this study, it was utilized IAA/C, and the best - conditions were 2.5/1 for hormonal balance and 1/1 - for thevetosides content. So it is concluded that - hormonal requirements are different from those in getting the major thevetosides content.

It is observed also that auxins class influences the secondary metabolite production. In this experimental project 2, 4 D and IAA/kinetin were used as parameters in studying thevetosides content and grown velocity. Results indicate that IAA/kinetin criteria was the - best in showing major thevetosides content.

Physical factors, such as photoconditions -light, darkness, photoperiod- were analyzed in their influences on grown velocity and thevetosides content. Light and darkness do not show any significative effect for the above measure variables mentioned, whereas photoperiod does.

Since the experimental model planned on Thevetia callus tissue induction gets its objectives in knowledge and technique, it is concluded that this kind of projects in Plant Biotechnology has a great deal with its application in Pharmaceutical Industry by bearing the experience developed in other plant tissue which are potentially cardiac glycosides suppliers.

C O N T E N I D O

	Página
INTRODUCCION	1
1 FUNDAMENTACION DEL TEMA	4
1.1 HISTORIA DE GLUCOSIDOS CARDIACOS	4
1.2 GENERO <u>Thevetia</u> COMO ALTERNATIVA EN LA PRODUCCION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS	6
1.2.1 CARACTERISTICAS Y DISTRIBUCION DEL GENERO <u>Thevetia</u>	6
1.2.2 USOS FOLKLORICOS DEL GENERO <u>Thevetia</u> ,	8
1.2.3 COMPOSICION QUIMICA	12
1.3 DESARROLLO DE METODOS SINTETICOS PARA CARDIOTONICOS	15
1.4 BIOSINTESIS DE CARDIOTONICOS	16
1.5 METABOLISMO Y ACCION INOTROPICA	19
1.6 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	20
1.6.1 ANTECEDENTES	20
1.6.2 PRODUCCION DE CARDIOTONICOS A PARTIR DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	24
1.6.3 BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS MEDIANTE CULTI- VO DE TEJIDOS VEGETALES	28
1.6.4 CONTROLES EN LA PRODUCCION DE FARMOQUIMICOS MEDIAN TE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	34
1.6.4.1 CONTROLES DEL MEDIO AMBIENTE	34
A) ASEPSIA	34
B) CONDICIONES NUTRICIONALES	35
C) PRECURSORES	37
D) SUBSTANCIAS REGULADORAS DEL CRECIMIENTO	38
E) FACTORES FISICOS	44

1.6.4.2	CONTROLES BIOLÓGICOS	45
	A) CRECIMIENTO	45
	B) DIFERENCIACION MORFOLÓGICA	45
	C) EXPRESION DEL METABOLISMO SECUNDARIO	46
	D) ALGUNAS ESPECULACIONES ACERCA DE LA EVOLUCION Y MECANISMO DE CONTROL EN EL METABOLISMO SECUNDARIO	48
1.6.5	CULTIVO DE TEJIDO CALOSO	50
1.6.6	PROBLEMAS Y PERSPECTIVAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	52
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
3	OBJETIVOS ESPECIFICOS	56
4	HIPOTESIS	57
5	MATERIALES Y METODOS	58
5.1	MATERIAL	58
5.1.1	EQUIPO	58
5.1.2	MATERIAL DE VIDRIO Y OTROS	58
5.1.3	MATERIAL BIOLÓGICO	58
5.1.4	REACTIVOS	59
5.2	METODOLOGIA	60
5.2.1	PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO	60
5.2.2	PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	62
5.2.3	SIEMBRA	63
5.2.4	INCUBACION	64
5.2.5	PARAMETROS DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALOSO	64
5.2.6	PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO	65
5.2.7	PORCIENTO DE DIFERENCIACION	65
5.2.8	PORCIENTO DE CONTAMINACION	65

5.2.9	DISPERSABILIDAD CELULAR	66
5.2.10	EXTRACCION DE THEVETOSIDOS DE LA SEMILLA DE <u>Thevetia</u>	66
5.2.11	EXTRACCION DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALLOSO	67
5.2.12	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA THEVETOSIDOS	68
5.2.13	ENSAYO COLORIMETRICO DEL PICRATO PARA THEVE- TOSIDOS	68
5.2.14	ANALISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES	71
6.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	73
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	76
7.1	SELECCION DE LA LOCALIDAD DE RECOLECCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	76
7.2	SELECCION DE LAS PARTES DE LA SEMILLA CON - MAS ALTO CONTENIDO DE THEVETOSIDOS	78
7.3	SELECCION DEL TIPO, TIEMPO Y CONCENTRACION DEL AGENTE DESINFESTANTE	79
7.4	SELECCION DEL TAMAÑO Y FORMA DEL EXPLANTE - PARA LOS COTILEDONES	81
7.5	INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO A PARTIR DE EM- BRIONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	85
7.6	EFFECTO DEL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO A LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO- DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALLOSO	92
7.7	EFFECTO DE LA AUXINA AIA, RESPECTO A LA VE- LOCIDAD DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THE- VETOSIDOS EN TEJIDO CALLOSO DE <u>Thevetia</u> - <u>thevetioides</u> EN CONDICIONES DE LUZ Y OBS - CURIDAD	103

7.8	EFFECTO DEL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO AL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN CON- DICIONES DE LUZ Y OSCURIDAD A LAS CUATRO SEMA- NAS	110
7.9	EFFECTO DE LA AUXINA 2,4 D y AIA/C, RESPECTO - A LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO	121
7.10	EFFECTO DE LAS FOTOCONDICIONES EN RELACION AL - CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN LA- INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO DE <u>Thevetia theve-</u> <u>tioides</u> A LAS CUATRO SEMANAS	128
8	CONCLUSIONES	132
9	PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	136
10	BIBLIOGRAFIA	138

INDICE DE FIGURAS

Fig		Página
1	APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	2
2	RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD DE LA OUABAINA- CON LOS THEVETOSIDOS	11
3	ESTRUCTURA DE LA THEVETIA A Y LA THEVETINA B- AISLADAS E IDENTIFICADAS DE SEMILLAS DE <u>Theve-</u> <u>tia peruviana</u>	13
4	MEZCLA DE THEVETOSIDOS	14
5	SINTESIS PROPUESTA POR SONDHEIMER	15
6	PRINCIPALES INTERMEDIARIOS EN LA BIOSINTESIS- DE GLUCOSIDOS CARDIACOS	18
7	HIDROXILACIONES DE CARDIOTONICOS MEDIANTE CUL- TIVO DE TEJIDOS VEGETALES	29
8	BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS MEDIANTE - GLUCOSILACIONES Y DESGLUCOSILACIONES	30
9	BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS POR OXIDA- CION Y EPIMERIZACION	31
10	DIFERENTES RUTAS DE BIOTRANSFORMACION QUE SE EFECTUAN SOBRE CARDIOTONICOS EN CULTIVOS VE- GETALES DE <u>Digitalis</u>	33
11	ESTRUCTURAS DE LAS AUXINAS	40
12	ESTRUCTURAS DE CITOCININAS	42
13	ESQUEMA DE TRABAJO	74
14	DIFERENCIACION EN CULTIVOS DE EMBRIONES DE - <u>Thevetia thevetioides</u>	88
15	INTERRELACION DEL BALANCE HORMONAL AIA/C, RES- PECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO- CALLOSO DE EMBRIONES A LAS OCHO SEMANAS	91

Fig		Página
16	CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDONES CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C, (P.S.)	94
17	CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDONES CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C, (I.P.F.)	97
18	CURVAS DE CRECIMIENTO COMPARATIVAS ENTRE LAS VARIABLES DE RESPUESTA P.S Y I.P.F.	98
19	TEJIDO CALOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> A DIFERENTES SEMANAS DE CRECIMIENTO	99
20	CINETICA DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS - PARA COTILEDONES CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C	102
21	CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDONES CON LA AUXINA AIA (P.S.)	105
22	CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDONES CON LA AUXINA AIA (I.P.F.)	107
23	INTERRELACION DEL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO AL PESO SECO	112
24	INTERRELACION DEL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS	117
25	CURVAS COMPARATIVAS DE LA INTERRELACION - DE LAS AUXINAS AIA Y 2,4 D/CINETINA, RES- PECTO AL PESO SECO EN FOTOPERIODO	123
26	CURVAS COMPARATIVAS DE LA INTERRELACION - DE LAS AUXINAS AIA Y 2,4 D/CINETINA, RES- PECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS	126

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	FUENTES VEGETALES DE IMPORTANCIA ECONOMICA	23
II	PROTEINAS COMO PRODUCTO DE UN PROCESO DE - DIFERENCIACION	48
III	LOCALIDADES DE RECOLECCION DE <u>Thevetia the-</u> <u>veticoides</u>	77
IV	SELECCION DE LAS PARTES DE LA SEMILLA CON- MAS ALTO CONTENIDO DE THEVETOSIDOS	78
V	EFFECTO DEL TIPO DE AGENTE DESINFESTANTE SO- BRE EL EXPLANTE DE SEMILLAS DE <u>Thevetia</u>	80
VI	PORCIENTO DE CONTAMINACION, RESPECTO A LA - CONCENTRACION Y TIEMPO DE EXPOSICION DEL - HIPOCLORITO DE SODIO	79
VII	EFFECTO DEL TAMAÑO Y FORMA DEL EXPLANTE, RES- PECTO A LA INDUCCION DE TEJIDO CALOSO DE- <u>Thevetia</u>	81
VIII	PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO EN EXPLANTES DE 1/8 DE COTILEDON EN RELACION - AL BALANCE HORMONAL AIA/C	82
IX	PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO EN EXPLANTES DE FORMA Y TAMAÑO CONSTANTES EVA- LUANDO EL EFFECTO DEL BALANCE HORMONAL AIA/C	84
X	PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO DE EMBRIONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	86

Tabla	Página
XI	87
PORCIENTO DE DIFERENCIACION DE TEJIDO CALOSO DE EMBRIONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	
XII	90
PORCIENTO DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS/ - gr. DE TEJIDO CALOSO SECO, DE EMBRIONES- DE <u>Thevetia thevetioides</u>	
XIII	93
CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u> , - CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C (P.S.)	
XIV	96
CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u> - CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C (I.P.F.)	
XV	101
CINETICA DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS- DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u> , CON EL BALANCE HORMONAL - AIA/C	
XVI	104
CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u> - CON LA AUXINA AIA (P.S.)	
XVII	106
CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u> - CON LA AUXINA AIA (I.P.F.)	
XVIII	108
PORCIENTO DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN COTILEDONES DE TEJIDO CALOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> , CON LA AUXINA AIA	

Tabla		Página
XIX	EFEECTO COMPARATIVO ENTRE EL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO A LA AUXINA AIA.	109
XI	EFEECTO DEL BALANCE HORMONAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u> (P.S.)	111
XXI	ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> , RESPECTO AL BALANCE HORMONAL AIA/C	113
XXII	EFEECTO DEL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO AL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> (I.P.F.)	115
XXIII	EFEECTO DEL BALANCE HORMONAL SOBRE EL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALOSO DE COTILEDON DE <u>Thevetia thevetioides</u>	116
XIV	ANALISIS DE VARIANZA DEL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> , RESPECTO AL BALANCE HORMONAL AIA/CINETINA	118
XXV	ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> , RESPECTO AL EFECTO DE LUZ-OSCURIDAD	120
XVI	EFEECTO DE LAS AUXINAS 2,4 D Y AIA /CINETINA, RESPECTO AL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	122
XXVII	EFEECTO DE LAS AUXINAS 2,4 D Y AIA/CINETINA, RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALOSO-DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	125

Tabla	Página
XXVIII ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALLOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> , RESPECTO AL EFECTO COMPARATIVO DE LAS AUXINAS 2,4 D Y AIA/C	127
XXIX EFECTO DE LA LUZ-OSCURIDAD_FOTOPERIODO PARA AIA/CINETINA, RESPECTO AL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	129
XXX EFECTO DE LA LUZ-OSCURIDAD-FOTOPERIODO PARA AIA/CINETINA, RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE <u>Thevetia thevetioides</u>	130
XXXI ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALLOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u> , RESPECTO AL EFECTO LUZ-OSCURIDAD FOTOPERIODO	131
XXXII CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION-DE TEJIDO CALLOSO DE <u>Thevetia thevetioides</u>	133

L I S T A D E A B R E B I A T U R A S

AIA	ACIDO INDOLACETICO
2,4 D	ACIDO 2,4-DICLOROPENOXIACETICO
C	CINETINA
ANA	ACIDO NAFTALENACETICO
I.P.F.	INDICE DE PESO FRESCO
P.S.	PESO SECO

I N T R O D U C C I O N

La Biotecnología ha sido considerada en las últimas décadas, como una de las alternativas de mayor atractivo y potencial en la solución de problemas de alimentación, salud, energía y contaminación, cuya complejidad y magnitud crecen día con día.

La producción de materia prima de origen natural, posee una gran importancia económica a nivel mundial por la gran diversidad de productos que se obtienen a partir de ellos como --- aceites, resinas, taninos, hule natural, gomas, ceras colorantes, sabores, fragancias, pesticidas y fármacos.

Sin embargo, la producción de materias primas de origen natural, se enfrenta a graves problemas como son: la explotación incontrolada, las dificultades de cultivo por condiciones inadecuadas de suelo, ataque de plagas, así como a los problemas técnicos en el cultivo de plantas superiores, lo cual pone de manifiesto la importancia en la implementación de alternativas que solucionen o minimicen tales problemas.

La Biotecnología mediante la técnica de Cultivo de Tejidos -- Vegetales, nos brinda una alternativa de un valor incalculable en desarrollo de nuevas técnicas en agricultura y en la - producción de farmoquímicos.

Países en desarrollo como México, podrían obtener grandes beneficios con esta nueva técnica, En 1970, se firmó el Convenio de Colaboración Científica entre México y Japón, iniciándose las investigaciones en este campo.

Las aplicaciones más importantes del Cultivo de Tejidos Vegetales se presentan en la figura No. 1, donde observamos que - las síntesis de "novo", de precursores, así como las biotransmis

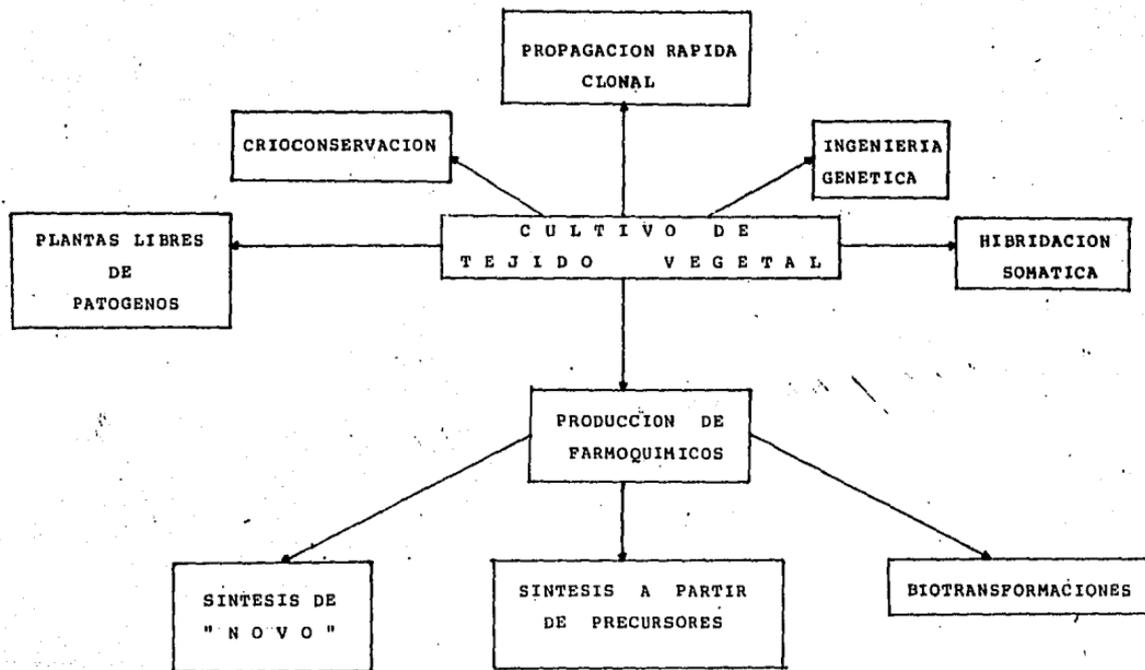


FIGURA No. 1 APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

formaciones son las de mayor interés en el campo de la farmacia.

Los glucósidos cardíacos, se encuentran normalmente en los -- géneros: Digitalis, Apocynum, Periploca, Strophanthus y Thevetia, este último se encuentra ampliamente distribuido de manera silvestre en nuestro país.

La producción de cardiotónicos a nivel mundial se realiza a partir del género Digitalis, del cual se aíslan la digitoxina y la digoxina sustancias que en México se importan en su totalidad, según datos del IMCE (1983). Es importante mencionar que en la actualidad no hay nada que las supere desde el punto de vista farmacológico, a pesar de presentar un margen de seguridad muy estrecho.

La digitoxina es una materia prima de importancia económica, no sólo por su utilidad en la clínica, sino además, por ser considerada la estructura base, a partir de la cual se obtienen cardiotónicos modificados en la búsqueda para lograr una mayor eficacia y un menor efecto tóxico.

Cruz y colaboradores (1977), proponen una fuente alterna en la producción de Digitoxina, a partir de semillas de Thevetia y en la ENEP Zaragoza también se han realizado trabajos al -- respecto Pérez, (1982) y Rodríguez (1982).

En el presente trabajo, se eligió a la Thevetia como modelo experimental en la implementación del Cultivo de Tejidos Vegetales para obtener thevetósidos.

1) FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1 Historia de los Glucósidos Cardíacos

La digital o dedalera fue mencionada por médicos galeses en 1250. Fuchs en 1542 hizo la primera descripción botánica de la planta, el nombre científico de Digitalis purpurea, alude al color y a la forma de la flor que semeja un dedal, Goodman (1978).

Fue usada internamente o en aplicaciones locales para diversas enfermedades no relacionadas entre sí, desde apilepsia -- hasta úlceras cutáneas, Goodman (1978).

En 1777, Withering fué el primero en sugerir el uso terapéutico de la Digitalis, realizó trabajos incipientes respecto a todas las partes de la planta, dió la pauta en la dosificación de esta y propuso los primeros usos específicos para curar la hidropesía Kreig (1967). Ferriar, en 1799, es quien atribuye a la digital una acción primaria sobre el corazón, Goodman (1978).

Nativelle, en 1844, aísla la digitalina amorfa, sin embargo, su inquietud por comprobar que la forma cristalina es más activa lo llevo en 1867, a realizar una experiencia comparativa, sobre ranas, Encontrando que la cristalina es, sin lugar a dudas, la más activa comprobando de esta manera su teoría, Giral (1979).

En el siglo XIX se utilizaron mucho las hojas de Digitalis, sin considerar los graves trastornos por las dosis tóxicas que se administraban y no fué sino hasta 1933 en que Lewis -- atribuye a la digital una acción específica en el tratamiento de la fibrilación auricular, Goodman (1978).

A partir de esta fecha se han incrementado notablemente los estudios clínicos sobre digitálicos, encontrando que la digo-

xina es el compuesto de elección en los padecimientos de insuficiencia cardíaca y que aún, hoy en día, no se ha podido encontrar otra substancia que sea más activa a ésta y con un -- margen de seguridad mayor, por ello la importancia que tiene a nivel mundial.

En la Medicina Tradicional y Herbolaria en México, existen otras plantas a las cuales se les ha atribuido una acción sobre el corazón, Martínez (1969).

Las semillas de Talauma mexicana conocidas como yoloxóchitl o flor de corazón, según experiencias del Instituto Médico Nacional, concluye que "la semilla y sobre toda la corteza contienen una o dos substancias que obran sobre el corazón modificando su sistema nervioso moderador", Martínez (1969).

Las hojas de Calea zacatechichi conocida como zacate de perro contiene un principio activo amargo de función semejante a la de los glucósidos cardíacos, Martínez (1969).

La especie de Chiranthodendron pentadactylon conocida como -- flor de manita, se recomienda que "sus flores, frescas o secas se preparen en un cocimiento que es adecuado para el corazón y contra la epilepsia", Martínez (1969).

A las semillas de Thevetia conocidas como codo de fraile, se les atribuye una acción comparable con los glucósidos cardíacos, Martínez (1969).

1.2. Género Thevetia, como alternativa en la producción de glucósidos cardíacos.

1.2.1. Características y Distribución del Género Thevetia

Las plantas del género Thevetia son árboles o arbustos con las flores largas de color amarillo a anaranjado con la corola en forma de embudo, con jugo lechoso y un fruto globoso de color rojo a negro con un endocarpo como la "nuez", de forma redondeada-triangular con dos cavidades en las cuales se localizan semillas largas con los bordes afilados, florece de julio a diciembre, Stanley (1920 - 1926), Martínez (1969, 1979)

Las especies del género Thevetia se localizan en comunidades de Bosques en Encino, Selva Baja Caducifolia, Selva secundarias de los anteriores tipos de vegetación, Del Amo (1979) y los Bosques Espinosos secundarios del sureste de San Luis Potosí, Rzedewski (1978).

Las semillas de Thevetia son conocidas comunmente como codo de fraile y en México se han encontrado seis especies, las cuales se distribuyen ampliamente en toda la República Mexicana en zonas tropicales y subtropicales:

1. Th. ahouai (L.) A. DC. Su área de distribución son los Estados de Tabasco y Yucatán. El ejemplar tipo fue colectado en Colombia.
2. Th. gaumeri Hemsl. Su área de distribución es el Estado de Yucatán. El ejemplar tipo fue colectado en la Isla de Cozumel.
3. Th. ovata (Cav.) A. DC. Su área de distribución es desde los Estados de Sinaloa y Jalisco hasta Chiapas. El ejemplar tipo fue colectado en Guatemala.
4. Th. peruviana (Pers.) Schum. Su área de distribución es -

desde los Estados de San Luis Potosí y Veracruz hasta los Estados de Yucatán, Chiapas y Guerrero.

5. Th. plumeriaefolia Benth. Su área de distribución son los Estados de Veracruz y Oaxaca. El ejemplar tipo fue colectado en Honduras.

6. Th. thevetioides (HBK) K. Schum. Su área de distribución es desde los Estados de Michoacán hasta Tamaulipas, Veracruz y Oaxaca. El ejemplar tipo fue colectado cerca de Taxco y Tehuilotepic, Guerrero Stanley (1920-1926), Stanley (1958-1976).



Flor de Thevetia thevetioides.

1.2.2 Usos de Tipo folklórico del género Thevetia

Por sus propiedades cardiotónicas la Thevetia peruviana, se asoció desde el siglo pasado con Digitalis purpurea Aguilar (1982); en México la especie Thevetia thevetioides, se ha propuesto también como un sustituto de la Digitalis, con el inconveniente de que su empleo es peligroso según los datos informados por Stanley (1926).

El Dr. M.Toussaint indica "Los efectos incipientes de la planta (bastante semejantes a los de la digital) hacen pensar que en ella se tiene tal vez un precioso sucedáneo de tan útil medicamento", Martínez (1969).

Las aplicaciones medicinales de Thevetia, conocidas por el pueblo mexicano se puede mencionar las siguientes; el jugo lechoso de la planta se emplea para curar la sordera, las úlceras, la sarna, roña, etc. Las hojas se utilizan para calmar dolores de los dientes por lo que se atribuye un notable poder analgésico.

De la tintura de las hojas se recomienda para madurar las hinchazones y para disolver tumores. Respecto a las semillas, el vulgo las amasa con sebo para curar las hemorroides, Martínez (1969).

En la India, los extractos de la semilla son utilizados como pediculicida, Atal (1977).

El polvo de las semillas de Thevetia, actúa como un protector para la conservación de las semillas contra las infestaciones ocasionadas por insectos, Pandey (1977).

De los usos folklóricos de las especies de Thevetia como insecticidas y agentes antitumorales, Mc. Laughlin (1980), realiza investigaciones al respecto, encontrando que la nerifolina y la 2'-acetil nerifolina son las responsables de esas propiedades.

Mediante un ensayo "in vitro" en células de KB (carcinoma humano), encuentra que la nerifolina es más tóxica que la 2'-acetil nerifolina - - - - (ED₅₀ 2.2 X 10⁻² µg/ml y ED₅₀ 3.3 X 10⁻² µg/ml respectivamente), comprobando de esta manera su actividad citotóxica.

En relación a su actividad insecticida, se realiza un ensayo incorporando nerifolina y 2'-acetil nerifolina a la dieta de larvas del gusano barrenador del maíz, Ostrinia nubilalis (Hubner), observando su porcentaje de mortalidad a los 9 días, se encontró que la nerifolina incorporada a la dieta es seis veces más activa que la 2'-acetil nerifolina (LD₅₀ 30 ppm y 192ppm respectivamente). Bajo condiciones similares se realiza el ensayo para un insecticida comercial para gusanos barrenadores del maíz carbofurano, el cual presenta una (LD₅₀ 1-2 ppm), por ello que se considera que los thevetósidos podrían utilizarse como insecticidas para la agricultura.

Respecto a la actividad farmacológica de los thevetósidos, Arora (1967) investigó al peruvósido en ensayos clínicos con pacientes con problemas de insuficiencia cardíaca, encontrando que si presentan actividad cardiotónica, pero desafortunadamente, tienen el mismo problema de los glucósidos cardíacos, es decir un margen de seguridad muy estrecho, aún menor a éstos.

Gupa, en 1977, realizó investigaciones con respecto a la actividad cardiotónica comparada con la Ouabaina y a la relación estructura-actividad. En sus estudios encontró que el orden de la potencia de los thevetósidos, es el siguiente: ouabaina < cerberina < cerberósido < ruvósido < nerifolina < - - peruvósido.

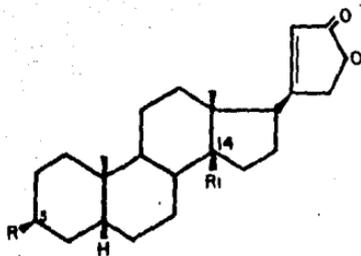
Por lo que respecta a su relación estructura-actividad, se llegaron a las siguientes conclusiones;

-El tipo y número de moléculas de azúcar conectadas al C-3, influye en la actividad cardiotónica.

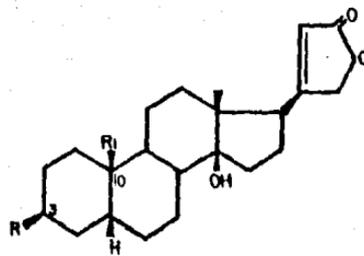
-La acetilación del -OH en el C-14 reduce la actividad.

-En relación a la actividad de los grupos presentes en el C-10, se ha observado que el orden de actividad es el siguiente: $-\text{CH}_2\text{OH} < -\text{CH}_3 < -\text{CHO}$

-El grupo -OH en el C-14, su importancia radica en que confiere solubilidad al compuesto, en la figura No. 2, se muestran las estructuras de estos compuestos.



cerberósido $R = L\text{-thevetosa-D-glu-D-glu}$
 $R_1 = OH$
 nerifalina $R = L\text{-thevetosa}$
 $R_1 = OH$
 cerverina $R = L\text{-thevetosa}$
 $R_1 = OC-CH_3$
 $\quad \quad \quad \underset{\underset{O}{\parallel}}{\quad}$



ruvidóido $R = L\text{-thevetosa}$
 $R_1 = CH_2OH$
 peruvósido $R = L\text{-thevetosa}$
 $R_1 = CHO$
 ouabaina $R = L\text{-rhamnosa}$

Fig. 2 RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LA OUABAINA CON LOS THEVETOSIDOS

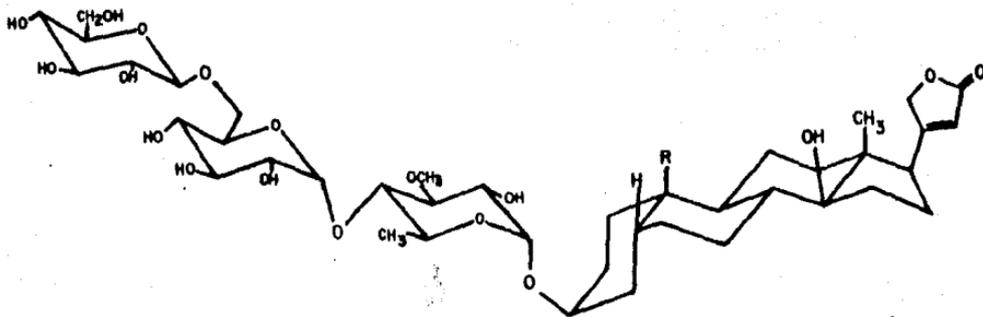
1.2.3. Composición Química

A partir de las últimas décadas mediante los avances de los estudios fitoquímicos, se ha logrado encontrar los principios tóxicos en toda la planta, pero la mayor cantidad se localiza en las semillas, de donde se han aislado una gran cantidad de triglicósidos, los cuales se han logrado hidrolizar mediante enzimas endógenas que posee la planta, para dar una mezcla de monoglicósidos de los cuales el más abundante es la nerifolina, Cruz (1977), Pérez (1982), Rodríguez (1982)

Según los estudios realizados en Thevetia thevetioides, por Cruz (1977), se propone que la nerifolina y el monoacetato de nerifolina pueden ser potencialmente una alternativa importante en la obtención de digitoxigenina, fármaco de importancia en la terapéutica cardiovascular y como intermediario importante en la síntesis de cardiotónicos modificados.

En las semillas de Thevetia peruviana, se han identificado dos glucósidos la thevetina A y la thevetina B o cerberósidos, Bloch (1960), Cosme (1958). En la figura No. 3, se muestran las estructuras espaciales.

Mediante la acción de enzimas endógenas que se encuentran en la semilla, se logra romper los enlaces β -glucosídicos de las posiciones 1-6 y de las 1-4, Cruz (1977). Las estructuras de los thevetósidos aislados se indican en la figura No.4.



Thevetine A R=CHO
 Thevetine B R=CH₃

**Fig. 3 ESTRUCTURA DE LA THEVETINA A Y DE LA THEVETINA B AISLADAS E IDENTIFICADAS DE SEMILLAS
 .. DE *Thevetia peruviana***

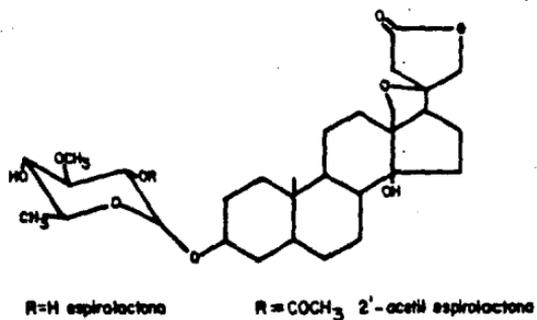
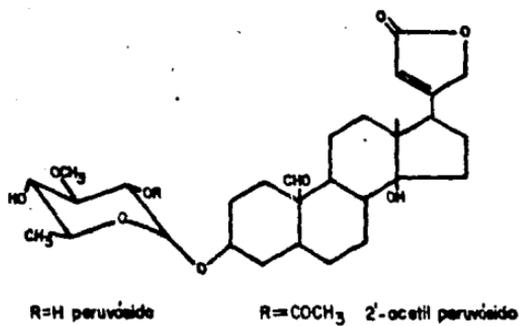
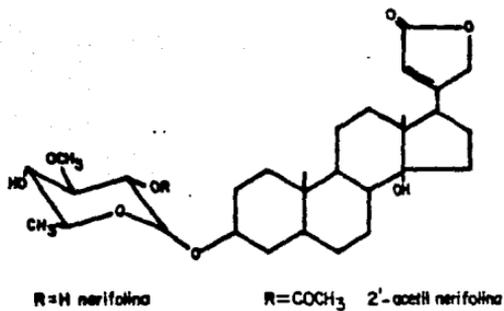


Fig. 4 MEZCLA DE THEVETOSIDOS

1.3. Desarrollo de Métodos Sintéticos para Glucósidos Cardíacos

A pesar de los avances en el campo de los esteroides, no es hasta 1962 cuando el grupo de Sondheimer logra la síntesis total para la digitoxigenina, la cual consta de nueve pasos partiendo de la 3-acetoxi-5-androstan-17-ona, figura No.5.

Se han publicado otras síntesis para glucósidos cardíacos --- Okada (1965), Pérez (1982), uno de los principales problemas de todas ellas es la naturaleza lábil del C-14 hidroxilado de la genina, el cual es fácilmente removido en medio ácido, unido a los rendimientos tan bajos por el gran número de pasos en la síntesis, estas son algunas razones por las cuales hoy en día se obtienen los glucósidos cardíacos a partir de fuentes naturales.

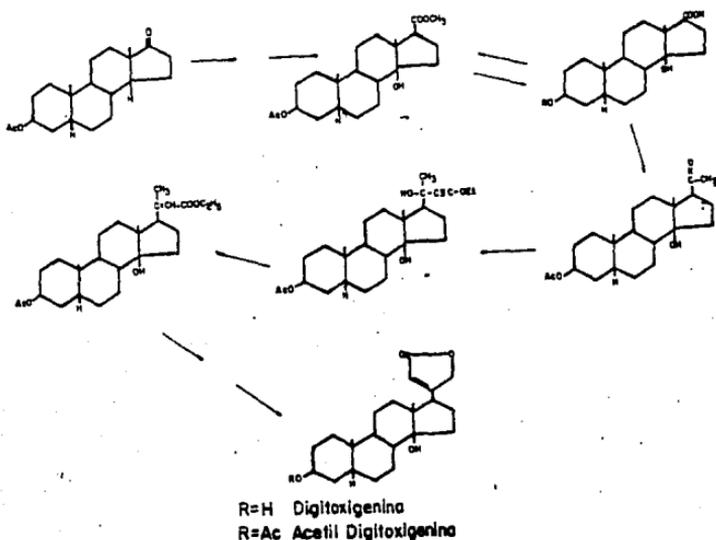


Fig. 5 SINTESIS PROPUESTA POR SONDHEIMER

1.4 Biosíntesis de Glucósidos Cardíacos

Las investigaciones en relación a la biosíntesis de glucósidos cardíacos, se ha enfocado a estudiar la incorporación de un precursor marcado y evaluar posteriormente si se formó el compuesto esperado, por ello es que en la actualidad se conocen los principales intermediarios de la ruta biosintética, Grunwald (1980), Luckner (1984).

La biosíntesis de esteroides es una ruta bien conocida, la cual parte de la sustancia más simple como es la acetil-CoA, Jacobsohn (1970), Luckner (1984).

El ácido mevalónico, es un intermediario importante en la biosíntesis de esteroides, Capstack (1962). Se han realizado estudios de esta conversión en cultivos de D.purpurea, Jacobsohn (1968). Además se demostró que si se incorporaba ácido mevalónico marcado con ^{14}C , en cultivos de D.lanata, se obtenía la genina de los cardenólidos marcada, Ramstad (1960).

El escualeno es un intermediario bien conocido en la biosíntesis de colesterol, Grunwald (1980). Este ha sido considerado desde hace muchos años como un precursor importante en la biosíntesis de esteroides y glucósidos cardíacos, Grunwald (1980), Luckner (1984). También se ha logrado aislar de las semillas de D.purpurea, según las investigaciones de Jacobsohn (1967).

Se ha investigado que cuando se incorpora colesterol a los cultivos de D. lanata, se logra obtener cardenólidos, Alberhart (1973). En cultivos de D. purpurea se ha identificado la presencia de pregnenolona, Caspi (1966), en un estudio posterior, se investigó la transformación de ésta en glucósidos cardíacos Caspi (1968). La ruta de biosíntesis de progesterona, a partir de colesterol, se ha logrado establecer por varias investigaciones, Luckner (1984).

El precursor inmediato de los glucósidos cardíacos es la progesterona, se ha investigado que cuando se incorpora este precursor en cultivos de D. lanata - se logra formar los cardenólidos, Caspi (1967) y Bennett (1968).

Techesche (1971), establece los intermediarios en la biosíntesis de cardenólidos a partir de progesterona y Nánási (1975) encuentra en cultivos de D. lanata que este precursor se metaboliza más rápido que la pregnenolona para formar a los cardenólidos.

Los dos átomos de carbono adicionados para formar la lactona en la estructura del glucósido cardíaco son provenientes del acetil o malonil CoA, Luckner (1984).

En la figura No. 6, se muestra los principales intermediarios que forman parte de la biosíntesis de glucósidos cardíacos, en relación a las investigaciones antes mencionadas.

1.5 Metabolismo y Acción Inotrópica

Hasta el momento no se ha encontrado ninguna relación entre el metabolismo y el mecanismo de acción de cardiotónicos, ya que el primero se efectúa en el hígado y en su sitio de acción (corazón), no se realiza ningún cambio, Goodman (1978)

Los principales caminos del metabolismo son vía hidroxilaciones sobre varios centros de la estructura, excepto el anillo de lactona, estas transformaciones convierten a los cardiotónicos en compuestos polares, los cuales son más fácilmente excretados generalmente en forma de glucoronidos, Goodman(1978)

Los cardiotónicos son capaces de aumentar la fuerza de contracción del miocardio y los efectos resultantes son aumento del gasto cardíaco, disminución del tamaño del corazón, de la presión venosa y del volumen sanguíneo, diurésis y alivio del edema, Goodman (1978).

Los cardiotónicos presentan un efecto inotrópico positivo, debido a la presencia de un receptor específico en la membrana del músculo cardíaco. La ATPasa, está envuelta en el transporte activo de los iones Na^+ y K^+ , los cuales son liberados o retenidos por la célula en cada contracción del corazón, Goodman (1978)

La salida de sodio durante la fase de polarización de la contracción del músculo, es lo que permite o facilita la competencia de digitálicos sobre el transporte de ATPasa Goodman (1978).

1.6.1. Antecedentes

El origen del cultivo de tejidos vegetales se estableció con los primeros experimentos de Haberlandt en 1902, el cual es considerado el padre de esta técnica, y quien cultivando "in vitro" células de mesófilo de hoja de Tradescantia sp. obtuvo crecimiento indefinido de tejido calloso.

Postula, además, que todas las células jóvenes vegetales y de tipo somático, tienen una alta capacidad para poder producir una planta idéntica a la que le dió origen, tal capacidad se refiere en la actualidad al concepto de totipotencialidad de las células vegetales, también predijo que se requerían de -- hormonas para lograr mejores resultados y propuso que tal vez se encontraban en el polen, meristemo o embrión, Murashige -- (1979)

Pero no fue sino hasta 1934 cuando se aisló e identificó la primera auxina al ácido indolacético mediante las investigaciones de Kogl y Haagen, Murashige (1979)

Miller y Skoog en 1955, descubren la cinetina, siendo la primera citocinina aislada de esperma de arenque. Con los descubrimientos de las auxinas y las citocininas, se efectúan estudios en donde se demuestra la gran importancia que tiene la relación hormonal auxina/citocinina respecto a los cultivos vegetales, Skoog (1957)

En las décadas pasadas, los grupos más preocupados por investigar el cultivo de tejidos vegetales, eran los propagadores de plantas y los fisiólogos vegetales, y no es, sino hasta el decenio pasado en el que la producción de farmacéuticos toma un particular interés y se realizan un gran número de investigaciones al respecto Tabata (1976), Reinert (1977), Thorpe -- (1978), Staba (1980), Mantell (1983), Robert (1985).

Las aplicaciones más importantes que presentan los sistemas de cultivo de tejidos vegetales respecto al cultivo tradicional, se describen a continuación:

- A) Propagación Clonal Rápida, la cual consiste en reproducir rápidamente grandes cantidades de material genéticamente idéntico y comercialmente uniforme (flores, frutos, etc.), mediante el aumento de brotes auxiliares y enraizamiento de brotes, Murashige (1979)

- B) Eliminación de Patógenos, provee de beneficios a las plantas, ya que el estar libres de patógenos, se logra recuperar rendimiento y calidad perdida por infecciones. Se logra, además minimizar el transporte de propágulos contaminados y acarrear pestes a otras zonas urbanas, -- Murashige (1979)

- C) Técnicas "in vitro" como ayuda o alternativa paresexual a mejoradores de plantas; en el desarrollo de plantas superiores las técnicas de crioconservación, cultivos de embriones, óvulos de anteras y polen, variantes somaclonales, son capaces de lograr cultivos resistentes a concentraciones elevadas de sales, toxinas, condiciones desfavorables de temperatura, y por último los cultivos por fusión de protoplastos, contribuyen de manera notable al mejoramiento en calidad y rendimiento de los cultivos de plantas superiores, Murashige (1979).

- D) Producción de Farmoquímicos; mediante la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales, se espera que se puedan obtener compuestos alrededor de un año, bajo condiciones -- controladas del medio ambiente, independientemente de -

ataque de plagas o condiciones desfavorables de suelo o clima, lo que asegura una producción continua y estable;-- Mantell (1983).

Una de las aplicaciones que más promete en este rubro, es la de las biotransformaciones de substratos específicos, mediante cultivo de Tejidos Vegetales en suspensión (bioreactores - vegetales), cuyas modificaciones estructurales se efectúan de manera selectiva y específica en un sólo paso, lo que la convierte en más eficiente comparada con los procesos químicos.

La desventaja principal de esta técnica en la obtención de materias primas, es que los cultivos acumulan muy bajas concentraciones de metabolitos secundarios y se desconoce los sistemas enzimáticos responsables de las biotransformaciones. Sin embargo, las nuevas metodologías de Ingeniería Genética, contemplan a mediano plazo que se podrá producir una mayor cantidad de metabolitos secundarios, Robert (1985).

En base a los últimos informes Reinhard (1980), Robert (1985), Paredes (1986) dan bases optimistas a la posibilidad de --comercializar la producción de materias primas para la Industria Farmacéutica, a partir de la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales.

En la tabla No. I, se muestra una lista de productos de gran interés en Farmacia, que potencialmente pueden ser obtenidos por cultivo de tejidos vegetales.

T A B L A I

FUENTES VEGETALES DE IMPORTANCIA ECONOMICA

FUENTE VEGETAL	COMPONENTES ACTIVOS	USO TERAPEUTICO
GLUCOSIDOS:		
<u>Digitalis purpurea</u> , <u>D. lanata</u> .	digitoxina, digoxina	Insuficiencia cardíaca
<u>Thevetia thevetioides</u>	nerifolina, peruvósido	precursor de cardiotó- nicos
<u>Dioscorea Composita</u> (barbasco)	diosgenina	precursor de anticon- ceptivos, corticoste- roides, etc,
ALCALOIDES:		
<u>Atropa belladonna</u> L. <u>Datura-</u> <u>stramonium</u>	atropina, escopolamina.	parasimpaticolíticos,
<u>Rauwolfia serpentina</u> L.	reserpina	Antipsicótico
<u>Catharanthus roseus</u>	Vincristina, vincalauco- blastina.	antileucémico
<u>Cinchona succirubra</u> (quina)	quina, quinidina	antimalárico
<u>Strychnos spp.</u> (curare)	d-tubocurarina	relajante muscular
<u>Colchicum autumnale</u>	colchicina	agente antigotoso
<u>Pilocarpus spp.</u>	pilocarpina	parasimpatomimético
<u>Physostigma venenosum</u> (haba de calabar)	fisostigmina	parasimpatomimético

1.6.2. Producción de Cardiotónicos a partir de Cultivo de -- Tejidos Vegetales

La producción de cardiotónicos mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetal, ha sido investigada ampliamente desde la década pasada como alternativa importante en su producción.-- Se han realizado estudios de propagación, morfogénesis y síntesis de "novo", cuyos resultados desafortunadamente indican que no hay producción de cardiotónicos, Staba (1962; 1963), -- Buchner (1964), Graves (1967), Hirotsani (1977), en cultivos de Digitalis.

Existen otras investigaciones en donde se menciona, que se -- detecta sólo trazas de cardiotónicos en los tejidos vegetales, como lo indican los trabajos de Lui (1979), Rucher (1976), -- Grave (1980) y Kartning (1977; 1979). al respecto.

Uno de los principales problemas que prevalecía, tanto en cul-
tivos de tejido calloso como en cultivos en suspensión, era -
el de no contar con una metodología analítica, lo suficiente-
mente sensible para lograr cuantificar a los cardenólidos, en
las concentraciones tan bajas en que generalmente se encuen-
tran en los cultivos.

Tal problema se vió resuelto con la implementación del radio-
inmunoensayo, técnica propuesta por Weiler (1976), para la --
cuantificación de cardenólidos provenientes de cultivos de te-
jidos vegetales. También con la técnica de cromatografía de
líquidos por alta presión se ha tratado de implementar para -
este fin, Castle (1975), Mechler (1982).

Otro grave problema a considerar, es que al parecer el tejido
calloso no posee la capacidad biosintética de producir al car-
diotónico, tal aseveración fue propuesta después de efectuar
varias resiembras de tejido calloso, en donde se evaluó que -
la presencia de cardiotónicos disminuía hasta desaparecer con

pletamente. En varios estudios llegaron a la misma conclusión según los experimentos realizados por Hiro-tani (1977), Pilgrim (1977), Helmbold (1978), Garve (1980) y Kartning (1983).

Respecto a Thevetia la única publicación que habla sobre tejido calloso, hace mención que después de varias resiembras -- también desaparece el contenido de thevetósidos, de donde se puede inferir que en este aspecto su comportamiento es similar al de Digitalis, dicho estudio fue realizado por Sen Gopa (1981).

En publicaciones recientes, se presentan resultados alentadores, con respecto a la producción de cardiotónicos mediante -- cultivo de tejidos vegetales, poniéndose de manifiesto que -- los cultivos diferenciados, juegan un papel importante en la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos de Digitalis, según se presenta en los trabajos de Garve (1980), Hiro-tani (1977), Hagimori (1980; 1982a, 1982b), y Anna (1983), -- los cuales evalúan la producción de cardiotónicos de cultivos diferenciados con formación de brotes provenientes de tejido calloso.

Sin embargo, es importante mencionar que además de requerirse de una etapa diferenciada, se ha observado que también es importante la morfogénesis presentada, esta teoría presentada -- es resultado de las investigaciones realizadas por Vogel --- (1981), el cual al efectuar cultivos diferenciados, tanto de brotes como de raíz, encontró que el mayor contenido de cardiotónicos se encontraba en los brotes mientras que en el cultivo de raíz, sólo había trazas, tales observaciones presentan un paralelismo con las condiciones naturales en donde se encuentra el cardiotónico, que es en las hojas de Digitalis, las investigaciones de Garve (1980), Hiro-tani (1977) y Kartning (1979) apoyan esta teoría.

Respecto al efecto que tiene la luz sobre la producción de me

tabolitos secundarios, Garve (1981), apoya la teoría de que la acumulación es el resultado de una diferenciación morfológica independientemente de la formación de clorofila o cloroplastos, se ha observado que el cardiotónico se forma en presencia y ausencia de luz, sin embargo al parecer la clorofila es un estímulo positivo, para la biosíntesis de estos compuestos según los resultados de Hagimori (1982) quien observó que los cultivos con brotes verdes presentaban un mayor contenido de cardiotónicos a diferencia de los cultivos sin pigmento de clorofila.

Anna en 1983, realizó estudios al respecto, evaluando la dependencia que existe entre los diferentes rangos espectrales de luz, encontrando que con la luz azul se logra un estímulo mayor con respecto a la acumulación de cardenólidos, resultado de gran interés industrial, debido a que su costo energético sería menor.

En relación a la producción de metabolitos secundarios, existen aún muchos problemas por resolver como son, el evaluar el efecto que presentan los nutrientes, precursores, sustancias reguladoras del crecimiento, debido a que existen pocas investigaciones al respecto.

Hagimori (1982a; 1982b), ha investigado respecto a los nutrientes, encontrando que el mio-inositol, la tiamina y la sacarosa al 3%, incrementan la producción de cardenólidos, también encontró que la glicina, el ácido nicotínico y la piridoxina al parecer, no muestran una dependencia sobre la producción

En lo que respecta a precursores, Lui (1979), realizó estudios en cultivos no diferenciados de hoja y raíz, en donde evaluó que no se pueden utilizar indiscriminadamente, ya que presentan un margen estrecho entre su efecto favorable y el tóxico para la producción de productos secundarios.

En lo referente a sustancias reguladoras del crecimiento como son AIA, ANA, 2,4D, B.A., se ha encontrado que dan buenos resultados sobre la acumulación, en relación a la cinetina su efecto aún no se ha podido determinar claramente y respecto a la GA_3 se encontró que a concentraciones mayores de 0.1mg/l reprime la producción de cardiotónicos en cultivos de Digitallis.

También se han realizado cultivos de fusión de protoplastos de D.purpurea por Diettrich (1980), sin embargo, no menciona nada respecto al contenido de cardiotónicos, su aportación es importante en la implementación de Técnicas de Ingeniería Genética.

En relación a estudios de conservación de líneas celulares, mediante crioconservación, se han realizado investigaciones observándose que no se pierde la capacidad enzimática, debido a que esta sigue funcionando cuando se vuelve a cultivar --- D.lanata, Diettrich (1982).

1.6.3. Biotransformación de Cardiotónicos mediante Cultivo de Tejidos vegetales

La biotransformación de sustratos específicos en sustancias de interés medicinal mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, es hoy en día una de las aplicaciones que más promete para competir económicamente con los procesos tradicionales en la producción de materias primas.

Las modificaciones estructurales específicas son llevadas a cabo de una manera fácil y en un sólo paso, en comparación con las síntesis químicas que requieren de más de un paso. Inclusive pueden competir con las biotransformaciones realizadas por microorganismos, por ejemplo, en la transformación de esteroides, según lo descrito por Stohs (1980).

En el grupo de los glucósidos cardíacos, se han realizado importantes investigaciones respecto a las biotransformaciones que se pueden realizar a través de los cultivos de tejidos vegetales, con el objeto de lograr transformar compuestos específicos en sustancias con mayor actividad farmacológica.

Uno de los procesos más importantes en las biotransformaciones son las hidroxilaciones, debido a que permite convertir la digitoxigenina en digoxigenina, sustancia que es más potente en la clínica, por ello se han realizado varias investigaciones al respecto, con el objeto de encontrar las condiciones más adecuadas.

En la figura No. 7, se muestran ejemplos de algunas biotransformaciones realizadas en la digitoxigenina, mediante cultivos vegetales de Digitalis, Cannabis, Deucus, Alferman (1977), de donde se concluye que dependiendo del género, la hidroxilación se realiza en diferente posición.

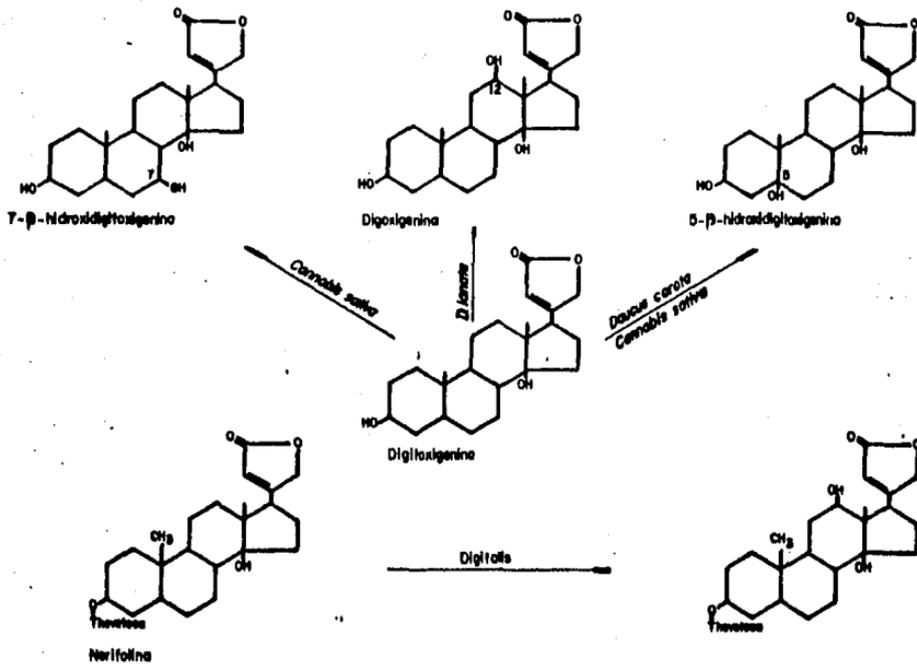


Fig. 7 HIDROXILACIONES DE CARDIOTÓMICOS MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Las glucosilaciones son un patrón de biotransformación importante, que se lleva a cabo sobre las estructuras de cardiotónicos, mediante cultivos de tejidos vegetales de *Digitalis* y *Thevetia*, pero tales cultivos, también poseen la maquinaria enzimática para realizar la reacción inversa como se indica en la fig. No. 8, según las investigaciones realizadas por Alferman (1977) y Doller (1979).

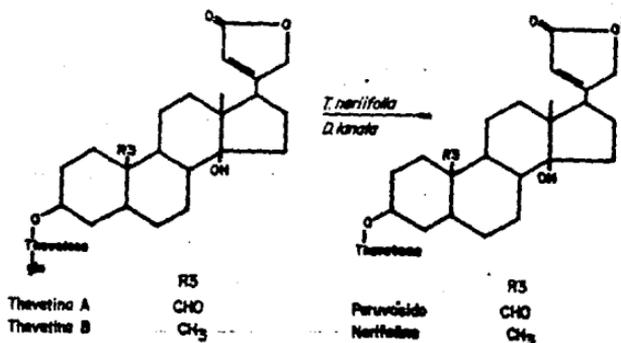
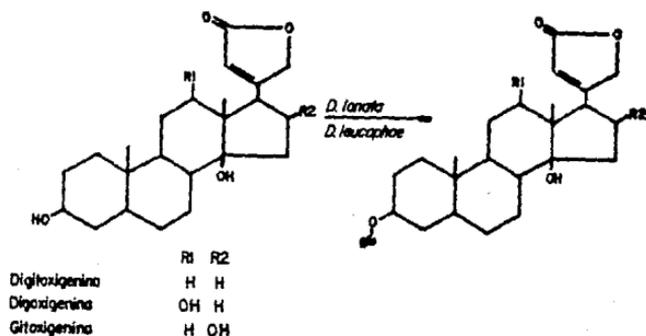


Fig. 8 BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS MEDIANTE GLUCOSILACIONES Y DESGLUCOSILACIONES

En cultivos de tejidos vegetales de Thevetia y Digitalis, también se han investigado las biotransformaciones, en donde se efectúa una reacción de oxidación en el alcohol C-3 transformándolo en una cetona, el cultivo también es capaz de realizar una epimerización, según se muestra en la figura No.9, Alferman (1977).

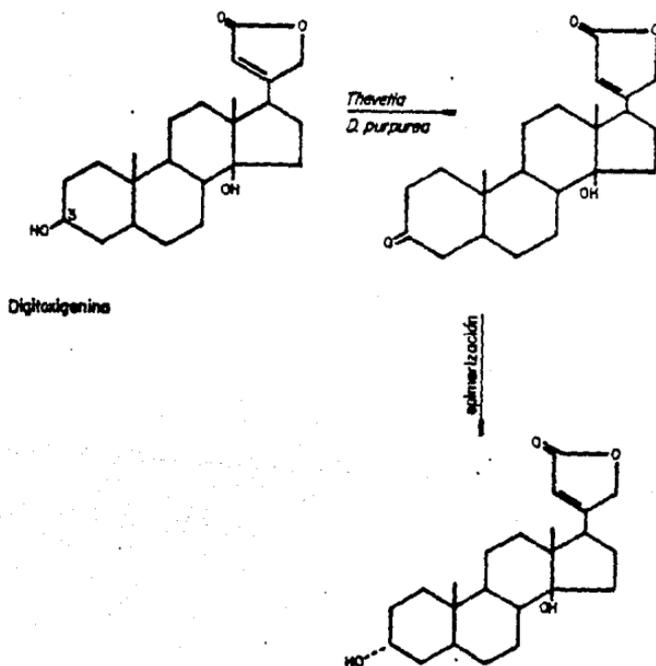


Fig. 9 BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS POR OXIDACION Y EPIMERIZACION

Según los estudios realizados, uno de los principales problemas que se presenta en las biotransformaciones, es la obtención de transformaciones simultáneas sobre un mismo sustrato, lo cual ocasiona que los rendimientos sean bajos, además de hacer difícil el proceso de separación por la gran cantidad de compuestos formados.

En la biotransformación de la digitoxina, se llevan a cabo diferentes transformaciones como la hidroxilación, glucosilación y acetilación como se indica en la figura No. 10.

Por ello es que en la mayoría de las investigaciones se está tratando de encontrar las condiciones que logren hacer más selectiva a la β -12-hidroxilación, se han realizado estudios con los géneros Digitalis y Thevetia, Alferman (1977), Döller (1977; 1979) e Hirotsani (1980), con el género Daucus, Jones (1978), también ha investigado al respecto, sin embargo, en todos los trabajos se siguen presentando los mismos problemas.

Heins en 1978, propone hacer más selectiva la biotransformación utilizando un derivado de la digitoxina, la β -metildigitoxina, con la cual se logra hidroxilar en el C-12 con una buena selectividad, tal aportación marca la pauta de que se pueda llevar a cabo un proceso a nivel industrial, sin embargo, aún hay problemas por resolver, como es lograr que el derivado se pueda solubilizar en otro disolvente diferente al etanol, el cual se ha observado que provoca inhibición sobre la reacción de hidroxilación.

Con la técnica de células inmovilizadas, Alferman (1980), Brodelius (1983), implementan un cultivo de células vegetales de D.lanata, en donde se compara la velocidad de biotransformación de la β -metildigitoxina de las células libres con las atrapadas, la importancia de este estudio es que tal sistema se puede utilizar para realizar varias biotransformaciones de un sustrato específico.

Sin embargo, el gran potencial que representan las biotransformaciones requiere aún de muchos aspectos por resolver antes de que se intente realizar a escala industrial, uno de los principales problemas será el conocimiento de los sistemas enzimáticos definidos que participan en la biotransformación de sustratos específicos. Además de establecer la dependencia que existe entre parámetros tales como la luz, pH, velocidad de agitación, tiempo de incubación y temperatura, etc.

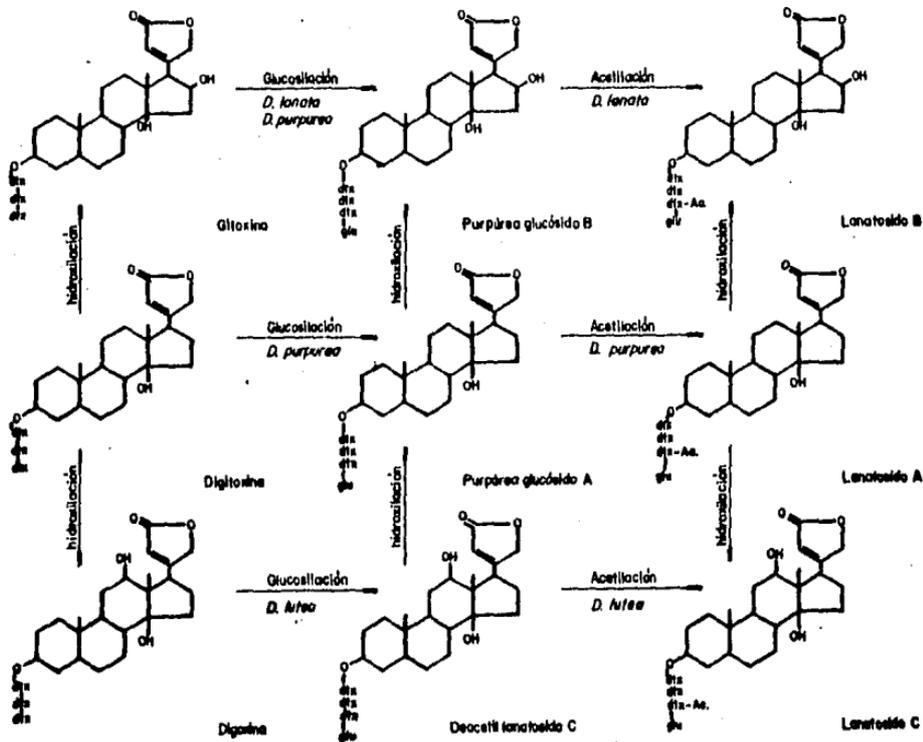


Fig. 10 DIFERENTES RUTAS DE BIOTRANSFORMACIÓN QUE SE EFECTUAN SOBRE CARDIOTÓNICOS EN CULTIVOS VEGETALES DE *DIGITALIS*

1.6.4 Controles en la Producción de Fermoquímicos mediante Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales, identifica en conjunto a los cultivos de plantas, protoplastos, tejidos y órganos, tales cultivos poseen atributos en común, como el requerir condiciones de asepsia, de un medio nutritivo-se tipo artificial, además de contar con un control de los factores del medio ambiente y de tipo biológico para que se pueda desarrollar adecuadamente.

Además se deben considerar las condiciones en las que se encuentra la fuente vegetal, ya que existe una gran variabilidad asociada al genotipo de las plantas usadas como inóculos, por ello será importante considerar los siguientes factores, Staba (1980), Mantell (1983).

i) Selección de Organo/tejido

El requisito fundamental es que el explante seleccionado cumpla con la totipotencia, y que sea capaz de responder a un estímulo organogénético, como es el caso de las sustancias reguladoras del crecimiento auxina/citocinina, las cuales promueven el crecimiento del tejido vegetal.

ii) Tratamiento Previo de la Fuente Vegetal

En algunas ocasiones las condiciones en que se encuentra la fuente vegetal no son las más adecuadas para dar respuesta "in-vitro", por lo que se pueden implementar tratamientos para obtener éxito en su respuesta. La etiolación, y el uso de giberelinas, son algunos ejemplos de estos, Staba(1980).

1.6.4.1 Controles del Medio Ambiente

A) Asepsia

En cultivo de tejidos vegetales un requisito importante es tener un medio de cultivo libre de contaminantes, debido a que

provoca una competencia metabólica por los substratos, por ello que la desinfección del explante sea una etapa primordial.

La desinfección superficial del explante, se logra mediante la exposición del tejido en soluciones a una determinada concentración de agentes químicos como: el hipoclorito de sodio y de calcio, el agua oxigenada y el etanol.

Se puede mejorar la efectividad de estos agentes, utilizando gotas de surfactantes como el tween 20, o aplicando vacío a agitación durante el contacto del explante con las soluciones desinfectantes.

Existen tratamientos para reducir la contaminación microbiana como son; el uso de antibióticos, antivirales y antimicóticos, los cuales se aplican directamente al medio de cultivo, sin embargo, su uso no debe ser indiscriminado, ya que puede ser tóxico al medio, Murashige (1979).

B) Condiciones Nutricionales

Para un desarrollo y funcionamiento óptimo de los cultivos, se requiere de medios de cultivo constituidos por macrosales y microsales, así como también por vitaminas, constituyentes orgánicos y aminoácidos, Murashige (1962), Huang (1976), Staba (1980).

i) Macrosales

El efecto de las macrosales es el de promover el crecimiento de tejidos vegetales, en investigaciones al respecto, se ha observado que si disminuyen los niveles de nitrato, potasio, amonio y fosfatos se altera el crecimiento, Mantell (1983).

En relación al metabolismo secundario su efecto no se ha logrado establecer claramente por haber pocos estudios al respecto. Las macrosales son responsables de regular la presión osmótica y el pH.

La fuente de nitrógeno en los cultivos está formada por sales de NO_3^- y NH_4^+ , se ha observado que se puede utilizar una u otra en los cultivos pero el balance de ambas da un mejor resultado, Fernández (1979), Mantell (1983).

La fuente de fósforo típica es la sal de PO_4^{3-} , y su efecto respecto a la producción de metabolitos secundarios se ha encontrado que si se disminuye su nivel a un 50% presenta un efecto positivo sobre la estimulación de la biosíntesis de productos secundarios en cultivos de Peganum, sin embargo, si se disminuye a un 10% provoca una inhibición en la biosíntesis del producto, Mantell (1983).

El hierro es importante, ya que promueve formación de brotes y raíces, Mura-shige (1979).

ii) Microsales

Son elementos catalíticos que actúan en las reacciones metabólicas y de óxido-reducción en las plantas, y su función es como cofactores en los sistemas enzimáticos, Staba (1980).

iii) Fuente de Carbono

La sacarosa o sus componentes monosacáridos, como la glucosa o fructosa, son fuentes de carbono que dan buenos resultados en el cultivo de tejidos vegetales. En cultivos de cardiotónicos se ha encontrado que la sacarosa al 3% funciona adecuadamente, Hagimori (1982).

iv) Vitaminas

Estas no pueden ser producidas por sí mismas en la célula vegetal, es por ello que Filling, estableció la siguiente mezcla como adecuada para los cultivos, la tiamina 10 mg/l, la piridoxina 0.5 mg/l y ácido nicotínico 0.5 mg/l, se han propuesto otras mezclas las cuales se utilizan dependiendo de los fines del cultivo, Huang (1976).

El uso de ác. ascórbico es más como antioxidante que como vitamina y en conjunto con el ác. cítrico, hacen que se eviten las oxidaciones en los cultivos Huang (1976).

v) -Constituyentes Orgánicos

El inositol=mio-inositol, es un compuesto muy importante, no es tóxico y para la mayoría de los cultivos es de beneficio al promover el crecimiento, Huang (1976).

C) Precusores

El uso de precursores en cultivo de tejidos vegetales, es con el fin de estimular la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Existen algunos ejemplos, en donde se ha evaluado que la productividad del metabolito secundario, se ve limitada por falta de un precursor, como en el caso de la biosíntesis de alcaloides del tropano, en donde la adición del ácido trópico como precursor directo incrementa la acumulación del metabolito en el medio de cultivo, sin embargo, también hay investigaciones en donde el precursor resulta tóxico, Tabata (1976).

En cultivos de Dioscorea deltoida, se ha encontrado que si se incorpora 100 mg/l de colesterol, se incrementa la productividad de diosgenina en un 100% Mantell(1983).

D) Substancias Reguladoras del crecimiento

En la actualidad se conocen sustancias que actúan en los diferentes estadios ontogenéticos de la planta, a los cuales se les denomina hormonas vegetales o reguladores del crecimiento.

Went y Thieman en 1934, definen como hormonas vegetales a ciertas sustancias producidas en estructuras o tejidos de la planta y posteriormente - transferidas a otras para ejercer su influencia en procesos fisiológicos - específicos.

El término hormona propiamente corresponde al lenguaje de los fisiólogos - animales, ya que fueron ellos los que desarrollan este concepto. Definen a la hormona como una sustancia sintetizada en una glándula secretora específica, para producir un efecto típico y específico en un punto distante de su origen.

En el caso de las "Hormonas vegetales", se pueden definir su sitio de síntesis, pero su efecto va a depender del tipo de tejido u órgano sobre el - cual actúe, Moore (1979).

Por otra parte, existen sustancias sintéticas capaces de causar efectos - similares a los provocados por las hormonas vegetales que son sintetizadas por la planta.

En la actualidad, se ha preferido denominar como "regulador del crecimiento", a toda sustancia natural o sintética capaz de provocar una respuesta fisiológica y morfológica en cualquier etapa ontogenética de la planta, -- Moore (1979).

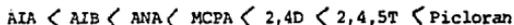
La interacción hormona-nutrientes, es de vital importancia en la productividad de metabolitos secundarios, Gresshoff (1978).

El grupo de sustancias reguladoras del crecimiento esta formado por; las auxinas, citocininas, giberélinas, ácido abscísico y etileno.

1)-Auxinas

La primera auxina natural encontrada, fue el ácido indolacético en 1934, y a partir de esa fecha se han encontrado un gran número de sustancias con efectos similares a éste. En la figura No. 11, se muestran sus estructuras.

En base a diversas investigaciones, se ha podido establecer su potencia, Murashige (1980):

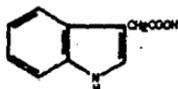


En condiciones naturales, las auxinas en la planta se localizan en las yemas y en las ápices de crecimiento de hojas y raíces.

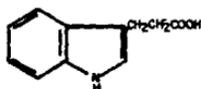
Algunos de sus efectos más importantes son: Moore (1979)

- 1) Inducir una respuesta fisiológica a concentraciones de 10^{-6} M.
- 2) Presentar un efecto alostérico, que activa la biosíntesis de ciertas proteínas.
- 3) Son capaces de incrementar la permeabilidad de la pared celular.
- 4) Promover la elongación celular.
- 5) Promover la presencia del ARN mensajero en la síntesis de proteínas.

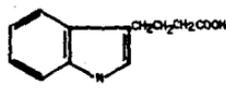
ACIDOS INDOLICOS



ACIDO INDOLACETICO
(AIA)

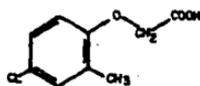


ACIDO INDOLPROPIONICO
(AIP)

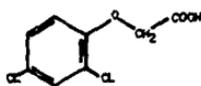


ACIDO INDOLBUTIRICO
(AIB)

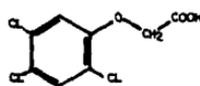
FENOXIACIDOS



ACIDO 2, METIL-4-CORO-
FENOXIACETICO (MCPA)

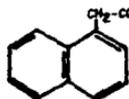


ACIDO 2, 4-DICORO-
FENOXIACETICO (2, 4-D)

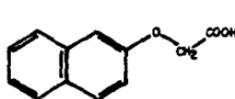


ACIDO 2, 4, 5-TRICORO-
FENOXIACETICO (2, 4, 5-T)

ACIDOS NAFTALENICOS

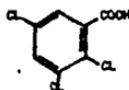


ACIDO NAFTALEN ACETICO

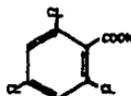


ACIDO-β-NAFTOXIACETICO

ACIDOS BENZOICOS

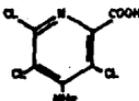


ACIDO 2, 3, 5-TRICORO-BENZOICO



ACIDO 2, 4, 6-TRICORO-BENZOICO

ACIDO PICOLINICO



ACIDO 4-AMINO-3, 5, 6-TRICORO-PICOLINICO
TORDON (PICLORAN)

Fig. 11 ESTRUCTURAS DE LAS AUXINAS

En relación al metabolismo secundario, se ha encontrado que la cantidad y tipo de auxina, influye en la productividad de un compuesto específico, por ejemplo en cultivos de Papaver bracteatum, se observó que para la biosíntesis de Tebaina, la auxina AIA, es más adecuada que el 2,4D o NAA, Gresshoff (1978).

En otro estudio, en la biosíntesis de nicotina, se observó que la auxina AIA activa la producción del metabolito secundario, mientras que la auxina, 2,4D, la suprime, Mantell (1983).

ii) Citocininas

La primera citocinina aislada fue el 6-furfurilaminopurina (cinetina), identificada por Miller en 1955, de esperma de arenque.

En la actualidad a toda sustancia que presente la misma acción fisiológica a la cinetina, se le denomina citocinina; en la fig. No.12, se muestran las estructuras de las citocinas sintéticas y naturales.

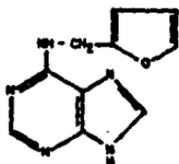
Los embriones, la raíz y los frutos jóvenes, son la fuente más común de citocininas, Murashige (1980).

Algunos de sus efectos más importantes son: Moore (1979).

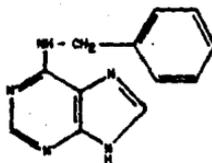
- 1) Cambios de polaridad en la membrana, que dan como consecuencia un estímulo al crecimiento.
- 2) Participan en la multiplicación celular.
- 3) Están involucrados en los procesos de iniciación y proliferación de brotes.
- 4) Promueve el rompimiento de la dormancia en las semillas.

CITOCININAS SINTETICAS

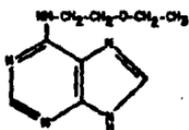
42



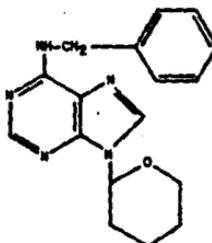
CINETINA



BENZILADENINA (BA)

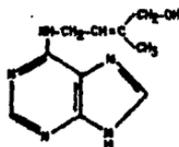


ETIOETILADENINA

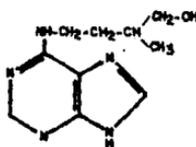


TETRAHIDROPRANILBENZILADENINA (PBA)

CITOCININAS NATURALES



ZEATINA



DIHIDROZEATINA

Fig. 12 ESTRUCTURAS DE CITOCININAS

Con respecto al metabolismo secundario, su participación en el balance hormonal auxina/citocinina, se ha observado que es importante para la biosíntesis de compuestos secundarios, Mantell (1983).

iii) Giberelinas

Las giberelinas son diterpenos, aislados de hongos y plantas, hasta 1979 se conocían 39, de las cuales las más abundantes son:



La importancia en cultivos de Tejidos vegetales, se restringe a dos aspectos: Moore (1979)

- 1) Superar la dormancia en semillas, mediante la inducción de síntesis de enzimas hidrolíticas de tipo amilasa
- 2) Promover la elongación de tallos, ápices o brotes en cultivos "in vitro".

iv) Acido Abscísico

El ác. abscísico (ABA), fué aislado de frutos de algodón en 1965. -
Algunos de sus efectos más importantes son: Moore (1979)

- 1) Estimular la abscisión.
- 2) Acelerar la caída de las hojas y fruto.
- 3) Prolongar la dormancia en la semilla.
- 4) Inhibir la floración de plantas de día largo en día corto.
- 5) Inhibir la síntesis de enzimas inducidas por AG_3 .

v) Etileno

El etileno es un compuesto gaseoso que regula el crecimiento vegetal, que es producido por la misma planta en situaciones de Stress y sus efectos son regularmente negativos como: Moore (1979).

- 1) Ser tóxico a la planta.
- 2) Producir hinchazón lateral de tallos.
- 3) Inhibir el transporte de auxinas, provocando pérdida del comportamiento geotrópico normal.

E) Factores Físicos

i) Luz

El efecto de la luz, juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios, en diferentes investigaciones se ha tratado de encontrar la dependencia con este factor en relación a un producto específico. Desde el punto de vista económico, el poder realizar el -- proceso en obscuridad lo hace más atractivo, sin embargo, esto no es siempre posible de realizar, Tabata (1976), Staba (1980) y Mantell -- (1983).

ii) Temperatura

Es un factor importante en la velocidad de crecimiento de los tejidos vegetales, los cuales se desarrollan adecuadamente en un rango de 25° a 28°C, Staba (1980).

1.6.4.2 Controles Biológicos

A) Crecimiento

Existen pocos estudios acerca de la velocidad de crecimiento y su dependencia con la formación de productos secundarios en cultivos de tejidos vegetales. - Con base en los datos experimentales, se postulan tres mecanismos de producción-crecimiento, Tabata (1976).

En el 1o., la formación de producto, procede casi siempre en relación paralela con el crecimiento celular, la producción de nicotina, así como la de alcaloides del trópano son algunos ejemplos de éste tipo, en otros estudios, se ha observado que la fase logarítmica es en donde se presenta la máxima concentración.

En el 2o., la producción de productos se retrasa hasta que el crecimiento celular declina o cesa.

En el 3er. tipo, la curva de producción es difásica, y la producción se presenta inferior a la curva de crecimiento, como es el ejemplo de la biosíntesis de diosgenina.

Con los postulados propuestos, se propone incrementar la eficiencia de la producción mediante una disminución en la fase lag, antes de que se inicie la síntesis del producto.

B) Diferenciación Morfológica

En las plantas superiores, existen ciertos compuestos, los cuales son sintetizados o acumulados, sólo en un órgano o tejido en particular, por ejemplo, -- compuestos como la nicotina y alcaloides del tropano se localizan en la raíz,

Staba (1980).

Se ha demostrado que se puede inducir una diferenciación morfológica, mediante la formación de brotes en cultivos no diferenciados de tabaco para lograr la biosíntesis de nicotina, Tabata (1976), Mantell (1983).

Por otra parte, también ha logrado inducir la diferenciación química, mediante medios artificiales, sin que se presente diferenciación morfológica, en la biosíntesis de compuestos específicos, un ejemplo al respecto, se presenta en la producción de derivados de Shikonina, cuyos compuestos en la planta se localizan en las capas del corcho de la raíz. Se ha observado en un cultivo de tejido vegetal que carece de células de corcho, que es capaz de producir los metabolitos secundarios, Tabata (1976).

C) Expresión del Metabolismo Secundario

La biosíntesis y acumulación de la mayoría de los productos secundarios esta limitada a células especializadas resultado de un proceso de diferenciación, Luckner (1984).

La diferenciación celular es uno de los mecanismos básicos de regulación metabólica en todo ser vivo. Las proteínas formadas como resultado de múltiples procesos de diferenciación, pueden ser clasificados respecto a su importancia biológica, en la Tabla II, se indican las diferencias entre las proteínas del metabolismo primario y las proteínas especializadas, Luckner (1977).

En relación a la tabla anterior, se puede decir que el metabolismo secundario, puede ser definido como la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos producidos endogenamente, mediante proteínas especializadas de acuerdo a la clasificación de Luckner (1977).

T A B L A No. 11

PROTEINAS COMO PRODUCTO DE UN PROCESO DE DIFERENCIACION
LUCKNER (1977)

A PROTEINAS DEL METABOLISMO PRIMARIO	B PROTEINAS ESPECIALIZADAS
<p>La formación y función de estas proteínas, es de importancia intracelular para su mantenimiento, reproducción y existencia.</p>	<p>La función de éstas es vital, generalmente en conjunto, su formación frecuentemente no tiene importancia directa para la misma célula.</p>
<p>1) <u>ENZIMAS</u></p> <p>Se encuentran envueltas en la expresión genética, en el metabolismo de ác. nucléicos y aminoácidos, también son suplementos energético, así como en la síntesis y degradación de ác. grasos, etc.</p>	<p>1) <u>ENZIMAS</u></p> <p>Proporcionan a la célula funciones de especialización, -- participan en el metabolismo secundario, en el catabolismo que degrada a fármacos, nutrientes especiales, etc., y también en la morfogénesis.</p>
<p>2) <u>PROTEINAS NO ENZIMATICAS</u></p> <p>Estructurales de membrana celular y protoplasma, etc.</p>	<p>2) <u>PROTEINAS NO ENZIMATICAS</u></p> <p>Que tienen una función especial de reserva, regulatoria, etc.</p>

La regulación de la actividad enzimática en el metabolismo secundario puede ser influida, no solo por la presencia de precursores, sino también por la acumulación de productos (inhibición por formación de producto por interacción alostérica o competencia con el sustrato por el sitio de enlace). Existen experimentos "in vitro" en donde se demuestra que las enzimas del metabolismo secundario son responsables de la inhibición por producto, Luckner - (1984).

También se ha especulado en relación a que se requiere de ciertos canales intracelulares para el transporte de precursores y de enzimas especializadas al sitio de biosíntesis de productos secundarios, lo cual hace que en algunos casos se vea limitada la velocidad de producción.

El microambiente, así como la compartimentalización al parecer también juegan un papel importante en la producción de productos secundarios. Existen estudios en donde se demuestra que muchas enzimas del metabolismo secundario están asociadas a las membranas del citoplasma, vacuolas, microcuerpos, etc., Luckner (1984).

Los productos secundarios hidrofílicos, se ha observado que se acumulan en compartimentos separados del citoplasma como vacuolas, vesículas de Golgi, y en el espacio extraplásmico, mientras que los productos secundarios lipofílicos pueden acumularse en las membranas mismas, por ejemplo los carotenoides en la membrana celular, la clorofila y el ácido giberético en la membrana de los cloroplastos, Luckner (1984).

D) Algunas Especulaciones acerca de la Evolución y Mecanismo de Control en el Metabolismo Secundario

El metabolismo secundario, ha sido caracterizado por un alto grado de orden, en donde los mecanismos de control más importante son: Luckner (1984).

- 1) Control estricto de la biosíntesis, degradación de metabolitos secundarios.
- 2) Regulación de la actividad enzimática.
- 3) Comportamentalización de enzimas especializadas.
- 4) Transporte de precursores, intermediarios, enzimas y productos secundarios, a través de Canales intracelulares.
- 5) Integración del metabolismo secundario en los programas de diferenciación y desarrollo relacionado con la etapa morfológica en la cual se lleva a cabo la formación del producto secundario.

Luckner (1980), propone tres principios fundamentales acerca de la evolución del metabolismo secundario.

- a) La formación de productos secundarios, es considerada como un medio de eliminación de exceso de compuestos, al mismo tiempo funciona como un factor de regulación fisiológica o ecológica, creando, por lo tanto un beneficio para las plantas.
- b) Sin embargo, hay características del metabolismo secundario, que no han sido explicadas ampliamente, como es la utilidad de los compuestos formados para la propia planta, así como la heterogeneidad de estructuras químicas complejas, así como su restricción en su distribución como es el caso de los esteroides y los alcaloides, etc., presentes solo en algunos géneros.
- c) La capacidad de formación de productos secundarios, puede ser conservada por un largo período, siempre y cuando tales compuestos no sean utilizados por la planta. Por ello se supone que la síntesis de la mayoría de los productos secundarios se considera un recurso metabólico menor.

1.6.5 Cultivo de Tejido Calloso

El tejido vegetal que más se ha investigado hasta la fecha es el tejido calloso. Los callos se encuentran en la naturaleza como resultado de un daño mecánico o por interferencia de los microorganismos o insectos sobre las plantas.

La inducción de tejido calloso, consiste en la división y proliferación celular, y se puede originar a partir de explantes de corteza, cambium, floema secundario o xilema parenquimatoso, también requiere de un medio ambiente apropiado, constituido por nutrientes, sustancias reguladoras del crecimiento auxina/citocinina y de factores físicos como la luz y la temperatura, Narayanaswamy - (1977).

Los cultivos de tejido calloso, se definen como tejidos que proliferan continuamente de manera desorganizada, dando lugar a una masa amorfa de células, -- Gresshisff (1978).

Los callos de especies diferentes pueden variar en su apariencia exterior, textura, coloración y friabilidad.

La pigmentación del tejido calloso, varía aún entre la misma especie. Las coloraciones que presenta son verde claro (presencia de clorofila), o amarillo pálido o albinos (presencia de carotenoides, flavonoides o púrpuras); la pigmentación puede ser uniforme o moteada y la intensidad de ésta, se ve alterada por deficiencia en factores nutricionales y del medio ambiente como luz y temperatura, Narayanaswamy (1977).

La diferencia en tipo, tamaño y forma celular, varía de acuerdo a diversos factores como: el origen, edad de los cultivos y composición del medio nutritivo.

El crecimiento acelerado en los cultivos, promueve la formación de células altamente vacuoladas, de formas diversas desde esféricas hasta filamentosas, Na rayanaswamy (1977).

La organogénesis en tejido calloso se logra mediante la manipulación de constituyentes nutricionales y por la incorporación de sustancias reguladoras -- del crecimiento auxina/citocinina, Gresshisff (1978).

1.6.6. Problemas y Perspectivas del Cultivo de Tejidos Vegetales

A fin de que se pueda llevar a nivel industrial, la aplicación de cultivo de tejidos vegetales, en la producción de farmoquímicos, será necesario satisfacer una serie de requisitos para lograr este objetivo; Tabata (1976), Petiard (1979), Staba (1980), Mantell (1983), Robert (1985).

- 1) -La velocidad de crecimiento celular, así como la biosíntesis del producto específico, deberá realizarse en un corto tiempo y con buen rendimiento. Como las células vegetales tienden a proliferar lentamente cuando se producen a gran escala, se pretende resolver este problema mediante la implementación de manipulaciones genéticas.
- 2) -El producto secundario formado, deberá permanecer íntegro sin sufrir acción catabólica en el cultivo, y de ser posible sería adecuado que una vez formado se excretará al medio de cultivo, también se tendrá que evaluar, si no existe efecto de represión por una alta concentración de producto acumulado en la célula.
- 3) -Las células cultivadas, deberán ser estables genéticamente, con el fin de dar siempre la misma calidad y rendimiento del producto, se piensa que el método de criopreservación de células, será un método útil en la conservación de líneas celulares altamente productoras y de un alto valor económico.

- 4) -Se deberán abatir los costos de producción relacionados con los constituyentes del medio de cultivo, los procesos de separación, así como los requerimientos energéticos, con el fin de que se considere rentable para su producción.

Los avances de los últimos años en relación a la producción de farmoquímicos, mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, ha sido de gran importancia, a continuación, se resumen algunos logros, Mantell (1983), Robert (1985):

- a) -Encontrar cultivos vegetales capaces de producir un producto secundario específico, con una similar o superior velocidad de producción, en comparación con la fuente vegetal.
- b) -Se ha logrado acumular productos secundarios en cultivos de tejidos diferenciados, ejemplo en cultivos de brotes o de raíz. Así como también en los cultivos no diferenciados (tejido calloso) .
- c) -Se ha demostrado que la actividad biosintética de cultivos celulares, puede ser intensificada por regulación de factores del medio ambiente, así como por la selección artificial o por inducción de variantes somaclonales.
- d) -El posible uso del cultivo de tejidos vegetales para las biotransformaciones específicas de compuestos naturales, ha sido demostrada y es uno de los potenciales que más promete a nivel industrial.

Sin embargo, a pesar de los grandes logros alcanzados, todavía se tendrá que fortalecer algunos aspectos, así como resolver aún problemas de tipo básico y práctico antes de lograr la meta.

2) Planteamiento del Problema

La fuente de obtención a nivel mundial de los glucósidos cardíacos, es a partir de las hojas de Digitalis, actualmente a pesar de encontrarse en bajas -- concentraciones resulta más rentable obtenerlos de esta manera, que a partir de métodos sintéticos, ya que éstos son generalmente complejos y costosos.

Sin embargo, el abastecimiento normal de estos productos naturales se enfrenta a graves problemas como son; la explotación incontrolada efectuada por el hombre, disturbios del medio ambiente, cambios de clima, plagas, etc. La técnica de cultivo de tejidos vegetales surge como una alternativa biotecnológica en la solución de tales problemas.

La digitoxina es una estructura estratégica en la actividad cardiotónica, por ello que se considere un intermediario importante en la producción de nuevos -- glucósidos cardíacos.

México cuenta con una alternativa en la producción de digitoxina, a partir de semillas de Thevetia, según investigaciones realizadas por Cruz (1977) y la -- ENEP Zaragoza, Pérez (1982) y Rodríguez (1982).

Cabe mencionar que los glucósidos cardíacos, son un grupo de fármacos que se -- importa en su totalidad en el país, según informes del IMCE (1983). Además, -- de ser los fármacos de elección en padecimientos cardiovasculares, enfermedad que ocupa el tercer lugar de incidencia en México (1974).

En el presente proyecto, se propone implementar la técnica de cultivo de tejidos vegetales, con el fin de lograr obtener cardiotónicos biotecnológicamente, a partir de un cultivo de tejido calloso de Thevetia, género ampliamente dis-- tribuido en el país.

Es importante mencionar que existen pocas investigaciones en relación al género Thevetia mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, respecto a la acumulación de Thevetósidos, el único estudio al respecto es el de Sen Gopa (1981).

En relación a estudios de biotransformación sobre estructuras de glucósidos cardíacos, Doller (1977;1979) y Reinhard (1980), realizan transformaciones mediante cultivos de Thevetia .

Por ello que resulte interesante establecer un cultivo vegetal de tejido calloso con el género Thevetia, que reúna las condiciones adecuadas para la -- producción de thevetósidos, lo cual dará la pauta y las bases para poder rea-- lizar en una etapa posterior, estudios de biotransformaciones sobre las es-- tructuras de los glucósidos cardíacos, técnica cuyo potencial es uno de los que más prometa para competir a nivel industrial con los procesos tradiciona-- les.

Por último, es importante considerar que el modelo experimental planteado con el género Thevetia, dará la pauta en el conocimiento de esta nueva Biotecno-- logía Vegetal, cuyo potencial en la producción de farmoquímicos, se contempla como una importante alternativa.

3) Objetivos Específicos

- a) -Seleccionar el explante más adecuado para la inducción de tejido calloso de Thevetia thevetioides.
- b) -Correlacionar la cinética de crecimiento con la cinética de contenido de thevetósidos.
- c) -Evaluar el efecto del balance hormonal Auxina/Citocinina en el crecimiento y contenido de thevetósidos.
- d) -Evaluar el efecto de las fotocondiciones (luz-obscuridad-fotoperíodo), respecto al crecimiento y contenido de thevetósidos.
- e) -Analizar estadísticamente los factores involucrados en el crecimiento y contenido de thevetósidos del tejido calloso de Thevetia thevetioides.

4. Hipótesis

Con la implementación de este modelo de cultivo de tejidos vegetales se logrará establecer los factores involucrados en la inducción de tejido calloso y la presencia de thevetósidos.

Siendo esta información extrapolable al modelo de cultivo de tejidos de otros vegetales como productores potenciales de cardiotónicos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Equipo

- Autoclave vertical marca AESA Mod. 300; 127 VCA
- Campana de flujo laminar marca VECCO
- Balanza analítica marca BOSH S 2000 capc. 200g Sensibilidad 0.1 mg.
- Refrigerador marca FRILATIC Mod. RF 200 serie 8505-334.
- Estufa con temperatura controlada CASA RIOS marca en trámite 127 volts.
- Agitador magnético MAGNESTIR.
- Potenciómetro CONDUCTRONIC pH 20
- Agitador Vórtex SUPERMIXER 1290 LAB-LINE Instruments Rotavapor Marca Buchi 133833.
- Balanza granataria OHAUS Capc. 2160 g.

5.1.2 Material de Vidrio y otros

- Material de vidrio de laboratorio marca PYREX.
- Frascos de gerber con tapa de plástico.
- Bisturí / navajas X-ACTO 24
- Pinzas de disección
- Algodón
- Gasa
- Extractor Soxhlet marca PYREX
- Cromatofolios Pl de gel de sílice 60 F₂₅₄ MERCK

5.1.3 Material Biológico

Las semillas de Thevetia thevetioides se recolectaron en la localidad de Izúcar de Matamoros, Estado de Puebla, en el Km. 9 de la Carretera Izúcar de Matamoros - Oaxaca, a una altitud de 1340 Km. sobre el nivel del mar.

Reactivos

Cloruro de Calcio dihidratado R.A.	R.A. BAKER J.T.
Nitrato de amonio R.A.	"
Nitrato de potasio R.A.	"
Tetramolibdato de amonio dihidratado R.A.	"
Sulfato de magnesio heptahidratado R.A.	"
Sulfato de manganeso tetrahidratado R.A.	"
Sulfato de cobre pentahidratado R.A.	"
Sulfato de zinc heptahidratado R.A.	"
Sulfato ferroso heptahidratado R.A.	"
Etilendiamintetracetato de sodio R.A.	"
Cloruro de cobalto hexahidratado R.A.	"
Fosfato dibásico de potasio R.A.	"
Acido pílorico R.A.	"
Hidróxido de sodio R.A.	"
Acido clorhídrico R.A.	"
Alcohol etílico R.A.	"
Cloroformo R.A.	"
Metanol R.A.	"
Eter etílico R.A.	"
Dimetilformamida R.A.	"
Diclorometano R.A.	"
Acido nicotínico R.A.	SIGMA CHEM
Cinetina	"
Acido indol acético	"
Acido 2,4 dicloro fenoxiacético	"
Glicina R.A.	MERCK
Mic-inositol R.A.	"
Clorhidrato de piridoxina R.A.	"
Clorhidrato de tiamina R.A.	"
Peróxido de hidrógeno 30% R.A.	"
Acido Sulfúrico concentrado R.A.	TECNICA QUIMICA
Acido Bórico R.A.	"
Ioduro de potasio R.A.	SCOTT REACTIVO
Hipoclorito de sodio comercial	CLORALEX

5.2 Metodología

5.2.1. Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo que se utiliza es el de Murashige y -
Skoog MS (1962).

-Preparar las siguientes soluciones stock:

SOLUCION	SOLUCION STOCK	CONCENTRACION FINAL (mg/l)
A: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44	440
B: NH_4NO_3	165	1650
KNO_3	190	1900
C: KI	0.083	0.83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.025
D: KH_2PO_4	17	170
H_3BO_3	0.62	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.25
E: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	370
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23	22.3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	8.6
F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	27.8
Na_2EDTA	3.73	37.3
G: Glicina	0.2	2
Ac. nicotínico	0.05	0.5
Mio-inositol	10	100
H: Clorhidrato piridoxina	0.05	0.5
Clorhidrato de tiamina	0.01	0.1

-Pesar todos los componentes y disolver en agua destilada y desionizada y aforar a un litro.

-Excepto los de la solución F, la cual se prepara de la siguiente forma; disolver primero el EDTA en agua caliente, con agitación constante, incorporar lentamente el sulfato ferroso hasta que la solución adquiriera una coloración amarilla cristalina. En caso de que se presente una solución turbia o un precipitado, se sugiere volver a preparar la solución.

-Soluciones de reguladores del crecimiento:

Auxina: Pesar 10 mg del AIA o del 2,4 D y disolverlas en unas gotas de hidróxido de sodio 0.5 N, adicionar una poca de agua hasta que se disuelvan completamente y aforar a 50 ml. La concentración final es de 200 mg/l.

Citocinina: Pesar 10 mg de cinetina y disolverla en unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 N, incorporar un poco de agua destilada y disionizada hasta que se disuelva completamente y aforar a 50 ml. La concentración final es de 200 mg/l.

Las soluciones de reguladores del crecimiento, deben usarse de preferencia -- frescas. Las soluciones G y H (vitaminas), sólo se conservan por unas tres -- semanas aproximadamente, ya que se descomponen y son susceptibles a la contaminación microbiana.

-En un matr az, adicionar aproximadamente 500 ml. de agua destilada y -- desionizada, adicionar 10 ml. de las soluciones A a la H en ese -- orden, posteriormente incorporar las soluciones de las hormonas en la --

concentración que se va a evaluar y por último adicionar 30 g. de sa
carosa y se ajusta a pH 5.8.

-Adicionar 8 gr. de agar, disolver por calentamiento con agitación pa
ra evitar formación de grumos y enfriar.

-Aforar a un litro, vaciar el medio con una probeta de 20 ml. a cada
frasco gerber, tapar estos y esterilizar a 115°C (15 lbs.) por 15 mi
nutos. Dejar solidificar el medio y se conserva en refrigeración.

5.2.2 Preparación del material Biológico

A) Conservación de las semillas.

Después de la recolección de los frutos de Thevetia thevetioides, se procede
a separar a las semillas, ya que de lo contrario, el fruto se descompone y -
promueve la contaminación de la semilla.

Las semillas se ponen a secar en una estufa de 40°C por 2-3 días para su con
servación.

B) Hidratación de las semillas de Thevetia

Las semillas de Thevetia, presenta una cubierta dura (como la nuez), la cual
debe de abrirse cuidando de no dañar el tejido.

-Colocar las semillas en agua destilada por un día.

-Lavar varias veces las semillas y quitar la membrana exterior que las
cubren, sin dañar el tejido.

-Colocar en una solución de etanol al 70% por 2 minutos y lavar.

-En una campana de flujo laminar, lavar las semillas con agua destila-
da estéril 4-5 veces y drenar el recipiente.

-Colocar las semillas sobre una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 20 minutos.

-Lavar las semillas con agua destilada estéril 4-5 veces para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio de la superficie.

-Tomar la semilla con una pinza de disección y colocarla sobre una caja petri, conteniendo papel filtro estéril, para guardar la semilla - en condiciones estériles, hasta el momento de la siembra (no debe de pasar de 3 días).

C) Obtención del explante.

-En condiciones estériles, se toma a la semilla y se procede a realizar cortes cilíndricos del cotiledón y el embrión se le aísla completo.

-Reunir estos explantes en cajas de petri diferentes.

-Colocar cada explante por separado en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se deja reposar por 15 minutos.

-Eliminar el hipoclorito de sodio y realizar varios lavados 4-5 veces con agua destilada estéril.

-Pasar los explantes a cajas de petri conteniendo papel filtro estéril para adsorber el exceso de agua.

-Los explantes obtenidos de esta manera están listos para la siembra.

5.2.3. Siembra

-En condiciones estériles en una campana de flujo laminar, se procede a la siembra;

-Tomar un frasco con medio de cultivo, destapar y colocar el explante con ayuda de unas pinzas de disección flameadas previamente y se coloca en la parte central.

-Flamear las bocas de los frascos, y tapar estos.

5.2.4 Incubación

Todos los frascos con tejido se incuban a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en fotocondiciones según se requiera en el experimento.

-Luz (24 hrs.)

-Oscuridad (24 hrs.)

-Fotoperíodo (16 hr. luz/8 hr. oscuridad)

5.2.5 Parámetros de Crecimiento del Tejido Calloso

A) Índice de Peso Fresco

-Extraer el callo del frasco después de un tiempo (t) de incubación.

-Colocar el callo sobre un papel glassine previamente pesado.

-Pesar el callo se pesa en una balanza analítica.

El índice de peso fresco se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IPF} = \frac{\text{PPD} - \text{PFI}}{\text{PFI}}$$

donde:

IPF = Índice de peso fresco

PPD = Peso del callo después de un tiempo (t) de incubación.

PFI = Peso del explante inicial.

El índice de peso fresco que se reporta, es el promedio de tres callos.

B) Peso Seco

-Extraer el callo del frasco después de un tiempo (t) de incubación y se coloca en un tubo de ensaye tarado.

-Introducir el tubo con el callo en la estufa durante 24 horas a una temperatura de 65°C.

-Pesar el tubo con el callo seco y determinar el peso seco por diferencia con el peso inicial.

El peso seco que se reporta es el promedio de tres determinaciones.

5.2.6 Porcentaje de Inducción de Tejido Calloso

El porcentaje de inducción se determina por la observación de la presencia o ausencia de inducción de callo y se calcula por el número de frascos incubados respecto al total que presenta respuesta, a un tiempo (t), se utilizan 20 frascos para cada experimento.

5.2.7 Porcentaje de Diferenciación

El porcentaje de diferenciación se determina por presencia de brotes, raíz o tallo. Se calcula por el número de frascos incubados respecto al total que presenta respuesta a un tiempo (t), se utilizan 20 frascos para cada experimento.

5.2.8 Porcentaje de Contaminación

El porcentaje de contaminación microbiana o por hongos se realiza también por observación de la presencia o ausencia de contaminación. Se calcula por el número de frascos incubados respecto al total que presenta respuesta a un - -

tiempo (t), se trabaja también con 20 frascos,

5.2.9 Dispersabilidad Celular

Es importante considerar esta variable de respuesta, la determinación se hace de la siguiente manera:

- Depositar un callo en un tubo de ensaye de 20 ml. conteniendo 5 ml. - de agua destilada estéril.
- Disgregar con ayuda de una barra magnética en una placa de agitación.
- Agitar durante diez minutos y observar si hay dispersión del tejido - calloso.

5.2.10 Extracción de Thevetósidos de las Semillas de Thevetia

Método modificado al propuesto por Pérez M. (1982).

- Las semillas de Thevetia se obtienen de frutos verdes.
- Machacar el tejido de la semilla. -
- Pesar 100 gr. de tejido fresco y colocar en un equipo de Soxhlet, con 250 ml. de cloroformo-metanol 1:1 como mezcla de extracción. ;
- A una temperatura de 45-50°C, durante ocho horas.
- Concentrar el extracto a sequedad en un rotavapor.
- Del paso anterior, se obtiene la mezcla cruda de thevetósidos y aceite de Thevetia el cual se separa por filtración.
- La mezcla cruda de thevetósidos se desengrasa con éter en un Soxhlet.
- Pesar el extracto crudo en una balanza analítica y calcular el rendimiento con base en el peso de tejido, del cual se parte. Se hace la corrección con base en el porciento de contenido de humedad del tejido inicial.

-Se procede a identificar la mezcla de Thevetósidos, mediante cromatografía en capa fina comparando con una mezcla tipo de thevetósidos. - Obtenida por el M.C. I: Regla en el Laboratorio de Química Orgánica - de la ENEP Zaragoza.

La mezcla de thevetósidos, separados de las semillas de Thevetia Thevetioides esta constituida por:

20% de nerifolina 2¹ -monoacetato

31% de nerifolina

20% de 18,20-óxido-20,22-dihidronerifolina 2¹-monoacetato

9% de 18,20-óxido20,22-dihidronerifolina

2.3% de peruvósido 2¹-monoacetato.

Se obtienen por cromatografía en columna de silicagel, según la metodología -- descrita por Cruz (1979).

5.2.11 Extracción de Thevetósidos de Tejido Calloso

-Pesar tres callos y colocar en un tubo de ensaye de 50 ml. con tapón de baquelita.

-Adicionar 22 ml. de una mezcla de cloroformo-metanol 1:1.

-Disgregar los callos y mantener una agitación constante durante 3 -- hrs. con ayuda de una barra magnética de 0.5 cm.

-Filtrar con un embudo de tallo corto y enjuagar el tubo y embudo con 2 ml. de la mezcla de solventes.

-Recibir el filtrado en un matraz de 25 ml. y aforar con la misma mezcla de disolventes.

-Identificar el extracto de thevetósidos mediante una cromatografía - en capa fina.

-Cuantificar el extracto de thevetósidos por el método de picrato.

5.2.12 Cromatografía en Capa fina para Thevetósidos

- Tomar una muestra de extracto de thevetósidos y colocar sobre placas de sílica gel 60F₂₅₄.
- Utilizar como eluyente, una mezcla de diclorometano-metanol-dimetilformamida 90;9;1.
- Utilizar como muestra de referencia se utiliza una mezcla de thevetósidos tipo.
- Revelar las placas con luz ultravioleta o con ácido clorhídrico al 10%.

5.2.13 Ensayo Colorimétrico de Picrato para Thevetósidos

Alcántara (1982)

Preparación de reactivos;

Solución (A) ácido picrico:

Pesar 600mg. de ácido picrico y disolver en 25 ml de agua destilada caliente, enfriar y aforar a 100 ml con agua, guardar en frasco ambar.

Solución (B) hidróxido de sodio al 3%.

Pesar 3gr. de hidróxido de sodio y disolver con agua destilada y completar a 100ml.

Reactivo Alcalino-picrato

Transferir 10 ml de (A) a un matraz aforado de 100ml, adicionar 20ml de la solución (B). Mezclar y aforar con agua destilada. Preparar siempre solución fresca antes de su uso.

Preparar muestras para cuantificación de thevetósidos;

- Tomar una alícuota de 5ml del extracto de thevetósidos y colocarlo en un tubo de ensayo de 20ml.
- Evaporar suavemente en baño maría.

- Enfriar los tubos a temperatura ambiente.
- Agregar 5ml de metanol para redissolver.
- Adicionar posteriormente 5ml de reactivo alcalino de picrato.
- Mezclar y dejar reposar por 3 minutos.

Determinar la absorbancia de estas soluciones a 492 nm.

- Utilizar un blanco (5ml de etanol + 5ml de reactivo alcalino de picrato).
- Calcular la concentración a partir de la curva estándar de una mezcla de thevetósidos tipo.
- Curva Estándar de una Mezcla de Thevetósidos

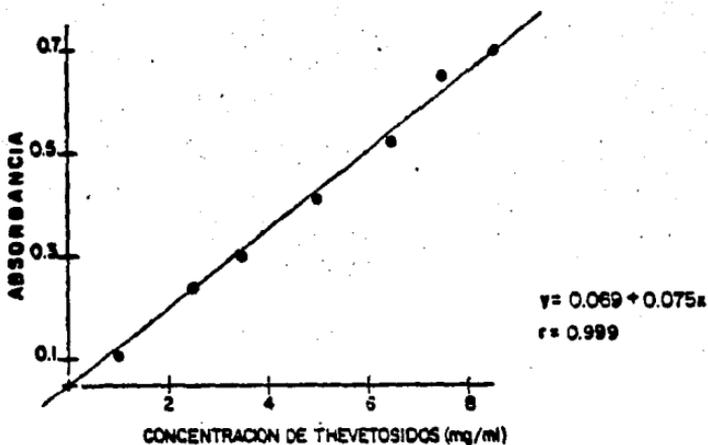
Se prepara una solución estándar de mezcla de thevetósidos tipo, en etanol a una concentración de 0.25 mg/ml.

- Cada tubo, conteniendo una concentración dada de mezcla de thevetósidos tipo en ml, se completa a 5ml con etanol, posteriormente se adiciona el reactivo alcalino de picrato, se mezcla y se deja reposar 30 minutos antes de determinar su absorbancia a 492 nm.
- Cada concentración es por triplicado.
- La absorbancia se indica como el promedio de tres muestras.

Concentración mg/ml	Absorbancia
1.25	0.115
2.5	0.225
3.75	0.32
5.0	0.43
6.25	0.535
7.5	0.665

-Realizar un ajuste de la recta por mínimos cuadrados.

-Cada vez que se analicen muestras problemas, utilizar mínimo dos concentraciones de thevetósidos conocidas y verificar que se ajustan a la curva estándar.



CURVA ESTANDAR DE THEVETOSIDOS

5.2.14 Análisis de Varianza de dos factores

Hicks (1973), Remington (1977).

El término "factor", aplicado al análisis de varianza, se refiere a un valor - utilizado para clasificar o bien para distinguir unidades experimentales, cuyo efecto se desea determinar.

En un experimento de 2 factores, formado por un nivel fijo del factor fila y - un nivel fijo del factor columna, se llama una casilla.

El objetivo principal del análisis de varianza, es determinar la influencia de cada factor individualmente y en combinación sobre cierta variable de respuesta.

Se Contrastarán tres hipótesis específicamente, para determinar si hay efecto -- significativo, cuando se compara la hipótesis calculada con la hipótesis observada.

El factor fila $\mu_r = \mu_{r_0}$

El factor columna $\mu_c = \mu_{c0}$

La interacción entre
fila y columna $\mu_{rc} = \mu_{rc0}$

En el contraste de hipótesis se consideran los siguientes supuestos:

- 1) La variable de respuesta tiene distribución normal.
- 2) Los efectos fila y columna son independientes.

Ejemplo: En un experimento para evaluar el efecto de la variable de respuesta del peso seco, en el crecimiento de Tejido calloso, a cuatro concentraciones de auxina y cuatro concentraciones de citocinina y ambos constan de 4 niveles ($r=4$, $c=4$), por lo tanto es una matriz experimental de 4×4 .

A continuación se describe la notación para el análisis de varianza de dos factores y las fórmulas de cálculo para la Gran media cuadrática y para F (modelo fijo).

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE DOS FACTORES CON m OBSERVACIONES POR CASILLA.

Fuente	Suma de cuadrados	Gran suma de cuadrados	Grados de libertad	Gran media cuadrática*	F (modelo fijo)
Filas	$cm \sum_{i=1}^r (\bar{x}_{i..} - \bar{x})^2$	$L_R = r \sum_{i=1}^r R_i^2 - T^2$	$r - 1$	M_R	$\frac{M_R}{M_{WR}}$
Columnas	$rm \sum_{j=1}^c (\bar{x}_{.j.} - \bar{x})^2$	$L_C = c \sum_{j=1}^c C_j^2 - T^2$	$c - 1$	M_C	$\frac{M_C}{M_{WR}}$
Interacción	$m \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c (\bar{x}_{ij.} - \bar{x}_{i..} - \bar{x}_{.j.} + \bar{x})^2$	$L_I = rc \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c T_{ij}^2 - r \sum_{i=1}^r R_i^2 - c \sum_{j=1}^c C_j^2 + T^2$	$(r-1)(c-1)$	M_I	$\frac{M_I}{M_{WR}}$
Dentro de las casillas	$\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{k=1}^m (x_{ijk} - \bar{x}_{ij.})^2$	$L_{W'} = n \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{k=1}^m x_{ijk}^2 - rc \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c T_{ij}^2$	$rc(m-1)$	$M_{W'}$	
Total	$\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{k=1}^m (x_{ijk} - \bar{x})^2$	$L_T = n \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{k=1}^m x_{ijk}^2 - T^2$	$n - 1$		

* Una gran media cuadrática es una gran suma cuadrática dividida por el correspondiente número de grados de libertad.

i = índice de fila (nivel del primer factor).

j = índice de columna (nivel del segundo factor).

k = índice de la observación individual de una casilla¹.

r = número de filas (número de niveles del primer factor).

c = número de columnas (número de niveles del segundo factor).

m = número de observaciones por casilla (observar que en este estudio es el mismo para cada casilla).

x_{ijk} = k -ésima observación en la i -ésima fila y j -ésima columna.

$\bar{x}_{ij.}$ = media de las observaciones en la casilla (i, j) , es decir, en la fila i y en la columna j .

$\bar{x}_{i..}$ = media de las observaciones de la i -ésima fila.

$\bar{x}_{.j.}$ = media de las observaciones de la j -ésima columna.

\bar{x} = media de todas las observaciones.

T_{ij} = la suma (total) de todas las observaciones en la casilla (i, j) , es decir, en la fila i , columna j .

R_i = suma de todas las observaciones de la fila i .

C_j = suma de todas las observaciones de la columna j .

T = suma de todas las observaciones.

$n = rc m$ = número total de observaciones.

6.0 Desarrollo Experimental

La secuencia de trabajo propuesta en el presente proyecto se esquematiza en - la fig. 13.

Cuando se desea producir metabolitos secundarios a partir de la técnica de -- cultivo de tejidos vegetales, es muy importante el explante del cual se parte. Ya que no sólo es obtener el tejido calloso, el cual puede obtenerse de cualquier parte de la planta con base en el principio de totipotencia. Sino que, además, se requiere de que el explante inicial también contenga el metabolito secundario para lograr un mayor éxito en la producción, según lo publicado -- por Hirotsani (1977), Karting (1979), Garve (1980) y Vogel (1981) para cultivos de Digitalis.

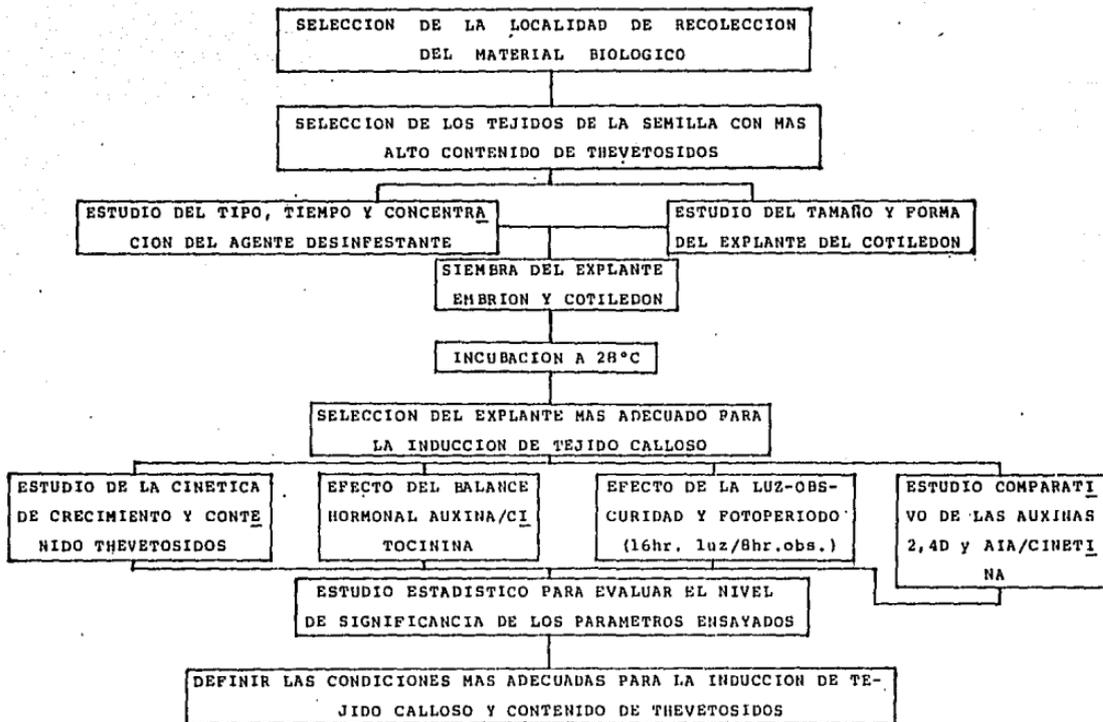
En relación al género Thevetia, el único estudio publicado para inducción de tejido calloso, utiliza al cotiledón por tener un alto contenido inicial de - las thevetinas A y B, Sen Gopa (1981).

Por ello la importancia de seleccionar el explante más adecuado para la inducción de tejido calloso y que además cuente con la presencia de thevetósidos.

Con el explante seleccionado se plantea realizar un estudio de la cinética de crecimiento del tejido calloso en relación al contenido de thevetósidos con - el fin de establecer si existe alguna correlación.

El efecto del balance hormonal auxina/citocinina, juega un papel importante en los cultivos de tejidos vegetales, por su control en la inducción de tejido calloso, así como por su participación en la biosíntesis de metabolitos secundarios, Gresshoff (1978).

Fig. 13 ESQUEMA DE TRABAJO



Se ha observado que el tipo de auxina presenta dependencia con la producción de productos secundarios, Gresshoff (1978), Mantell (1983), por ello se plantea un estudio comparativo entre las auxinas AIA y 2,4D, para evaluar cual - da mejor respuesta para la inducción de tejido calloso de Thevetia y presencia de thevetósidos.

Las fotocondiciones son un parámetro que influye notablemente en la inducción de tejido calloso, así como en el contenido de metabolitos secundarios, para este estudio se pretende evaluar el efecto en condiciones de luz, obscuridad y fotocondiciones.

Con el fin de evaluar la dependencia del Balance hormonal, Tipo de Auxina y - fotocondiciones, en relación a la velocidad de crecimiento y contenido de thevetósidos se plantea realizar un análisis de varianza de dos factores.

Con los estudios anteriores, se pretende encontrar las condiciones más adecuadas, para el crecimiento y contenido de thevetósidos en el tejido calloso de Thevetia thevetioides.

7. Resultados y Discusión

7.1 Selección de Localidad de Recolección del Material Biológico

En base a la información obtenida de herbarios, México cuenta con seis especies de Thevetia distribuidas ampliamente en todo el País. Se seleccionó la especie Th. thevetioides, por estar en localidades cercanas al D.F.

Las localidades en donde se recolectó, así como el contenido de thevetósidos totales, se muestra en la Tabla No. III, el material recolectado fue clasificado botánicamente en el Herbario de la ENEP Zaragoza por el B.Mario Ishiki, el cual encontró que todas las localidades tenían la misma especie de Th. thevetioides.

Es importante señalar el problema de variabilidad que nos enfrentamos cuando se trabaja, con productos naturales obtenidos de manera silvestre, de aquí que se trató de estandarizar la recolección del material, ya que este producto no cuenta con un control en los nutrientes y agua para su cultivo, de aquí la importancia de realizar el trabajo experimental con material de la misma zona. Por ello, seleccionamos a las zonas 1 y 2 como las más adecuadas por varias razones; presentan una amplia extensión de árboles de Thevetia, además de que su contenido de thevetósidos es muy semejante al reportado por Pérez (1982).

Por otra parte, no se cuenta con antecedentes, respecto a la época del año más adecuada para la recolecta en relación a su contenido de thevetósidos, por ello se manejaron dos períodos, de marzo-abril y de septiembre-octubre, siempre después de su floración, para recolectar únicamente frutos verdes. Se procede a secar la semilla a 40°C por 3 días para evitar contaminación bacteriana o micótica, o posible degradación de los thevetósidos por acción de enzimas endógenas.

Para la realización del presente trabajo, se trabajó exclusivamente con la zona No. 2.

T A B L A III

LOCALIDADES DE RECOLECCION DE Th. thevetioides

ZONA	LOCALIDAD	DISTRIBUCION DE ARBOLES	% DE THEVETOSI DOS (en base - seca)
1	Km 65 Teloloapan carretera 51, Edo. de Gro.	AMPLIA	1.791
2	Km 12 Izúcar de Matamoros carretera a Oaxaca, Edo. Pue.	AMPLIA	1.812
3	El Zapote; Km 5 Tonicó - desviación Grutas de la -- Estrella Edo. de México.	ESCASA	1.734
4	Km 83 carretera a Taxco, - Edo. de Gro.	ESCASA	1.767

7.2. Selección de las partes de la semilla con más alto contenido de Thevetósidos

Para lograr la inducción de tejido calloso, el único requisito es partir de células meristemoides, en este estudio como - además, se desea lograr la producción de metabolitos secundarios, la selección del explante, se hace más complicada, es por ello, que los investigadores que trabajan Cultivo de tejidos Vegetales prefieren utilizar el explante que se sabe contiene el metabolito secundario a estudiar Garve (1980), Hiro-tani (1977), Kartning (1983), Tabata (1976).

En la tabla IV, se indica las partes de la semilla evaluadas, en donde podemos observar que el cotiledón y embrión son los explantes más adecuados respecto a su contenido de thevetósidos para utilizarlos en la inducción de tejido calloso.

La semilla completa, en condiciones de cultivo tiende a regenerar la planta y no se promueve la inducción de tejido calloso, por ello no se utiliza.

T A B L A IV

SELECCION DE LAS PARTES DE LA SEMILLA CON MAS ALTO CONTENIDO DE THEVETOSIDOS.

EXPLANTE	PESO FRESCO gr.	EXTRACTO ml.	CONTENIDO & RENDI THEVETOSI- MIEN- DOS gr. TO %
semilla completa	100	200	6.181 6.18
capa externa	32	75	0.0394 0.12
capa interna	14	75	0.1031 0.73
cotiledón	95	200	1.7798 1.868
embrión	1	75	0.0314 3.14

% Ensayo colorimétrico con picrato.

7.3 Selección del tipo, tiempo y concentración del agente desinfectante

Para este estudio se trabajó con cortes de 1/4 de semillas de Thevetia como explante, los cuales deben ser sometidos a un proceso de hidratación previo como se describe en la metodología.

En la tabla V, se muestran los resultados de los agentes desinfectantes ensayados, de donde podemos observar que el más adecuado es el hipoclorito de sodio.

Una vez elegido el agente desinfectante, se procede a evaluar la concentración y el tiempo de exposición. En la tabla VI, se indican los resultados obtenidos, de donde podemos observar que la concentración del 5% en un intervalo de 15-20 minutos, son las condiciones más adecuadas, de tal modo, que se utilizarán en todo el desarrollo experimental.

T A B L A VI

PORCIENTO DE CONTAMINACIÓN RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO

CONCENTRACION %	TIEMPO min.			
	5	10	15	20
0.5	100	100	100	100
2.5	100	80	70	50
5.0	35	25	5	0

Condiciones: incubación a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad

Variable de respuesta: % de contaminación a los ocho días
(20 frascos por tratamiento).

T A B L A V

EFFECTO DEL TIPO DE AGENTE DESINFESTANTE SOBRE EL EXPLANTE DE SEMILLAS DE THEVETIA

AGENTE DESINFESTANTE	CONCENTRACION	TIEMPO DE EXPOSICION	EFFECTIVIDAD	VENTAJA	DESVENTAJA
Hipoclorito de Sodio	5%	20 min.	Muy bueno	Fácil de remover	Inestable al diluirse
Hipoclorito de calcio	sol. saturada al 10%	20 min.	Bueno	Fácil de remover	Difícil de disolver; inestable en solución
Agua oxigenada	3%	20 min.	Bueno	Fácil de remover	Daña el tejido. Muy inestable
Etanol	70%	5 min.	Bueno	Muy estable	Difícil de remover

7.4. Selección del tamaño y forma del explante para los cotiledones

En este estudio, se evaluaron diferentes cortes con el fin de encontrar la dependencia respecto a este parámetro sobre la inducción de tejido calloso, manteniéndose constantes las condiciones nutricionales con el medio MS de Murashige, sin suplemento hormonal. En la tabla VII se observan los resultados obtenidos.

T A B L A VII

EFFECTO DEL TAMAÑO Y FORMA DEL EXPLANTE RESPECTO A LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO DE Thevetia.

EXPLANTE	INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO	DIFERENCIACION
Semilla completa	-	regenera la planta
1/2 cotiledón horizontal	-	Raíz
1/2 cotiledón vertical	-	Raíz
1/4 cotiledón	+,-	Raíz
1/8 cotiledón	+	-
embrión	+	-

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en obscuridad a las tres semanas.

Variable de respuesta: inducción positiva (+) (20 frascos por inducción negativa (-) tratamiento)

De los resultados se concluyó que a medida que el explante es menor, como es el caso para el cotiledón, mayor es la tendencia a inducir el tejido calloso. La presencia de tejido diferenciado se observa en explantes grandes en los cuales se realizan menos cortes, para obtener el explante.

Considerando a 1/8 de cotiledón como un explante adecuado, se realizó un estudio preliminar en donde se evaluaría el porcentaje de inducción de tejido calloso, en un medio de cultivo con Balance Hormonal AIA/Cinetina, en una matriz experimental de 5 x 3.

En la tabla VIII se indican los resultados obtenidos para el porcentaje de inducción de Tejido calloso.

T A B L A VIII

% DE INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO EN EXPLANTES DE 1/8 DE COTILEDON EN RELACION AL BALANCE HORMONAL.

AIA (mg/l)

C I N E T I N A		0.5	1	1.5	2	3.5
	0.25	60	100	100	40	80
	0.5	38	78	100	85	8
	0.75	0	20	80	100	28

(mg/l)

Condiciones: incubados a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en obscuridad a las cinco semanas. (después de siete semanas gran parte del tejido se necrosa).

Variable de respuesta: % de inducción de tejido calloso.
(20 frascos por tratamiento).

De los resultados se encontró, que su respuesta a la inducción de tejido calloso es muy irregular. Debido tal vez a que la superficie de contacto del explante con el medio, no es homogénea, provocando que después de un tiempo se necrose y por lo tanto se altere su capacidad de inducción del tejido calloso.

En base a esta información, se propuso un experimento en donde se estandarice la forma y tamaño del explante, para evaluar su efecto en relación al porcentaje de inducción de tejido calloso, manteniéndose constantes las condiciones nutricionales con el medio MS de Murashige, y suplementado con el balance hormonal auxina/citocinina, en una matriz experimental de 3x3.

Se utilizó un aparato muestreador, el cual nos permite obtener explantes cilíndricos, con un diámetro de 0.72cm., manteniendo de esta manera la forma y el tamaño constante del explante cotiledón.

En la tabla IX, se observa un 100% de inducción de tejido calloso en todos los tratamientos, por esto se consideró que los explantes cilíndricos de cotiledón, son adecuados para realizar los estudios de velocidad de crecimiento y presencia de chevetósidos.

T A B L A IX

PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO EN EXPLANTES DE FORMAS Y TAMAÑO CONSTANTES, EN RELACION AL BALANCE HORMONAL AIA/C.

AIA (mg/l)

C

		0.5	1.5	2.5
I				
M				
E	0.25	100	100	100
T				
I	0.5	100	100	100
M				
A	0.75	100	100	100

(mg/l)

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad a las cinco semanas.

Variable de respuesta: % de inducción de tejido caloso (20 frascos por tratamiento).

7.5 INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO A PARTIR DE EMBRIONES DE Thevetia thevetioides

En relación a este explante embrión, se planteó un estudio -- para evaluar el por ciento de inducción de tejido calloso y la presencia de thevetósidos, manteniéndose constantes las condiciones nutricionales con el medio MS de Murashige, evaluando su efecto del balance hormonal AIA/C, en condiciones de luz y oscuridad a las cuatro semanas.

En la tabla X, se muestran los resultados obtenidos, de donde se concluyó que el embrión utilizado como explante, presenta problemas para promover la inducción de tejido calloso, suponemos que tal vez es la hidratación de la semilla de Thevetia, y por lo tanto no se logra romper por completo el estado de dormancia de este tejido.

Otro de los problemas que se presentó, es que en estos cultivos de embrión se promueve la diferenciación del tejido en -- hojas, raíz y tallo, como se indica en los resultados de la tabla XI.

La etapa de diferenciación como primera respuesta del tejido, no es recomendable para nuestros fines, debido a que no se -- puede deslindar cual etapa es la responsable de la producción del metabolito secundario. En estudios al respecto Tabata -- (1976) y Luckner (1980), se ha propuesto que es conveniente -- promover un tejido no diferenciado y posteriormente a partir de él inducir una diferenciación mediante efectos físicos o -- químicos, a fin de evaluar cual etapa es la responsable de la producción de productos secundarios.

En la figura No. 14, se observa el efecto de la diferencia- -- ción.

T A B L A X

PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO DE EMBRIONES DE
Thevetia thevetioides.

AIA (mg/l)

C I M E T I M A (mg/l)		0.1	1.0	2.5	
	0.25	61.3	33.4	86	
	1.0	88.3	97.8	100	LUZ
	1.5	46.5	95.7	100	

AIA (mg/l)

C I M E T I M A (mg/l)		0.1	1.0	2.5	
	0.25	74.1	59.7	73.2	
	1.0	79.1	95.4	100	OBSCURIDAD
	1.5	36.5	45.7	81.2	

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en luz-obscuridad
a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: % de inducción de tejido caloso.
(20 frascos por tratamiento).

T A B L A X I

PORCIENTO DE DIFERENCIACION DE TEJIDO CALLOSO DE EMBRIONES
DE Thevetia thevetioides

AIA (mg/l)

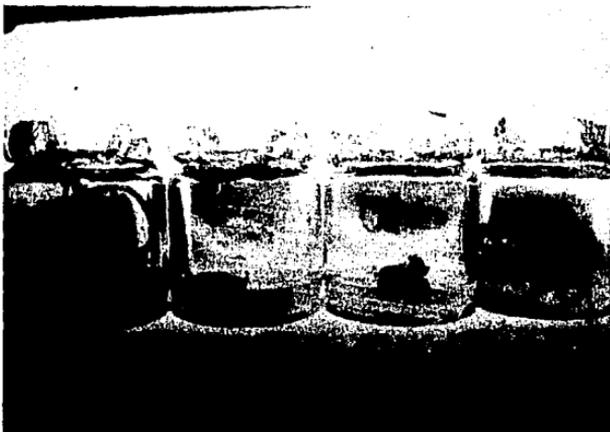
C I N E T I N A (mg/l)		0.1	1.0	2.5	LUZ
	0.25	0	57	14	
	1.0	14	28	0	
	1.5	28	0	0	

AIA (mg/l)

C I N E T I N A (mg/l)		0.1	1.0	2.5	OBSCURIDAD
	0.25	0	42	0	
	1.0	28	28	0	
	1.5	42	0	14	

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad,
a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: % de diferenciación, se considera
tallo, hoja o raíz (20 frascos por
tratamiento).



OBSCURIDAD



Fig. 14. Diferenciación en cultivo de embriones de Thevetia
thevetioides.

La cuantificación de thevetósidos se realiza a las ocho semanas en la tabla XII, se muestran los resultados, de donde se puede inferir que las mejores condiciones tanto para luz como para obscuridad, son el balance hormonal de 1/1.5 de AIA/C en mg/l.

En relación al efecto del contenido de Thevetósidos respecto al balance hormonal en la figura No. 15, se muestra gráficamente esta interrelación y la dependencia que presenta con -- este parámetro, de donde se observa que el balance hormonal es importante para la presencia de Thevetósidos.

Se puede concluir que para que el embrión, pueda ser considerado adecuado para la inducción de tejido calloso, se tendrá que aumentar el porcentaje de inducción mediante un tratamiento previo del explante, en donde se logre romper con la dormancia de este tejido. A diferencia de los cotiledones, en los cuales si se logra un 100% para la inducción de Tejido -- Calloso, según se indica en la tabla IX.

De aquí que se considere a estos explantes, idoneos para realizar los estudios de velocidad de crecimiento y la presencia de thevetósidos.

Por último, el no contar con una técnica analítica lo suficientemente sensible para detectar trazas, limita el estudio de la cinética de contenido de thevetósidos, dato importante para conocer la etapa idónea de recolección.

T A B L A XII

PORCIENTO DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS/gr. DE TEJIDO CALLOSO SECO DE EMBRIONES DE Thevetia thevetioides

AIA (mg/l)

C I N E T I N A					LUZ
		0.1	1.0	2.5	
E	0.25	0.54	0.21	0.29	
I	1.0	0.11	0.22	0.15	
A	1.5	0.16	0.81	0.503	

(mg/l)

AIA (mg/l)

C I N E T I N A					OBSCURIDAD
		0.1	1.0	2.5	
E	0.25	0.60	0.28	0.74	
I	1.0	0.38	0.28	0.19	
A	1.5	0.59	0.98	0.42	

(mg/l)

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad a las ocho semanas.

Variable de respuesta: % de contenido de Thevetósido/gr. de tejido calloso seco (promedio de tres frascos por tratamiento)

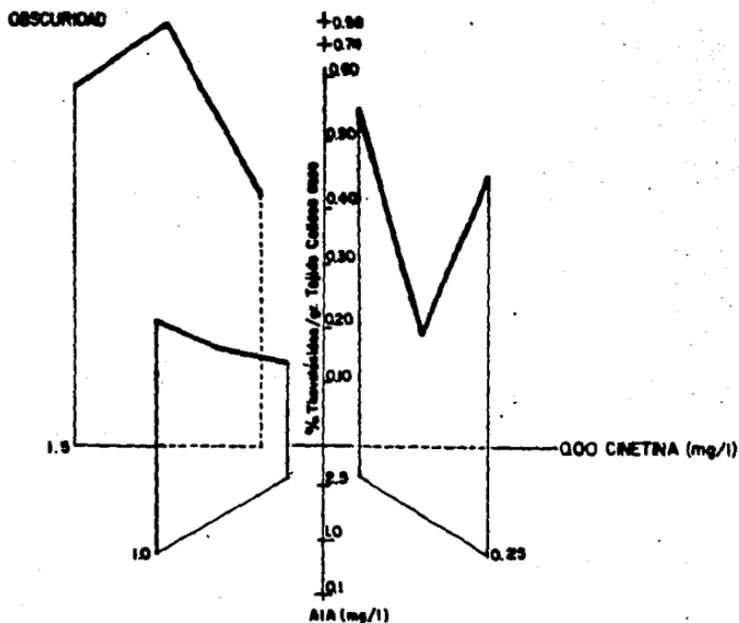
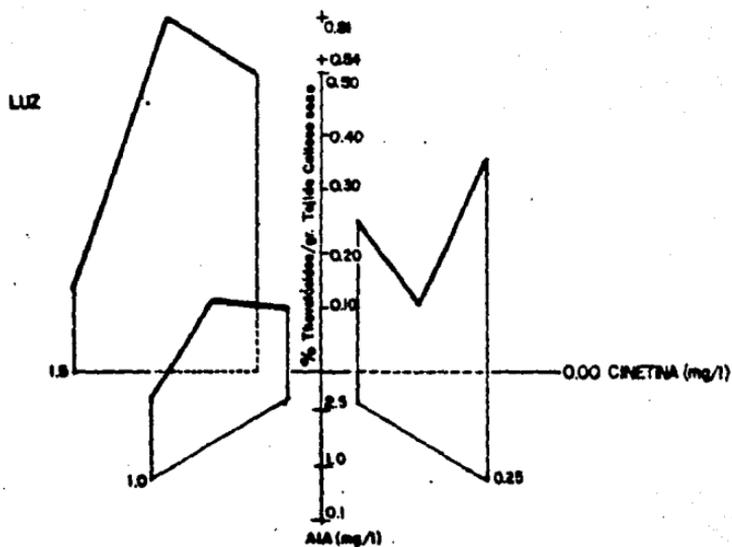


Fig. 15 INTERRELACION DEL BALANCE HORMONAL AIA/CINETINA RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALOSO DE EMBRIONES A LAS 8 SEMANAS.

7.6 Efecto del balance hormonal AIA/C, respecto a la velocidad de crecimiento y contenido de Thevetósidos en tejido calloso de Thevetia thevetioides en condiciones de Luz-Obscuridad.

1) Cinética de Crecimiento

En la producción de metabolitos secundarios, es importante establecer si existe dependencia entre la formación de thevetósidos, con la velocidad de crecimiento del tejido calloso, -- con el fin de poder establecer la etapa de crecimiento más -- adecuada para subcultivar.

En relación a este estudio, se planteó evaluar el efecto del balance hormonal AIA/C, en una matriz experimental de 2 x 2, utilizando los cortes cilíndricos de cotiledón, manteniendo constantes los requerimientos nutricionales, en condiciones de luz-obscuridad, incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Las variables de respuesta para cuantificar la velocidad de crecimiento son el peso seco y el índice de peso fresco, cuyas determinaciones se realizarán cada dos semanas.

Respecto a la variable de respuesta del peso seco, los resultados se indican en la tabla XIII. De ahí se concluyó que el balance hormonal, sí influye en la velocidad de crecimiento, encontrando que la relación 2.5/1 de AIA/C, fué la más adecuada para la velocidad de crecimiento en condiciones tanto de luz como de obscuridad.

La gráfica de la velocidad de crecimiento se observa en la figura No. 16. De ahí se infiere que entre las cuatro a seis semanas, se obtienen los valores máximos de crecimiento para el peso seco.

En relación al índice de peso fresco, los resultados se mues-

T A B L A XIII

CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetioides, CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C

S E M A N A S

B A H L O A R N M C O E N A L	AIA/C	S E M A N A S				LUZ
	mg/l	2	4	6	8	
	1/0.4	4.8	12.36	14.36	17.88	
	1/1	5.0	9.16	8.72	7.99	
	2.5/0.5	11.76	11.68	14.02	12.32	
	2.5/1	8.04	24.59	18.66	16.36	

S E M A N A S

B A H L O A R N M C O E N A L	AIA/C	S E M A N A S				OBSCURIDAD
	mg/l	2	4	6	8	
	1/0.5	1.24	12.25	12.75	14.42	
	1/1	3.31	8.45	8.03	12.09	
	2.5/0.5	12.21	14.31	9.21	8.5	
	2.5/1	8.65	29.15	12.10	11.55	

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad

Variable de respuesta: Peso seco (gr/frasco) $\times 10^{-2}$

(promedio de tres frascos por tratamiento)

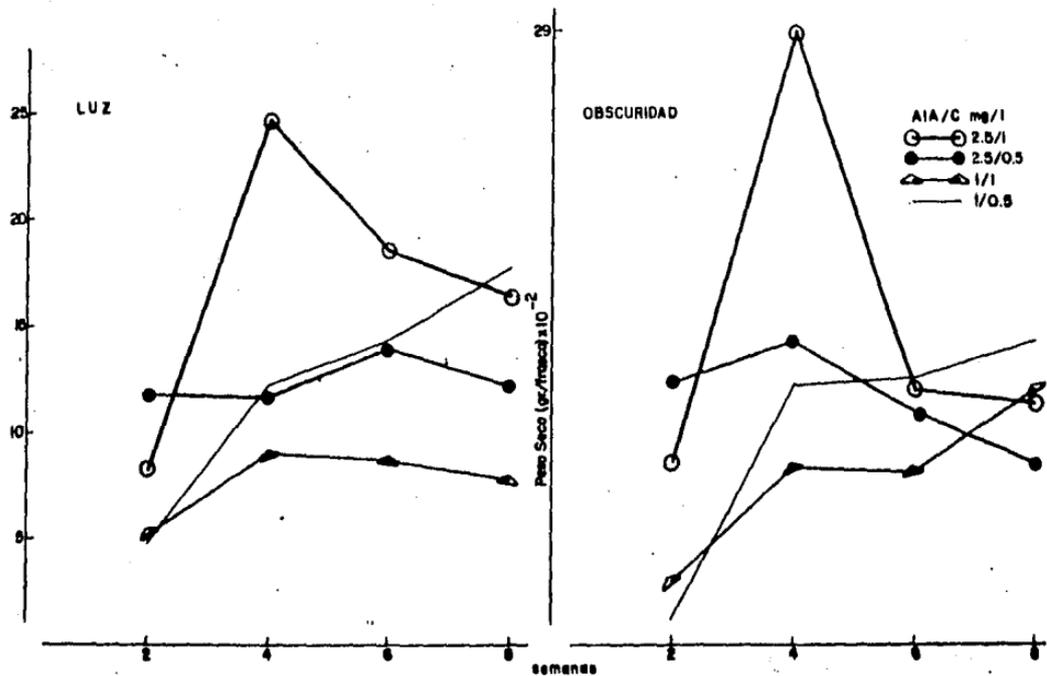


Fig. 16 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDONES CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C

Condiciones: Inoculados a 28°C ± 1°C en luz-obscuridad

Variable de respuesta: peso seco

tran en la tabla XIV. Los datos encontrados son heterógenos debido tal vez a la gran capacidad de hidratación del tejido calloso ($98.2\% \pm 0.33$ de contenido de agua).

De aquí que esta variable de respuesta, presente máximos de crecimiento hasta las ocho semanas, ocasionando que la información proporcionada sea difícil de interpretar.

En la figura No. 17, se observa gráficamente la velocidad de crecimiento para el índice de peso fresco. De ahí se infiere que el máximo crecimiento es a las ocho semanas.

Con los resultados obtenidos para las dos variables de respuesta de la velocidad de crecimiento, se concluyó que estos parámetros no se pueden correlacionar para definir el máximo crecimiento, como se puede observar gráficamente en la fig. No. 18. De aquí, se propone utilizar el peso seco, como variable de respuesta más adecuada.

Con los antecedentes planteados, se sugiere que la etapa de cultivo más adecuada para subcultivar en base al peso seco, es a las cuatro semanas, ya que después de éste tiempo, disminuye el crecimiento por un agotamiento de nutrientes.

Por lo que respecta a las condiciones de luz-obscuridad, sus curvas de crecimiento son muy similares, por ello es que no se puede con este experimento definir su dependencia con este parámetro.

En la figura No. 19, se observa los cambios en el crecimiento del Tejido Calloso de Thevetia thevetioides en condiciones de luz-obscuridad.

T A B L A XIV

CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES
DE Thevetia thevetioides CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C

S E M A N A S

B A H L O A R N M C O E N A L	AIA/C mg/l	2	4	6	8	LUZ
	1/0.5	1.804	3.166	2.93	5.996	
	1/1	1.421	1.163	3.672	4.388	
	2.5/0.5	1.611	3.933	6.621	7.25	
	2.5/1	0.813	5.045	10.665	9.885	

S E M A N A S

B A H L O A R N M C O E N A L	AIA/C mg/l	2	4	6	8	OBSCURIDAD
	1/0.5	0.312	3.114	2.687	7.45	
	1/1	2.103	2.1123	2.693	8.01	
	2.5/0.5	0.536	3.603	6.412	8.027	
	2.5/1	0.5531	2.687	9.673	10.998	

Condiciones: incubados a 28°C + 1°C en luz-obscuridad

Variable de respuesta: Índice de peso fresco.

(promedio de tres frascos por tratamiento).

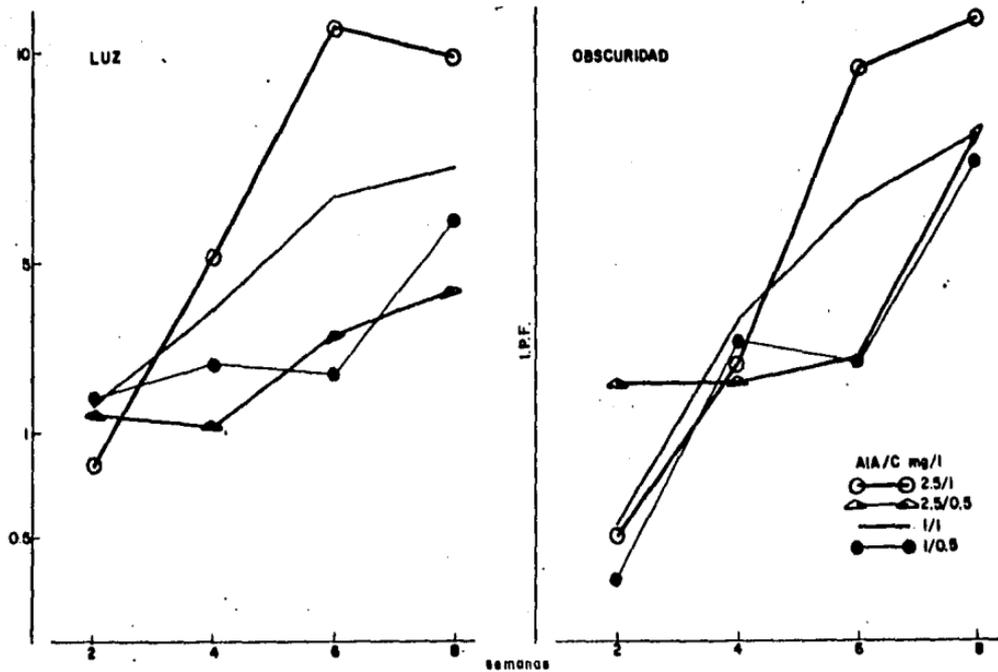


Fig. 17 **CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDONES CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C**
 Condiciones: incubados a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz - oscuridad
 Variable de respuesta: índice de peso fresco

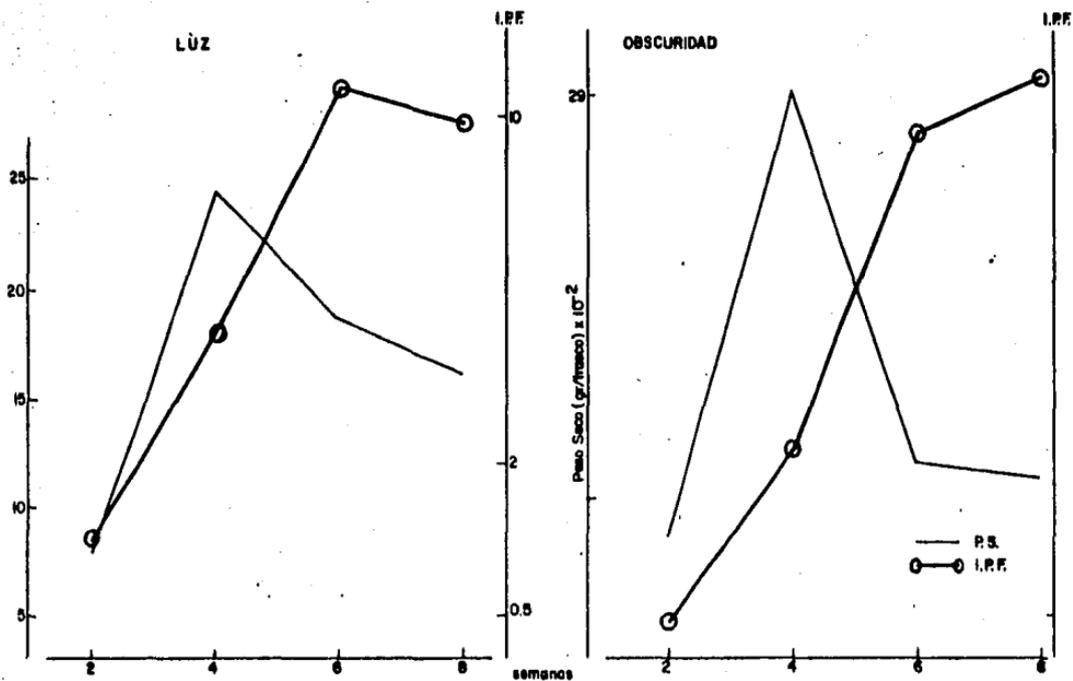


Fig. 10 CURVAS DE CRECIMIENTO COMPARATIVAS ENTRE LAS VARIABES DE RESPUESTA DEL P.S. Y EL I.P.F.



OBSCURIDAD

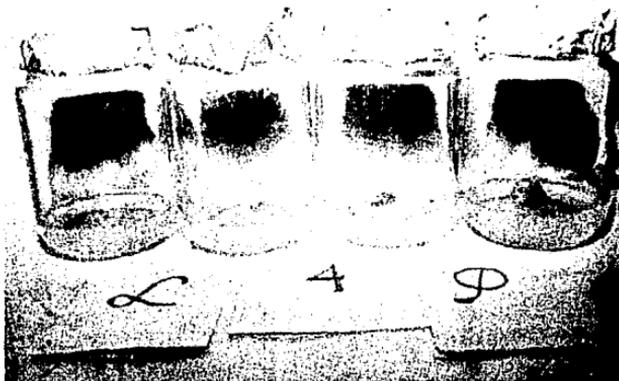


Fig. 19. Tejido Calloso de Thevetia thevetioides a diferentes semanas de crecimiento.

II) Contenido de Thevetósidos

Se utilizó la misma matriz experimental que para el peso seco y las mismas condiciones de luz y oscuridad, las cuantificaciones de thevetósidos, se realizaron por el método del picrato cada cuatro, seis y ocho semanas. En la tabla XV, se indican los resultados de donde se observa que el valor máximo, es el de las cuatro semanas. El contenido de thevetósidos se observa que disminuye a través del tiempo, resultado similar al publicado por Sen Gopa (1981), para un cultivo de Thevetia peruviana.

En la figura No.20, se muestra gráficamente el contenido de thevetósidos, a través del tiempo. Comparando los máximos de crecimiento y contenido de thevetósidos, observamos que son a las cuatro semanas. De ahí se infiere que esta etapa sea la más adecuada para subcultivar.

En relación al efecto del Balance hormonal, sobre el contenido de thevetósidos, se encontró que si tiene efecto, siendo la relación hormonal de 1/1 de AIA/C en mg/l, la más adecuada en condiciones tanto de luz como de oscuridad.

Comparando el efecto del balance hormonal en relación a la velocidad de crecimiento y contenido de thevetósidos, se concluye que los requerimientos hormonales son diferentes para estos parámetros.

T A B L A X V

CINETICA DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetioides CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C

S E M A N A S

B A H L O A R N M C O E N A L	AIA/C	4	6	8	LUZ
	mg/l				
	1/0.5	0.383	0.217	0.156	
	1/1	0.695	0.294	0.242	
	2.5/0.5	0.138	0.081	0.061	
	2.5/1	0.372	0.193	0.110	

S E M A N A S

B A H L O A R N M C O E N A L	AIA/C	4	6	8	OBSCURIDAD
	mg/l				
	1/0.5	0.417	0.258	0.184	
	1/1	0.712	0.364	0.295	
	2.5/0.5	0.123	0.052	0.043	
	2.5/1	0.293	0.127	0.086	

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad

Variable de respuesta: % contenido de Thevetósidos/gr de tejido caloso seco.

(promedio de tres frascos por tratamiento)

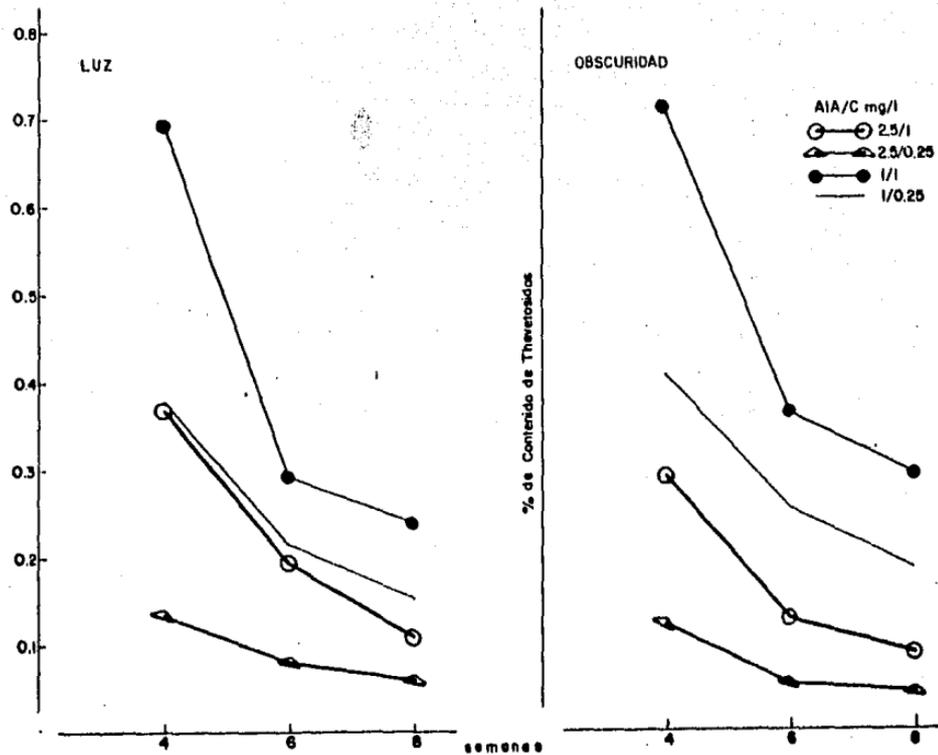


Fig 20 CINÉTICA DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS PARA COTILEDONES CON EL BALANCE HORMONAL AIA/C
 Condiciones: Incubados a 28°C ± 1°C en luz-obscuridad

7.7 Efecto de la auxina AIA, respecto a la velocidad de crecimiento y contenido de Thevetósidos en tejido calloso de Thevetia chevetioides en condiciones de luz-obscuridad.

Este estudio se realizó con el fin de evaluar a la auxina por sí misma, es importante en la inducción de tejido calloso, se propone trabajar con cuatro concentraciones del AIA en mg/l, en condiciones de luz y obscuridad incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, utilizando cortes cilíndricos de cotiledón como explantes. Se evalúa cada dos semanas con la variable de respuesta del peso seco y únicamente a las cuatro para el contenido de thevetósidos.

En la tabla XVI, se muestran los resultados para el peso seco de donde se infiere que la concentración de 1 mg/l de AIA es la más adecuada para obscuridad y 2.5 mg/l de AIA para luz. Los valores máximos de crecimiento se presentan entre las cuatro y seis semanas según se observa en la fig. No. 21.

En relación al índice de peso fresco, los resultados se indican en la tabla XVII, de donde se puede observar que se presentan máximos de crecimiento a las seis y ocho semanas, en la fig. No. 22, se muestra gráficamente este efecto, cuya interpretación es similar al estudio realizado para el balance hormonal en donde también se denota, una gran captación de agua por el tejido calloso, y por ello que sea difícil su interpretación.

La cuantificación de Thevetósidos, se realiza a las cuatro semanas, los resultados se presentan en la tabla XVIII, en donde podemos observar que la concentración de auxina (AIA) más adecuada es de 2.5 mg/l, en condiciones de luz, así como también de obscuridad. En este estudio también se puede inferir que los requerimientos de auxina para el crecimiento, son diferentes a los que necesita para la presencia de thevetósidos.

T A B L A XVI

CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES
DE Thevetia thevetioides CON LA AUXINA AIA

S E M A N A S

A U X I N A	AIA (mg/l)	2	4	6	8	LUZ
	0.01	7.66	11.77	8.27	8.40	
0.1	10.65	11.66	12.86	12.66		
1.0	8.11	9.92	14.46	12.94		
2.5	12.54	14.0	13.90	9.65		

S E M A N A S

A U X I N A	AIA (mg/l)	2	4	6	8	OBSCURIDAD
	0.01	8.33	12.20	12.76	11.20	
0.1	11.8	11.63	10.84	10.63		
1.0	8.73	25.0	14.86	13.0		
2.5	9.65	13.20	13.22	14.49		

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad.

Variable de respuesta: peso seco (gr/frasco) $\times 10^{-2}$
(promedio de tres frascos por tratamiento).

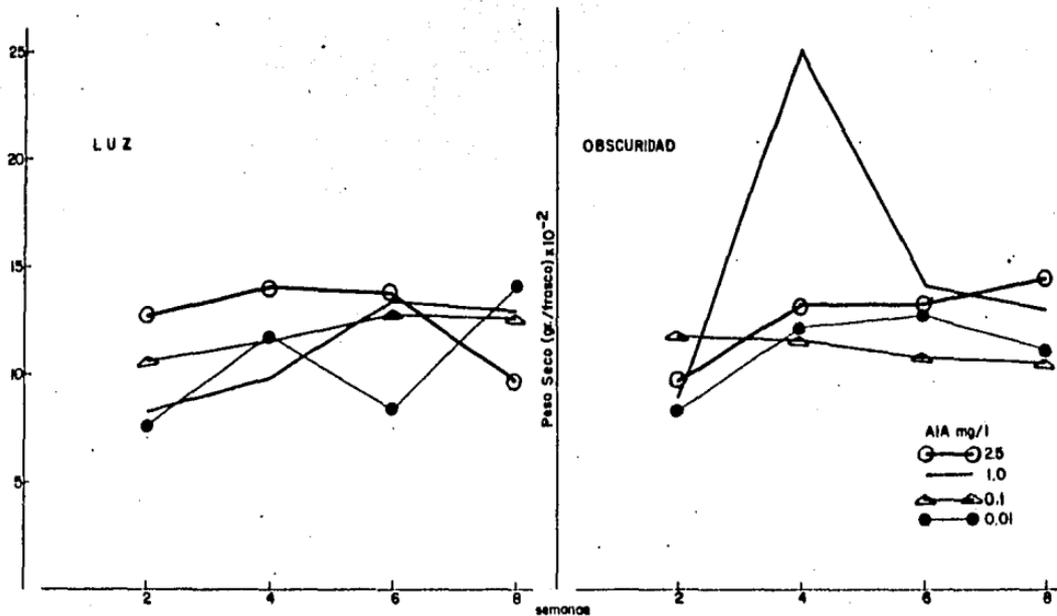


Fig. 21 **CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDON CON LA AUXINA AIA**

Condiciones: Incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad

Variable de respuesta: peso seco

T A B L A XVII

CINETICA DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES
DE Thevetia thevetioides CON LA AUXINA AIA

S E M A N A S

A U X I N A	AIA (mg/l)	S E M A N A S				LUZ
		2	4	6	8	
	0.01	0.6937	5.1912	7.6412	7.501	
	0.1	0.6001	2.9575	2.3866	4.9486	
	1.0	0.9395	5.3159	8.2358	5.10	
	2.5	1.1538	3.40	5.110	6.4542	

S E M A N A S

A U X I N A	AIA (mg/l)	S E M A N A S				OBSCURIDAD
		2	4	6	8	
	0.01	0.4875	3.2647	3.8716	4.0226	
	0.1	0.2530	1.3695	5.9166	9.9740	
	1.0	0.9736	4.1625	4.3621	5.7383	
	2.5	1.5878	4.250	4.101	3.1310	

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad

Variable de respuesta: Índice de peso fresco

(promedio de tres frascos por trata-
miento).

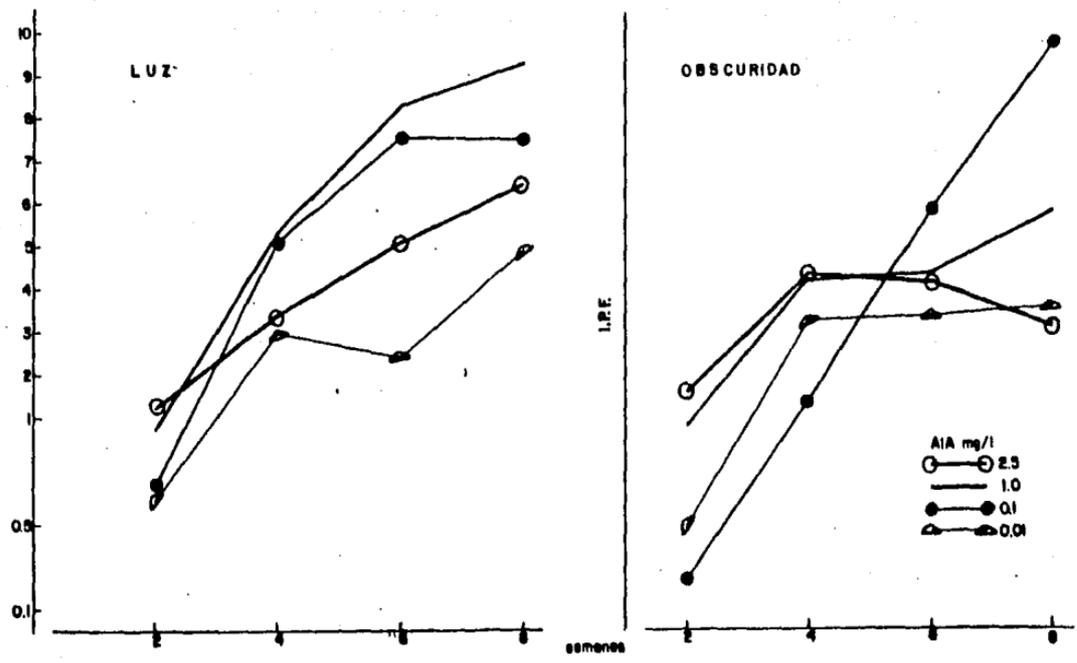


Fig. 22 CINETICA DE CRECIMIENTO PARA COTILEDON CON LA AUXINA AIA
 Condiciones: incubadas a 28°C±1°C en luz-oscuridad
 Variable de respuesta: índice de peso fresco

T A B L A XVIII

PORCIENTO DE CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN COTILEDONES DE TEJIDO CALOSO DE Thevetia thevetioides, con la auxina AIA.

A U X I N A AIA (mg/l)

	0.01	0.1	1.0	2.5
Luz	0.113	0.185	0.266	0.297
Obscuridad	0.126	0.214	0.272	0.286

Condiciones: incubados a 28°C + 1°C en Luz-obscuridad a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: % de contenido de Thevetósidos/gr. de tejido caloso seco,

(promedio de tres frascos por tratamiento)

Con el fin de poder evaluar si la auxina AIA, por sí misma -- presenta efecto sobre la inducción de tejido calloso y presencia de thevetósidos. Se realiza una comparación entre los valores más adecuados del estudio en donde se evaluó el efecto del Balance Hormonal AIA/C, en relación con la auxina AIA, -- los resultados se presentan en la tabla XIX.

Se puede concluir que el balance hormonal es el que presenta mayor efecto en relación al desarrollo del tejido calloso y presencia de thevetósidos, a diferencia de cuando se utiliza la auxina sola.

T A B L A XIX

EFFECTO COMPARATIVO ENTRE EL BALANCE HORMONAL AIA/C, RESPECTO A LA AUXINA AIA.

Balance Hormonal AIA/C (mg/l)	P.S.		% de Thevetósidos	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
2.5/1	24.59	29.15		
1/1			0.695	0.712
AUXINA AIA (mg/l)				
1.0		25.0		
2.5	14.00		0.297	0.286

Condiciones: Incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: Peso seco (P.S.); (gr/frasco) $\times 10^{-2}$
% de thevetósidos/gr de tejido calloso seco. (promedio de tres frascos por tratamiento)

7.8 Efecto del balance hormonal AIA/C respecto al crecimiento y contenido de Thevetósidos en condiciones de luz-obscuridad a las cuatro semanas.

Con el fin de poder establecer la dependencia entre las variables de respuesta para el crecimiento y contenido de thevetósidos, se propone utilizar un análisis de varianza de dos factores para evaluar el nivel de significancia de éstos parámetros.

Para este estudio se trabajó con una matriz experimental de 4 x 4 de balance hormonal AIA/C en condiciones de Luz-obscuridad utilizando a los cotiledones como explante y manteniendo el tiempo de toma de muestras constante (cuatro semanas), los requerimientos nutricionales y la temperatura de incubación $-28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. En relación al crecimiento, se elige el peso seco como variable de respuesta.

Los resultados se muestran en la tabla XX, de donde podemos concluir que el balance hormonal de 2.5/1 de AIA/C mg/l, es el más adecuado para el crecimiento, tanto para luz como para obscuridad.

En la figura No. 23, se describe gráficamente la interrelación entre el balance hormonal AIA/C respecto al peso seco, en donde se observa que sí hay dependencia, en relación al crecimiento. Analizando la gráfica, se observan varios máximos, lo cual hace suponer que las hormonas actúan en un rango muy estrecho. De ahí que sea difícil realizar predicciones respecto al intervalo más adecuado para la inducción de tejido calloso.

Con la variable de respuesta del peso seco, para el crecimiento, se llevo a cabo el estudio estadístico, los resultados se resumen en la tabla XXI. De donde podemos inferir que tanto

T A B L A XX

EFFECTO DEL BALANCE HORMONAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE Thevetia Thevetioides

AIA (mg/l)

C I N E T I N A		0.01	0.1	1.0	2.5	LUZ
	0.05	9.49	8.3	11.6	10.1	
	0.25	11.8	12.39	12.36	11.68	
	1.0	12.8	14.2	9.15	24.59	
	1.5	9.91	12.4	10.61	12.0	
	(mg/l)					

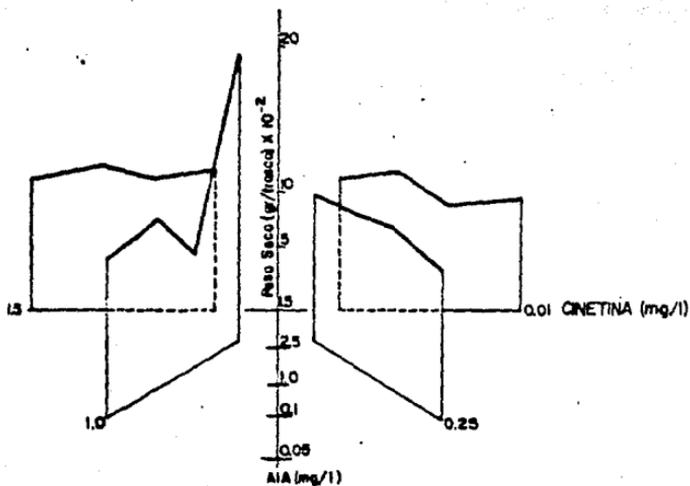
AIA (mg/l)

C I N E T I N A		0.01	0.1	1.0	2.5	OBSCURIDAD
	0.05	10.3	9.1	13.4	7.10	
	0.25	9.6	8.5	12.2	14.3	
	1.0	10.8	12.0	8.45	29.15	
	2.5	6.74	12.4	7.38	8.75	
(mg/l)						

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad. a las cuatro semanas.

Variablé de respuesta: peso seco (gr./frasco) $\times 10^{-2}$
(promedio de tres frascos por tratamiento).

LUZ



OSCURIDAD

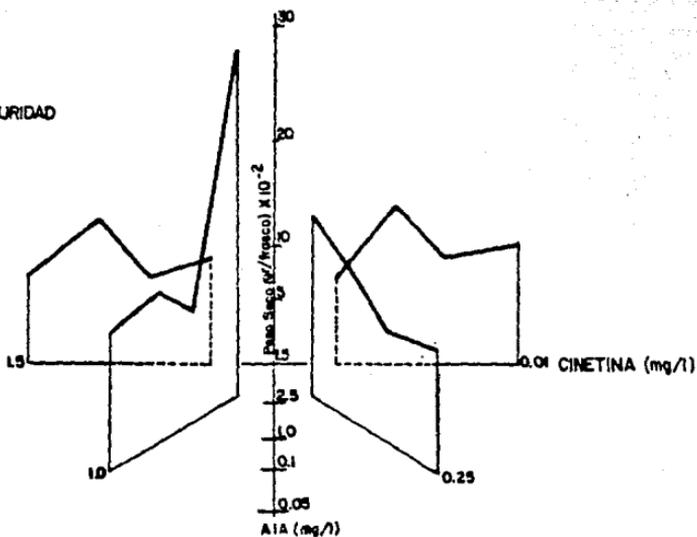


Fig. 23 INTERRELACION DEL BALANCE HORMONAL AIA/CINETINA
RESPECTO AL PESO SECO

T A B L A XXI

ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO DE Thevetia thevetioides RESPECTO AL BALANCE HORMONAL AIA/C

Fuente de variación	g.l.	M.C.		F.C.		F _{0.95}
		Luz	Oscuridad	Luz	oscuridad	
Auxina (AIA)	3	2909.6	4322.7	12.73	13.29	2.92
Cinetina (C)	3	1659.6	3404.8	7.26	10.97	2.92
Interacción						
Auxina-Cinetina	9	1704.9	4101.7	7.46	12.61	2.21
Error	32	228.5	325.1			

g.l. = grados de libertad

M.C. = cuadros medios

F_c = F calculada

F_{0.95} = F teórica al 95% de confianza

F_c > F_{0.95} hay efecto significativo

Variable de respuesta: P.S. = peso seco.

la auxina como la cinetina, así como la interacción A-C, presentan un efecto significativo a un intervalo del 95% de confianza.

De aquí que se pueda afirmar que el balance hormonal juega un papel importante en el crecimiento de tejido calloso.

Con respecto a los resultados del índice de peso fresco, no se consideran para el análisis estadístico, por presentar gran variabilidad en relación a la hidratación del tejido calloso, como ya se había discutido.

Los valores obtenidos para el índice de peso fresco, se indican en la tabla XXII, de donde se observa que el balance hormonal más adecuado es de 2.5/1 para luz y de 0.1/1.5 para obscuridad.

En relación al contenido de thevetósidos en la tabla XXIII, se muestran los resultados obtenidos a las cuatro semanas, de donde se infiere que el balance hormonal 1/1 de AIA/C en mg/l, es el más adecuado, tanto para luz como para obscuridad.

En la figura No. 24, se representa gráficamente la interrelación entre el contenido de thevetósidos y el balance hormonal AIA/C, en donde también se observa la dependencia entre éstos parámetros y por lo tanto, la dificultad de poder realizar predicciones respecto.

En la tabla No. XXIV, se resumen los valores del estudio estadístico para el contenido de thevetósidos a las cuatro semanas, en donde se puede inferir que tanto la auxina como la cinetina así como la interacción entre ambas, presentan un efecto significativo al 95% de confianza, con esta información se confirma la importancia del balance hormonal en el crecimiento celular, así como en la presencia de thevetósidos como ya se había establecido en otras especies en cultivo de tejidos vegetales Gresshoff (1978), Mantell (1983).

T A B L A XXII

EFFECTO DEL BALANCE HORMONAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetioides

AIA (mg/l)

C I N E T I N A (mg/l)	AIA (mg/l)					LUZ
	0.05	0.1	0.1	1.0	2.5	
0.05	2.969	0.82	3.487	2.690		
0.25	1.25	2.516	3.165	3.933		
1.0	1.51	4.23	1.162	5.044		
1.5	2.709	3.20	1.672	5.214		

AIA (mg/l)

C I N E T I N A (mg/l)	AIA (mg/l)					OBSCURIDAD
	0.01	0.1	1.0	2.5		
0.05	1.037	0.750	5.309	1.486		
0.25	3.250	4.415	3.113	3.603		
1.0	1.501	4.810	2.112	2.687		
2.5	1,576	5.80	1.278	1,728		

Condiciones: incubados a 28°C ± 1°C en luz-obscuridad a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: Índice de peso fresco

(promedio de tres frascos por tratamiento)

T A B L A XXIII

EFFECTO DEL BALANCE HORMONAL SOBRE EL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetoides

AIA (mg/l)

C I N E T I N A	(mg/l)	AIA (mg/l)				
		0.01	0.1	1.0	2.5	
	0.05	0.113	0.201	0.246	0.342	LUZ
	0.25	0.217	0.236	0.381	0.149	
	1.0	0.152	0.473	0.691	0.393	
	1.5	0.183	0.247	0.506	0.652	

AIA (mg/l)

C I N E T I N A	(mg/l)	AIA (mg/l)				
		0.01	0.1	1.0	2.5	
	0.05	0.092	0.163	0.272	0.201	OBSCURIDAD
	0.25	0.197	0.275	0.414	0.106	
	1.0	0.134	0.590	0.719	0.283	
	1.5	0.227	0.182	0.568	0.434	

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obscuridad.
a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: %contenido de Thevetosidos/gr. de
tejido calloso seco.
(promedio de tres frascos por tratamiento).

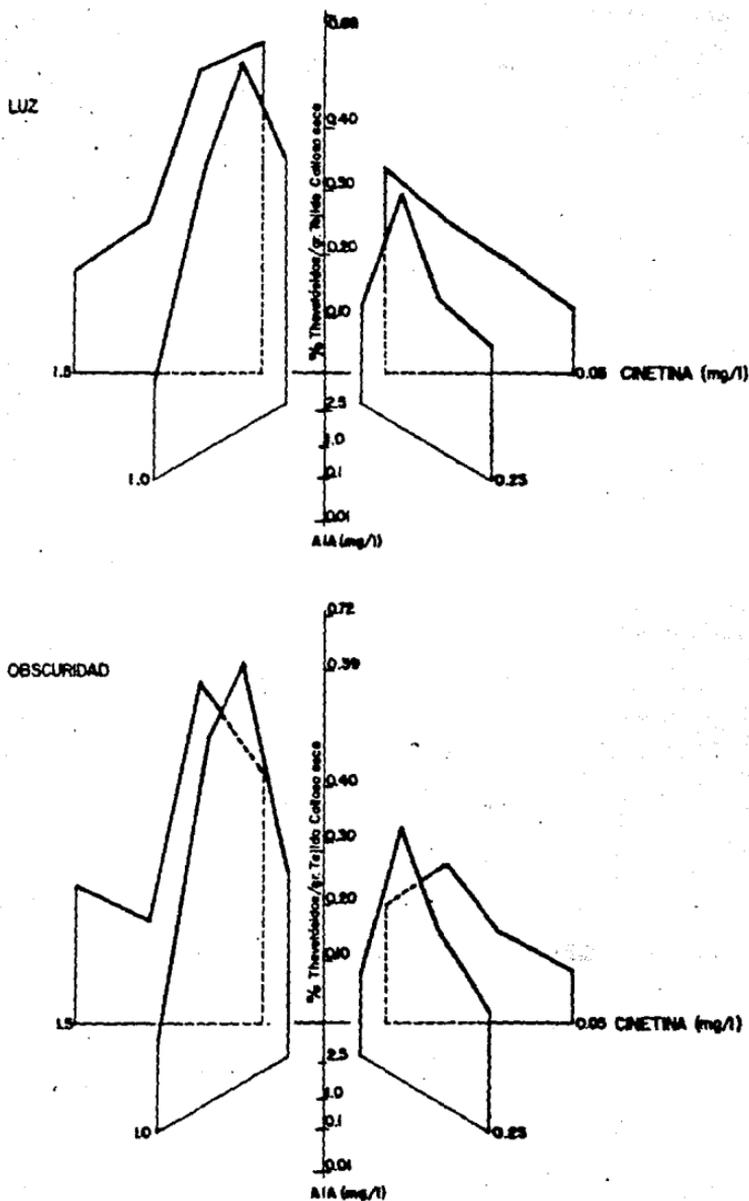


Fig. 24 INTERRELACION DEL BALANCE HORMONAL AIA/CINETINA
RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS

T A B L A XXIV

ANALISIS DE VARIANZA DEL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALOSO DE
Thevetia thevetioides RESPECTO AL BALANCE HORMONAL AIA/CINETINA

Fuente de Variación	g.l.	M.C.		F.C.		F _{0.95}
		Luz	obscuridad	Luz	obscuridad	
Auxina (AIA)	3	79003.5	67984	2.98	11.0	2.92
Cinetina (C)	3	72670.4	107901.1	2.74	17.46	2.92
Interacciones						
Auxina-Cinetina	9	85907.92	23319	3.23	3.77	2.21
Error	32	26522.7	6179.8			

g.l. = grados de libertad

M.C. = cuadrados medios

Fc = F calculada

F_{0.95} = F teórica al 95% de confianza

Fc > F_{0.95} hay efecto significativo

Variable de respuesta: % de contenido de thevetósidos

Con el objeto de evaluar si el factor luz-obscuridad, tiene efecto sobre el crecimiento y la presencia de thevetósidos, se realizó un análisis de varianza de dos factores manteniendo constante el tiempo de toma de muestra a las cuatro semanas, en la tabla XXV, se presentan estos resultados de donde se infiere que el factor luz-obscuridad, no tiene efecto significativo al 95% de confianza, respecto a las variables de respuesta del peso seco y contenido de thevetósidos, a diferencia del balance hormonal AIA/C que sí lo presenta.

T A B L A XXV

ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE Thevetósidos de TEJIDO CALLOSO DE Thevetia thevetioides RESPECTO AL EFECTO DE LUE-OBS.

FUENTE DE VARIACION	g.l.	M.C.		F.C..		F _{0.95}
		P.S.	%The	P.S.	%The	
Luz-obscuridad	1	1497	11990	3.42	2.64	4.17
Tratamientos AIA/Cinetina	15	10962	175640	25.01	38.69	2.01
Interacción						
Luz-Obs-AIA/C	15	924,6	9870.4	2.11	2,17	2.01
Error	32	438,4	4539.5			

g.l.= grados de libertad M.C.=cuadrados medios Fc=F calculada

$F_{0,95} = F_{teórica}$ $F_c > F_{0,95}$ hay efecto significativo

Variables de respuesta: P.S. = peso seco %the =% de contenido de thevetósidos.

7.9 Efecto de la auxina 2,4 D y AIA/cinetina, respecto a la inducción de tejido caloso

En este estudio se plantea evaluar el efecto que tiene el tipo de auxina en relación a la velocidad de crecimiento y al contenido de thevetósidos, se utilizó una matriz experimental de 4 x 3 con las auxinas AIA y 2,4 D/cinetina, manteniendo el tiempo constante a las cuatro semanas y en fotocondiciones de fotoperíodo (16 hr luz/8 hr obscuridad), las concentraciones de auxinas utilizadas, no son las mismas en algunos tratamientos, debido a que su potencia es diferente.

En la tabla XXVI, se muestran los valores para el crecimiento en peso seco, de donde se observa que el balance hormonal más adecuado para la auxina 2,4 D/cinetina es de 2/0.5, a diferencia del AIA/cinetina en donde el balance hormonal más adecuado fué el de 2.5/0.5.

Comparando los valores obtenidos para las dos auxinas se puede decir que la auxina AIA promueve una velocidad de crecimiento mayor. Otro aspecto importante de considerar es que la auxina AIA, promueve la formación de un tejido caloso más suave y esponjoso a diferencia del aspecto de los callos con 2,4 D que son más duros, estas observaciones son cualitativas. Los callos, se someten a una prueba de disgregación celular en la cual después de 10 minutos se disgregan totalmente.

Los tejidos provenientes de AIA/C, se disgregan más rápido, que los de 2,4 D/C, este aspecto es importante de considerar en el caso que se piense realizar cultivos en suspensión.

En la figura No. 25, se presenta gráficamente la interrelación que existe entre el balance hormonal y el peso seco, comparado el efecto de cada una de las auxinas ensayadas, de donde se puede concluir que efectivamente hay una diferencia en relación al crecimiento.

T A B L A XXXVI

EFFECTO DE LAS AUXINAS 2,4,D y AIA/Cinetina RESPECTO AL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetioides

2,4 D (mg/l)

C I N E T I N A		0.5	1.0	1.5	2.0
	0.25	2.72	3.14	2.53	3.41
	0.5	8.46	7.89	9.24	11.82
	1.0	3.96	5.24	6.83	6.13
	(mg/l)				

AIA (mg/l)

C I N E T I N A		1.0	1.5	2.5	3.5
	0.25	7.32	6.83	2.70	7.43
	0.5	8.17	9.12	19.71	12.01
	1.0	4.68	8.92	10.71	13.40
	(mg/l)				

Condiciones: incubados a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en fotoperíodo (16hr.luz/
8 hr.obs). a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: Peso seco (gr./frasco) $\times 10^{-2}$

(promedio de tres frascos por tratamiento)

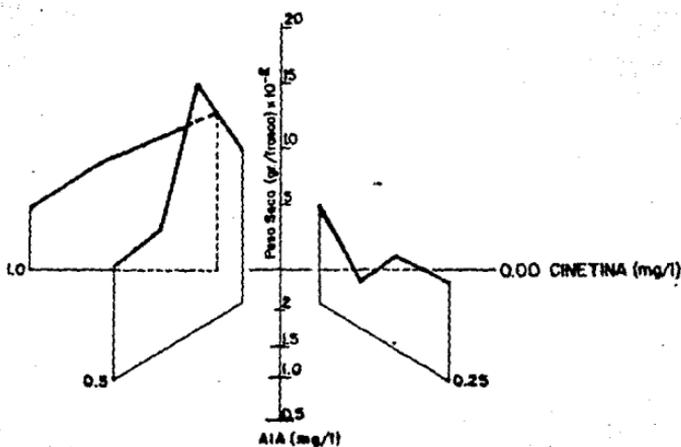
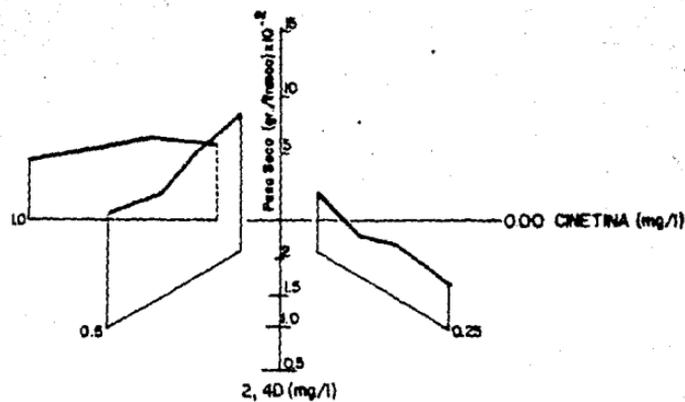


Fig. 25 CURVAS COMPARATIVAS DE LA INTERRELACION DE LAS AUXINAS AIA Y 2,4D/CINETINA RESPECTO AL PESO SECO EN FOTOPERIODO (16hrs. luz/8hrs. oscuridad).

En relación al contenido de thevetósidos, en la tabla XXVII, se indican los valores encontrados, de donde se puede inferir que el mejor balance hormonal para el 2,4,D/Cinetina es el de 2/1, a diferencia del AIA/cinetina que es de 1.5/1. Comparando de nuevo sus valores, se observa que se obtiene mayor contenido de thevetósidos para la auxina AIA/cinetina.

Lo cual confirma lo ya publicado, respecto a la importancia de la auxina AIA, en relación a la producción de Metabolitos secundarios Grasshoff (1979) y Mantell (1983).

En la figura No. 26, se muestra la interrelación del balance hormonal con el contenido de thevetósidos, comparado el efecto de cada una de las auxinas ensayadas, se observa que también tiene influencia el tipo de auxina sobre la presencia de Thevetósidos.

Con estos resultados, se puede decir que para estas condiciones ensayadas, la auxina que resulta ser más adecuada, tanto para el crecimiento, como para el contenido de thevetósidos es el AIA.

También se realizó un análisis de varianza de dos factores, para evaluar el efecto de las dos auxinas. En la tabla XXVIII se presentan los resultados de donde se infiere que si hay efecto significativo por el tipo de auxina al 95% de confianza, así como también para la interacción tipo de auxina-balance hormonal.

En este estudio estadístico, sólo se utilizan los tratamientos en donde las auxinas presentan los mismos balances hormonales, por lo que la matriz experimental se reduce a una de 2 x 3.

T A B L A XXVII

EFFECTO DE LAS AUXINAS 2,4,D y AIA/Cinetina RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetioides

2,4,D (mg/l)

C I N E T I N A		0.5	1.0	1.5	2
	0.25	0.235	0.197	0.228	0.452
	0.5	0.182	0.408	0.341	0.383
	1.0	0.226	0.241	0.162	0.456

(mg/l)

AIA (mg/l)

C I N E T I N A		1.0	1.5	2.5	3.5
	0.25	0.354	0.226	0.467	0.328
	0.5	0.266	0.376	0.138	0.289
	1.0	0.313	0.734	0.367	0.187

(mg/l)

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en fotoperíodo
(16 hr. luz 18 hr. obs).

Variable de respuesta: % de contenido de thevetósidos/gr de tejido calloso seco. (promedio de tres frascos por tratamiento).

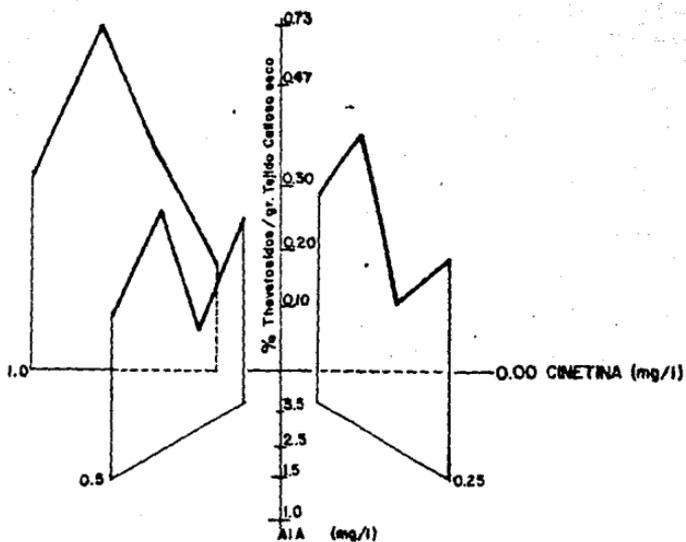
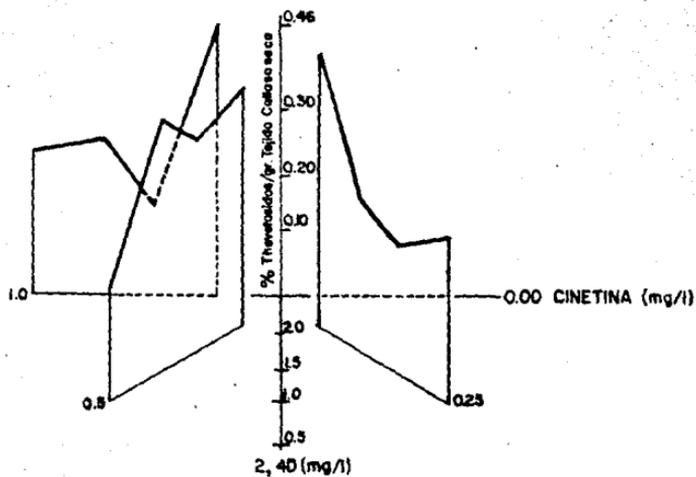


Fig. 26 CURVAS COMPARATIVAS DE LA INTERRELACION DE LAS AUXINAS AIA Y 2,4D/CINETINA. RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN FOTOPERIODO (16hrs. luz/8hrs. obscuridad).

T A B L A XXVIII

ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALLOSO DE Thevetia thevetioides RESPECTO AL EFECTO COMPARATIVO DE LAS -- AUXINAS 2,4D, yAIA/CINETINA.

FUENTE DE VARIACION	g.l.	M.C.		F.C.		F _{0.95}
		the	P.S.	the	P.S.	
2,4D yAIA	1	25217.4	1142	11.74	18.6	9.55
Tratamientos Auxina/citocinina	5	92854	745	43.24	12.13	4.49
Interacción 2,4D y AIA tratamientos A/C	5	23261	284.8	10.83	4.64	4.49
Error	24	2147	61.4			

g.l. = grados de libertad

M.C. = cuadrados medios

Fc = F calculada

F_{0.95} = F teórica al 95% de confianza.

Fc > F_{0.95} hay efecto significativo

Variables de respuesta; P.S. = peso seco

the = thevetósidos,

7.10 Efecto de las fotocondiciones en relación al crecimiento y contenido de Thevetósidos en la inducción de tejido -- calloso de Thevetia thevetioides a las cuatro semanas

Para este estudio se trabaja con una matriz experimental de 3 x 2 de AIA/Cinetina en (mg/l), en donde se pretende evaluar el efecto de la luz-obscuridad-fotoperíodo (16 hr luz/8 hr -- obs), a las cuatro semanas.

Para el crecimiento se evalúa el peso seco como variable de respuesta, los resultados se muestran en la tabla XXIX, de donde se observa que las condiciones más adecuadas del balance hormonal son 2.5/0.5 de AIA/Cinetina para el fotoperíodo y de 2.5/1 de AIA/Cinetina para luz y obscuridad.

En relación del contenido de thevetósidos en la tabla XXX, se presentan los resultados de donde se observa que el mejor balance hormonal es de 1.5/1 de AIA/Cinetina para el fotoperíodo y de 1/1 de AIA/Cinetina para luz y obscuridad.

Con los resultados obtenidos se concluye que los requerimientos hormonales son diferentes para promover el crecimiento, que los requeridos para la presencia de thevetósidos. También se puede decir que las condiciones de fotoperíodo, promueven un comportamiento diferente al que se logra con la luz y obscuridad.

Para evaluar el efecto significativo de las fotocondiciones, se realiza un análisis de varianza de dos factores, cuyos resultados se indican en la tabla XXXI, donde observamos que el factor luz-obscuridad-fotoperíodo no tiene efecto significativo para el crecimiento, mientras que para el contenido de thevetósidos sí lo tiene.

El efecto por balance hormonal AIA/Cinetina, así como la interacción fotocondiciones- balance hormonal, sí presentan efecto significativo al 95% de confianza.

T A B L A XXIX

EFFECTO DE LA LUZ-OSCURIDAD-FOTOPERIODO PARA EL AIA/Cinetina RESPECTO AL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALLOSO DE COTILEDONES DE Thevetia thevetioides

AIA (mg/l)

C
I
N
E
T
I
N
A
(mg/l)

	1.0	1.5	2.5
0.5	5.73	8.43	7.42
1.0	9.16	14.16	24.59

LUZ

AIA (mg/l)

C
I
N
E
T
I
N
A
(mg/l)

	1.0	1.5	2.5
0.5	11.26	7.14	6.43
1.0	8.45	13.06	29.15

OSCURIDAD

AIA (mg/l)

C
I
N
E
T
I
N
A
(mg/l)

	1.0	1.5	2.5
0.5	8.17	9.12	19.71
1.0	4.68	8.92	10.71

FOTOPERIODO
(16hr.luz/
8hr.obs)

Condiciones: incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz-obs-fotoperiodo a las cuatro semanas.

Variable de: respuesta peso seco (gr./frasco) $\times 10^{-2}$ (promedio de tres frascos por tratamiento).

T A B L A XXX

EFFECTO DE LA LUZ-OSCURIDAD-FOTOPERIODO PARA EL AIA/CINETINA, RESPECTO AL CONTENIDO DE THEVETOSIDOS DE TEJIDO CALLOSO DE CO TILEDONES DE Thevetia thevetioides.

		AIA (mg/l)			
		1.0	1.5	2.5	
C I N E T I N A (mg/l)	0.5	0.314	0.410	0.298	LUZ
	1.0	0.69	0.593	0.37	

		AIA (mg/l)			
		1.0	1.5	2.5	
C I N E T I N A (mg/l)	0.5	0.271	0.346	0.316	OSCURIDAD
	1.0	0.71	0.614	0.291	

		AIA (mg/l)			
		1.0	1.5	2.5	
C I N E T I N A (mg/l)	0.5	0.266	0.377	0.138	FOTOPERIODO (16 hr, luz/ 8hr,obs)
	1.0	0.313	0.734	0.367	

Condiciones: incubados a 28°C + 1°C en luz-obscuridad, fotoperiodo a las cuatro semanas.

Variable de respuesta: % de contenido de thevetósidos / gr. de tejido calloso seco (promedio de tres frascos por tratamiento)

T A B L A XXXI

ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE THEVETOSIDOS EN TEJIDO CALOSO DE Thevetia thevetioides RESPECTO AL EFECTO DE LUZ - OSCURIDAD - FOTOPERIODO.

FUENTE DE VARIACION	g.l.	M.C.		F.C.		F _{0.95}
		P.S.	% the	P.S.	% the	
luz-Obs-Fotoperfodo	2	1569.7	1671.9	2.67	14.87	3.23
Tratamientos AIA/C	5	14044	1272.2	23.9	11.32	2.45
Interacción						
luz-Obs-Fotoperfodo	10	5269.4	1906.1	8.97	16.9	2.08
Error		587.5	112.4			

g.l. = grados de libertad

M.C. = cuadrados medios

F_c = F calculada

F_{0.95} = F teórica al 95% de confianza

F_c > F_{0.95} hay efecto significativo

Variables de respuesta:

P.S. = peso seco

% the = % de thevetósidos

8. CONCLUSIONES

En la tabla XXXII, se resume las condiciones más adecuadas para la inducción de tejido calloso de Thevetia thevetioides, a partir de cotiledones y embriones.

- Todos los experimentos se llevaron a cabo con una fuente vegetal seleccionada y clasificada botánicamente para evitar variaciones en los resultados.
- Se determinó que el explante más adecuado para la inducción de tejido calloso, era a partir de cortes cilíndricos de cotiledón, en donde se logra obtener un 100% de respuesta a la inducción de tejido calloso, en todos los balances hormonales ensayados.
- En relación a los embriones se encontró que no se logra obtener un 100% de inducción de tejido calloso en todos los balances hormonales ensayados, es por ello que suponemos -- que sea necesario realizar un tratamiento previo con el fin de aumentar la respuesta del explante.
- En relación a la capacidad de diferenciación de los explantes, se encontró que el embrión es el que posee mayor capacidad.
- En base a los resultados anteriores se considera que los -- cortes cilíndricos de cotiledón son los más adecuados para evaluar la cinética de crecimiento y presencia de thevetósidos.
- Con respecto a la velocidad de crecimiento, se encontró que el máximo desarrollo celular, se logra a las cuatro semanas. En relación al contenido de thevetósidos, se encontró que -- después de cuatro semanas, el contenido disminuye, es por ello que se recomienda que cada cuatro semanas se subcultive.

T A B L A XXXII

CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION DE TEJIDO CALOSO DE Thevetia thevetioides

VARIABLE DE RESPUESTA	EXPLANTE	BALANCE	HORMONAL	FOTOCONDICIONES	TIEMPO SEMANAS
I.P.F.	cotiledón	2.5/1.5	AIA/C	Luz	4
	cotiledón	0.1/1.5	AIA/C	Oscuridad	4
F.S.	cotiledón	2.5/0.5	AIA/C	Luz y oscuridad	4
	cotiledón	2.5/0.5	AIA/C	Fotoperíodo (16hr luz/ 8 hr obs.)	4
	cotiledón	2/0.5	2,4 D/C	Fotoperíodo (16 hr luz/ 8 hr obs.)	4
% contenido de thevetósidos	cotiledón	1/1	AIA/C	Luz y oscuridad	4
	cotiledón	1.5/1	AIA/C	Fotoperíodo (16 hr luz/ 8 hr obs.)	4
	cotiledón	2/1	2,4 D/C	Fotoperíodo (16 hr luz/ 8 hr obs)	4
% Contenido de thevetósidos	embrión	1/1.5	AIA/C	Luz y Oscuridad	8

- En relación al balance hormonal AIA/C, se encontró que presenta un efecto significativo respecto a la velocidad de -- crecimiento, encontrándose que a una concentración de 2.5 mg/l de AIA y 1.0 mg/l de cinetina, se logra las mejores -- condiciones, tanto para luz como para oscuridad.
- Con respecto al contenido de thevetósidos, se encontró que a un balance hormonal de 1 mg/l de AIA y 1.0 mg/l de cinetina, se obtiene el mayor contenido, tanto para luz como para oscuridad, siendo el balance hormonal también significativo para la presencia de metabolitos secundarios en el cultivo vegetal.
- Se encontró que los factores luz-oscuridad, no presentan un efecto significativo para el peso seco, ni para el contenido de thevetósidos.
- En el estudio comparativo de auxinas 2,4 D y AIA/cinetina, se encontró que la más adecuada era el AIA, debido a que -- favorece una mayor velocidad en el crecimiento, así como -- también el de lograr una mayor presencia en el contenido de thevetósidos.
- Se encontró que en condiciones de fotoperíodo-Luz-Oscuridad, no se presenta un efecto significativo en relación a -- la velocidad de crecimiento. A diferencia del contenido de thevetósidos en donde sí presenta un efecto significativo -- en las condiciones de luz-oscuridad-fotoperíodo en cultivos con balance hormonal AIA/cinetina.

El modelo experimental planteado respecto a la inducción de -- tejido calloso de Thevetia cumplió su objetivo respecto al conocimiento y adaptación de esta nueva Biotecnología Vegetal -- de gran importancia para la Industria Farmacéutica, además, -- de que permitió conocer los parámetros que están involucrados en el desarrollo de esta Tecnología.

Con los resultados encontrados, se considera factible, el continuar con estudios de cultivo en suspensión, con el objeto de evaluar la capacidad que posee las células vegetales de Thevetia, para realizar biotransformaciones específicas de glucósidos cardíacos que aumenten su actividad, así como también el lograr obtener estructuras de las que no existen en la naturaleza y evaluar su actividad farmacológica.

9. PROUUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

- Realizar estudios en donde se utilice ácido giberélico, como tratamiento previo en las semillas de Thevetia para facilitar el rompimiento de la dormancia y evaluar si este efecto presenta efectos positivos respecto a la inducción de tejido calloso a partir de embriones.
- Realizar estudios de germinación de semillas de Thevetia, para obtener explantes de hipocotilo y raíz y evaluar el efecto que tiene sobre la inducción de tejido calloso y el contenido de thevetósidos.
- Realizar experimentos, en donde se promueva la diferenciación del tejido a partir de cultivos de tejido calloso, con el fin de evaluar si el contenido de thevetósidos es diferente al que se encuentra presente en los cultivos no diferenciados (callos), y determinar la importancia que tiene la diferenciación sobre la producción de metabolitos secundarios.
- Evaluar la dependencia que existe del órgano diferenciado - por ejemplo, hoja, raíz o tallo, en relación al contenido de thevetósidos.
- Efectuar estudios de cultivo en suspensión, utilizando el tejido calloso proveniente de las mejores condiciones encontradas para su inducción, con el objeto de evaluar su capacidad de acumulación de thevetósidos.
- Realizar un estudio comparativo de cultivo en suspensión -- provenientes de cultivos de tejido calloso y de cultivos diferenciados.
- Realizar estudios de biotransformación (bioreactor vegetal) y evaluar el potencial específico de células vegetales de Thevetia, para llevar a cabo biotransformaciones específicas de cardiotónicos.

- Llevar a cabo estudios de Ingeniería Genética Vegetal, con el fin de seleccionar líneas celulares altamente productoras de metabolitos secundarios o capaces de efectuar biotransformaciones específicas.
- Implementar un método analítico por cromatografía líquida - alta presión o radio-inmunoanálisis, las cuales nos permitan lograr establecer la etapa de mayor producción del metabolito secundario específico, así como también el poder evaluar si se llevó a cabo efectivamente una biotransformación.

10. Bibliografía.

1. Aberhart, D.J., J.G.Lloyd-Jones, and E.Caspi.1973.Biosynthesis - of cardenolides in Digitalis lanata.Phytochemistry.12: 1065-1071.
2. Aguilar,A.and C. Zolla.1982.Plantas tóxicas de México. IMSS. - - México. 196-198.
3. Alcántara,P.A.1982.- Desarrollo de una técnica colorimétrica para la cuantificación de thevetósidos caediotónicos,Tesis para obtener el título de Q.F.B. ENEP.Zaragoza, UNAM. México.
4. Alferman, A.W., H.M. Boy., P.C. Döller., W.Hagedorn., M.Heins. J. Wahl., and E. Reinhard. 1977. Biotransformation cardiac glycosides by plant cell cultures. Plant Tissue Cult. Its.: Bio-Technol Appl. Proc. Int. Congr. Ist. 1976. Ed. by Barz., Wolfgang., Reinhard., Ernot., Zenk. Springer -Verlag New York.
5. Alferman,A.W., I.Shuller, and E.Reinhard. 1980. Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of Digitalis lanata. -- Planta Medica .40:218-223.
6. Anna,B.O., L.Bjork, and S.Gatenbeck. 1983. Effect of light on - - cardenolide production by Digitalis lanata tissue cultures. Phytochemistry. 22(11) : 2427-2450.
7. Atal,C.K. and B.N. Kapur. 1977. Cultivation and utilization of medicinal and aromatic plants. Council of Scientific and Industrial -- Research, JammuTawi:Regional Research Laboratory. New Delhi, India. 568-570.

8. Balandrin, M.F., J.A.Klock., E.S. Wortele., W.H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal material. Science. 228:1154-1160.
9. Bennett, R.D., H.S. Horst., and E.Heftman.. 1968. Progesterone -- metabolism in Digitalis lanata. Phytochemistry. 7:41-50'
10. Bloch, R., S. Rangaswami., and O.shindler. 1960. Diekonstitution von cerberosid (thevetin B), thevetin A and peruvosid. Hel.Chim.-Acta. 43(3):652-658.
11. Brodelius, P.1983. Catalysts for the production and transformation of natural products having their origin in higher plants, process for production of the catalysts, and use thereof. European Patent Application. No. 80850IQ5.0
12. Brodelius, P. 1983. Production of biochemicals whith immobilized plant cells: Possibilities and problems. Annals New York Academy - of Sciences. 383-393.
13. Buchner, S.A. & E.J. Staba. 1964. Preliminary examination of Digitalis tissue cultures for cardenolides, J.Pharm. Pharmacol. 16:733-735.
14. Capstack E., D.J.Baisted., W.W. Newschwander., G. Blondin., N.L. Rosin., and W.R. Nes.1962. The biosynthesis of squalene in germinating seeds of Pisum sativum.Biochemistry. 1(6):1178-1183.
15. Caspi, E., D.O.Lewis., D.M. Piatak., K.V.Thizmann, and A.Winter. - - 1966. Biosynthesis of plant sterols conversion of cholesterol to - pregnenolone in Digitalis purpurea. Experientia. 22:506-507.

16. Caspi, E. and D.O. Lewis. 1967. Progesterone: Its possible role in biosynthesis of cardenolides in Digitalis lanata. Science. 156: - 512-516.
17. Caspi, E. and G.M.Hornby. 1968. Biosynthesis of plant sterols III. Mechanism of saturation of ring B in pregnenolone during its - - conversion to digitoxigenin in Digitalis lanata. Phytochemistry.- 7:423-427.
18. Castle, M.C. 1975. Isolation and quantitation of picomole quantities of Digoxin, Digitoxin and their metabolites by high-pressure liquid chromatography. Journal of chromatography.115:437-445.
19. Cochella, T.1971. Determinación cualitativa de los A.A. contenidos en semillas de Thevetia peruviana. Raymondiana. 4:73.77. Lima.
20. Cosme, L. I., J.Murañon., and V.P. Arida. 1958. Distribution of -- glycosides in Thevetia peruviana (pers) Merr. and Nerium Indicum - mill. The Philippine Journal of Science. 87(1):1-6.
21. Cruz, A., I.García., J.Iriarte., J.M.Muchowski, and I.Regla.1977. Seeds of Thevetia Species as an Alternative Source of digitoxigenin J.Org.Chem.42(22):3580-3584.
22. Cruz, A.A.Guzmán, J.Iriarte, R.Medina., and J.M. Muchowski. 1979.- 18-20-oxido-20,22-dihidroneriifolin, and unusual oxygenated cardenolide. J.Org. Chem. 44:(20),3511-3515.
23. Del Amo,S.1979.Plantas medicinales del Estado de Veracruz, Inireb. México. 217-218.

24. Diettrich, B., D. Neumann, and M. Luckner. 1980. Protoplast derived clones from cell cultures of Digitalis purpurea. Planta Medica -- .38:375-382.
25. Diettrich, B., A.S. Popov., B. Pfeiffer., D. Neumann., R. Butenkoand, and M. Luckner. 1982. Cryopreservation of Digitalis lanata cell -- cultures. Planta Medica .46:82-87.
26. Doller, Von. P.C., A.W. Alfermann, and E. Reinhard. 1977. Biotransformation von cardenoliden durch zellsuspensions kulturen von -- Digitalis lanata und Thevetia neriiifolia. Planta Medica. 31:3-6.
27. Doller, P.C. and E. Reinhard. 1979. Biotransformation of cardenolides comparative studies with cell cultures of Thevetia neriiifolia and Digitalis lanata. Planta Medica. 37:277-288.
28. Donald, J., D.J. Aberhart., J.G. Lloyd-Jones, and E. Caspi. 1973. - Biosynthesis of cardenolides in Digitalis lanata. Phytochemistry. 12:1065-1071.
29. Engel, Ch.R. and G. Bach. 1964. Steroids and related products. - -- XXIII: Cardiotonic steroids. The synthesis of 14 β -hydroxy cardenolides part 1². Steroids. 3(6):593-629.
30. Estadísticas del Instituto Mexicano de Comercio Exterior 1974-1983.
31. Estadísticas del Instituto Nacional de Cardiología. 49:1-2, México 1974.

32. Fernández, L. 1979. Metabolismo Nitrogenado de Cultivo de Tejidos de Bouvardia ternifolia. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímica) Fac. de Química. División de Estudios de Posgrado. UNAM. México.
33. Garve, R., M. Luckner., E. Vogel., A. Tewes, and L. Nover. 1980. - - Growth, Morphogenesis and cardenolide formation in long-term - - cultures of Digitalis lanata. Planta Medica. 49:92-103.
34. Giral, F. 1979. Episodios ejemplares en la historia de la Farmacia XI. Un farmacéutico parisino, hijo de una Yerbera: Nativille y la digital Rev. Méx. Ciencias Farm. 5:40-43.
35. Goodman, L.S., A. Gilman. 1978. Bases Farmacológicas de la terapéutica. Ed. Interamericana.
36. Graves, J.M.H., W.K. Smith. 1967. Transformation of pregnelone -- and progesterone by cultured plant cells. Nature (Lond.) 214:1248-1249.
37. Gresshoff, P.M. 1978. Phytohormones and Growth and Differentiation of Cells and Tissues Cultured in vitro. In. Phytohormones and Related Compounds- a Comprehensive Treatise. Vol II. (Lethann, D.S., P.B. Goodwin and T.J.V. Higgins. eds.) Elsevier/North-holland Biomedical Press. New York. 1-29.
- Grunwald, C. 1980. Steroids. In: Encyclopedia of Plant Physiology, - New Series, Vol 8, Seccion Plant Products (Bell, E.A., and B.V. Charl wool, eds), Springer Verlag, Berlin-New York.
38. Guntertand Linde, H.H.A. 1977. Generalia cardiac glycosides: Prerequisites for the development of new cardiotonic comp. Experientia. 33(6):697-703.

39. Gupta, O.P. K.C. Misra, and R.B. Arora. 1974. Cardiotoxic and -antiveratrinic action of Thevetia nerifolia juss glycosides -- compared with Ouabain and their structure activity relationship. Indian Journal of Experimental Biology. 12:399-401.
40. Hagimori, M., T.Matsumoto, and T.Kisaki. 1980. Studies the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture I. -- Determination of digitoxin and digoxin contents in first and -- second passage calli and organ redifferentiating calli of several Digitalis species by radioimmunoassay. Plant and Cell - - Physiol. 21(8):1391-1404.
41. Hagimori, N., T.Matsumoto, and Y.Obi. 1982. Studies on the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture II. - Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of -- Digitalis purpurea L. grown in liquid media. Plant Physiol.69: 653-656.
42. Hagimori., M., T.Matsumoto, and Y. Obi 1982a.Studies on the pro duction of Digitalis cardenolides by plant tissue culture III. Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming -- cultures of Digitalis purpurea L. grown in liquid media. Plant and Cell Physiol. 23(7):1205-1211.
43. Hagimori, M., T.Matsumoto, and Y.Obi. 1982b. Effects of cultural conditions on digitoxin formation by shoot-forming cultures of Digitalis purpurea grown in liquid media. Proc.5th. Intl. Cong. Plant. Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture.349-350.

44. Hartwell, J.L. 1967. Plants used against cancer a survey. Lloydia. 30:379-436.
45. Heins, M., J.Wahl., H.Lerch., F.Kaiser, and E.Reinhard. 1978.- Preparation of β -methyldigoxin by hydroxylation of β -methyldigoxin in fermenter cultures of Digitalis lanata. Planta Medica. 33:57-62.
46. Helfenberger, H., and T.Reichstein. 1948. Thevetin I. Helvetica Chimica Acta. 31(6): 1470-1482.
47. Helfenberger, H., and T. Reichstein. 1948. Thevetin II. Helvetica Chimica Acta. 31(7) :2097-2104.
48. Helmhold, H., W.Urelter, and E.Reinhard. 1978. Sterols in cell cultures of Digitalis lanata. Planta Medica. 33:185-187.
49. Hicks, Ch. R. 1973. Fundamental Concepts in The Design of Experiments. Holt, Rinehart and Winston. New York.
50. Hirotsani, M., and T. Furuya. 1977. Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of - Digitalis purpurea. Phytochemistry. 16:610-611
51. Hirotsani, M., and T. Furuya. 1980. Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of Digitalis purpurea. - - - Phytochemistry. 19:531-534.
52. Huang, L., and T. Murashige. 1976. Plant Tissue Culture Media:- Major constituents, their preparation and some applications. -- TCA Manual. 3:(I) 539-548.

53. Jacobsohn, G.M., and M.J. Frey. 1967. Biosynthesis of cholesterol by seedling of Digitalis purpurea. J.Amer. Che. Soc. -- 89:3338-3340.
54. Jacobsohn, G.H., and M.J.Freg. 1968. Sterol cont and metabolism during early growth of Digitalis purpurea. Arch. Biochem. 127:655-659.
55. Jacobsohn, G.H. 1970. Sterol formation and transformation in Digitalis. Recent Advances in Phytochemistry. Appleton-Century-Crofts. 3:229-247.
56. Jones, A., I.A. Velily, and R.S.Ozubko. 1978. Biotransformation of cardenolides by plant cell suspension cultures. I. -- Isolation and identification of periplogenin from cultures of Daucus carota CA₆₈ incubated with digitoxigenin. Lloydia. 41 (5):476-487.
57. Kartning, T., V.R. Bheim., G.Trousil, and B.Maunz. 1979. Cardenolides in callus cultures of Digitalis purpurea and Digitalis lanata III. Callus cultures derived from roots. Planta Medica. 35:275-278.
58. Kartning, T., G.Jummer-Fustinioni, and B.Heydel 1983. The effect of aging on the formation of secondary products by tissue cultures of Digitalis purpurea. Planta Medica. 47:247-248.
59. Kaul, B., P. Wells, and E.J. Staba. 1967. Production of cardioactive substances by plant tissue cultures and their screening for cardio-vascular activity. J.Pharm. Pharmc. 19:760-766.

60. Kurz, N.G.W., and F.Constabel. 1979. Plant cell cultures a - potential source of pharmaceutical. *Advances in Applied Microbiology* 25:209-240.
61. Luckner, M., L.Nover, and H. Bohm. 1977. Secondary metabolism and cell differentiation Springer-Verlag. Berlin -New York.
62. Luckner, M. 1980. Expression and control of secondary metabolism. *Encyclopedia of Plant Physiology New Series* vol. 8. - Secondary Plant Products. Ed. by E.A.Bell, and B.V. Charlwood Springer-Verlag. New York. 23-63.
63. Luckner, M. 1984, Secondary Metabolism in Microorganisms, Plant and Animals. 2o. Ed. Springer-Verlag. New York. I-65.
64. Lui. J.H.C., and E.J. Staba. 1979. Effect of precursors on serially propagated Digitalis lanta leaf and root cultures. *Phytochemistry*. 18: 1913-1916.
65. Mantell, S.H., and H. Smith. 1983. Plant Biotechnology. Ed. - Cambridge University Press. New York.
 . Kreig, M.B.1964. *Medicina Verde*. Ed. Continental, S.A. México España Argentina. 201-215.
66. Martínez, M. 1969. Las plantas medicinales de México. Imprenta Aztecas. México, D.F.
67. Martínez, M. and E. Matuda. 1979. Flora del Estado de México. Edición facsimilar de los fascículos publicados en los años -- 1953 a 1972. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. - México. Tomo I y III.

68. Wechler, E. 1982. Quantitative determination of -methylidigoxin by HPLC in fermenter broth. *Planta Medica*. 45:164-166.
69. McLaughlin, J.L., B.Freedman., R.G. Powell, and C.R. Smith Jr. 1980. Nerifolin and 2'-acetylnerifolin: Insecticidal and cytotoxic agents of Thvetia thevetioides seeds. *J. Econ. Entomol.* 73:396-402.
70. Miller, C.O., F.Skoog., F.S. Okumura., M.H. Von Saltza, and F.M. Strong. 1955. Structure and synthesis of Kinetin. *J.A.M.-Chem. Soc.* 77:2662-2665.
71. Moore, T.C. 1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag. New York.
72. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol - Plant.* 15:473-497.
73. Murashige, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to agriculture. In Maramorosch, K., & H. Hirumi, eds. *Practical - Culture Applications*. Academic press. New York.
74. Murashige, T. 1980. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In Skoog, F., ed., *Plant Growth Substances* 1979. Springer-Verlag. New York. 426-434.
75. Nánási, P, and B.Lenkey. 1975. Cardenolide glycoside production in Digitalis lanata. *Phytochemistry*. 14:1755-1757.

76. Marayanaswamy, M. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant cell, tissue, and organ culture. (Reinert, and Bajaj, eds.) Springer-Verlag, New York 176-248.
77. Mickel, S. and E.J. Staba. 1977. Riaztes of Digitalis plants -- and tissue cultures. Plant Tissue Cult Its Bio-Tecnol Appl. - Proc. Int. Cong. Ist. 1976. Ed. by Barz, Wolfgang, Reinhard. -- Zentk. Springer-Verlag. New York. 275-284.
78. Okada, M, and Y. Saito. 1965. Studies Synthesis of epoxides of anhydro cardenolides and on their cleavage III¹. Synthesis of Uzariogenin acetate and 17 β -uzariogenin acetate. Steroids. 6(5): 645-649.
79. Pandey, M.D., S.R. Singh, and G.C. Sewart. 1977. use of some -- plant powders, oils, and extracts as protectans against pulse beetle, Callosobruchus chinensis Linn. Indian J. Entomol. 38: 110-113.
80. Paredes, L.D. 1986. La biotecnología de plantas: Una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México. Ciencia y Desarrollo. No.68. 27-43.
81. Pérez-Bermúdez, P., M.J. Comejo, and J. Segura. 1983. In vitro - propagation of Digitalis obscura L. Plant Science Letters. 30: 77-82.

82. Pérez, M.A. 1982. Síntesis de cardiotónicos modificados. Tesis para obtener el título de Q.F.B. ENEP-Zaragoza, UNAM. México, D.F.
83. Petiard, V. 1979. Production de métabolites par les cellules végétales cultivées "in vitro": Exemple de filière méthodologique. In. D.G.R.S.T. Production de substances naturelles par culture. In vitro de tissus et de cellules de végétaux. APRIA. Paris. 5-44.
84. Pilgrim, H. 1977. Sapogeninbildung in suspension by Digitalis purpurea. Phytochemistry. 16:1311-1312
85. Ramstad, E. and J.L. Beal. 1960. Mevalonic acid as a precursor in the biogenesis of digitoxigenin. Chem. Industr. (London). 79:177-180.
86. Reinert, J. and I.P.S. Bajaj. 1977. Applied and Fundamental - Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Springer-Verlag. New York. 668-716.
87. Reinhard, E., A.W. Alferman. 1980. Biotransformation by plant cell cultures. Advances in Biochemical Engineering. 16:49-84. Ed. Flechter. Springer-verlag. New York
88. Remington, R.D., and M.A. Schork. 1977. Estadística Biométrica y Sanitaria. Ed. Prentice Hall Internacional. Madrid-México.
89. Robert, M. 1981. La modificación genética de las células vegetales en cultivo. Transplante y Movilización de Genes, 2a. Ed. - CONACYT. México, D.F.

90. Robert, M.L. y V.M. Loyola. 1985. El cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY y CONACYT. 1o. Ed. México, D.F.
91. Rodríguez, H.R. 1982. Obtención de digitoxigenina a partir de semilla de Thevetia: Tesis para obtener el título de Q.F.B. -- ENEP-Zaragoza, UNAM. México, D.F.
92. Rucker, W., K.Jentzsch, and M. Wichtl. 1976. Root differentiation and glycoside formation in tissues of Digitalis purpurea L. cultured in vitro. Z. Pflanzenphysiol. Ba. 80:323-335.
93. Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. 76: 151-158,214
94. Sen Gopa, and P.C. Datta. 1981. Dedifferentiation and loss of thevetin in Thevetia peruviana callus. Planta Médica. 41(4): - 415-417
95. Skoog, F. and S.O.Miller 1957. Chemical regulation of growth - and organo formation in plant tissues cultured in vitro Symp.- Soc. Exp. Biol. 11:118-131.
96. Sondheimer, F., N.Danieli., Y.Mazur. 1962. The synthesis of digitoxigenin. J. Am. Chem. Soc. 84:875-876.
97. Staba, E.J. 1962. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures I. Journal Pharmaceutical Science. 53(3):249-254.
98. Staba, E.J. and S.S. Lamba. 1963. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures II. Growth of Digitalis lanata and Digitalis purpurea in suspension culture. Lloydia. 26:29-35.

99. Staba, E.J. 1980. Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals. C.R.C. Press, Inc. Boca Raton, Florida.
100. Stanley, P. 1920-1926. The trees and shrubs of México. Contr. U.S. National Herbarium 23, Part. 4 Reimpresión por Otto - - Koeltz, 1982. 1151-1153.
101. Stanley, P., J. Steyermark, and L. Williams. 1968-1976. Flora - of Guatemala. Fieldiana, Botany 24.
102. Stohs, S.J. and E.J. Staba. 1965. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures IV. J.Pharm. Sci. 54(1):56-58.
103. Stohs, S.J. and H. Rosenberg. 1975. Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures. *Ilydia*. 38(3):181-194.
104. Stohs, S.J. 1977. Metabolism of steroids in plant tissue cultures. Plant Tissue Cult Its Bio-Technol. Appl. Proc. Int. Congr. Ist. 1976. Ed. by Barz. Wolfgang, Reinhard, Zenk. Springer- - Verlag. New York. 142-150.
105. Stohs, S.J. 1980. Metabolism of steroids in plant tissue cultures. *Advances in Biochemical Engineering*. 16:85-133. Ed. Fiechter. Springer Verlag. New York.
106. Stumpf, P.K., and E. E. Conn. 1981. The biochemistry of plants, a comprehensive treatise. vol 7 Secondary Plant Products. Academic Press. New York.

107. Tabata, M. 1976. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. *Plant Tissue Cult. Its. Bio-Technol Appl. Proc. Int. Congr. Ist. 1976.* ed. Barz. Wolfgang,-Reinhard, Zenk. Springer-Verlag. New York. 3-17.
108. Thorpe, T.A. 1978. *Frontiers of Plant Tissue Culture. Intl. - - Assoc. Plant. Tissue Culture.* Calgary.
109. Tschesche, R., R.Hombach., H. Sholten, and M.Peter. 1970. Neue Beitrage zur biogenese der cardenolide in Digitalis lanata. *Phytochemistry.* 9:1505-1515.
110. Tschesche, R. Zur Biosynthese der cardenolid-und bufadienolidglykoside *Planta Med.* 4:34-39 (1971).
110. Vogel, E, and M. Luckner. 1981. Distribution of cardenolides in Digitalis lanata. *Planta Medica.* 41:161-165.
112. Weiler, E.W. and M.H. Zenk. 1976. Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in Digitalis lanata. *Phytochemistry* 15:1537-1545.
113. Went, F.W., and Thieman. 1937. *Phytohormones.* Macmillan Company. New York.
114. Wiermann, R. 1981. *Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation.* The Biochemistry of plants, vol 7 ed Conn E.E. Academic Press. New York. 85-116.