

29
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

INDUCCION Y MANTENIMIENTO DE
TEJIDO CALLOSO DE Digitalis lanata EHRH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARCO AURELIO CORDOBA SALGADO

Asesor: Dra. Ma. Elena Mellado Rojas





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Ejemplar de <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	2
Fig. 2. Estructura química general de los glucosidos cardiacos digitalicos (Burger, 1964)	4
Fig. 3. Diagrama de la extracción de glucosidos cardiacos en tejido calloso de <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	15
Fig. 4. Efecto de la adición de extracto de levadura en la inducción del tejido calloso de <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	21
Fig. 5. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> en medio SHAL (1/0.1 ppm 2,4-D/cinetina). Complementado con 1.5 g/l de extracto de levadura.	23
Fig. 5a. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> en medio MSCL (2 ppm 2,4-D). Complementado con 3.0 g/l de extracto de levadura.	34
Fig. 5b. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> en medio MSCL (2/2 ppm 2,4-D/cinetina). Complementado con 3.0 g/l de extracto de levadura.	35
Fig. 7a. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> NNAL (1 ppm 2,4-D) y NNBL (2 ppm 2,4-D). Complementados con 3.0 g/l de extracto de levadura.	37
Fig. 7b. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> en medio NNBL (2/2 ppm 2,4-D/cinetina). Complementado con 3.0 g/l de extracto de levadura.	38
Fig. 8. Tejido calloso de <i>D. lanata</i> Ehrh. obtenido en medios NNAL, NNBL y SHAL.	39
Fig. 9. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> en medios NNAL (1 ppm 2,4-D), NNBL (2 ppm 2,4-D) con 3 g/l de extracto de levadura y SHAL (1/0.1 ppm 2,4-D/cinetina) con 1.5 g/l de extracto de levadura. a) peso fresco; b) peso seco.	41
Fig. 10. Cinéticas de crecimiento en escala logarítmica de tejido calloso de <i>D. lanata</i> con inóculo controlado en medios NNAL, NNBL y SHAL.	47

INDICE DE TABLAS.

	página
Tabla 1. Algunos glucosidos cardiotactivos de las hojas de <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	3
Tabla 2. Tratamiento de desinfección para explantes adultos de <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	10
Tabla 3. Composición de los medios de cultivo Murashige-Skoog (MS), Schenk-Hildebrandt (SH) y Nitsch-Nitsch (NN).	11
Tabla 4. Efectos de 2,4-Diclorofenol en los medios de cultivo MS, SH y NN.	12
Tabla 5. Complementos naturales.	13
Tabla 6. Medios de cultivo complementados con 2,4-Diclorofenol que presentaron inducción de tejido calloso en <i>D. lanata</i> Ehrh.	17
Tabla 7. Balance de iones de los medios de cultivo Murashige-Skoog, Nitsch-Nitsch y Schenk-Hildebrandt.	19
Tabla 8. Respuesta de diferentes explantes de <i>D. lanata</i> a la inducción de tejido calloso.	29
Tabla 9. Medios de cultivo complementados con extracto de levadura que favorecen la inducción de tejido calloso en <i>D. lanata</i> Ehrh.	30
Tabla 10. Análisis de variancia de cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> Ehrh. por resiembras, cultivado en los medios NNAL, NNBL y SHAL.	40
Tabla 11. Análisis de variancia de cinéticas de crecimiento de tejido calloso de <i>D. lanata</i> Ehrh. por semana, cultivado en medios de NNAL, NNBL y SHAL.	42
Tabla 12. Glucosidos cardiotactivos en tejido calloso de <i>D. lanata</i> Ehrh. (cinéticas por semanas) cultivado en los medios NNAL, NNBL y SHAL.	45

Tabla 13. Glucósidos cardíacos en tejido calloso de <i>D. lanata</i> Ehrh. (cinéticas por resiembra) cultivado en los medios NNaL, NNbL y SHAL	45
Tabla x. Análisis de varianza de un diseño completamente al azar, con diferente número de repeticiones	26

RESUMEN

El presente trabajo describe los requerimientos nutricionales, ambientales, así como de concentración de reguladores de crecimiento, para obtener tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

Para inducir el tejido calloso de *D. lanata* Ehrh. se complementaron los medios de cultivo Nitsch-Nitsch (1959), con 1, 2 ppm de 2,4-D y 3.0 g/l de extracto de levadura, y Schenk-Hildebrandt (1972) con 170.1 ppm de 2,4-D/cinetina y 1.5 g/l de extracto de levadura. De los diferentes explantes empleados, los cotiledones de 10 días mostraron la mejor respuesta. Los explantes fueron inoculados en los medios de cultivo antes descritos y sometidos a incubación en condiciones de oscuridad total.

Para determinar el crecimiento del tejido calloso obtenido en estos medios de cultivo se implementaron cinéticas de crecimiento, donde resultó que el tejido que mayor peso adquirió, provenía del medio de cultivo SH.

Se efectuó asimismo, la determinación de los glucósidos contenidos en el tejido calloso, se encontró que el medio NN con 2 ppm de 2,4-D y 3 g/l de extracto de levadura, contenía la mayor concentración de estos. También, el tejido proveniente de este mismo medio, presentó el mayor contenido de digoxina.

INTRODUCCION

Muchas plantas superiores acumulan en su interior sustancias orgánicas que pueden ser extraídas en cantidades lo suficientemente económicas para utilizarse como materia prima o material crudo para diversas aplicaciones científicas, tecnológicas, comerciales, etc., ejemplo de esto es la elaboración de aceites industriales, taninos, saponinas, goma natural, fármacos, tintes naturales y muchos otros más.

Tales sustancias orgánicas son denominadas metabolitos secundarios. Estos compuestos son frecuentemente acumulados y sintetizados en células especializadas en pequeñas cantidades, su localización y cantidad hacen que los procesos de extracción y purificación sean difíciles y caros, todo esto repercute en un alto costo específico que algunos de estos metabolitos alcanzan en el mercado (Balandrin y Kockle, 1985).

Debido a que los habitats naturales de las plantas silvestres comienzan a desaparecer y la inestabilidad tanto geopolítica como ambiental se incrementa, el abastecimiento de materia prima a las industrias se hace cada vez más difícil, por lo que es necesario implementar una fuente segura y confiable para estos productos, que a su vez no esté sujeta a algún tipo de presión externa.

La utilización del cultivo de células vegetales ha producido resultados alentadores con respecto a la producción de metabolitos secundarios, como es el caso de los cultivos de células en suspensión, productores de alcaloides de varias especies de *Datura* que han elevado el nivel de éstos (aposcopolamina), mientras que in vivo este alcaloide se encuentra en trazas (Corduan, 1975, tomado de Mantell y Smith, 1983). Además ciertos cultivos producen nuevos alcaloides que la planta in vivo no presenta, por ejemplo la producción de edulinina y aromarina en *Ruta graveolens* y *Stephania cepharantha* respectivamente (Rohm, 1980, tomado de Mantell y Smith, 1983).

Actualmente, la literatura tiende a apoyar el punto de vista que células vegetales cultivadas, derivadas de plantas que producen niveles detectables de metabolitos secundarios, contienen la información genética necesaria para la biosíntesis de estos mismos metabolitos. Sin embargo, se ha demostrado que algunos cultivos de células vegetales son capaces de producir metabolitos secundarios, mientras que otros, efectúan reacciones de biotransformación sobre compuestos orgánicos añadidos a los medios de cultivo. Esto hace posible elevar el valor comercial de una sustancia. Además algunos cultivos pueden sintetizar sustancias de estructura desconocida y con nuevas propiedades químicas y farmacológicas (Tabata, 1977).

Entre los metabolitos secundarios de gran interés terapéutico se encuentran los glucósidos cardíacos o cardenólidos, tales como

la digitoxina, digoxina y lanatósido C. Estos compuestos se obtienen básicamente del género *Digitalis* y su estructura es difícil de elaborar por vía sintética. Estos fármacos son importados en su totalidad por nuestro país, donde las afecciones al corazón se catalogan entre las principales causas de mortalidad (I.N.C. 1974). De ahí que el objetivo general del presente trabajo esté dirigido a encontrar las condiciones de inducción y mantenimiento de cultivos de tejido desdiferenciado (callo) de *Digitalis lanata* susceptibles de llevar a cabo la biotransformación de digitoxina a digoxina.

1.0 ANTECEDENTES

1.1. Descripción botánica de *Digitalis lanata* Ehrh.

Familia SCROPHULARIACEAE.

Hierbas o arbustos, rara vez árboles, con las hojas opuestas o verticiladas, sin estípulas.

Flores cigomorfas, hermafroditas, cimosas, axilares, solitarias o en racimos terminales o axilares. Cáliz 4-5 partido, o 4-5 lobulado, bilabiada, o con los lóbulos desiguales, de prefloración imbricada. Estambres 2-4, didinamos, rara vez 5, insertos en el tubo de la corola, en alternancia con los lóbulos; el estambre superior suprimido o transformado en estaminodio; anteras biloculares de dehiscencia longitudinal. Ovario súpero, bicarpelar, bilocular, sobre un disco; óvulos numerosos, sobre placentas axilares; estilo entero o bifido. Fruto capsular, raramente es una baya, con numerosas semillas. (Sanchez, 1980).

Género *Digitalis*

Hierba bianual o perenne, raramente arbustiva, hojas simples, alternadas algunas veces, mayormente basales, flores en la parte terminal, bracteadas, frecuentemente racemadas, el cáliz igualmente 5-lobado, más corto que el tubo de la corola. La corola con tubo cilíndrico inflado o globoso, frecuentemente constreñido en la base, el limbo más o menos 2-labiado; labios patente-erectos el superior más corto que el inferior, estambres 4, capsula ovoide a cónica, semillas numerosas.

Digitalis lanata Ehrh. (*D. orientalis* auct. balc; nom lam) ver figura 1.

Planta perenne o bianual, 30-100 cm; tallo usualmente solitario, frecuentemente rojizo-púrpura, glabro o subglabro. Hojas oblongas-lanceoladas a lanceoladas glabras o algunas veces ciliadas. Racimos usualmente muy densos; eje glandular-viloso o velatinoso. Brácteas lanceoladas. Cáliz-lóbulo lanceolado, agudo, glandular-viloso, agudo, glandular viloso, sin márgenes remarcados, corola 20-30 mm, blanca o blanca-amarillenta con venas café o violetas; lóbulo medio del labio inferior 8-13 mm, oblongo u ovoide, blanquecino. $2n = 56$, arbustiva (Heywood, Tutin, 1972).

1.2. Componentes de *Digitalis lanata* Ehrh.

Digitalis es un género de plantas arbustivas nativo de Europa y Asia, algunas especies de este género son cultivadas en muchas partes del mundo. *D. lanata* y *D. purpurea*, son las especies de mayor



Fig. 1. Ejemplar de *Digitalis lanata* Ehrh.

valor terapéutico. Las hojas de *D. lanata* son utilizadas como fuente de digoxina, un activo glucósido cardíaco, no reportado en otras especies del género. Las hojas en fresco de *D. lanata* contienen los glucósidos naturales, lanatosido A, lanatosido B, lanatosido C (ver tabla 1) lanatosido D, y lanatosido E, siendo el más potente el lanatosido C (Hatoch, et al. 1980).

Tabla 1.- Algunos glucósidos cardioactivos de las hojas de *Digitalis lanata* Ehrh. (Trease y Williams, 1984).

GLUCÓSIDO	GENINA	AZUCARES
Lanatosido A	digitoxigenina	glucosa-acetildigitoxosa-(digitoxosa) ₂
Acetil-digitoxina	digitoxigena	Acetildigitoxosa-(digitoxosa) ₂
Digitoxina	" "	(digitoxosa) ₃
Glucosetratromonósido	" "	Glucosa-digitoxosa
Digitoxigen- α -glucosil- β -desoxiglucósido	" "	Glucosa-glucosetilosa
Glucodigitofucósido	" "	Glucosa-fucosa
Lanatosido B	Gitoxigenina	Glucosa-acetildigitoxosa-(digitoxosa) ₂
Glucogitofucósido	Gitoxigenina	Glucosa-digitoxosa
Digitalum verum	" "	Glucosa-digitalosa
Lanatosido C	Digoxigenina	Glucosa-acetil digotoxosa-(digitoxosa) ₂
Acetil-digoxina	Digoxigenina	Acetil digotoxosa-(digitoxosa) ₂
Desacetil-lanatosido C	" "	Glucosa-(digitoxosa) ₃
Digoxina	" "	(digitoxosa) ₃
Digoxigenin-glucosil-bis-digitoxósido	" "	Glucosa(digitoxosa) ₂
Lanatosido D	Digitaligenina	Glucosa-acetil digitoxosa-(digitoxosa) ₂
Lanatosido E	Gitaloxigenina	Glucosa-acetil digitoxosa-(digitoxosa) ₂
Glucolanodoxina	Gitaloxigenina	Glucosa-digitoxosa
Glucoverodoxina	Gitaloxigenina	Glucosa-digitalosa

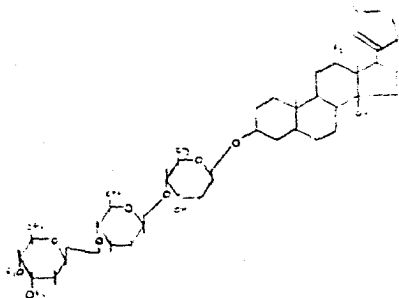
1.3. Orígenes de los glucósidos cardíacos.

Las agliconas de los glucósidos cardíacos, aunque están químicamente y biogénicamente relacionadas con las hormonas esteroidales, pueden distinguirse de acuerdo a sus características partici-

lares que son de hecho necesarias para su actividad biológica:

- 1) Una configuración cis-trans-cis del sistema ciclohexanoperhidrofenantreno.
- 2) Un grupo hidroxilo en la posición 14 β .
- 3) Un anillo lactona insaturado de cinco miembros en la posición 17 β .
- 4) Una cadena de carbohidratos enlazada en el grupo hidroxilo en la posición 3 β , generalmente digitoxosas.

La estructura base (fig. 2), es un núcleo ciclohexanoper-



	R1	R2	R3	R4
Digoxina	H	OH	H	H
Digitoxina	H	H	H	H
Digoxina	OH	H	H	H
Lanatosido A	H	H	Gluc	acetilo
Lanatosido E	H	OH	Gluc	acetilo
Lanatosido C	OH	H	Gluc	acetilo

Fig. 2.- Estructura química general de los glucósidos cardíacos digitálicos (Eurger, 1964).

hidrofenantreno, al cual se encuentra ligado un anillo lactona, la insaturación del anillo lactona es indispensable, por lo que una reducción en los dobles enlaces disminuye su toxicidad, además la desaparición de los dobles enlaces de este anillo le confiere

inactividad terapéutica al compuesto. Aunado a los efectos de la sustitución de los grupos hidroxilo por hidrógeno, la configuración estereoquímica influye marcadamente en la actividad fisiológica de estos compuestos.

A pesar del gran número de glucósidos cardíacos que se pueden encontrar en la planta de *Digitalis lanata*, solo tres de estos se emplean ampliamente con fines terapéuticos y poseen distinta potencia en la acción cardiovascular; tomando en cuenta que la digoxina es la más potente se le asignaría un valor de 10, comparativamente el lanatosido C tendría 2,9 y la digitoxina solo 5,1 (Lopez, 1986). Como consecuencia de su baja potencia y de una alta demanda de cardiotónicos cada día más potentes y eficaces, la digitoxina va quedando como un subproducto, el cual puede ser aprovechado por su conversión a digoxina.

1.4. Acción farmacológica sobre el músculo cardíaco.

La compleja regulación de la función cardíaca es afectada por numerosos factores, por lo que un gran número de fármacos que actúan por sí mismos directamente sobre el corazón, influyen en sus funciones indirectamente. El uso terapéutico queda reducido a un pequeño grupo de fármacos que actúan directamente sobre el corazón, entre estos se incluyen a los glucósidos cardíacos.

Los glucósidos cardíacos encontrados en las especies del género *Digitalis* tienen un efecto sobre el miocardio de un corazón enfermo, producen una acción inotrópica positiva, incrementando la fuerza sistólica, lo que da lugar a un llenado completo de los ventrículos. Como resultado de deprimir la conducción atrio-ventricular, dando lugar a una ampliación del intervalo P-R en el electrocardiograma. Los efectos vagales dan lugar a una disminución de la velocidad de conducción en el nódulo sinovenotricular / posterior depresión en el fascículo de His. La sobredosis de digitálicos incrementa la excitabilidad del músculo cardíaco, dando lugar a latidos ectópicos.

La eficiencia farmacológica de los glucósidos cardioactivos depende tanto de las geninas como de los azúcares a ellas unidas; la actividad inherente reside en las geninas, pero los azúcares hacen a los compuestos más solubles e incrementan el poder de fijación de los glucósidos al músculo cardíaco (Trease y Williams, 1984).

1.5. Métodos cromatográficos para el análisis de glucósidos cardíacos.

En años recientes la cromatografía ha pasado a primer plano como medio para separar y analizar sustancias orgánicas e inorgánicas. Pueden emplearse desde grandes cantidades hasta cantidades

del orden de nanogramos, y los análisis pueden ser cualitativos o cuantitativos. A menudo los métodos cromatográficos son más eficaces que otras técnicas destinadas a la separación e identificación de soluciones que contienen los principios de las drogas. Estas técnicas hallan gran aplicación en los trabajos de investigación farmacéutica y en los procesos de fabricación.

La cromatografía puede ser definida como un método de análisis en el cual el flujo de un disolvente o gas favorece la separación de sustancias por migración diferencial, a partir de una estrecha zona inicial en un medio poroso adsorbente (T. Iler, 1979).

Para la detección de los glucosidos cardiacos han sido empleadas un gran número de técnicas de alto poder resolutivo que van desde la polarografía, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta presión (Reinhard, et al. 1989), hasta el radioinmunoanálisis, no obstante, las técnicas colorimétricas tradicionales siguen teniendo gran uso por los buenos resultados que arrojan.

La introducción de los métodos cromatográficos en el análisis de los glucosidos cardiacos por Richstein, Schenker y Schindler y Kaiser (Nover, 1972) ha dado un gran impulso al conocimiento de la Química y Bioquímica de estos compuestos naturales, sobre todo en los últimos 20 años con el desarrollo de la Cromatografía de Capa Fina (CCF).

Desde un punto de vista farmacéutico, el análisis cromatográfico de los glucosidos cardiacos deben dar solución a los siguientes tres problemas:

- Control de la producción y estabilización de glucosidos cardiacos puros obtenidos del material vegetal o por síntesis parcial, así como todo aquello concerniente a sus preparaciones farmacéuticas.
- Análisis de las dinámicas de formación y degradación de los glucosidos cardiacos en la planta para ordenar y controlar los procesos de siembra, así como mejorar condiciones de cosecha y almacenamiento e,
- Investigación sobre la distribución y transformación de cardenólidos y bufadienólidos, tanto en el cuerpo humano como en animales.

Como parte complementaria de las investigaciones de los métodos cromatográficos para los glucosidos cardiacos, se encuentran aquellas correspondientes a la detección en el cromatograma de los cardenólidos por agentes colorimétricos. Estos pueden ser divididos en cuatro grupos, dependiendo de la parte de la estructura del cardenólido que ataquen:

- 1) Agentes basados en la reactividad del anillo butenólido. El

agente colorimétrico más usado de este grupo es el ácido nitrobenzoico.

2) Agentes que atacan el núcleo esteroidal. Al calentarse los cardenólidos en presencia de ácidos fuertes (ácido fosfórico, ácido clorhídrico y ácido tricloroacético) dan los correspondientes derivados 14, 16 dianhidro con un intensa fluorescencia azul bajo luz ultravioleta (365 nm).

3) Agentes que reaccionan con la parte del carbohidrato. Los azúcares 2-deoxi con el reactivo de xantidrol, dan un color rojo-carmin. La reacción es menos sensible con azúcares 2-deoxi acilados (acilados) y negativa cuando éstos se sustituyen en posición 4 por glucosa.

4) Agentes con múltiples puntos de ataque. Todos los reactivos de este grupo están caracterizados por el hecho de proceder a la formación de color bajo condiciones fuertemente ácidas y oxidativas. Uno de estos agentes es la mezcla de Cloramina T y ácido tricloroacético, introducido por Jensen y modificado por Kaiser, 1955.

La cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography, HPLC) es la optimización tecnológica de los principios básicos de la técnica cromatográfica; se considera el proceso cromatográfico como un conjunto de fuerzas que compiten de manera selectiva por un compuesto, ya sea tendiendo a fijarlo al relleno de la columna o fase estacionaria, ya sea tendiendo a recogerlo en los líquidos que fluyen o fase móvil, para que junto a ellos atraviese la columna. La aportación de la HPLC está dada en la fuerza (presión) que se aplica al soluto, ya en contacto con el disolvente, para hacerle atravesar una columna muy compactada, dada por el mínimo tamaño (5 μm o menor) de las partículas componentes del relleno columnar (García de Marina y Castillo, 1988).

1.6. Biotransformación de glucosidos cardiacos.

La obtención de metabolitos secundarios utilizando la técnica de cultivo de tejidos vegetales, había sido idealizada como la solución a la problemática que enfrentan la mayoría de estos compuestos, sin embargo la experiencia ha demostrado que las condiciones para la producción de estas sustancias no son universales para todas las especies.

Tal es el caso de los cardenólidos presentes en el género *Digitalis* y específicamente *D. lanata*, con la cual desde los primeros trabajos se había formulado el propósito de utilizar las células en suspensión como productoras de cardiotónicos (Staba, 1962; Staba y Lamba, 1963) tal idea hasta la fecha permanece inconcluse. Sin embargo, se ha observado que los cultivos en suspensión de células de *D. lanata*, son susceptibles de realizar una amplia gama de reacciones cuando se agrega al cultivo un cardenólido que actúe

como sustrato, estas incluyen glucosilación, desglucosilación, acetilación, desacetilación, 12 β hidroxilación, 5 β hidroxilación, reducción y oxidación, tanto en el esqueleto esteroidal como en las cadenas de carbohidratos que presenta la molécula del cardenólido (Doller y Reinhard, 1979).

La biotransformación de cardenólidos ha sido ampliamente estudiada en cultivo de células de *Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea*, *Thevetia nerifolia*, *Daucus carota*, *Cannabis sativa*, *Iponoea spp* y otras especies vegetales (Doller y Reinhard, 1979).

Los trabajos iniciales sobre conversión de cardiotónicos cumplieron a cargo de Staba y Lamba (1963), quienes usaron como sustrato digitoxigenina, digitoxina, ácido litocólico, escualeno, digitoxigenina + cofactores, ácido mevalónico + cofactores e hidroxiquinona; sin embargo, no lograron identificar los productos esperados. Lui y Staba (1979) utilizaron precursores como el glicolato de sodio, el acetato-colesterol y la progesterona, sus resultados indicaron un aumento de la concentración de digoxina en los cultivos.

Reinhard, et al, (1975) reportaron la posibilidad de glucosilar la digitoxina y α -acetildigitoxina, así como también realizar la 12 β hidroxilación de digitoxina, de α -acetildigitoxina y del lanatósido A.

Alfermann, et al, (1977) lograron la bioconversión de las agliconas (esqueleto esteroidal sin carbohidratos) y encontraron como productos, grandes cantidades de compuestos no identificados, que presentaban características estructurales (esqueleto esteroidal y anillo lactona) similares a los cardiotónicos digitalícos, reportaron un compuesto que probablemente sea 3-dehidrodigitoxigenina, asimismo encontraron digitoxigenina en concentraciones del 15% del sustrato añadido; también fue detectada la glucosilación de α -acetildigitoxina a lanatósido A y convertido posteriormente a lanatósido C por hidroxilación en 12 β . Simultáneamente la α -acetildigitoxina es desacetilada a digitoxina. La cual es glucosilada a purpureaglucoósido A, que puede ser hidroxilado a deacetyl lanatósido C. Utilizando diferentes líneas celulares de *D. lanata* y *D. leuphcea* obtienen un gran número de compuestos a partir de la β -metildigitoxina, siendo el más importante la β -metildigoxina.

Heins, et al, (1978) reportaron la preparación de β -metildigoxina a partir de β -metildigitoxina en un reactor de 20 l. Utilizaron células de la línea 291, la cual a diferencia de otras líneas, hidroxila específicamente la β -metildigitoxina. De 3 g de sustrato agregado obtuvieron 1.96 g del producto esperado.

Doller y Reinhard (1979) detallan específicamente, de acuerdo a las características de cada cardenólido, aglicona, monoglucósido, diglucósido, triglucósido y tetraglucósido, la biotransformación de estos compuestos mediante la utilización de cultivos celu-

lares de *Digitalis lanata* y *Thevetia nerifolia*.

a) Transformación de agliconas.

Ambos cultivos *D. lanata* y *T. nerifolia* son capaces de glucosilar la digitoxigenina a digitoxigenina monoglucósido. El cultivo de *Thevetia* produce la digitoxigenona. Además los dos cultivos glucosilan la gitoxigenina a gitoxina y la uzarigenina a urazigarina monoglucósido.

b) Transformación de monoglucósidos.

Tanto los cultivos de *Digitalis* como el de *Thevetia* glucosilan la nerifolina a diglucósido B, así como el peruvósido a diglucósido A.

c) Transformación de diglucósidos.

Ambos cultivos son capaces de glucosilar el digitoxigenindigitoxósido a glucodigitoxigenindigitoxósido, así mismo, sólo cultivos de *D. lanata* son capaces de glucosilar el digoxigeninbidigitoxido a glucodigoxigeninbidigitoxido.

d) Transformación de triglucósidos. Reportado por Reinhard, et al. (1975).

e) Transformación de tetraglucósidos.

El lanatósido A fue desacetilado y desglucosilado a digitoxina por los cultivos de *Thevetia*. En tanto que los cultivos de *D. lanata* desacetilaban a purpureaglucósido A e hidroxilaban a lanatósido C. El lanatósido B fue desacetilado y desglucosilado a gitoxina por los cultivos de *Thevetia*, en tanto que las células de *Digitalis* desacetilaban a deacetilglucósido B. El lanatósido C fue desacetilado y desglucosilado a digoxina por las células de *Thevetia*, mientras que las células de *Digitalis* desacetilaban a deacetilglucósido C.

Alfermann, et al. (1980) investigaron la transformación de digitoxina y β -metildigitoxina via inmovilización de células de *Digitalis lanata*. Reportaron la transformación de digitoxina a purpureaglucósido A y de β -metildigitoxina a β -metil digoxina.

Spieler, et al. (1985) continúan trabajando sobre el escalamiento del proceso de biotransformación, emplearon reactores con movimiento interno debido a aire (airlift) y por agitación. Reportaron buenas condiciones de crecimiento celular y de biotransformación.

Petersen y Seitz, (1985) lograron identificar la 12 β -hidroxilasa, que es responsable de catalizar la hidroxilación de digitoxina y otros cardenólidos de la serie A, a digoxina y los correspondientes cardenólidos de la serie C. Esta enzima está localizada en la fracción microsomal. El O₂ y NADPH₂ son esenciales para su actividad catalítica. El CO₂ inhibe la enzima, pero esta inhibición es reversible a 450 nm; esto sugiere que la enzima es un citocromo P-450 dependiente de la función de la monooxigenasa. En 1988 Petersen y Seitz caracterizaron el citocromo P-450 dependiente de digitoxina 12 β hidroxilasa.

Kreiss, et al (1985) identificaron la UDP-glucosa:digitoxina 16-O-glucosiltransferasa, enzima que es responsable de la glucosilación, principalmente de digitoxina a purpureaglicósido A.

Kreiss y Reinhard (1988) monitorearon la producción de deacetylato de C a partir de la 12 β hidroxilación de la digitoxina. Encontraron una producción de 88 % de deacetylato de C y 12 % de purpureaglicósido A. Presentan la opción de hidrolizar al deacetylato de C para llevarlo a digoxina.

Reinhard y Kreiss (1988) reportaron la producción de β -metil digoxina en tres niveles: en un matraz de 1 l, un "airlift" de 20 l y un reactor de 300 l, con miras a su establecimiento comercial. De acuerdo a su cuantificación por HPLC reportan la formación de 531.1 g de β -metildigoxina a partir de 541.7 g de β -metildigitoxina, en el reactor de 300 l. En tanto que en el "airlift" indican una productividad de 28.8 g/l/día.

1.7. Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica basada en el comportamiento de una masa de células (explanje) que se desarrolla separada de la planta de donde proviene, en un medio nutritivo adecuado, bajo la influencia de determinada concentración de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) en condiciones ambientales y de asepsia controladas, aprovechando la propiedad de totipotencialidad que las células vegetales presentan.

a) Composición del medio de cultivo.

Los componentes del medio para el crecimiento de tejido celular y células en suspensión pueden ser clasificados de la siguiente manera:

- Macronutrientes inorgánicos (N, S, P, Ca, Mn, Mg, Cl, Zn, generalmente en forma de sales y en cantidades de mmoles/litro).
- Micronutrientes inorgánicos (Cu, Co, I, EDTA-Na₂, Mo, generalmente en forma de sales y en cantidades de mmoles/litro), (Fossard

de, 1976).

Clarkson y Hanson, 1980 (tomado de Vasil, 1985) dividen los nutrimentos de acuerdo a su funcionalidad en dos grupos:

- Aquellos elementos (N, P, S) que están unidos covalentemente a compuestos de carbono y son constituyentes vitales de las macromoléculas DNA, RNA y proteínas, y
- Todos los demás elementos (K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, B, Cl) que participan en una variedad de funciones que incluyen regulación de gradientes osmóticos y eléctricos, conformación de proteínas y reacciones de oxidación-reducción de metaloproteínas (Vasil, 1985).
- Fuente de carbono. Principalmente sacarosa, a veces glucosa, en cantidades del 2% al 10%.
- Suplementos orgánicos. Se incluyen vitaminas, generalmente hidrosolubles, ocasionalmente aminoácidos y amidas.
- Sustancias reguladoras del crecimiento. Auxinas, citocininas, giberelinas.
- Material inerte de soporte. Principalmente agar o papel filtro (Fossard de, 1976).

1) Macronutrimentos inorgánicos.

Son los responsables del crecimiento estructural de las células vivas. Cada uno de estos elementos o la forma en que se presentan desempeñan un papel primordial dentro del metabolismo de la célula, una deficiencia o ausencia de alguno de estos, pueden conducir a un lento y precario desarrollo o en última instancia a la muerte del tejido. Así por ejemplo, el nitrógeno que se suministra en cualquiera de sus formas (NO_3^- , NH_4^+) es asimilado por las células y utilizado para síntesis de aminoácidos y proteínas, éstos junto con los ácidos nucleicos representan el total de nitrógeno celular. Por su parte el hierro está involucrado en el metabolismo de la mitocondria, el calcio incrementa la secreción al medio de polisacáridos precursores de las paredes celulares (Staba, 1980).

Deficiencias de los macroelementos N, P, K, Mg, y Ca, son más claramente perceptibles en cultivos de tejidos, cuando las células son cultivadas en medio líquido, que cuando lo son en medio sólido, debido posiblemente a las impurezas del agar, Heller, 1953, (tomado de Vasil, 1985), sodio y cloro, aunque son considerados esenciales quizás pueden ser estimuladores a ciertas concentraciones (Heller, 1953; Murashige-Skoog, 1962), y son arbitrariamente incluidos como sales de otros elementos.

De todos los nutrientes minerales, la forma del nitrógeno (oxidado o reducido, orgánica o inorgánica) probablemente sea la responsable de los más pronunciados efectos sobre el crecimiento y diferenciación de los tejidos cultivados (Vasil, 1985).

11) Micronutrientes inorgánicos

Estos son suministrados en cantidades de μ moles/litro de medio nutritivo y los más comunes son el iodo, boro, zinc, molibdeno, cobre, cobalto, aluminio y níquel. Estos elementos juegan un papel más específico con respecto a la activación de enzimas presentes en las células. Por ejemplo, el molibdeno es requerido para la síntesis de la nitrato reductasa activa; el níquel, que no es añadido a muchos medios de cultivo es parte del sitio activo de la ureasa, enzima que es requerida en cultivos cuya única fuente de nitrógeno es la urea (Staba, 1980).

111) Fuente de carbono

Una amplia variedad de carbohidratos han sido probados para determinar aquel que pueda sostener el crecimiento del cultivo vegetal en condiciones *in vitro*. Los niveles de incremento de biomasa y de crecimiento varía notablemente dependiendo del carbohidrato suministrado (Fowler, 1982).

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea en concentraciones de 2 a 3%; sin embargo, en ciertas especies se requiere emplear cantidades más elevadas (5 al 12%). Apparently hay una preferencia por utilizar sacarosa debido a los altos niveles de producción de biomasa en los cultivos, al parecer la presencia de enzimas que hidrolizan la sacarosa en los monosacáridos glucosa y fructosa, hacen no viable la utilización de otros carbohidratos como fuente principal de carbono; una vez que se ha llevado a cabo la hidrólisis, los productos de esta entran a la célula y pueden ser objeto de oxidación o de utilización en algún proceso de biosíntesis (Fowler, 1982). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como el almidón y la fructosa en otras especies.

Por otra parte los aminoácidos y amidas que han demostrado tener efectos beneficiosos son la L-arginina, el ácido L-aspartico, L-asparagina, el ácido L-glutámico y L-glutamina. Los requerimientos de aminoácidos y/o amidas se pueden determinar rápidamente por medio de la adición de un hidrolizado proteico (Merino, 1987). De entre las vitaminas, solo la tiamina tiene reconocimiento como imprescindible en los medios de cultivo, y le siguen en frecuencia la piridoxina, el ácido nicotínico y el aminoácido glicina son necesarios en pequeñas cantidades; otras vitaminas que son utilizadas por su ya conocido efecto estimulante son la biotina y el ácido fólico. Otro compuesto que tiene un efecto estimulante muy

significativo es el inositol, un carbohidrato del grupo de los hexitoles, el cual se incluye generalmente en todos los medios nutritivos. Como complemento estimulador de la respuesta deseada se han empleado diferentes extractos naturales entre los cuales destacan el agua de coco, el extracto de plátano, de levadura, de malta, ácidos orgánicos, bases de ácidos nucleicos (Vasil, 1985).

1v) Sustancias reguladoras del crecimiento.

Existen una serie de compuestos que poseen un efecto regulador sobre el desarrollo de procesos fisiológicos de la planta completa. De estos compuestos las auxinas y las citocininas son de clara importancia dentro del cultivo de tejidos vegetales, dado que estas sustancias son las responsables de los diferentes eventos que pueden realizar las células vegetales: formación de brotes, formación y mantenimiento de tejido calloso, multiplicación masiva de plántulas, emisión y proliferación de raíces, etc., todo esto depende de que sustancia reguladora, combinación y concentración sea utilizada. El papel de las auxinas en la división celular se ha visto que ocurre en algún punto de la fase G1 del ciclo celular debido a que, en su ausencia la síntesis de DNA es inhibida. Por su parte las citocininas participan en un balance entre la división celular y la expansión celular (Staba, 1980) casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivadas de la adenina. Se ha detallado minuciosamente el papel de la interacción auxina-citocinina en el desarrollo de eventos organogénéticos; ambas, auxinas y citocininas son incluidas por inducir la división celular y esto dar como resultado la formación del callo. Sin embargo las citocininas no son siempre esenciales, hay cultivos que pueden crecer indefinidamente tan solo con la adición de la auxina (Fossard de, 1976; Staba, 1980; Vasil, 1985).

A continuación se enlistan las auxinas y citocininas más ampliamente usadas:

AUXINAS

Acido 3-indolacético	(AIA) muy termolábil
Acido 3-indolbutírico	(AIB)
Acido naftalacético	(ANA)
Acido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)	
Acido 4 clorofenoxiacético (CPA)	
Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	

CITOCININAS

NS benzil aminopurina	(BAP)
NS dimetil alil aminopurina	(2ip)
NS furfuril-aminopurina	(cinetina)
NS 4-hidroxi,3-metil,2-butenil adenina	(zeatina)

v) Material inerte de soporte.

El agar es el material de soporte más comúnmente usado en el cultivo de tejidos vegetales, pues provee de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Otros agentes gelificantes usados ocasionalmente en lugar de agar son la poli(acrilamida y la sílica gel. También se utiliza como material de soporte del inóculo el papel filtro (Merino, 1987).

b) Elección del inóculo.

El tejido calloso puede ser derivado a partir de una amplia variedad de órganos vegetales (raíces, brotes, hojas o de tipos específicos de células, por ejemplo: endospermo, polen, ovulos, etc.). Es importante el estado fisiológico y la edad de la planta proveedora del explante, es recomendable utilizar plantas jóvenes, sanas y de crecimiento activo. La respuesta que se obtenga del explante inicial dependerá fundamentalmente del medio nutritivo y el balance hormonal que haya sido utilizado (Dixon, 1985).

c) Desinfección del tejido.

Para dar inicio a este evento es imprescindible una condición de asepsia en el explante inicial, esta se puede dar sometiendo al inóculo a un tratamiento con agentes desinfectantes, entre los más usuales se encuentran el hipoclorito de sodio (1-5% de Cl_2 activo), el hipoclorito de calcio (20-35 % de Cl_2 activo) el peróxido de hidrógeno, agua bromada, mercurioloate, etc., en distintas disoluciones. Otro método muy frecuente es obtener inóculos desinfectados a partir de plantulas germinadas en condiciones asepticas (Yeoman y Macleod, 1977).

d) Iniciación del callo.

Para la iniciación del tejido calloso se requiere hacer una transferencia aseptica del explante al frasco que contenga el medio nutritivo en estado semisólido y depositarlo firmemente en la superficie, de manera que tenga un buen contacto. Realizada la siembra es necesario que las condiciones de asepsia persistan durante la formación del callo, por lo cual es recomendable sellar herméticamente el frasco. Otros factores que influyen en la inducción del tejido calloso son la intensidad luminosa y la temperatura. Generalmente los cultivos de tejido calloso tienen un comportamiento diverso de acuerdo a la presencia o ausencia de luz. Con respecto a la temperatura no existe mucha discrepancia al someterlos a 25 °C.

Asumiendo que se han establecido las condiciones óptimas para la proliferación, al cabo de 3 a 8 semanas se tendrá suficiente material para iniciar los subcultivos, manteniendo y conservando las condiciones de asepsia con que fue iniciado el cultivo (Yeoman y Macleod, 1977; Dixon, 1985).

1.8. Antecedentes del cultivo de tejido calloso de *D. lanata*.

El estudio de la producción de glucósidos cardíacos utilizando el cultivo de tejidos vegetales, se inicia con los trabajos de Staba (1962), quien reporta en su artículo, los requerimientos nutricionales para la inducción de tejido calloso en algunas especies de *Digitalis*, utiliza bajas concentraciones de 2,4-D y medio nutritivo Murashige-Skoog (1962), obtiene para *D. lanata*, indicios de callo después de 45 días.

Staba y Lamba (1963) investigaron el crecimiento de cultivos de células en suspensión de *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea*, para lo cual, emplean 2,4-D en bajas concentraciones y medio de cultivo Murashige-Skoog (1962) así como un medio modificado de White (1963), y observan estructuras diferenciadas, así como una incipiente inducción de tejido calloso cuando son resembradas en este mismo medio.

Kartnig (1977) realizó análisis químicos para determinar la presencia de los cardiotónicos en sucesivas resiembras de tejido calloso de *D. purpurea* y *D. lanata*. Concluye que con el tiempo, la concentración de cardiotónicos va disminuyendo. Asimismo reporta un lento crecimiento del tejido calloso de *D. lanata* y serias dificultades para su inducción.

Con el fin de determinar el efecto de algunos precursores de glucósidos cardíacos sobre la producción de digoxina, Lui y Staba (1979) incorporaron progesterona, gluconato de sodio, lanosterol y 5 β androsteno 3,17 diona a los cultivos en suspensión de hojas, raíz y callo de *D. lanata*; encuentran un efecto significativo en los cultivos organizados (hoja y raíz) siendo mayor en hoja, mientras que en las células en suspensión es mucho menor.

Hagimori, et al, (1980) obtuvieron tejido calloso en seis especies de *Digitalis* a partir de plántulas de diez días de edad y en discos de hojas. Emplean combinaciones de auxinas y citocininas (2,4-D, ANA, cinetina, BAP) en concentraciones de 2 mg/l en medio nutritivo de MS suplementado con extracto de malta y con extracto de levadura, realizan la incubación de los cultivos tanto en fotoperíodo como en oscuridad, y determinan los cardenólidos digoxina y digitoxina contenidos en tejido calloso de 1ra. y 2da. resiembras. Sus resultados muestran que la mejor inducción de tejido calloso se logró en el medio que contiene la auxina 2,4-D y como suplemento el extracto de levadura.

Las investigaciones realizadas por Garve, et al, (1980) tienden a mostrar que cultivos celulares de *D. lanata* a largo término (hasta 100 subcultivos) son capaces de producir cardenolidos y diferentes patrones de crecimiento y morfogénesis, cuando son pasados a medios de cultivo con diferente composición y concentración hormonal. Asimismo el comportamiento depende del tipo de tejido que haya dado lugar al callo. El tejido calloso fue obtenido a partir de dos tipos de explantes: filamentos estaminales y anteras, dió lugar a 2 líneas celulares, respectivamente I y V, esta última se caracteriza por necesitar cambios continuos de medio nutritivo MS con alta actividad auxínica a medio con baja actividad auxínica (1.0 a 0.1 mg/l) con el propósito de mantener su viabilidad y características morfológicas y bioquímicas (estructuras globulares y embrioides).

2.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La imperiosa necesidad de una independencia tecnológica y la búsqueda de la sustitución de importaciones, hace más que justificable cualquier proyecto que considere estos aspectos entre sus objetivos.

La magnitud que las enfermedades cardiovasculares tienen en nuestro país, las sitúa entre las principales causas de morbi-mortalidad entre la población (I.N.C.,1974) y los principales fármacos para atender estos padecimientos son los glucósidos cardíacos, digoxina, digitoxina y lanatosido C, que son importados en su totalidad. La mayor actividad cardiotónica de la digoxina ha llevado a considerar a la digitoxina como un subproducto de la industria farmacéutica, sin embargo la transformación de ésta, o de su derivado metilado a digoxina y β -metildigoxina respectivamente, ha sido logrado por medio de cultivos de células en suspensión de *Digitalis lanata*.

El programa "Obtención de cardiotónicos mediante procesos tradicionales y biotecnológicos" que se desarrolla en el Laboratorio de Biotecnología de la ENEP Zaragoza, tiene como objetivo general la obtención de materias primas (cardiotónicos) para la elaboración de medicamentos, el cual incidiría sobre la importación de estos compuestos.

El presente estudio, sobre el establecimiento de las condiciones de inducción y mantenimiento de tejido calloso de *Digitalis lanata*, forma parte de los aspectos biotecnológicos del programa que tienen como finalidad la biotransformación de digitoxina a digoxina.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La experimentación con distintos medios nutricionales y diferentes combinaciones de auxinas y citocininas, así como la manipulación de las condiciones de fotoperíodo permitirán establecer las condiciones de inducción y mantenimiento de tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer, mantener y evaluar cultivos de tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh.

Objetivos específicos

- Establecer las condiciones óptimas de requerimientos nutricionales, de balance hormonal (auxinas/citocininas) y de fotoperíodo para la inducción y mantenimiento de tejido calloso.
- Determinar las cinéticas de crecimiento del tejido calloso en los distintos medios nutricionales en los que se haya iniciado y mantenido el cultivo.
- Evaluar los glucósidos cardíacos presentes en los distintos cultivos de tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh. desarrollados.

3.0. MATERIALES Y METODOS

3.1. Reactivos

Agar bacteriológico y extracto de levadura marca Bioxon
Hipoclorito de sodio marca Cloralex (5% cloro activo)
Detergente para uso doméstico
Cloroformo, etanol y metanol marca Merck, R.A.
Sales minerales marca Baker, R.A.
Vitaminas y reguladores del crecimiento marca Sigma
Estándares de glucósidos cardíacos marca Aldrich.
Agua destilada
Agua desionizada
Agua de coco

3.1.1. Material biológico

Las semillas de *Digitalis lanata* Ehrh. fueron colectadas de un cultivo tradicional establecido en el kilómetro 26 de la carretera Querétaro-Celaya. Las hojas de los ejemplares adultos procedieron tanto de este mismo lugar, como de un cultivo hidropónico.

Para la iniciación del tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh. se partió de dos tipos de tejidos vegetales, hojas de ejemplares adultos (16-17 meses de edad) plántulas y cotiledones de menos de 1 mes de edad.

3.2. Métodos

3.2.1. Desinfestación del material biológico

a) Semillas para obtención de plántulas.

Las semillas se sometieron a un tratamiento de desinfestación con hipoclorito de sodio (5% Cl_2 activo) en solución 1:1 v/v con agua destilada estéril (a.d.e.) por 25 minutos. Transcurrido este tiempo se enjuagaron repetidamente con a.d.e., en la cual se dejaron finalmente reposar por 24 horas. Se repitió el tratamiento con la solución de hipoclorito de sodio, por cinco minutos, se enjuagaron abundantemente con agua destilada estéril y se sembraron en condiciones asépticas en frascos (con una pequeña cama de algodón impregnada con agua corriente) previamente esterilizados en autoclave a 120°C por 20 minutos. Las semillas ya sembradas se dejaron germinar bajo fotoperiodo de 16 h (Beltrán, 1989).

b) Explantes adultos.

La obtención de explantes desinfestados a partir de hojas de ejemplares adultos se realizó de acuerdo al siguiente método: Las hojas se cortaron por la parte basal para separarlas de la planta,

se sometieron a un lavado con agitación en agua jabonosa por cinco minutos, terminada esta operación se enjuagaron repetidamente. A continuación las hojas fueron expuestas a la acción del hipoclorito de sodio (5% Cl_2) en disolución 1:6 y etanol al 70 %, por diferentes tiempos. La exposición al agente desinfectante fue seguida de numerosos enjuagues con agua destilada, estéril. Finalmente fueron seccionadas en fragmentos de 1-1.5 cm^2 y sembradas en los medios nutritivos preparados para tal fin. La tabla 2 muestra los tiempos de exposición a cada uno de los agentes desinfectantes.

Tabla 2. Tratamientos de desinfección para explantes adultos de *Digitalis lanata* Ehrh.

Hip. Na	tiempo minutos				
	1	2	3	4	5
EtOH t a i n	1	A	B		C
	2		D	E	
	3	F		G	H
	4		I	J	

3.2.2. Evaluación de los métodos de desinfección.

Terminado el tiempo de exposición a los distintos tratamientos de desinfección, los explantes fueron inoculados en un medio que contenía papa, sacarosa y agar (PSA). Este medio proporciona las condiciones nutricionales para un rápido crecimiento de los microorganismos que hayan persistido en el explante, si el método de desinfección no es el adecuado. La efectividad de este medio consiste en su rápida respuesta, generalmente si el explante aún mantiene microorganismos patógenos, estos se manifiestan en 2-3 días.

Preparación de PSA: 250 g de papa fresca, pelada y cortada en cubitos de 1 cm se colocaron en un matraz erlenmeyer de 1 l, se agregaron 500 ml de agua. Se esterilizó a 16 libras por 15 minutos. El extracto del cocimiento se filtró sobre gasa y algodón, después, a éste se le adicionaron 20 g de sacarosa y se aforó a 1 l. Posteriormente se agregaron como agente gelificante 7 g de agar y se volvió a esterilizar en las mismas condiciones. La mezcla resultante fue vaciada en frascos previamente esterilizados. Esta última operación se realizó en condiciones de asepsia total.

3.2.3. Composición y preparación de los medios de cultivo

Se emplearon los medios de cultivo de Murashige-Skoog (1962), Nitsch-Nitsch (1969), (Schenk-Hildebrandt (1972) denominados MS, SH, y NN respectivamente (tabla 3).

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo Murashige-Skoog (MS) Schenk-Hildebrandt (SH) y Nitsch-Nitsch (NN).

Compuesto	MEDIOS DE CULTIVO		
	Concentración (mg/l)		
	MS ₁₉₆₂	NN ₁₉₆₉	SH ₁₉₇₂
KNO ₃	1900.0	950.0	2500.0
NH ₄ NO ₃	1650.0	720.0	--
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370.0	165.0	400.0
CaCl ₂	440.0 *	166.0	200.0
K ₂ H ₂ PO ₄	170.0	68.0	--
NH ₄ H ₂ PO ₄	--	--	300.0
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3 **	25.0 ***	10.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	10.0	1.0
H ₃ BO ₃	6.2	10.0	5.0
KI	0.85	--	1.0
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0.25	0.25	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	--	0.1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	0.2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.85	15.0
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.3	37.25	20.0
Inositol	100.0	100.0	100.0 ^c
Ac. Nicotínico	0.5	5.0	5.0
Piridoxina HCl	0.5	0.5	0.5
Tiamina HCl	0.1	0.5	5.0
Ac. fólico	--	0.5	--
Biotina	--	0.05	--
Glicina	2.0	2.0	--
Sacarosa	30.0 g	20.0 g	30.0 g
Agar	7.0	7.0	7.0

* 2H₂O ** 3H₂O ***4H₂O
 - 10 veces menos que la concentración original.

Estos medios fueron suplementados con las fitohormonas 2,4-diclorofenolacético y cinetina tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Relación de auxina/citocinina en los medios de cultivo MS, NN y SH.

2,4-D	Cinetina			ppm
	0	0.1	2.0	
0	MS0, SH0	--	--	
	NN0			
1.0	NNa SHa	SHA	--	
	MSa			
2.0	NNb SHb		NNc	
	MSb		MSc	
3.0	SHd			

Nota: Las letras vocales denotan la concentración hormonal respectiva.

La preparación de medios se realizó de la siguiente manera: los macro y micronutrientes en solución, se mezclaron perfectamente con la sacarosa, se llevaron a un volumen determinado con agua destilada y se ajustó el pH a 5.8, posteriormente se adicionó el agar al 0.7 % y se esterilizó esta parte en autoclave a 121°C por 15 minutos. La parte orgánica restante se preparó por separado, se ajustó el pH a 5.8 y se pasó a través de un filtro millipore estéril; en seguida se mezcló con la parte inorgánica y se vació el medio en frascos estériles. La operación de mezclado y vaciado del medio se realizó en condiciones asepticas.

3.2.4. Inducción de tejido calloso

Dependiendo del explante, la proliferación del callo puede surgir del cambium, floema o del parénquima. Por lo general el callo se desarrolla en un tiempo de 3 a 6 semanas, al cabo de las cuales debe ser resembrado a medio fresco.

a) Selección del explante

Con el fin de establecer en que tipo de explante se induce mejor el tejido calloso, se ensayaron como explantes cotiledones de 5, 10 y 21 días de edad, plántulas de 5, 10 días y fragmentos de hojas de 2 meses de edad. Estos fueron inoculados en los diferentes medios de cultivo en estrictas condiciones de asepsia.

Se colocaron 4 inoculos por frasco de medio, en un total de 20 frascos por cada tratamiento; posteriormente fueron incubados a 28°C en condiciones de fotoperíodo 16/8 h luz/obscuridad. La res-

puesta de inducción de tejido calloso en los diferentes explantes fue evaluada visualmente a las 6 semanas de incubación.

b) Adición de complementos naturales

Se ha demostrado que la inducción y buen desarrollo de tejido calloso en algunas especies son altamente estimulados por complementos naturales tales como, agua de coco (Heins, et al. 1978) y extracto de levadura (Hagiwara, et al. 1980). De ahí que se hayan incorporado estos complementos a los diferentes medios de cultivo como se muestra en la tabla 5. En este caso fueron empleados como explantes, cotiledones de 10 días de edad y la inoculación se realizó como en el inciso anterior. Estos cultivos se ensayaron bajo condiciones de fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y oscuridad total.

Tabla 5. Complementos naturales.

Complementos	Medios de cultivo		
	Murashige-Skoog	Schenk-Hildebrandt	Nitsch-Nitsch
Agua de coco (300 ml/l)	MSbC	--	NNaC
	MSCC	--	NNbC
		--	NNcC
Extracto de levadura (3 g/l)	MSbL	SHAL *	NNaL
* (1.5 g/l)	MSCL	--	NNbL
Mezcla A.C./E.L.		--	NNcL
		--	NNaM
		--	NNbM
		--	NNcM

Nota: Las letras vocales indican la concentración hormonal que contiene cada tratamiento (ver Tabla 4). C: agua de coco; L: extracto de levadura.

3.2.5. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* Ehrh por resiembra (cada tres semanas).

A las seis semanas de inducido el tejido calloso, éste se evaluó, y se procedió a efectuar la 1ª. resiembra del material en medio de cultivo fresco; las resiembra subsiguientes se realizaron cada 3 semanas. En cada resiembra fue determinado el peso fresco del tejido calloso; en este caso se procedió a pesar previamente los frascos que contenían el medio nutritivo fresco, depositar (en condiciones asépticas) la masa de tejido, y pesar nuevamente los frascos. La diferencia de peso dio el peso fresco.

La determinación de peso seco en muestras de tejido calloso de cada resiembra fue por liofilización (liofilizadora Labconco), esto con el fin de destinar las muestras a extracción de cardiotónicos para su posterior cuantificación.

3.2.6. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* Ehrh con inóculo controlado para determinar el tiempo de resiembra.

Con base a las características de inducción, crecimiento y friabilidad, se seleccionaron los tratamientos NN3L, NN6L y SH3L en fotoperíodo y en obscuridad para determinar las cinéticas de crecimiento del tejido calloso.

A las seis semanas de incubado el tejido calloso, (período de inducción) se realizó su evaluación, y se procedió a resemar 1 g de callo en medio fresco, este se llevó a incubación por cuatro semanas más. Cada semana se tomaron muestras que fueron evaluadas por los parámetros siguientes:

Peso húmedo: el tejido de cada frasco se transfirió a un vial previamente tarado, se pesó y la diferencia de peso dio el valor de peso fresco.

Peso seco: se colocó el tejido en cajas Petri puestas previamente a peso constante, en seguida se secaron a 90°C por 24 h; se pesaron y la diferencia de peso dio el valor de este parámetro.

3.2.7. Extracción, identificación y cuantificación de glucósidos cardíacos del tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

a) Extracción

Muestras de 3 g de tejido calloso (previamente liofilizado) se sometieron a maceración en una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1) durante 18 h, terminada la maceración la muestra se filtró sobre un matraz balón, el extracto se concentró bajo presión reducida, (Rotavapor BUCHI 133833) el residuo se diluyó con agua destilada y se procedió a eliminar las impurezas (clorofilas, grasas, lípidos, etc.) mediante la extracción con heptano. La fase acuosa de este tratamiento fue extraída 3 veces con 10 ml de CHCl_3 para recuperar los cardiotónicos. El disolvente fue eliminado por evaporación al vacío. Para pruebas posteriores de cuantificación e identificación, el crudo de cardiotónicos obtenido se redisolvió en una mínima cantidad de mezcla CHCl_3 -MeOH (1:1). La figura 3 muestra en forma esquemática este procedimiento.

b) Identificación

Esta se realizó a través de la cromatografía de capa fina (Cromatoplasas MERCK de sílica-geloo y GF25, 20x20x20). Del crudo obtenido en el proceso de extracción se hizo una dilución en 0.1-1.0 ml de CHCl_3 -MeOH (1:1) y se tomaron muestras por duplicado, una de éstas se aplicó sobre una placa de sílica-gel, que se resolvió en un sistema de elución de CHCl_3 -MeOH (9:1). Intercaladas entre las muestras se aplicaron las muestras testigo, gitoxi-

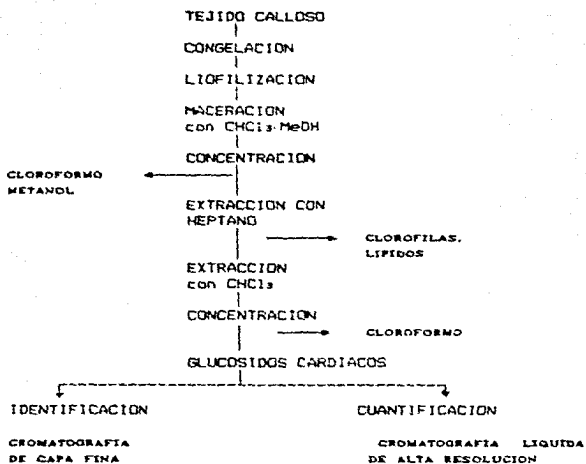


Figura 3. Diagrama de la extracción de glucósidos cardiacos en Tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh.

na, digitoxina, digoxina y lanatosido C. Las placas se revelaron por aspersión de una mezcla de cloramina T (1%) / ácido tricloroacético (25%) en relación 1:4 y calentamiento a 100°C (Nover, 1972).

c) Cuantificación

Esta se realizó por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución Perkin-Elmer) la muestra problema se disolvió en 1 ml de etanol al 95 % que contenía una mezcla de estándares (digoxina, digoxigenina y digitoxina), se inyectaron 20 µl en una columna peccosil C-18, teniendo como fase móvil acetonitrilo al 33% con un flujo de 3 ml por minuto y una presión de 900 a 1000 psi (bomba Isocrática Perkin Elmer 250), las muestras fueron detectadas a 220 nm en luz ultravioleta (Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3A). Las curvas de concentración fueron tomadas en un registrador

(Perkin-Elmer R100A) y la concentración calculada por el método de área bajo la curva.

3.2.8. Análisis estadístico empleado para determinar diferencias altamente significativas en el crecimiento del tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

Tabla x. Análisis de varianza de un diseño completamente al azar con diferente número de repeticiones.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
tratamientos	$t-1$	$\sum_{i=1}^t \frac{Y_i^2}{r_i} - \frac{Y^2}{\sum_{i=1}^t r_i}$	$\frac{SCT}{t-1}$	$\frac{CMT}{CME}$
error	$\sum_{i=1}^t r_i - t$	diferencia	$\frac{SCE}{\sum_{i=1}^t r_i - t}$	
total	$\sum_{i=1}^t r_i - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{r_i} Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{\sum_{i=1}^t r_i}$		

4.0. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Desinfestación de material biológico

a) Semillas: El tratamiento empleado indicó una eficiencia del 100% en la asepsia del material y aseguró la permanencia de la viabilidad, y la germinación en un 95%. Este método fue empleado anteriormente con otra especie del mismo género, *D. purpurea*, obteniéndose respuestas similares en cuanto a porcentajes de asepsia y germinación (Beltrán, 1989).

b) Explantes adultos: De los tratamientos experimentados para la obtención de explantes asepticos de edad adulta, sólo dos de éstos aseguraron la total eliminación de microorganismos patógenos. Los tratamientos referidos son el I y F, que presentaron tiempos de exposición a etanol e hipoclorito de sodio 4/2 y 3/1 minutos respectivamente. Sin embargo, el tratamiento F presentó ventajas sobre el tratamiento I al no evidenciar los explantes daño debido a la exposición de los agentes desinfectantes.

4.2. Efecto del medio nutritivo y de la concentración de 2,4-D y cinetina en la inducción de tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

La tabla 6 reporta los medios nutritivos y la relación de las concentraciones de 2,4-D/cinetina que indujeron tejido calloso de *D. lanata* empleando cotiledones de 10 días de edad.

Tabla 6. Medios de cultivo suplementados con 2,4-D/Cinetina que presentaron inducción de tejido calloso en *D. lanata* Ehrh.

2,4-D/cinetina ppm	Murashige-Skoog	Schenk-Hildebrandt	Nitsch-Nitsch
1/0	—	—	NNa
1/0.1	—	SHA	—
2/0	MSb	—	NNb
2/2	MSc	—	NNc

La inducción y crecimiento del callo de *D. lanata* se vió favorecida en medio NN y SH, se pudo apreciar que en medio MS la respuesta a la inducción del tejido calloso era más tardía y de menor friabilidad; El tejido procedente del los cultivos en medios NN y SH, después de seis semanas, presentó indicios de desdiferenciación en las células del explante, es decir, el inculo se apreciaba hinchado, translúcido, de consistencia poco firme. Por su parte, el tejido en medio MS, se encontró necrosado, con una fuerte presencia de oxidación.

Una apreciación visual del tejido obtenido de los tres medios básicos, pudo evidenciar un gradiente de favorecimiento de la inducción del callo con respecto a la disminución de la concentración de los iones componentes de los tres medios nutritivos (ver tabla 7) así, se pudo observar una mejor inducción de callo en NN, el cual posee en su formulación mineral la menor concentración de iones, seguida del medio medio SH, y finalmente el medio MS indujo de manera menos favorable la formación del tejido calloso de *D. lanata*, éste es el medio que posee la mayor concentración de iones minerales de los tres medios básicos experimentados.

Tabla 7. Balance de iones en los medios de cultivo Murashige-Skoog, Schenk-Hildebrandt y Nitsch-Nitsch.

compuesto o ión	MEDIOS DE CULTIVO		
	Concentración (mg/l):		
	MS(1002)	NN(1000)	SH(1072)
NO ₃ ⁻	2480.0	1147.0	1550.0
NH ₄ ⁺	360.0	162.0	45.0
N total	840.0	385.0	385.0
P ⁵⁺	46.5	15.5	77.5
K ⁺	840.65	391.0	977.5
Ca ⁺²	120.0	60.0	50.0
Mg ⁺²	36.45	18.27	36.45
Cl ⁻	213.0	106.5	106.50
Fe ⁺²	5.585	5.585	3.07
S ⁺⁶	55.360	31.520	51.808
Na ⁺	4.646	4.642	2.553
B ⁺³	1.080	1.620	0.864
Mn ⁺²	5.500	5.500	3.300
Zn ⁺²	1.962	2.289	0.2289
Cu ⁺²	0.00635	0.00635	0.0508
Mo ⁺⁶	0.0960	0.0960	0.0384
Co ⁺²	0.0059	—	0.0236
I ⁻	0.534	—	—
Inositol	99.110	99.110	99.110
Acido nicotínico	0.4924	4.924	4.924
Piridoxina-HCl	0.514	0.514	0.514
Tiamina-HCl	0.101	0.509	5.059
Acido Fólico	—	0.441	—
Biotina	—	0.05	—
Glicina	1.876	1.876	—

Respecto al rango de concentraciones hormonales que se manejaron en este estudio, coinciden con la mayoría de los reportes de la literatura. Staba (1962) indujo tejido calloso en seis especies de *Digitalis* con 1 y 2 ppm de 2,4-D en medio nutritivo MS modifi-

cado; sin embargo, el tejido que obtuvo presentaba "nódulos como raíces en algunos callos", esta respuesta es similar a la que apreciamos en el tejido calloso obtenido en medio Schenk-Hildebrant con 1/0.1 ppm 2,4-D/cinetina. No obstante que estas estructuras se eliminaron durante la resiembra, volvieron a aparecer, pero en una forma más fina. Garve, et al, (1980) indujeron tejido calloso en un medio modificado MS, con bajas concentraciones de 2,4-D, a partir de explantes florales. Beltrán (1989) reportó el uso del medio de cultivo Schenk-Hildebrant suplementado con 1, 2 y 3 ppm de 2,4-D y 1/1 ppm de 2,4-D/cinetina, para la obtención de tejido calloso en explantes de *D. purpurea*, obteniendo buenos porcentajes de crecimiento y friabilidad. La utilización del medio Schenk-Hildebrant no había sido reportada en *Digitalis lanata*. Este medio nutritivo posee un amplio espectro de respuesta favorable para el cultivo *in vitro* de especies vegetales, pues ha sido empleado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

Es importante señalar que la respuesta que se encontró en los testigos (sin hormonas) de los diferentes medios de cultivo fue la regeneración total de la plántula a partir de los cotiledones inoculados bajo condiciones de fotoperiodo, en tanto que en oscuridad la regeneración era incompleta.

4.3. Efecto del tipo de explante utilizado en la inducción del tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

De los diferentes tipos de explantes usados, la mejor respuesta a la inducción del tejido calloso se localizó en los explantes de cotiledones de diez días.

Tabla B. Respuesta de diferentes explantes de *D. lanata* a la inducción de tejido calloso.

Edad del explante	tiempo de inducción	grado de inducción	friabilidad
cotiledones			
5 días	6 semanas	incipiente	no friable
10 días	6 semanas	avanzado	friable
21 días	7-8 semanas	medio	no friable
fragmentos de hojas			
2 meses	12 semanas	medio	no friable
plántulas			
5 días	6 semanas	incipiente	no friable
10 días	6 semanas	medio	no friable

Friable: cantidad de células que se disgregan en agua.

Nota: Cultivos realizados en los medios indicados en la tabla A.

Los resultados obtenidos coinciden plenamente con los datos reportados en la literatura. La mayoría de los trabajos (Hagimori et al. 1980; Garve et al 1980; Staba 1982) indican la inducción de tejido calloso de *D. lanata* en cotiledones de ejemplares de menos de dos semanas de edad. Hagimori et al. (1980) inducen callo en explantes de hojas (fragmentos de 4 mm²) sin mencionar la edad del explante, ni detallar la zona de iniciación y grado de friabilidad. Garve et al. (1980) reportan el uso de partes florales como explantes para la formación del tejido calloso de *D. lanata*, debido a la capacidad de este tipo de tejido a formar embriones somáticos y la relación directa que tiene con la formación de cardenillos.

4.4 Efecto de la adición de complementos naturales y condiciones de iluminación en la inducción de tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

La tabla 9 describe los seis medios de cultivos que tuvieron efectos positivos sobre la inducción del callo de *D. lanata* Ehrh. La adición de concentraciones moderadamente altas de una fuente de nitrógeno orgánico, exógena al medio nutritivo original, tal como el extracto de levadura, favoreció un buen crecimiento del tejido calloso.

Tabla 9. Medios de cultivo complementados con extracto de levadura que favorecen la inducción del tejido calloso en *D. lanata* Ehrh.

Extracto de levadura	medios de cultivo		
	Murashige-Skoog	Schenk-Hildebrandt	Nitsch-Nitsch
3 g/l	—	—	NNaL
	MSbL	—	NNbL
	MScL	—	NNcL
1.5 g/l	—	SHAL	—

Nota: L denota la concentración de extracto de levadura.

Se observaron buena inducción y crecimiento del tejido calloso en los medios con extracto de levadura, mientras que el agua de coco y la mezcla de agua de coco/extracto de levadura no ejercieron un efecto determinante sobre este, tanto en fotoperiodo como en oscuridad total.

El crecimiento y la friabilidad de los cultivos de tejido calloso en los medios NN, SH y MS, se mejoró notablemente cuando se mantuvieron en oscuridad total, sin embargo, el tejido calloso en medio MS, no alcanzó la friabilidad ni el crecimiento de los otros dos medios de cultivo (ver fig. 4).



1

Fig. 4. Efecto de la adición del extracto de levadura en tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh.

Algunos de los resultados obtenidos en este trabajo contrastan fuertemente con los encontrados en la literatura, Meins et al. (1978) reportan la inducción de tejido calloso en *D. lanata*, en medio NN con 1 ppm de 2,4-D y 300 ml/l de agua de coco, sin hacer mención de las condiciones de iluminación. En nuestro caso, la experimentación realizada con agua de coco como complemento, fue negativa tanto en condiciones de iluminación como de oscuridad.

Hagimori et al. (1980) reportan inducción de callo en medio MS con 2/2 ppm de 2,4-D/cinetina y 3 g/l de extracto de levadura en condiciones de oscuridad total. Comparativamente, de los medios de cultivo empleados por nosotros, el medio MS mostro ser menos favorable para el desarrollo del tejido calloso, sin embargo, hubo coincidencia en la respuesta obtenida en los medios NN y CH.

4.5. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* Ehrh.

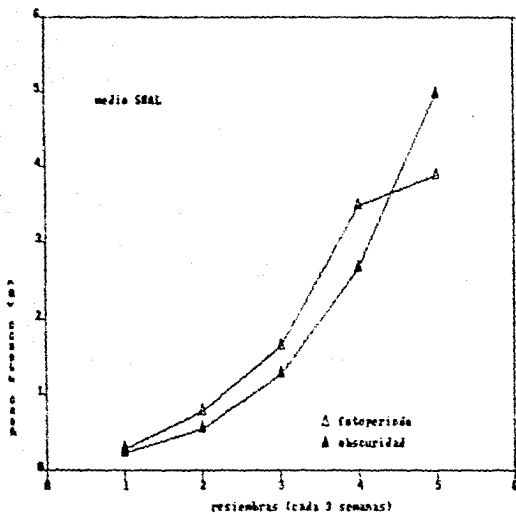
4.5.1. Cinéticas de crecimiento por resiembras.

Una vez determinados los requerimientos nutricionales y hormonales que afectan la inducción del tejido calloso de *D. lanata* se siguió el crecimiento a través de una cinética en los medios de cultivo MNAL, NNBL, NNCL, MSBL, MSCL y SHAL, tanto en oscuridad como en fotoperiodo. A continuación se detallan aspectos de su comportamiento tanto en crecimiento como en friabilidad.

La figura 5, muestra el crecimiento en peso fresco del tejido calloso en medio SHAL incubado bajo fotoperiodo y en oscuridad. Asimismo, se presentan los valores de error estándar para cada punto. Como se puede observar desde R1 hasta R4 hay un incremento en peso del tejido incubado en fotoperiodo sobre los cultivos en oscuridad, sin embargo en R5 el comportamiento se invierte, el peso fresco decae en fotoperiodo y aumenta en oscuridad. Esto se puede explicar por la tendencia del tejido a oxidarse, observada desde las primeras resiembras, y que en esta resiembra ya es tóxica para el tejido; en tanto que en oscuridad, la oxidación no se hace presente, el callo crece bien, es compacto y disgregable, aunque emite pelillos que son eliminados durante la resiembra.

Las figuras 6a y 6b, corresponden al crecimiento del tejido calloso en los medios MSBL y MSCL; al igual que en el caso anterior, se dan los valores del error estándar para cada punto. En ambos cultivos el comportamiento es similar, el tejido en oscuridad adquiere mayor peso que en fotoperiodo, donde se necrosa rápidamente. En oscuridad su crecimiento es lento (son los valores más bajos de los seis cultivos) los callos son muy compactos, casi duros, poco disgregables.

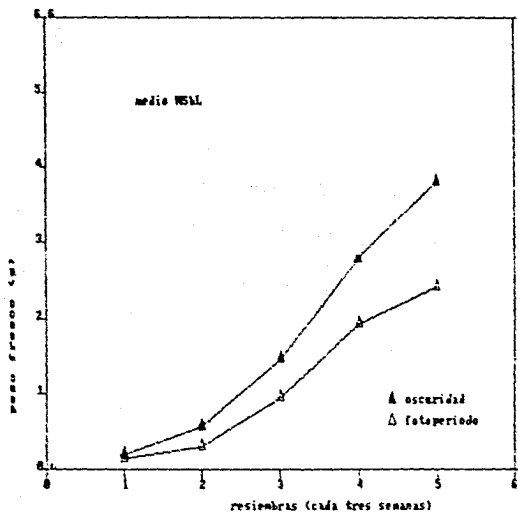
Las figs. 7a y 7b muestran el crecimiento del tejido calloso sobre los medios MNAL, NNBL y NNCL, así como el error estándar para cada punto. En la figura 7a se observa que los cultivos pro-



error standard

medio SHAL	R1	R2	R3	R4	R5
fotop.	0.0794	0.0953	0.2837	0.6346	1.0187
obsc.	0.0245	0.0601	0.2136	0.4228	0.9280

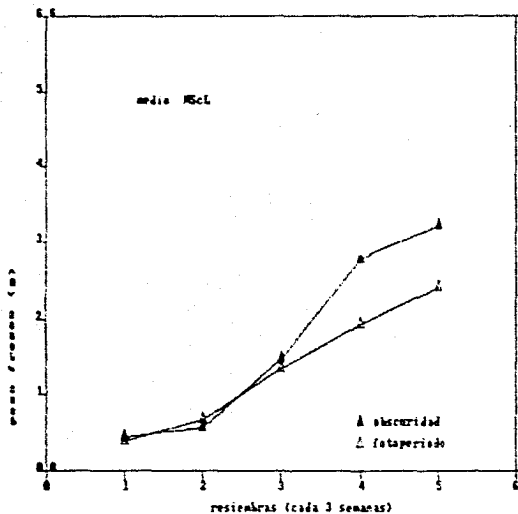
Fig. 5. Dinámicas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* en medio SHAL (1/0.1 ppm 2,4-D/cin.) Completado con 1.5 g/l de extracto de levadura.



error standard

medio MSBL	R1	R2	R3	R4	R5
fotop.	0.0419	0.0661	0.3121	0.4079	0.7838
obsc.	0.0257	0.0778	0.1811	0.2319	0.5420

Fig. 6a. Cinéticas de crecimiento de tejido caloso de *D. lanata* en medio MSBL (2 ppm 2,4-D). Complementado con 3.0 g/l de extracto de levadura.



	error standard				
medio MSCL	R1	R2	R3	R4	R5
fotop.	0.481	0.0909	0.1724	0.5108	0.062
obsc.	0.0346	0.0793	0.2251	0.5495	0.6652

Fig. 6b. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* en medio MSCL (2/2 ppm 2,4-D/cin.). Complementado con 3.0 g/l de extracto de levadura.

venientes del medio NNAL incubados en fotoperiodo, denotan un incremento mayor del peso fresco, desde R1 hasta R4 con respecto a los cultivos desarrollados en la oscuridad. Sin embargo en R5 el aumento de peso fresco cesa y decae debido a que el tejido muestreado estaba totalmente oxidado. Mientras tanto, el tejido en oscuridad crece a una velocidad sostenida, compacto y friable, de coloración amarilla. En esta misma figura se observa el comportamiento del tejido obtenido en medio NNBL, el cual adquiere mayor peso fresco en oscuridad que en fotoperiodo a lo largo de las resiembras muestreadas. Al igual que en los otros cultivos en fotoperiodo el tejido se necrosa, en tanto que en oscuridad crece compacto, disgregable y de una coloración amarillo-naranja. El crecimiento del tejido en medio NNCL se encuentra graficado en la fig. 7b, donde se observa que el comportamiento es similar al de los cultivos anteriores, esto es, mayor crecimiento en oscuridad y friabilidad favorecida. De la serie de cultivos implementados sobre el medio básico NN, este último cultivo presentó menor crecimiento y friabilidad.

Los resultados y observaciones de estas cinéticas, permitieron determinar los medios de cultivo donde iniciar y mantener tejido calloso de *D. lanata*, susceptible de ser transferido a cultivos en suspensión. Los cultivos que alcanzaron mayor incremento de peso y buena friabilidad fueron NNAL (1 ppm de 2,4-D) NNBL (2 ppm de 2,4-D) y SHAL (1/0.1 ppm de 2,4-D/cinetina) con 3 g/l de extracto de levadura para los dos primeros y 1.5 g/l para el último, incubados en oscuridad (ver fig.8).

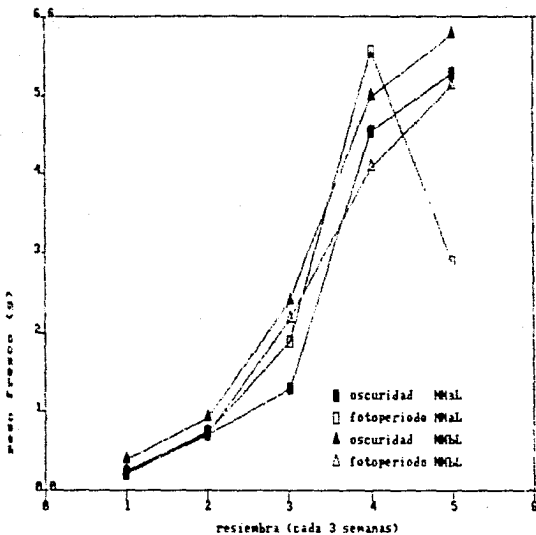
4.5.1.1. Análisis de varianza de las cinéticas de crecimiento del tejido calloso de *D. lanata* (por resiembras) en los medios de cultivo NNAL, NNBL y SHAL.

Los datos provenientes de las cinéticas de crecimiento se utilizaron para desarrollar un análisis de varianza (el cual se resume en la tabla 10) que nos indicara posibles cambios significativos estadísticamente a lo largo del tiempo de resiembra.

El análisis de varianza de los datos obtenidos en la resiembra R1 (al término de las seis semanas de inducción) está indicando que no hay diferencia altamente significativa en los medios NNAL, NNBL y SHAL. Este resultado coincide con la apreciación física del tejido desarrollado, a esta edad el tejido es inducido lentamente.

En la resiembra R2 el análisis de varianza del crecimiento del tejido obtenido, tampoco presenta diferencias altamente significativas. Esto se explica porque la proliferación del tejido calloso aún no está disparada en su totalidad.

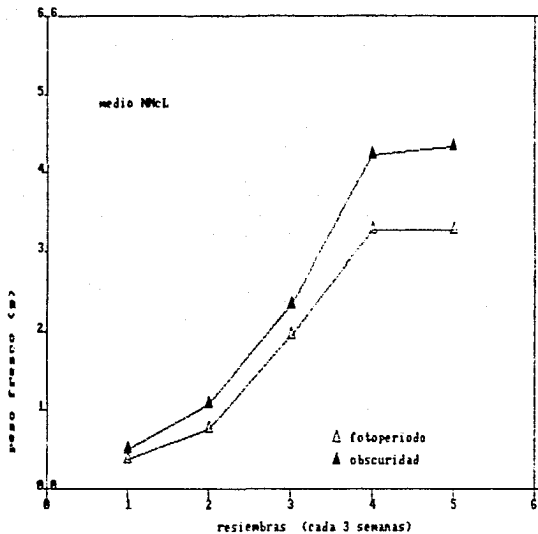
En R3 el análisis de varianza del crecimiento del tejido calloso de los medios NNAL, NNBL y SHAL presenta diferencias alta-



error standard

	R1	R2	R3	R4	R5
medio NNaL					
fotop.	0.0220	0.1376	0.3811	1.0945	1.0575
obsc.	0.0269	0.1164	0.1754	0.6099	0.8867
medio NNbL					
fotop.	0.0277	0.0649	0.4076	0.5287	0.3092
obsc.	0.0371	0.0748	0.2837	0.5958	0.4057

Fig 7a. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* en medio NNaL (1 ppm 2,4-D) y NNbL (2 ppm 2,4-D). Complementados con 3.0 g/l de extracto de levadura.



error standard

medio NNcL	R1	R2	R3	R4	R5
fotop.	0.0374	0.0856	0.2520	0.5773	2.3100
obsc.	0.0533	0.1216	0.3715	0.6391	0.8126

Fig. 7b. Cinéticas de crecimiento de tejido caloso de *D. lanata* en medio NNcL (2/2 ppm 2,4-D/cin.). Complementado con 3.0 g/l de extracto de levadura.

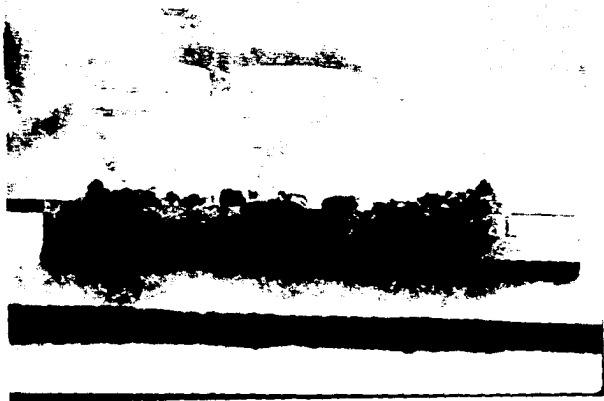


Fig. 8. Tejido calloso de *Digitaria lanata* Ehrh. obtenido en medio NNaL, NNbL y SHAL.

Tabla 10. Analisis de varianza de las cineticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* Ehrh. por resiembras, cultivado en los medios NNAI, NNBL y SHAL.

	Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	F tablas (al 1%)
R1	Tratamientos	2	0.2008	0.1004	4.152	4.98
	Error	69	1.6684	0.024		
	Total	71	1.8692			
Ho	$T_1 = T_2 = T_3$				al Fc < F tablas.	
Ha	$T_1 \neq T_2$					
R2	Tratamientos	2	1.449	0.7247	3.103	4.98
	Error	65	15.1804	0.2335		
	Total	67	16.6299			
Ho	$T_1 = T_2 = T_3$				al Fc < F tablas	
Ha	$T_1 \neq T_2$				al Fc > F tablas	
R3	Tratamientos	2	5.6814	36.4343	63.75	4.98
	Error	62	72.8667	0.5870		
	Total	64	78.7502	36.4343		
Ho	$T_1 = T_2 = T_3$				al Fc < F tablas	
Ha	$T_1 \neq T_2$				al Fc > F tablas	

mente significativas. Asimismo, se pudo observar que los cultivos ya difieren en coloración, consistencia y apariencia. Terminado el periodo de adaptación del explante al medio de cultivo, las células de *D. lanata* se dirigen a una etapa de continua división, que depende de las condiciones nutricionales y ambientales.

Gurky et al., (1980) con *D. purpurea*, analizaron la influencia del tipo de explante y del medio nutritivo (MS y SH) con 1 ppm de 2,4-D y diferentes concentraciones de cinetina, con el fin de determinar la fuente de mayor variación en el crecimiento del tejido calloso. Encontraron que el medio SH estimula el crecimiento más fuertemente que el medio MS; sin embargo, no determinan una concentración óptima de cinetina. El análisis de varianza fue realizado para cultivos de tejido calloso de una edad de trece a dieciséis meses, esta característica invalida una posible comparación con el análisis desarrollado para *D. lanata*.

4.5.2. Cineticas de crecimiento con inculo controlado para determinar el tiempo de resiembra.

Una vez definidos los medios de cultivo idóneos para la inducción del tejido calloso de *D. lanata*, este fue resembrado cada tres semanas de acuerdo a lo reportado para *D. purpurea* (Beltrán

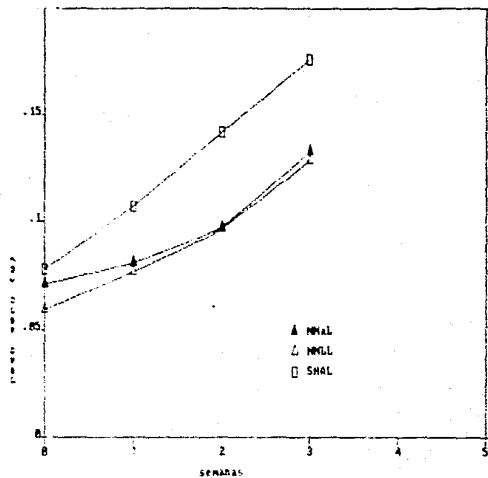
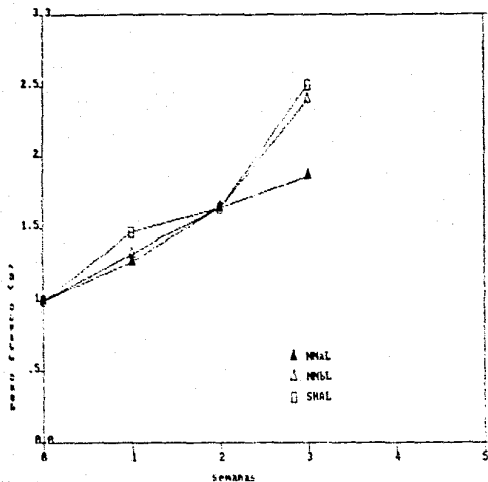


Fig. 9. Cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *D. lanata* en medio NNAL (1 ppm 2,4-D), NNBL (2 ppm 2,4-D) con 3 g/l de extracto de levadura; medio SHAL (1/0.1 ppm 2,4-D/cin.) con 1.5 g/l de extracto de levadura.
a) Peso fresco; b) Peso seco.

1989), sin embargo, había que determinar el tiempo al cual debería efectuarse la resiembra, es decir, cuando es necesario suministrar nuevos nutrientes al cultivo para su buen crecimiento. Se siguieron las cinéticas con inóculo controlado de 1 g en peso fresco.

Los resultados de crecimiento en peso fresco se encuentran reportados en la figura 9a. Donde se puede observar un incremento generalizado en los tres medios de cultivo, siendo mayor en SHAL, seguido por NNBL y NNAI. La cinética solo pudo ser seguida hasta la 3era semana ya que en la cuarta, el tejido se encontraba girdado.

Esta cinética también se efectuó determinando el peso seco de los cultivos en cada semana. En la fig 9b se puede observar que el cultivo en SHAL tiene un comportamiento lineal a lo largo de las tres semanas y fue el que adquirió mayor peso, en tanto que la variación en NNAI y NNBL puede no ser apreciable, salvo en la semana cero (semana de inicio de cinética) donde el peso seco de NNAI es mayor que el de NNBL.

Con el fin de dar una mejor interpretación a los resultados de las cinéticas de crecimiento, se procedió a calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de la masa celular de tejido calloso de cada uno de los cultivos, los cuales se observan en la figura 10. El cultivo que duplicó más rápidamente su masa celular fue el SHAL con un $t_d = 2.03$ semanas, seguido del cultivo NNAI con $t_d = 3.01$ semanas / finalmente NNBL con $t_d = 2.89$ semanas.

4.5.2.1. Análisis de varianza del crecimiento por semanas del tejido calloso de *Digitalis lanata* en medios de cultivo NNAI, NNBL y SHAL.

La Tabla 11 detalla los resultados del análisis estadístico utilizado para determinar variaciones altamente significativas en el crecimiento del tejido calloso a lo largo de tres semanas.

Los resultados indican que no hay diferencias altamente significativas, lo cual concuerda con los datos obtenidos para R2 en las cinéticas de crecimiento por resiembra; donde R_2 sería igual a 3 semanas.

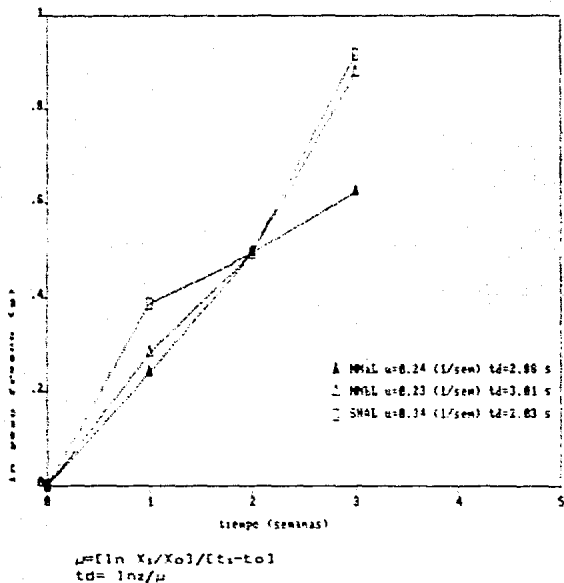


Fig. 10. Cinéticas de crecimiento en escala logarítmica de tejido callosa de *D. lanata* Ehrh. con inóculo controlado en medio NNAL, NNBL y SHAL.

Tabla 11. Análisis de varianza de las cinéticas de crecimiento de tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh. por semana, cultivado en los medios NNAL, NNBL y SHAL.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	F tablas (al 1%)
Tratamientos	2	0.06529	0.0326	3.005	10.92
S1 Error	6	0.0641	0.0107		
Total	8	0.1294			
Ho $T_1 = T_2 = T_3$	si Fc < F tablas				
Ha $T_1 \neq T_2$	si Fc > F tablas				
Tratamientos	2	0.0025	0.1291	3.010	10.92
S2 Error	6	0.2569	0.0428		
Total	8	0.2594			
Ho $T_1 = T_2 = T_3$	si Fc < F tablas				
Ha $T_1 \neq T_2$	si Fc > F tablas				
Tratamientos	2	0.7110	0.3555	1.819	10.92
S3 Error	6	1.1725	0.1954		
Total	8	1.8839			
Ho $T_1 = T_2 = T_3$	si Fc < F tablas				
Ha $T_1 \neq T_2$	si Fc > F tablas				

4.6. Cuantificación de glucósidos cardíacos en el tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh

Las muestras de tejido calloso de las cinéticas de crecimiento, tanto por semanas (con inóculo controlado), como por resiembra, fueron analizadas (Tabla 12 y 13) para determinar el contenido de los glucósidos cardíacos.

El contenido total de los glucósidos cardíacos digoxigenina, digoxina y digitoxina, determinado al tejido calloso crecido en los medios de cultivo NNAL, NNBL y SHAL, al inicio de las cinéticas fue menor en el tejido SHAL, mientras que el mayor contenido se determinó en NNAL, destacándose un alto contenido de digitoxina. Estos resultados pueden estar asociados al comportamiento de la velocidad específica de crecimiento observado en los cultivos (ver fig. 10), donde SHAL duplica más rápidamente su biomasa, mientras que NNAL y NNBL crecen más lentamente y por lo tanto pueden dirigir su metabolismo hacia la producción de glucósidos cardíacos, o bien que este alto contenido de cardenólidos puede ser debido a que las células vegetales en NNAL y NNBL al presentar una menor tasa de crecimiento, conservan por más tiempo dichos compuestos.

Tabla 12. Glucosidos cardiacos en tejido calloso de *D. lanata* Ehrh. (cineticas por semanas) cultivado en los medios NNAL, NNBL y SHAL.

Medio	tiempo semana	Digoxigenina ng/mg p.s.	Digoxina ng/mg p.s.	Digitoxina ng/mg p.s.	Total ng/mg
NNAL	S0	102.72	109.93	772.70	985.35
	S1	209.26	89.05	n.d.	298.31
	S2	210.4	75.00	n.d.	285.40
	S3	25.69	18.30	n.d.	43.99
	S4	11.60	n.d.	n.d.	11.60
NNBL	S0	76.179	n.d.	286.50	362.68
	S1	58.498	93.82	439.65	591.96
	S2	58.850	75.58	354.16	488.59
	S3	44.025	37.69	132.46	214.17
	S4	11.22	n.d.	168.27	180.09
SHAL	S0	72.22	31.00	217.00	320.22
	S1	31.60	n.d.	n.d.	31.60
	S2	47.87	17.07	n.d.	64.94
	S3	25.68	n.d.	n.d.	25.68
	S4	15.93	12.78	n.d.	28.71

n.d. = no detectado; p.s. = peso seco

Tabla 13. Glucosidos cardiacos en tejido calloso de *D. lanata* Ehrh. (cineticas por resiembra) cultivado en los medios NNAL, NNBL y SHAL.

Medio	tiempo 3 semanas	Digoxigenina ng/mg p.s.	Digoxina ng/mg p.s.	Digitoxina ng/mg p.s.
NNAL	R1	102.720	109.93	772.7
	R2	25.690	18.30	n.d.
	R3	45.300	27.62	194.28
NNBL	R1	76.169	n.d.	286.50
	R2	44.025	37.69	132.46
	R3	43.720	26.00	182.92
SHAL	R1	72.22	31.00	217.94
	R2	25.68	n.d.	n.d.
	R3	34.37	21.00	n.d.

El comportamiento que presentan los cardenólidos detectados a partir del tejido calloso de *D. lanata*, es el de disminución al transcurso de las resiembras, generalizándose esta tendencia para los tres medios de cultivo. Esto era esperado, puesto que las células *in vitro* de *D. lanata* no son productoras, y las cantidades de los compuestos que aparecen en R1 deben de ser reminiscencias del tejido original utilizado como explante.

De la literatura revisada, sólo encontramos el trabajo de Hagimori, et al. (1980) quienes reportan la cuantificación de cardenólidos por radioinmunoensayo, en callos de 70 días, inducidos en plántulas de diez días de edad en medio MS (1962) con 2,4-D y cinetina (2/0, 2/2 ppm) con 3.0 µ/l de extracto de levadura. Para el medio MS con 2 ppm de 2,4-D reporta 23.57 ng de digitoxina por gramo de peso fresco, en tanto que nosotros reportamos 9.30 µg de digitoxina por gramo de peso fresco en el cultivo NNBL a los 60 días de edad. La cantidad que reporta de digitoxina es de 65.65 ng/g peso fresco, mientras que nosotros encontramos 2.130 µg/g de peso fresco.

De los resultados expuestos podemos sugerir que las diferencias encontradas, en crecimiento, morfología y contenido de cardenólidos, en los cultivos en medio Nitsch-Nitsch y Schenk-Hildebrandt son debidas fundamentalmente a la composición del medio.

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo Nitsch-Nitsch adicionados de 1 y 2 ppm de 2,4-diclorofenoxiacético (NNAI y NNbL), así como el medio Schenk-Hildebrandt con 1/0.1 ppm de 2,4-D/cinetina (SHAL), indujeron la formación de tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh. en cotiledones de diez días de edad, así como su mantenimiento mediante resiembras.

La consistencia y friabilidad de estos tejidos fue marcadamente mejorada cuando los medios de cultivo fueron complementados con extracto de levadura, 3 g/l para medio Nitsch-Nitsch y 1.5 g/l para medio Schenk-Hildebrandt, e incubados en oscuridad.

Las cinéticas de crecimiento del tejido calloso permitieron establecer un tiempo óptimo de tres semanas para realizar las resiembras.

Así mismo, las cinéticas de crecimiento del tejido calloso, permitieron determinar el tiempo de duplicación de la masa celular en cada medio de cultivo, siendo muy similares los valores en NNAI y NNbL, 2.88 y 3.01 semanas, respectivamente, y para SHAL de 2.03 semanas.

Los cultivos en medio NNAI y NNbL presentan mayor contenido de glucósidos cardíacos al cabo de tres resiembras, estando presente la digoxina, esto asegura la actividad enzimática para llevar a cabo reacciones de biotransformación.

El presente trabajo aporta información sobre las condiciones de inducción y mantenimiento del tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh. no reportada en la literatura.

RECOMENDACIONES

No obstante que los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios para la inducción y mantenimiento de tejido calloso de *Digitalis lanata* Ehrh. es necesario optimizar algunos parámetros:

- Determinar la concentración del extracto de levadura en los medios de cultivo NN y SH.
- Determinar la concentración de la fuente de carbono en ambos medios de cultivo.
- Determinar el número de resiembra idóneo para realizar los ensayos de biotransformación.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Alfermann A., I.Schuller, E.Reinhard., 1980. Biotransformation of Cardiac Glycosides by immobilized cell of *Digitalis lanata*. *Planta Medica*, 40:218-223.
- Alfermann A.W., H.M.Roy, P.C.Doller, W.Hagendorn, M.Heins, J.Wahl and E.Reinhard., 1977. Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures. In: *Plant tissue culture and it's Bio-technological application*. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds.) Springer-Verlag, Berlin. pp 125-141.
- Alfermann A., C.Bergmann, C.Figur, U.Helmbold, D.Schwantag, I.Schuller, and E.Reinhard., 1983. Biotransformation of β -methylidigitoxin to β -methylidigoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. In: *Plant Biotechnology*. Mantell and K. Smith Eds. Cambridge University Press, England.
- Balandrin M.F., J.A.Klocke., 1985. Natural Plant Chemicals: Source of Industries and medicinal materials. *Science* 228:1154-1160.
- Beltrán F.E., 1989. Estudio sobre la implementación de un cultivo de células vegetales de *Digitalis purpurea* para la biotransformación de glucósidos cardiacos. Tesis de Maestría UNAM, México.
- Burger A., 1964. Química médica, química, bioquímica, acción terapéutica y farmacológica de las drogas naturales y sintéticas. Tomo I. Ed Aguilar, S.A. Madrid, España.
- Caballero A., 1940. Flora Analítica de España. Soc. Anónima Española de Tradés y autores. Madrid, España.
- 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.
- Dixon R.A., 1985. *Plant Cell Culture a practical approach*. Edited by Dixon R.A. IRL Press Oxford Washington, D.C.
- Doller F., A.Alfermann, E.Reinhard., 1977. Biotransformation of Cardenolides by Cell Cultures of *Digitalis lanata* and *Thevetia nerifolia*. *Planta medica* 31:1-6.
- Doller F. and E.Reinhard., 1979. Biotransformation of cardenolides. *Planta Medica*. 37:277-287.
- Estadísticas del Instituto Nacional de Cardiología. 49:1-2. México D.F., 1974.
- Fossard de R.A., 1976. Tissue culture for plant propagators. Printed by the University of New England Printery.

- Fowler M.W., 1982. Substrate Utilisation by Plant-Cell Cultures. *J. Cem. Tech. Biotechnol.* 32:329-346.
- García de Marina A., B.Castillo., 1988. Cromatografía líquida de alta resolución. Limusa, Mexico D.F.
- Garve R., M.Luchner, E.Vogel, A.Tewes, L.Nover., 1980. Growth, Morphogenesis and cardenolide formation in long-term cultures of *Digitalis lanata*. *Planta medica* 40:92-103.
- Gurmy, P., R.Gurmy, I.Papetandis., 1980. Cultures de cals de *Digitalis purpurea* L. Ire partie: étude de la croissance par analyse de variance. *Pharm Acta Hel.* 55:11-17.
- Hagimori M., T.Matsumoto, T.Hisaki., 1980. Studies on 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 Cell Physiol* 21(8):1391-1404.
- Heins M., J.Wohl, H.Lerch, F.Kaiser, and E.Reinhard., 1979. Preparation of β -methylidigoxin by hydroxylation of β -methylidigitoxin in fermenter cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Medica*, 33:57-62.
- Heywood V.H., T.G.Tutin., 1972. *Flora Europaea*. Cambridge, University Press. pp 209-241.
- Kartnig T., 1977. Cardiac Glycosides in Cell cultures of *Digitalis*. In: *Plant tissue cultures and it's Biotechnological applications*. Edited by W.Barz, E.Reinhard and M.Zenk. Springer-Verlag, Berlin. pp 44.
- Kovar K., A.Franças, G.Seidel., 1977. *Arch. Pharm.* 310 (1):40.
- Katoch P.C., S.D.Bhardwaj, A.N.Kaushal., 1980. Effect of different levels of N, P, and K on herbage (leaves) yields and digoxin content of *Digitalis lanata* Ehrh. *Indian Forester*. August, 561-564.
- Kreiss W., E.Reinhard., 1985. Rapid Isolation of Vacuoles from Suspension-cultured *Digitalis lanata* Cells. *J. Plant Physiol.* 121: 385-390.
- Kreiss W., U.May, E.Reinhard., 1986. UDP-glucose:digitoxin 16'-O-glucosyltransferase from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. *Plant Cell Reports*, 5:442-445.
- Kreiss W., E.Reinhard., 1988. 12 β -Hydroxylation of Digitoxin by Suspension-cultured *Digitalis lanata* Cells. Production of deacetylkanatoside Using a Two-Stage Culture Method. *Planta Medica*, pp 143-148.

Kuberski Ch., H.Scheibner, C.Steup, B.Diettrich, M.Luckner. 1984. Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 23(7):1407-1412.

López, M.R., 1986. Obtención de cardiopónicos a partir de recursos naturales nacionales (*Digitalis purpurea*). Tesis CFB. UNAM, México.

Lui J., E.Staba. 1979. Effects of precursors on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures. *Phytochemistry* 18: 1913-1916.

Mantell S.H. and H.Smith., 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. In: *Plant Biotechnology*. Mantell & Smith Eds. Cambridge University Press.

Merino M.E., 1987. Medios de cultivo. En: *Cultivo de tejidos vegetales*. Hurtado D. y Merino M. (eds). Editorial Trillas, México.

Murashige T., F.Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Nover L., 1972. Cardiac Glycosides and their genins. In *Pharmaceutical applications of thin layer and paper chromatography*. Karel M. (eds). 3rd Medical Faculty Charles, University Prague Czechoslovakia, Printer: Elsevier Publishing Company. 352-372.

Nitsch J.P and C.Nitsch., 1959. Haploid plant from pollen grains. *Science* 163:85-87.

Ohlsson B., S.Gatenbeck., 1983. Effects of the light on cardenolides production by *D lanata* tissue callus. *Phytochemistry*, 22(11): 2447-2450.

Petersen M., U.Seitz., 1985. Cytochrome P-450 dependent digitoxin 12 β -hydroxylase from cell cultures of *Digitalis lanata*. *FEBS* 188 (1):11-14.

Petersen M., U.Seitz., 1988. Reconstitution of cytochrome P-450 dependent digitoxin 12 β -hydroxylase from cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh). *Biochemical J.* 252:537-543.

Reinhard E., M.Boy, F.Kaiser., 1975. Transformation of *Digitalis* glycosides by cells suspension cultures. *Planta Medica Suppl.* 163-168.

Reinhard E., W.Kreis, J.Barthlen., 1989. Semicontinuous cultivation of *D lanata* by production β -methyl-digoxin in a 300 L airlift bioreactor. *Biotechnology & Bioengineering.* 43:502-508.

Sanchez O., 1980. La Flora del valle de México. Ed. Herrero, 2da edición, México. pp 355.

Schent R., C.A.Hildebrandt., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50:199.

Spieler H., W.Alfermann, E.Reinhard., 1985. Biotransformation of β -methyl digitoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors. Appl Microbiol Biotechnol. 23:1-4.

Staba E., 1962. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. I. Nutritional requirements in tissue cultures of *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. J. Pharm. Sci., 51:249-254.

Staba E., 1980. Plant tissue as a source of biochemicals. E.John Staba (ed). CRC Press, Inc, Florida. pp 22-58.

Staba E., J.Sidney., 1965. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. IV. Biotransformation of digoxigenin and related substances. J. of Pharm Sci., 54(1):56-58.

Staba E., S.Lamba., 1963. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. II. Growth of *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea* in suspension cultures. Lloydia, 20(1):29-35.

Tabata M., 1977. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: Plant tissue Cultures and its Bio-technological Application. Barz W., Reinhard E. and Zenk M., (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

Tewes A., A.Wappler, E.Pescke, R.Garve, L.Nover., 1962. Morphogenesis and embryogenesis in long-term cultures of *Digitalis*. Zpflanzenphysiol. bot 106:311-324.

Trease G.E., E.Williams. 1984. Pharmacognosia. Compañía Editorial Continental S.A. México D.F. pp 136-139.

Tyler V.E., 1979. Farmacognosia. El Ateneo Pedro García S.A. Buenos Aires, Argentina.

Vasil K.I., 1985. Cell Cultures and Somatic Cell Genetics of plants. Academic Press, Inc. Florida, USA. pp 130-139.

Yeomann M., A.Macleod., 1977. Tissue (callus) cultures techniques. In: Plant tissue and cell cultures. Street H.J. (ed.) Oxford blackwood Scientific Publications. pp 31-60.