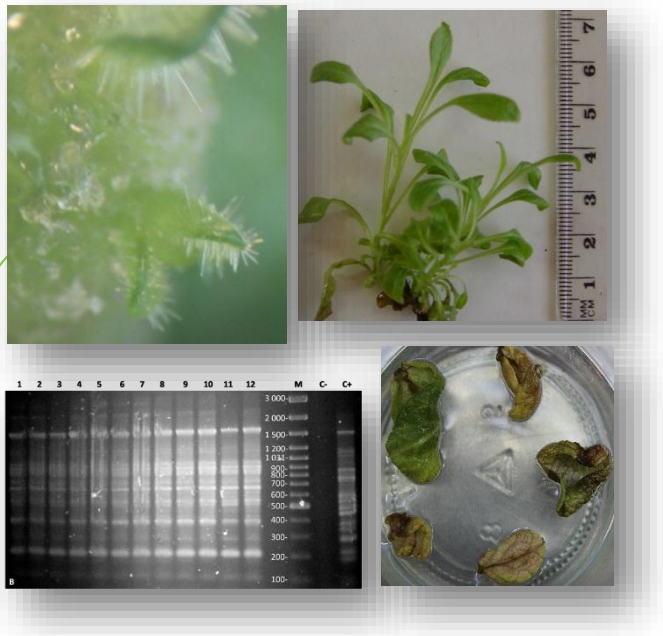
UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Tesis de Diploma

Morfogénesis *in vitro* y efecto de agentes selectivos sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L.



Randel Martín Hernández

2015

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Tesis de Diploma

Morfogénesis *in vitro* y efecto de agentes selectivos sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L.

Autor: Randel Martín Hernández

Tutores: Dra. C. Naivy Pérez Alonso [a]

Dr. C. Borys Chong Pérez [b]

a naivy@ibp.co.cu

b boris@ibp.co.cu

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas

Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

2015

"... y conoceréis la verdad, y la verdad os hará libres"

Jn 8:32

A Ramona y René a quienes les debo todo lo que soy, por ser además de mis abuelos, mis padres, mis amigos, mis héroes…

Agradecimientos

Agradecer es lo mínimo y a la vez lo más difícil que puedo intentar hacer después de haber recibido tanto, prometo hacer mi mayor esfuerzo. Aunque temo que las siguientes palabras nunca estarán a la altura de a quienes va dirigido…Agradezco a:

Luis Bravo mi mejor amigo, quien fue durante todos mis años de universidad mi guía, mi apoyo, como un padre me enseñó a andar…

Todos los profesores del Dpto. de Biología de la UCLV y al Instituto de Biotecnología de las Plantas, de quienes obtuve mi formación académica y aprendí casi todo lo que sé…

Raúl Barbón, por brindarme su ayuda y sabios consejos en medio de tantas responsabilidades

Grecia, por socorrerme cuando más lo necesité, gracias por tu tiempo y geniales ideas

Luiso, por brindarme sus conocimientos en biología molecular y no flaquear a pesar de las adversidades, demostrándome ser profesional a toda costa

Miladys, por tu disposición de ayudarme siempre a pesar de tu trabajo y por todos tus consejos

Baby, qué sería del laboratorio de Biología Molecular sin ti que le conoces cada detalle, gracias por ayudarme siempre que lo necesité

Laicín, por socorrerme cuando los recursos escasearon y la locura estaba a la puerta...

Elizabeth Kairúz, mi profesora y amiga quien me enseñó a dar los primeros pasos en la biotecnología, gracias por recibirme cada vez que te necesité, jamás lo olvidaré

Todo mi grupo incluso a los que ya no están y siguen entre nosotros, de quienes guardo las lecciones que nunca olvidaré, esas que me enseñaron a convivir…Especialmente a: Jennifer, Wendy, Anaimy, Anneris, Aimeec y Lucía mis amigas, juntos compartimos el estrés por los estudios, noches santaclareñas, comidas, cafés…en fin los mejores años de nuestra vida, todo lo que en realidad se quedará; aunque lejos nos encontremos siempre estarán en mi corazón…

Eliza Quiala, gracias mi amiga, por tus diálogos enriquecedores, cargados de sabiduría, eres un constante ejemplo de profesional, por ti entré al IBP; ¿te acuerdas en primer año? Lo que más te agradezco es que por ello tuve el privilegio de conocer a personas tan increíbles como:

Anabel, que sin sus manos hábiles y dispuestas no hubiera terminado jamás este trabajo… gracias por tanto cariño Ana…

Alina, quien además de ayudarme tanto se convirtió en una amiga inolvidable, sabes que soy fan a ti por tu calidad humana, tu alegría infinita, tu temple…a las tres las quiero sin miseria,

Y a mis tutores Naivy y Borys para los cuales no tengo palabras que describan lo agradecido que estoy con ellos. Gracias por poner a mi servicio todos sus conocimientos y tiempo invaluables. Me enseñaron todo lo que sé de biotecnología y de investigación científica, son un equipo perfectamente complementado, además un ejemplo de investigadores, que admiro, respeto y quiero. No creo que exista mejores tutores, ¡Ojalá que cuando sea grande, pueda ser como ustedes!,

A mi papá por su apoyo y constante preocupación, aun en la distancia siempre ha estado presente,

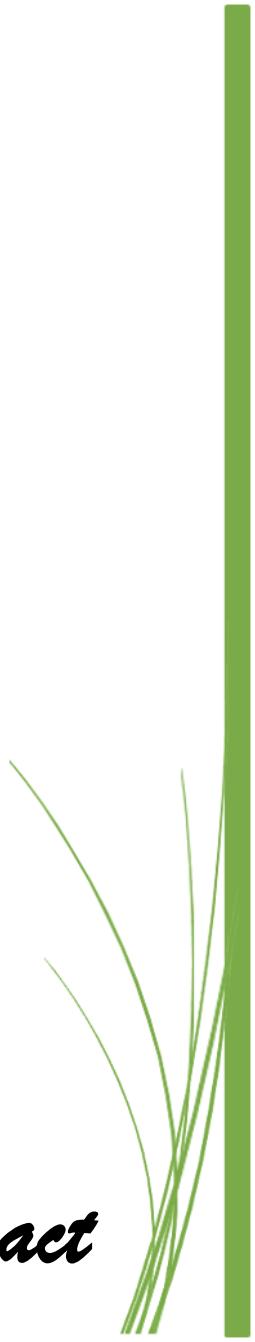
Para el final dejé mi tesoro más grande: mami Monga y papi René, les agradezco infinitamente por apoyarme en cada sueño, son mis luces, mi inspiración, el aliento cuando faltó el aire, la fuerza y la fe que me llevaron a alcanzar esta meta, para ustedes todo el mérito.

Resumen

RESUMEN

Digitalis purpurea L. es una especie de interés ornamental y medicinal. Tiene gran importancia por los efectos de sus metabolitos en las enfermedades cardiovasculares. A la vez, se expanden sus horizontes terapéuticos ya que se ha comprobado la actividad anti-cancerígena de estos. El presente trabajo tuvo como objetivos desarrollar la morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de plantas de dicha especie con el uso de los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (6-BAP) y el ácido naftalenoacético (ANA). Además se determinó la estabilidad genética de las plantas regeneradas. Por último, se determinó la concentración mínima letal de agentes selectivos (espectinomicina, estreptomicina, G-418, higromicina B) para la transformación genética. Los resultados permitieron describir los procesos morfogenéticos asociados a la regeneración a partir de explantes foliares de *D. purpurea* en diferentes condiciones de cultivo. Se determinó que mediante el empleo de 0,1 mg/L de ANA y 0,3 mg/L de 6-BAP se puede obtener a los 42 días de cultivo, un promedio de 18,86 brotes en el 96% de lo explantes, mediante un proceso de organogénesis directa. El análisis con marcadores tipo RAPD (del ingés *Random Amplified Polymorphic DNA*) demostró la estabilidad genética de las plantas obtenidas mediante esta tecnología. Se determinaron las concentraciones mínimas letales para un esquema de selección de plantas regeneradas mediante organogénesis directa. Las concentraciones fueron 300 mg/L para estreptomicina, 10 mg/L de higromicina B, 20 mg/L de G-418 y espectinomicina requiere nuevos estudios. Los resultados descritos podrán ser empleados para la propagación *in vitro* y el mejoramiento genético de la especie.

Palabras clave: agentes selectivos, antibióticos, cardenólidos, marcadores moleculares, organogénesis directa



Abstract

ABSTRACT

Digitalis purpurea L. is an ornamental and medicinal plant species. It has great importance because the effects of its metabolites on cardiovascular diseases. In turn, their therapeutic horizons are in expansion as its metabolites have proven anti-cancer activity. This study aimed to develop *in vitro* morphogenesis from leaf segments of plants with the use of growth regulators 6-benzylaminopurine (6-BAP) and naphthalene acetic acid (NAA). Besides, genetic stability of the regenerated plants was determined. Finally, the minimum lethal concentration of selective agents (spectinomycin, streptomycin, G-418 and hygromycin B) for the genetic transformation was determined. The results allowed to describe the morphogenetic processes associated with regeneration from leaf explants of *D. purpurea* in different growing conditions. It was determined that by using 0,1 mg/L NAA and 0,3 mg/L 6-BAP an average of 18,86 shoots per explant and 96% of the explants through direct organogenesis can be obtained at 42 days of culture. The analysis with RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) type markers of plants obtained showed its genetic stability and hence the biological safety of such technology. Minimum lethal concentrations to a selection scheme of regenerated plants by direct organogenesis was determined. These were 300 mg/L for streptomycin, 10 mg/L for hygromycin B, 20 mg/L for G-418 and spectinomycin requires further studies. The results described here can be used for *in vitro* propagation and genetic improvement of this species.

Keywords: antibiotic, cardenolides, direct organogenesis, molecular markers, selective agents

Índice

Índice

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 *Digitalis purpurea* L. 4

2.1.1 Origen y distribución geográfica 4

2.1.2 Clasificación taxonómica, características botánicas 4

2.1.3 Importancia farmacológica 5

2.2 Cultivo *in vitro* de *Digitalis* 6

2.3 Métodos de regeneración 8

2.3.1 Organogénesis 8

2.3.2 Organogénesis directa en *Digitalis* 9

2.4 Marcadores genéticos moleculares 10

2.4.1 Marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) 10

2.4.2 Otros marcadores moleculares 11

2.4.3 Análisis de clúster 13

2.5 Aplicaciones de la Organogénesis directa 14

2.5.1 Transformación genética 14

2.5.2 Transformación sobre ADN nuclear 15

2.5.3 Transformación sobre cloroplastos 15

3. MATERIALES Y MÉTODOS 17

3.1 Morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold 18

3.1.1 Análisis de la estabilidad genética de las plantas regeneradas 21

3.1.1.2 Marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)..... 23

3.1.1.3 Análisis y procesamiento de los datos obtenidos mediante los marcadores moleculares……...23

3.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de *D. purpurea* durante la organogénesis directa.....23

3.2.1 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación de cloroplastos 24

3.2.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación de ADN nuclear 24

4. RESULTADOS 26

4.1 Morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold.....26

4.1.1 Análisis de la estabilidad genética de las plantas regeneradas.....35

4.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de *D. purpurea* durante la organogénesis directa.....38

4.2.1 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de cloroplastos 38

4.2.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación de ADN nuclear 45

5. DISCUSIÓN.....52

5.1 Morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold.....52

5.1.1 Análisis de la estabilidad genética de las plantas regeneradas 58

5.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de *D. purpurea* durante la organogénesis directa.....60

5.2.1 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de cloroplastos 60

5.2.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación nuclear.....61

6. CONCLUSIONES.....64

7. RECOMENDACIONES 65

8. LITERATURA CITADA.....67

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Desde los albores de la humanidad, es conocido el uso de las plantas como fuente de alimentos, energía, materiales de construcción; pero sin lugar a las dudas, de las aplicaciones más ingeniosas que nuestra especie le ha encontrado es como remedio a las enfermedades. Un peculiar ejemplo es *Digitalis purpurea* L., planta que además de su valor ornamental por sus llamativas inflorescencias, desde finales del siglo XVIII, es empleada en el tratamiento contra trastornos cardiovasculares. Posteriormente se demostró que contiene una serie de sustancias cardiotónicas, de naturaleza esteroideo-glucosídica, conocidas comúnmente como cardenólidos, cuyas propiedades, los avalan como medicamentos insustituibles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Kreis y Müller-Uri, 2013). Entre ellas la insuficiencia cardiaca, el flúter auricular, la taquicardia paroxística supraventricular (Prassas y Diamandis, 2008) y la fibrilación auricular crónica (Dostanic-Larson *et al.*, 2006).

A la par se expanden sus horizontes terapéuticos, ya que se ha comprobado la actividad anti-cancerígena de dichos metabolitos. Algunos estudios, demuestran la actividad anti-proliferativa y apoptótica que tienen sobre numerosas líneas celulares cancerígenas (mama, próstata, melanoma, mieloma, páncreas, pulmón, leucemia, neuroblastoma, y adenocarcinoma renal). Además ejerce un efecto protector sobre células normales, por lo cual se ha descrito su potencial uso en enfermedades neurodegenerativas y en isquemias. También se describe su probado efecto en la disminución de la inflamación de pulmón en la fibrosis quística (Prassas y Diamandis, 2008).

Las enfermedades cardiovasculares y los tumores malignos son las primeras causas de muerte en Cuba según los reportes del anuario estadístico de salud (Ministerio de Salud Pública Dirección de Registros Médicos y Estadístias de Salud, 2015). Además, las primeras son la principal causa de muerte en el mundo, descrito en la página oficial de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014). Sin embargo, la síntesis química de los cardenólidos, una de las principales terapias en sus tratamientos, no es viable. Por lo que las fuentes naturales, principalmente *D. purpurea y D. lanata*, son las únicas que pueden brindarnos este recurso (Sales *et al.*, 2011).

En Cuba se gasta anualmente, una suma considerable, en la importación de materias primas desde la India; para la producción de 24 millones de tabletas de digoxina uno de los cardenólidos más

empleados en trastornos cardiovasculares (Pérez-Alonso, 2013). Contar con una producción anual de *D. purpurea,* permitiría desarrollar la industria nacional y la sustitución de importaciones.

Por otro lado las condiciones de cultivo en campo varían considerablemente el contenido de dichos metabolitos. Esto se debe a diversos factores entre ellos: el contenido de iones en el suelo, el efecto de las estaciones sobre el metabolismo secundario, mientras que en verano se obtienen los mejores resultados en otoño e invierno se alcanzan los peores (Sales *et al.*, 2011). Por lo cual, el cultivo *in vitro* pudiera constituir una alternativa promisoria a la producción de cardenólidos. Este ha sido explorado en algunas investigaciones (Pérez-Bermúdez *et al.*, 1984, Cacho *et al.*, 1999, Patil *et al.*, 2012), de las cuales se ha concluido que se precisa de una diferenciación morfológica de los tejidos fotosintetizadores para la síntesis de cardenólidos, además de que su producción *in vitro* es menor que la de campo. Por estas razones, se ha pensado en la ingeniería metabólica, mediante la transformación genética como la única estrategia biotecnológica que pudiera incrementar significativamente su producción (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, para efectuarla se necesita en dependencia del blanco, plastídico o nuclear, adecuados sistemas de regeneración y un esquema de selección (Díaz *et al.*, 2004).

La literatura científica describe la regeneración vía organogénesis indirecta en *D. purpurea* y ha sido utilizada en el desarrollo de un protocolo para la transformación genética de la especie (Pérez-Alonso *et al.*, 2014). Sin embargo, otros métodos de regeneración como la organogénesis vía directa son utilizadas en el mejoramiento genético y la propagación *in vitro*. Esta permite la transformación plastídica, el chequeo rápido de las plantas y una disminución en el fondo de tiempo y recursos. Trabajos previos en la especie a partir de segmentos foliares (Fernández, 2014), mostraron resultados preliminares respecto a la organogénesis directa de la especie que abren paso a nuevos estudios.

En el género *Digitalis,* los esquemas de selección han sido desarrollados a partir de la regeneración vía organogénesis indirecta con el empleo de agentes selectivos como la geneticina (Pérez-Alonso *et al.*, 2014) y la higromicina (Kairúz *et al.*, 2013) . Mientras, Li *et al.* (2014) emplearon la kanamicina para la selección de plantas obtenidas vía organogénesis directa con una baja eficiencia de selección.

Por todo lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se trazaron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar la morfogénesis *in vitro* y el efecto de agentes selectivos sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L.

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de los reguladores del crecimiento ácido naftalenoacético y 6-bencilaminopurina en la morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L.;
2. Evaluar la estabilidad genética de las plantas regeneradas mediante marcadores moleculares de tipo RAPD;
3. Identificar la concentración mínima letal de agentes selectivos a utilizar en la transformación genética nuclear y plastídica de la especie.

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Digitalis purpurea* L.

2.1.1 Origen y distribución geográfica

El género *Digitalis* está principalmente distribuido a través de dos grandes áreas geográficas: la península ibérica y el noroeste de África. También se encuentra en Macaronesia, la península de los Balcanes y Asia menor (Sales *et al.*, 2011). Se introdujo en Cuba gracias a sus propiedades medicinales, sin embargo las características climatológicas del país no le permitieron completar su ciclo vital (altas temperaturas y pluviosidad) imposibilitando su adaptación (Roig, 1974). Por lo cual el desarrollo de métodos biotecnológicos que permitan la micropropagación masiva de la especie es una alternativa que puede solucionar este problema, para Cuba y otros países con características similares, de modo que la producción y empleo de la especie puedan ser posibles.

2.1.2 Clasificación taxonómica, características botánicas

El nombre científico de esta especie parte de las raíces latinas *digitus* que significa dedo y *purpurea*, lila o púrpura en español. Ambas características responden a la estructura en forma de dedal de su flor. Vulgarmente se le han atribuido diversos nombres aludiendo a sus características morfológicas, entre ellos guante de zorra, guante de zorra púrpura o guante de señora (Wu *et al.*, 2012).

El naturalista sueco Carl von Linné dio nombre a esta especie en el siglo XVIII; su ubicación taxonómica actual según NCBI *taxonomy* es la siguiente (disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov):

Reino: *Viridiplantae*

***Phylum*:** *Streptophyta*

División: *Magnoliophyta*

Subclase: *Asterids*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Plantaginaceae*

Tribu: *Digitalideae*

Género: *Digitalis*

Especie: *Digitalis purpurea* L.

La planta se desarrolla en un ciclo de dos años; en cada uno de los cuales presenta características morfológicas diferentes. Durante el primero, produce únicamente una roseta de hojas basales, ovales, dentadas y de largo peciolo. En el segundo año desarrolla un tallo que puede alcanzar 2,5 m, con hojas sésiles y rugosas; ligeramente pubescentes, dentadas, simples y alternas, cuyo envés es finamente texturado. Las flores son tubulares llegando a tener 5,0 cm de largo, cuyos pétalos presentan una coloración que va del amarillo pálido hasta el púrpura, en el interior; forman racimos colgantes terminales (según PLANTS Profile, disponible en http://plants.usda.gov).

2.1.3 Importancia farmacológica

Desde finales del siglo XVIII *Digitalis* es empleada en el tratamiento contra trastornos cardiovasculares. Posteriormente se demostró que contiene una serie de sustancias cardiotónicas, muy activas, de naturaleza esteroideo-glucosídica, conocidas comúnmente como cardenólidos. Estos actúan inhibiendo la ATPasa sodio-potasio cardiaca, por lo que aumenta la concentración de Na^+ intracelular, el cual se intercambia con el Ca^{2+} extracelular; produciéndose un incremento intracelular del mismo. De este modo la fuerza de contracción del músculo cardiaco aumenta (efecto inotrópico positivo), disminuye la frecuencia cardiaca (cronotropismo negativo) y se reduce la velocidad de conducción del corazón (dromotropismo negativo). También inhibe de forma directa la actividad simpática y actúa sobre el músculo liso directamente provocando vasodilatación. Estas propiedades, hacen de los cardenólidos, medicamentos insustituibles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Kreis y Müller-Uri, 2013). Entre ellas la insuficiencia cardiaca, el flúter auricular, la taquicardia paroxística supraventricular (Prassas y Diamandis, 2008) y la fibrilación auricular crónica (Dostanic-Larson *et al.*, 2006).

A la par se expanden sus horizontes terapéuticos, ya que se ha comprobado la actividad anti-cancerígena de dichos metabolitos. Numerosos estudios, demuestran la actividad anti-proliferativa y apoptótica que tienen sobre numerosas líneas celulares cancerígenas (mama, próstata, melanoma, mieloma, páncreas, pulmón, leucemia, neuroblastoma, y adenocarcinoma renal). Mientras que ejerce un efecto protector sobre células normales, por lo cual se ha descrito su potencial uso en enfermedades

neurodegenerativas y en isquemias. Además de su probado efecto, en la disminución de la inflamación de pulmón en la fibrosis quística (Prassas *et al*., 2008, Gurel *et al*., 2010).

Las enfermedades cardiovasculares y los tumores malignos son las primeras causas de muerte en Cuba según los reportes estadísticos del anuario estadístico de 2015 (Ministerio de Salud Pública Dirección de Registros Médicos y Estadístias de Salud, 2015). Además las primeras son la principal causa de muerte en el mundo, reportado en la página oficial, de la OMS (consultado el 17-11-13 disponible en línea). Sin embargo, la síntesis química de los cardenólidos, una de las principales terapias en sus tratamientos, no es viable. Por lo que las fuentes naturales, principalmente *D. purpurea y D. lanata,* son las únicas que pueden brindarnos este recurso (Sales *et al.*, 2011).

En Cuba se gasta anualmente, una suma considerable, en la importación de materias primas desde la India; para la producción de 24 millones de tabletas de digoxina (Pérez-Alonso, 2013). Contar con una producción anual de *D. purpurea,* permitiría desarrollar la industria nacional y la sustitución de importaciones, nuevamente retomada en los lineamientos de la política económica y social del Partido y la Revolución.

2.2. Cultivo *in vitro* de *Digitalis*

El cultivo *in vitro* de plantas de interés para el hombre, ya sea por sus propiedades como fuentes de sabores, pigmentos, pesticidas o compuestos medicinales; ha cobrado auge durante las últimas décadas. Esto se debe en gran medida a sus ventajas con respecto al cultivo en campo, entre ellas:

- los cultivos se inician con pequeños fragmentos de tejido,
- solo se requiere un reducido espacio para el mantenimiento e incremento del número de plantas,
- uniformidad del cultivo y aumento del rendimiento,
- producción continua durante todo el año,
- condiciones ambientales controladas y optimizadas,
- no se necesitan pesticidas ni herbicidas tóxicos,
- posibilidad de síntesis de *novo,* por el suministro de compuestos análogos a los naturales presentes en la naturaleza,

- no dependencia del clima, ni la ubicación geográfica (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

En el cultivo *in vitro* del género *Digitalis*, se han realizado un gran número de investigaciones, empleando diversas estrategias biotecnológicas. Las principales han sido: cultivo de tejidos y suspensiones celulares, la adición de precursores, elicitación, sistemas de inmersión temporal (SIT), embriogénesis, organogénesis. La tabla I muestra un resumen de las principales.

Tabla I. Principales estrategias biotecnológicas empleadas en el cultivo *in vitro* del género *Digitalis*

Especie	**Estrategia biotecnológica**	**Referencia**
D. purpurea L.	Cultivo de anteras	(Corduan y Spix, 1975)
D. lanata Ehrh.	Cultivo de brotes	(Gedeon, 1982)
D. purpurea L.	Cultivo de células	(Hagimori *et al.*, 1982)
D. purpurea L.	Cultivo de brotes en medios líquidos	(Hagimori *et al.*, 1983)
D. obscura L.	Embriogénesis somática	(Pérez-Bermúdez *et al.*, 1985)
D. thapsi L.	Suspensiones celulares	(Corchete *et al.*, 1991)
D. lanata Ehrh.	Embriogénesis somática	(Reinbothelst *et al.*, 1 992)
D. purpurea L.	Cultivo de callos	(Chaturvedi y Madhu, 1994)
D. thapsi L.	Suspensiones celulares	(Cacho *et al.*, 1995)
D. purpurea L.	Cultivo de callos	(Palazón *et al.*, 1995)
D. purpurea L. *D. lanata* Ehrh. *D. cariensis* Loudon. *D. grandiflora* Boiss. *D. lutea* L.	Suspensiones celulares	(Nover *et al.*, 1996)
D. thapsi L.	Elicitación con iluminación	(Cacho *et al.*, 1999)
D. lanata Ehrh.	Cultivo de brotes	(Eisenbeig *et al.*, 1999)
D. lanata Ehrh.	Adición de precursores	(Fatima *et al.*, 2009)
D. purpurea L.	SIT	(Pérez-Alonso *et al.*, 2009)
D. lamarckii Ivan	Embriogénesis somática	(Verma *et al.*, 2011)
D. lanata Ehrh.	Elicitación/SIT	(Pérez-Alonso *et al.*, 2012)
D. purpurea L.	Adición de precursores Elicitación	(Patil *et al.*, 2012)

Los objetivos principales de las mismas han sido: determinar la influencia de diversos factores, en la producción de biomasa y de cardenólidos tales como el efecto de componentes del medio de cultivo, reguladores del crecimiento, sustancias químicas de naturaleza diversa y precursores biosintéticos, condiciones del ambiente como fotoperíodo, temperatura, pH, entre otros. Por otra parte se usaron explantes de diferentes orígenes (raíz, tallo, hoja, antera, hipocotilo) y numerosas especies, siendo *D. purpurea* y *D. lanata* las más estudiadas por su importancia económica (Sales *et al.*, 2011).

2.3 Métodos de regeneración

Los métodos de regeneración, consisten en un grupo de eventos morfogenéticos, que pueden probablemente ser logrados en todas las especies de plantas si se proveen las condiciones ambientales, el explante y medio de cultivo apropiados. Los principales son la embriogénesis somática y la organogénesis. La embriogénesis somática puede definirse, como el proceso a través del cual, las células somáticas se pueden diferenciar en embriones somáticos (Arnold, 2008).
Se ha descrito en la literatura que el desarrollo de embriones somáticos, sigue una ruta similar al de los cigóticos, provenientes de semillas. Sin embargo, para algunas especies la variación somaclonal es un problema. En general el uso de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y una fase de callo prolongada, son responsables de la inducción de variación genética y epigenética (Arnold, 2008).

2.3.1 Organogénesis

La organogénesis es otro de los principales métodos de regeneración, esta puede clasificarse en indirecta y directa. La primera tiene lugar cuando la producción de brotes, ocurre mediante una fase intermedia de formación de callos. Mientras que la organogénesis directa, consiste en la propagación a partir de explantes, sin la presencia de meristemos preexistentes, ni fases intermedias de callo (George, 2008).

Este proceso se induce artificialmente por medio de hormonas vegetales o reguladores del crecimiento. Generalmente se emplean auxinas por ejemplo: Ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA), 2,4-D y citoquininas como 6-bencilaminopurina (6-BAP), Zeatina, tidiazurón (TDZ). En estos casos, la proporción de las últimas debe ser mayor que los de la primera (George *et al.*, 2008).

La respuestas *in vitro* pueden variar debido a múltiples factores. Entre ellos la proporción de fitohormonas endógenas, la biodisponibilidad de reguladores del crecimiento, la edad fisiológica del explante, así como por la especie de que se trate (Taiz y Zeiger, 2006).

2.3.2 Organogénesis directa en *Digitalis*

La organogénesis directa se ha logrado con éxito en algunas especies el género *Digitalis* como *D. davisiana*, *D. trojana*, *D. nervosa* y *D. purpurea.* En estas investigaciones se ha variado el medio de cultivo basal, tipo de explante; también se han empleado diferentes reguladores del crecimiento (tabla II).

Tabla II. Condiciones de cultivo más exitosas empleadas en la organogénesis directa de *Digitalis* spp.

Especie	Medio de cultivo basal	Reguladores del crecimiento	Fuente de Explante	Brotes por explante/Tiempo (semanas)	Referencia
D. davisiana	LS, sacarosa 3% y agar 0,7%, pH 5,7	IAA 0,25 mg/L TDZ 0,5 mg/L	hipocotilo	7,8- 8,1/ 6	(Gurel *et al.*, 2010)
D. trojana	MS, sacarosa 3% y agar 0,8%, pH 5,75	ANA 0,1 mg/L 6-BAP 3,0 mg/L	hoja	28/12	(Çördük y Akı, 2010)
D. nervosa	MS , sacarosa 3% y agar 0,8%, pH 5,9	ANA 0,1 mg/L 6-BAP 3 mg/L	hipocotilo, cotiledón, radícula	6-9/5	(Karimi y Kazemitabar, 2013)
D. purpurea	MS, sacarosa 3% 2,8 g mg/L de gelificante	ANA 0,1 mg/L TDZ 1 mg/ L	hoja	-/6	(Li *et al*., 2014)

Mediante la organogénesis directa se puede minimizar la variación somaclonal en los procesos de transformación, al prescindir de la fase de callo, que también puede intervenir en el proceso de regeneración (Verma y Ajay, 2011). Sin embargo, es importante realizar estudios moleculares que comprueben la fidelidad genética de las plantas obtenidas a través de esta tecnología, ya que también

puede inducir variabilidad genética debido al propio cultivo de tejidos y al empleo de reguladores del crecimiento.

2.4 Marcadores genéticos moleculares

Los marcadores moleculares están fundamentados en la detección de polimorfismo, a nivel de macromoléculas dentro de la célula. Sin embargo, recientemente se agrupan bajo este nombre, los marcadores de ADN solamente. Sus principales aplicaciones incluyen caracterización de germoplasma, diagnóstico genético, estudios de organización del genoma, análisis filogenético, entre otros. Dentro de los marcadores moleculares se encuentran los basados la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*). Estos ofrecen el potencial de reducir el tiempo, esfuerzo y gastos requeridos en la tecnología con marcadores moleculares (Pushpendra *et al.*, 2002).

2.4.1 Marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Los Marcadores de ADN Polimórfico Amplificado al Azar o RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*), son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN, empleando PCR (Williams *et al.*, 1990). La técnica pertenece a la primera generación de marcadores moleculares, disponible desde finales de 1980 (Pushpendra *et al.*, 2002). Es una de las técnicas moleculares consideradas como *multilocus*, ya que permite el análisis de varios *loci* a la vez. Se basa en la posibilidad estadística de que se presenten sitios complementarios a un iniciador de diez bases, a lo largo del genoma (Castro-Félix *et al.*, 2006).

La hibridación ocurre si las secuencias homólogas se encuentran en cadenas opuestas del ADN, a una separación no mayor de unos cientos de pares de bases entre ellas, se puede amplificar múltiples veces a través de la PCR y ser visualizado en un gel de electroforesis. Cualquier alteración en los nucleótidos del ADN molde se evidenciará por la variación en el tamaño del *locus* amplificado o por la ausencia del mismo (Zambrano *et al.*, 2003).

Esta técnica provee un método muy eficiente para detectar variaciones genéticas incluso para organismos relacionados, tan cercanos como dos líneas isogenéticas. Solo requiere muestras con

poca cantidad de ADN, no involucra radioactividad y es bien rápida de realizar (Lakshmanan *et al.*, 2007).

Sin embargo, al ser marcadores dominantes con respecto a los marcadores codominantes tienen la desventaja del bajo poder discriminante de los individuos, dada la imposibilidad o poca fiabilidad en la diferenciación del genotipo homocigoto dominante del heterocigoto cuando hay presencia de productos de amplificación. Por esta razón, en el análisis de los datos adquiere vital importancia encontrar la mejor relación entre las medidas de similitud o disimilitud entre individuos y la técnica de agrupamiento que minimice esta pérdida de información (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2011).

La técnica RAPD ha sido exitosamente usada para evaluar la fidelidad clonal de *Piper* spp., *Musa* spp. (Harirah y Norzulaani, 2006) así como otras especies de interés medicinal como *Hypericum perforatum* L. (Goel *et al.*, 2009a). Otra gran ventaja de esta técnica, es que permite el análisis de la variación genética, sin la necesidad de secuenciar o caracterizar el genoma de interés. Su uso en forma adecuada, permite resolver, una gran cantidad de marcadores neutros y detectar polimorfismo (Castro-Félix *et al.*, 2006).

Los RAPDs pueden ser muy importantes en la identificación y caracterización, además puede ser empleada para detectar sucesos de introgresión genética interespecíficos. Han sido empleados eficientemente en la determinación de la variación interespecífica entre seis especies del género *Digitalis* (*D. obscura*, *D. lanata*, *D. grandiflora*, *D. purpurea*, *D. thapsi* y *D.minor*) así como en *D. excelsior*, híbrido entre *D. purpurea* y *D. grandiflora*. Esta técnica permitió corroborar la clasificación taxonómica realizada por Werner en 1965, basada en criterios morfológicos (Sales *et al.*, 2011). En *D. obscura*, se empleó con el objetivo de determinar la estabilidad genética de plantas cultivadas *in vitro* durante largos períodos de tiempo (Gavidia *et al*., 1996).

2.4.2 Otros marcadores moleculares

Existen otras técnicas moleculares empleadas en el análisis de la estabilidad genética; entre ellas destaca la ‘Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico’ (del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*) o AFLP (Vos *et al.*, 1995), se conoce como un sistema de marcadores moleculares rápido, durante el cual en cada reacción se puede realizar el cribado de polimorfismos de gran cantidad de *loci* en un genoma, incluyendo el ADN no expresado (Engelborghs *et al.*, 2000).

Ha sido empleada en numerosos estudios sistemáticos de plantas como *Lactuca sativa* L., *Glycine max* L., *Oryza sativa* L., *Bambusa* spp., el género *Musa* (Wong *et al.*, 2002). También en especies propagadas *in vitro* como *Solanum tuberosum* L. (Sharma *et al.*, 2007).

Sin embargo, las enzimas de restricción son muy sensibles a los componentes de la planta, tales como polisacáridos, celulosa, fenoles, por lo que se requiere ADN con alto nivel de pureza (Keb-Llanes *et al.*, 2002). Después de la separación, de los fragmentos de restricción amplificados, por medio de una electroforesis, se obtiene una 'huella dactilar', característica del organismo (Demey *et al.*, 2004).

Los marcadores de Repetición de Secuencias Inversas Marcadas o ISTR (del inglés *Inverse Sequence-Tagged Repeat*), son otros marcadores basados en secuencias de transposones y retrotransposones. Estos elementos genéticos se mueven dentro del genoma de un organismo, reinsertándose en regiones diversas del mismo, los segundos lo hacen con un intermediario de ARN. Existen en la mayoría de las plantas y son secuencias que se auto-replican y reinsertan en diferentes partes del genoma (Rohde, 1996).

El análisis que permite esta metodología, está fundamentado en la amplificación selectiva mediante PCR de las mencionados secuencias del ADN genómico. Esto se logra empleando cebadores delanteros y traseros de 15 a 21 pares de bases, diseñados como copias de elementos repetitivos universalmente distribuidos en los eucariontes. Los marcadores se producen aleatoriamente y generan un gran número de bandas sin requerir la manipulación del ADN después de aislado (Demey *et al.*, 2004).

Son comparables a los AFLP con respecto a su polimorfismo y al número de *loci* detectados en cada evaluación. Aunque es más barata y puede realizarse en menor tiempo, al prescindir de las fases de restricción, ligazón y pre-amplificación. Permite obtener una "huella dactilar" genómica de cada organismo analizado, por lo que sus aplicaciones incluyen: estudios de genética poblacional, caracterización de patógenos, sistemática, filogenia de diversos grupos taxonómicos (Salas, 2010).

2.4.3 Análisis de clúster

Los datos obtenidos a través de las electroforesis, se procesan comúnmente en matrices. Posteriormente se les realizan diversos análisis estadísticos que permiten la correcta interpretación de los resultados obtenidos. Uno de los primeros pasos a efectuar es la selección de las Unidades Básicas de Caracterización (UBCs), estas son la unidad básica del objeto (planta, animal o entidad) que se va a describir y que a su vez será empleada para lograr el objetivo de la caracterización. Después se procede a realizar el análisis, uno de los más empleados es el análisis de clúster, método matemático de estadística multivariada o estadística multivariante. Es principalmente utilizado para la formación de grupos de UBCs con características similares a partir de las similitudes o disimilitudes que se presentan en *n* características evaluadas. Se realiza a través de dos métodos interrelacionados: el cálculo de los índices de similitud o de disimilitud entre UBCs (aplicados de acuerdo a la naturaleza de los datos) y el método de aglomeración. Esto permite a partir de los índices de similitud o disimilitud generar gráficas de árbol o dendrogramas, donde el investigador puede tener de una manera resumida el parecido que presentan los grupos de UBCs (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2011).

Los datos obtenidos de la interpretación de las electroforesis, son de doble estado, de presencia o ausencia de la banda en el gel. Esta respuesta presentan una distribución estadística binomial y el cálculo de sus estadísticos básicos debe realizarse con las fórmulas diseñadas para esta distribución. El índice más adecuado a utilizar es la fórmula desarrollada por Dice en 1945 (2a/2a+b+c), donde: *a,* es que los dos individuos tengan presente la misma característica; *b,* es que el primero la presente y el segundo no; *c*, que el segundo presente la característica y el primero no (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2011).

En este tipo de investigación se emplea como método de aglomeración el UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method Arithmetic average*) (Sokal y Michener, 1958), uno de los más utilizados. El re-cálculo de la matriz de distancias o de índices de similitud se hace promediando los valores de las distancias o de los índices de similitud de las UBCs del nudo o grupo con el de las otras UBCs que es lo matemáticamente más lógico para el recálculo de la matriz (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2011). La selección adecuada de los estadísticos, brinda robustez y seguridad a la interpretación realizada de los datos obtenidos.

2.5 Aplicaciones de la Organogénesis directa

La organogénesis directa es un método rápido, menos costoso y seguro de propagar masivamente plantas (Serrano, 2005). Razón por la cual esta es una de sus principales aplicaciones. Su uso se ha extendido a los trabajos de transformación genética, pues al disminuir el tiempo de los tratamientos con reguladores del crecimiento y prescindir de la fase intermedia de callos, se minimiza la probabilidad de formación de quimeras y el tiempo de cultivo.

2.5.1 Transformación genética

La transformación genética o Ingeniería Genética, tecnología conocida como del ADN recombinante, permite la introducción de genes foráneos en plantas. A través de la misma se pueden desarrollar transgénicos con resistencia a patógenos, tolerantes a herbicidas, estrés abiótico, modificar la calidad nutricional de sus producciones, estudios de genómica funcional entre otras aplicaciones (Díaz *et al.*, 2004).

Recientemente la ingeniería metabólica, se ha convertido en una rama prometedora dentro de este campo. Se fundamenta en la manipulación de las rutas metabólicas, involucradas en la producción de compuestos de interés. Su empleo ha logrado aumentar la producción de metabolitos secundarios, de algunas plantas con interés farmacológico. En el género *Digitalis*, es una de las alternativas más esperanzadoras para aumentar la producción de cardenólidos (Sales *et al.*, 2011).

La transformación genética requiere de cuatro elementos básicos para que sea exitosa: un sistema de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas, vectores apropiados, un protocolo de transformación (con sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado) y por último, herramientas de análisis para detectar la presencia del transgen y sus productos (Díaz *et al.*, 2004).

Referente al cultivo de tejidos, es válido aclarar, que en la mayoría de las especies, se observa una importante influencia del genotipo en la respuesta al cultivo *in vitro*. Por ello, cuando se usa con fines de mejoramiento genético, es necesario desarrollar protocolos de regeneración. Estos nos permiten conocer la respuesta morfogenética del cultivar, ya que la variación somaclonal no deseada, es una variable latente (Serrano, 2005).

En los protocolos de transformación, se emplean genes de selección. Estos garantizan que solo las plantas que los contengan, puedan vivir bajo determinadas condiciones de cultivo. Generalmente

confieren resistencia a compuestos fitotóxicos, como herbicidas y antibióticos. En otros casos, la selección estará dada por la posibilidad de utilizar diferencialmente un sustrato. Un ejemplo es el gen *man A* de *Echerichia coli*, que permite utilizar a la manosa como fuente de carbono. En muchas casos la planta diana puede tener resistencia natural, por lo cual, se debe escoger cuidadosamente el agente selectivo y su concentración (Díaz *et al.*, 2004).

Una vez que se transforman las células vegetales los protocolos para la selección *in vitro* generalmente se basan en un esquema básico de selección, directa o por pasos. La directa es hecha con la concentración mínima letal del agente selectivo. La selección por pasos, utiliza un incremento gradual y progresivo del agente selectivo, hasta alcanzar la concentración mínima letal. Seleccionar entre una u otra estrategia, así como el agente selectivo a emplear, precisa de estudios preliminares, donde se determina la reacción del tejido de la planta frente al agente selectivo.

2.5.2. Transformación sobre ADN nuclear

Para lograr la transformación sobre el ADN nuclear se emplean generalmente como marcadores de selección el gen *neo* y el *hpt*. El gen *neo* (*nptII*) tuvo su origen en el transposón Tn5 de *Klebsiella pneumonia*. La enzima neomicina fosfotransferasa II (NPTII), codificada por este detoxifica a antibióticos aminoglucósidos (neomicina, kanamicina, paramomicina y geneticina o G-418).

También es generalizado el uso del gen de la *higromicina fosfotransferasa* (*hpt*) el cual confiere resistencia a la higromicina B, un aminoglucósido tóxico a la célula vegetal debido a que inhibe la síntesis proteica (Padilla y Burgos, 2010).

En el género *Digitalis* se han desarrollado protocolos de transformación genética sobre ADN nuclear. La selección se ha realizado con kanamicina en diversa especies del género, *e.g., D. purpurea* (Saito *et al.*, 1991, Li *et al.*, 2014), *D. lanata* (Lehmann *et al*., 1995) y *D. minor* (Sales *et al*., 2002, Sales *et al*., 2007).

2.5.3. Transformación sobre cloroplastos

La transformación genética de cloroplastos en plantas, requiere sucesivas rondas de propagación y selección. Permiten primeramente recuperar células heteroplastídicas, las cuales también pueden contener plastidios no transformados y luego células homoplastídicas, solamente con plastidios

quiméricos y eventualmente plantas homoplastídicas no quiméricas. La regeneración desde células homoplastídicas facilita la producción de plantas homoplásticas (Day y Michel, 2011).

Cada una de estas selecciones se realiza en un medio con el respectivo agente selectivo. El gen *aadA* es uno de los preferidos, ya que confiere resistencia a la espectinomicina y a la estreptomicina. El mismo es clasificado como dominante porque su mecanismo de acción procede mediante la inactivación de los antibióticos. La dominancia es de particular relevancia para la transformación de plastomas altamente poliploides. Los marcadores dominantes incrementarán la frecuencia de transformación, puesto que ellos ejercen su efecto alrededor de las etapas tempranas de selección incluso aunque estén presentes en la minoría de los plastomas (Day y Michel, 2011). También dentro de los marcadores de selección primaria usado en la transformación de plastomas, se encuentran *neo* y *aph A-6*, que garantizan la resistencia a la kanamicina (Lutz *et al.*, 2007).

En el caso de la selección no letal con espectinomicina, las células no transformadas sobreviven pero con blanqueamiento; mientras que los sectores transformados son verdes y forman brotes. La espectinomicina inhibe la proliferación celular en *Solanaceae, Nicotiana tabacum* L. pero no en *Brassicas* (Day y Michel, 2011). Por lo cual es necesario antes de ser empleado como agente selectivo determinar la concentración mínima letal en cada especie. En algunos casos un marcador conferirá un fenotipo que no es lo suficientemente fuerte para la selección primaria después de la transformación, pero puede usarse para una selección secundaria, una vez establecida en una proporción suficiente de plastomas transformados.

La transformación de cloroplastos ha encontrado sus aplicaciones principales en la producción de fármacos (Loössl y Mohammad, 2011), biocombustibles (Rogalski y Helaine, 2011) y se ha realizado en plantas y algas como las del género *Chlamydomonas* (Day y Michel, 2011).

El estudio de métodos de regeneración y la confirmación de la estabilidad genética de las plantas obtenidas así como el desarrollo de esquemas de selección, serán de gran importancia para la propagación *in vitro* y el mejoramiento genético de la especie *D. purpurea* y el género *Digitalis*.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Biología Molecular y de Metabolitos Secundarios del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Los experimentos se realizaron en el período comprendido entre junio del 2014 y abril del 2015.

Técnicas y procedimientos generales de trabajo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron esterilizados en autoclave a 121 ºC y 1,2 $Kg.cm^{-2}$ de presión, por 20 min, según la información técnica de la firma SIGMA (1991). Se dosificaron 30 mL del mismo en frascos de vidrio con tapa plástica de 250 mL. Los platos metálicos se esterilizaron a 180 ºC en estufa por dos horas previo a su uso. Las pinzas y bisturíes se mantuvieron en condiciones asépticas con un esterilizador de bolas de vidrio. Las puntas para micropipetas y tubos de plástico se esterilizaron en autoclave a 121 ºC y 1,2 $Kg.cm^{-2}$ de presión, por 40 min y se pusieron a secar en estufa a 70 ºC previo a su empleo. El manejo del material vegetal (establecimiento y sub-cultivos), se realizó en la cámara de flujo laminar, siguiendo las normas de bioseguridad correspondientes.

Medios de cultivo para tejidos vegetales

Para el cultivo *in vitro* se utilizó como medio de cultivo basal la siguiente formulación: 100 % sales inorgánicas propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 1,0 mg/L de tiamina; 100 mg/L de mio-inositol; 30 g/L de sacarosa y 3,0 g/L de gelificante Gelrite®. El pH fue ajustado a 5,7 con NaOH 0,5 N o HCl 0,5 N antes de la esterilización del medio de cultivo en autoclave vertical (Raypa) a 121ºC y 1,2 $Kg.cm^{-2}$ de presión.

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* obtenidas a partir de semillas de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold. Las semillas fueron adquiridas en la empresa Pharmasaat GmbH (Alemania). Estas fueron desinfectadas según el protocolo propuesto (Erdei *et al.*, 1981). Las mismas fueron colocadas para su germinación en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, a 27±2 ºC de temperatura. Para la germinación se empleó el medio de cultivo

propuesto por Erdei *et al.* (1981) en estado semisólido, con las siguientes modificaciones: sales MS suplementadas con 1,0 mg/L de tiamina y 30 g/L de sacarosa. Se utilizaron frascos de policarbamato de 500 mL de capacidad a los cuales se añadieron 50 mL de medio de cultivo. Las plántulas obtenidas crecieron hasta alcanzar una altura aproximada de 4,0 cm (fig. 1). Las hojas y raíces de estas fueron cortadas y subcultivadas cada 28 días hasta ser utilizadas en los experimentos posteriores. Los brotes fueron subcultivados en el medio de cultivo propuesto por Erdei *et al.* (1981) modificado, compuesto por sales MS (100%) suplementado con 1,0 mg/L de tiamina; 100 mg/L de mio-inositol; 1,0 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP); 0,1 mg/L de ácido indol-3-acético (AIA) y 30 g/L de sacarosa, el cual a partir de este momento se denominará MMb (Medio de cultivo de Multiplicación de brotes). Se emplearon frascos de policarbamato de 500 mL de capacidad a los cuales se le añadieron 70 mL de medio de cultivo semisólido y en cada frasco se colocaron cinco explantes.

Figura 1. Plántulas de *D. purpurea* obtenidas a partir de semillas en medio semisólido de germinación.

3.1 Morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold

El presente experimento se realizó con el objetivo de corroborar la influencia de los reguladores del crecimiento: Ácido naftalenoacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (6-BAP) en el proceso de morfogénesis *in vitro* de *D. purpurea.* Para su realización se emplearon los resultados preliminares obtenidos por Fernández (2014). Se utilizaron frascos de cultivo de vidrio con tapa

plástica de 250 mL, los cuales fueron esterilizados mediante autoclave.

Previo a la esterilización, el medio de cultivo basal fue enriquecido con diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento: ácido naftalenoacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (6-BAP), según se refleja en la tabla III conformándose 12 tratamientos.

Tabla III. Concentraciones de reguladores del crecimiento empleados para la regeneración de brotes de *D. purpurea* (modificado de Fernández, 2014).

ANA+6-BAP (mg/L)
0,0+0,0
0,1+0,0
0,5+0,0
0,0+1,0
0,0+3,0
0,0+5,0
0,1+1,0
0,1+3,0
0,1+5,0
0,5+1,0
0,5+3,0
0,5+5,0

Se emplearon segmentos foliares de plantas obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro* entre siete y diez subcultivos, con un área de 1,0 cm^2 (fig. 2). Estos fueron colocados sobre su superficie adaxial en el medio de cultivo semisólido. Se cultivaron cinco segmentos en cada frasco, a razón de 6,0 mL de medio de cultivo por cada uno. Los mismos se incubaron en cámara de crecimiento

con luz natural con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de 68-72 µmol.m^{-2}.s^{-1} y temperatura controlada de 27±2 ºC.

Figura 2. Segmento foliar de planta *in vitro* de *D. purpurea* con un área de 1,0 cm^2.

Para describir el proceso morfogenético se realizaron evaluaciones semanales. Las obtenidas a los 28 y los 42 días se procesaron estadísticamente. En ellas se determinaron varios aspectos morfológicos como: la formación callos; el número de brotes por explante, el porcentaje de explantes que formaron brotes, la formación de raíces y la coloración de los explantes, para lo cual se utilizó el código hexadecimal de colores (http://www.cwp.linet.edu/cwis/cwp.html).

Las plantas obtenidas a los 42 días de cultivo fueron transferidas al MMb. Se emplearon frascos de policarbamato de 500 mL de capacidad a los cuales se le añadieron 70 mL de medio de cultivo semisólido y en cada frasco se colocaron cinco explantes. Los brotes se cultivaron en cámara de crecimiento con luz natural con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de 68-72 µmol.m^{-2}.s^{-1}, a 27±2 ºC de temperatura. Las plantas fueron subcultivadas tres veces cada 28 días en el medio de cultivo propuesto para su multiplicación.

Luego de este período, fueron caracterizadas para determinar variaciones morfológicas en cuanto a las variables evaluadas. Las variables cuantitativas y cualitativas fueron:

Variables cuantitativas:

-Altura de la planta (cm)

-Número de hojas y tallos

Variables cualitativas:

-Presencia de raíces

-Color de la hoja

-Forma de la hoja Se determinó a partir de la relación entre el largo y ancho de la hoja y clasificada de la siguiente forma:

Lanceolada: 3:1

Escasamente ovada: 2:1

Ovada: 1,5:1

Ampliamente ovada: 1,2:1

Cordiforme: 1:1

3.1.1 Análisis de la estabilidad genética de las plantas regeneradas

Para comprobar la estabilidad genética entre las líneas obtenidas durante la regeneración vía organogénesis directa se emplearon: Marcadores de ADN Polimórfico Amplificado al Azar o RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*). A través de los cuales se establecieron perfiles genéticos para cada línea. Las muestras se tomaron de plantas regeneradas *in vitro* con dos subcultivos de edad.

Todas las reacciones en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*) se efectuaron en un volumen final de 30 µL, con una concentración de cebadores de 50 ng/ µL, dNTPs 200 µM, $MgCl_2$ 1,5 µM y 1 U de TopTaq ADN polimerasa (QIAGEN, Alemania). En el control de contaminación se sustituyó el ADN por un volumen equivalente de agua. Se utilizó un termociclador Mastercycler epgradient (Ependorff, Alemania) con el sistema comercial TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Extracción del ADN vegetal

Se tomaron fragmentos foliares de 12 plantas regeneradas *in vitro* con el tratamiento que presentó mejores resultados en la regeneración, entre los descritos en el acápite 3.1, también se tomaron segmentos de plantas germinadas de semillas subcultivadas en medio de multiplicación, los cuales se emplearon como control en el siguiente experimento (3.1.1.2). La extracción del ADN vegetal se realizó según el protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004), con algunas modificaciones, las cuales son explicadas a continuación.

Para 100 mg de tejido triturado en nitrógeno líquido, se añadió 1 mL de tampón de extracción y se mezcló vigorosamente. Se incubaron las muestras a 55 ºC por 30 min, transcurrido dicho tiempo se colocaron en hielo por 5 min. Posterior a la incubación las muestras se centrifugaron a 3 200 g por 5 min a 4 °C, tomándose el sobrenadante, el cual se trató con ARN asa I (200 µg/mL volumen final) por 15 minutos a 37 ºC.

El siguiente paso fue añadir igual volumen de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) y mezclar bien. Se centrifugó a 12 857 g durante 10 min a 4 ºC y transfirió la fase acuosa; a la cual se le adicionó igual volumen de isopropanol helado; inoculándose a -80 ºC por 60 min. Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 18 500 g por 15 min a 4 ºC. *A posteriori* se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron a 9 850 g por 15 min a 4 ºC. Las muestras secas se disolvieron en 30 µL de agua estéril.

Una vez obtenido el ADN genómico vegetal, se comprobó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (m/v) (TBE 1 X: Tris-HCl 0,89 M, EDTA 0,02 M y ácido bórico 0,89 M) y fue visualizado con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) bajo luz UV. A través de las relaciones de absorbancia A260/A280 se determinó la contaminación con proteínas y A260/A230 la presencia de polifenoles y polisacáridos. Estas fueron determinadas mediante un espectrofotómetro Biophotometer (Eppendorf, Alemania). El ADN purificado se almacenó a -20°C.

3.1.1.2 Marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

El procedimiento para la obtención de los RAPD se realizó de acuerdo al método desarrollado por Williams *et al.* (1990). En este procedimiento se empleó ADN en una concentración de 100 ng/µL y consistió en una PCR cuya reacción siguió el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 ºC durante 4 min, 35 ciclos (94 ºC por 30 s, 36 ºC por 30 s, 72 ºC por 1 min 30 s) y 72 ºC por 10 min, para la cual se utilizaron los cebadores descritos en la tabla IV en las combinaciones: 2, 2-3, 2-5, 2-6, 2-11, 3-5, 5, 5-11, 5-6, 6-11.

Tabla IV Cebadores empleados en la determinación de marcadores de tipo RAPD

Cebador	Secuencia de nucleótidos
2	5´-GAGGGACCTC-3´
3	5´-GGGCTATGCC-3´
5	5´-GATGACCGCC-3´
6	5´-ACCGCGAAGG-3´
11	5´-CTTCCCTGTG-3´

Los resultados obtenidos de la PCR fueron corridos en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (m/v) a 110 V por 90 min, en tampón TBE 1 X y teñidos en Bromuro de etidio 0,5 µg/mL para su posterior observación bajo luz UV.

3.1.1.3 Análisis y procesamiento de los datos obtenidos mediante los marcadores moleculares

Los patrones de bandas obtenidos de las electroforesis de los RAPDs, se introdujeron en una matriz, en la que 0 representó la ausencia de bandas, 1 la presencia y 999 la presencia dudosa. Las variaciones entre muestras se asumieron como bandas polimórficas (*locus* polimórfico) y la presencia de una banda en todas las muestras como bandas monomórficas (*locus* monomórfico).

Se emplearon como Unidades Básicas de Caracterización (UBCs) las líneas regeneradas y las que le dieron origen a estas. Se les realizó un análisis de clúster para el cual se usó el índice Dice (1945) y el método de aglomeración empleado fue el UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method Arithmetic average*) (Sokal y Michener, 1958).

3.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de *D. purpurea* durante la organogénesis directa

El objetivo de este experimento fue determinar la concentración mínima letal de agentes selectivos a la cual los tejidos o las células no transformadas con genes de resistencia, mueren durante el proceso de regeneración vía organogénesis directa.

Se emplearon segmentos foliares de *D. purpurea* de 1 cm^2 de área, obtenidos a partir de plantas multiplicadas *in vitro* entre el séptimo y el décimo subcultivo. Se colocaron sobre la superficie adaxial en el medio de cultivo. El mismo estuvo compuesto por las sales MS suplementado con 1,0 mg/L de tiamina; 100 mg/L de mio-inositol; 30 g/L de sacarosa, 3,0 g/L de gelificante Gelrite®, 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP; con pH ajustado a 5,7 antes de su esterilización en autoclave. El medio de cultivo fue dosificado (30 mL) en frascos de vidrio con tapa plástica de 250 mL.

La solución stock de los antibióticos G-418 e higromicina B se preparó a una concentración de 50 mg/mL en agua destilada, mientras que la de espectinomicina y estreptomicina se preparó a una concentración de 100 mg/mL. Posteriormente, cada solución se esterilizó utilizando una membrana de filtración ANALIPORE® (OSI) de celulosa estéril, con una porosidad de 0,22 μm. El antibiótico fue adicionado posterior a la esterilización del medio de cultivo a una temperatura entre 40-45 ºC. Cada tratamiento se evaluó semanalmente durante 42 días, tiempo durante el cual no se realizaron subcultivos.

3.2.1 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación de cloroplastos

La espectinomicina y estreptomicina son antibióticos utilizados frecuentemente en sistemas de selección durante la transformación de cloroplastos. Estos fueron evaluados en la presente investigación a las concentraciones: 0 (Control), 25, 50, 75, 100, 300, 500 y 700 mg/mL, respectivamente. Se colocaron cinco segmentos por frasco a razón de 6 mL de medio por cada uno, cada tratamiento contó con 50 réplicas.

3.2.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación de ADN nuclear

Dentro de los antibióticos más utilizados en los sistemas de transformación del ADN nuclear se encuentran la higromicina B y la geneticina G-418. En este trabajo fueron evaluados diferentes concentraciones de los mismos. En el caso de la higromicina B se utilizaron 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/L, mientras que para la geneticina o G-418 fueron 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50. Para cada tratamiento se emplearon 50 réplicas.

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se efectuó a través del programa STATISTICA versión 10 para Sistema operativo Windows. Después de comprobar los supuestos de normalidad y heterogeneidad de los datos, se realizó una comparación de rangos múltiples mediante el test no paramétrico de Kruskal- Wallis, seguido de un análisis de medias *a posteriori*. Para el análisis clúster se empleó el programa NTSYSpe versión 2.10 (Exeter Software, 2000).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold

Durante la realización de este experimento los valores de contaminación microbiana fueron del 3,43%, en su mayoría ocasionada por hongos (fig. 3). Este es un valor aceptable (menos del 5%) en un proceso productivo y por tanto satisfactorio para esta investigación.

Figura 3. Contaminantes microbianos en el proceso de morfogénesis *in vitro* de *Digitalis purpurea* L.

Los segmentos empleados como control (sin reguladores del crecimiento), no manifestaron cambios morfogenéticos asociados a la formación de brotes, durante los 42 días que duró el experimento. Solo se pudieron observar fenómenos como crecimiento y ligeros tropismos. A los 15 días aparecieron señales de necrosis, las cuales finalmente se extendieron por todo el segmento foliar, quedando inviables para la regeneración (fig. 4).

Figura 4. Segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento a los 15 días.

Los segmentos foliares en medio de cultivo con reguladores del crecimiento, no mostraron cambios morfológicos durante la primera semana del cultivo *in vitro*. Principalmente se observaron tropismos (fototropismo positivo de la región adaxial) y la erección de los tricomas.

A los 15 días en los segmentos foliares a diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento se formaron meristemoides, en la nerviación central próxima al peciolo, así como en los bordes marginales previamente seccionados (fig. 5).

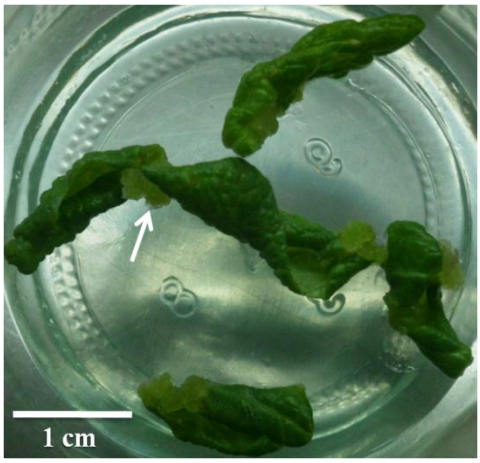
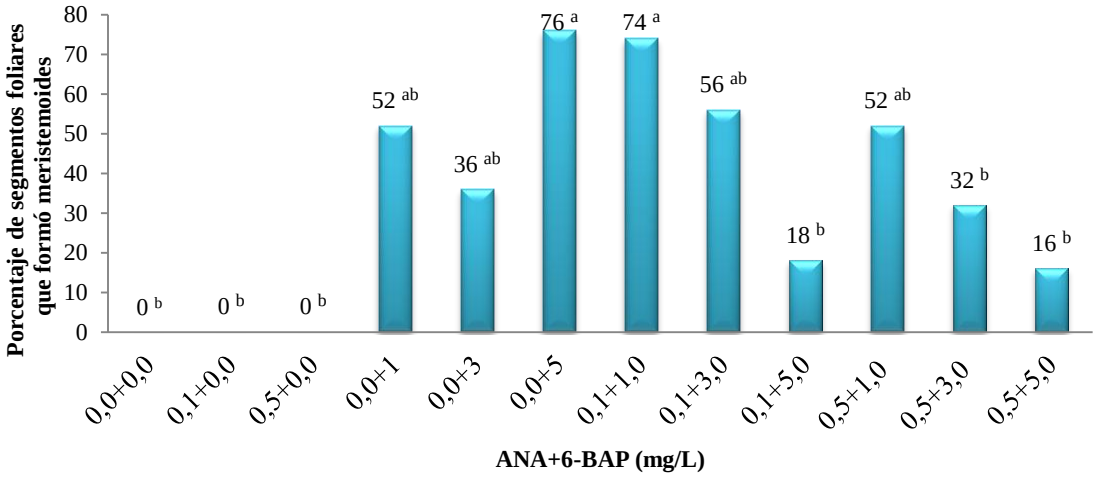


Figura 5. Meristemoides en la nerviación central próxima al peciolo en segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 15 días en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP.

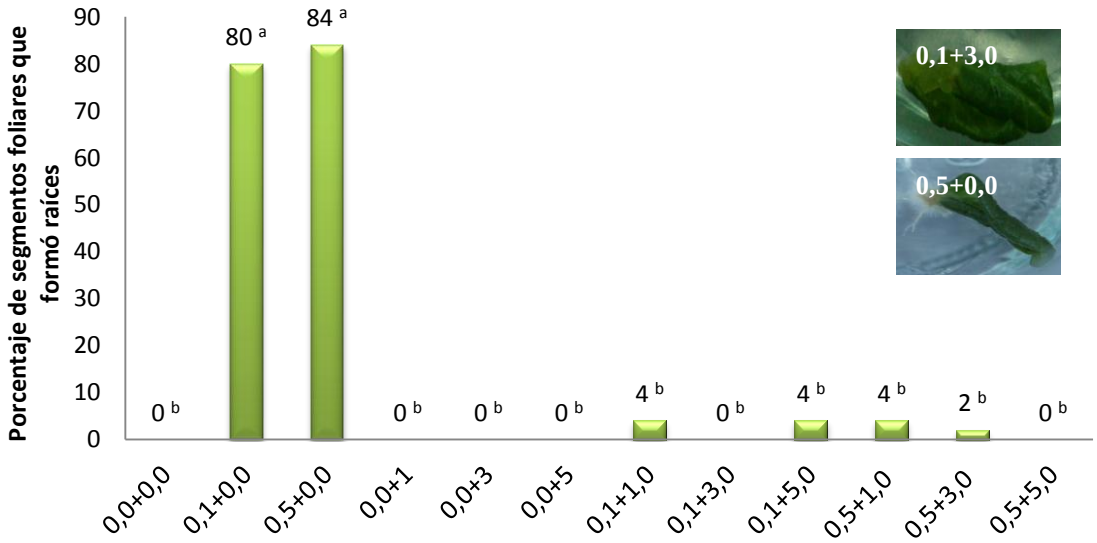
En el tratamiento con 0 mg/L de ANA y 5,0 mg/L de 6-BAP, se observó el mayor porcentaje en la formación de meristemoides por segmento foliar (76%), seguido de la combinación 0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP con un 74%. La menor respuesta (16%) se obtuvo con 0,5 mg/L de ANA con 5,0 mg/L de 6-BAP (fig. 6). El empleo de 0,1 y 0,5 mg/L de ANA sin combinar con 6-BAP produjo raíces en los explantes, 80 y 84% respectivamente (fig. 7).

Los primeros brotes pudieron observarse desde los 20 días con la ayuda del estereoscopio (fig. 8). Estos no necesitaron una fase intermedia de callo en su desarrollo, por lo cual se consideró un proceso morfogenético de regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa.



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 6. Efecto de la concentración (mg/L) de reguladores del crecimiento ANA+6-BAP en el porcentaje de segmentos foliares que formó meristemoides a los 15 días del cultivo *in vitro*.



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 7. Efecto de la concentración (mg/L) de reguladores del crecimiento ANA+6-BAP en el porcentaje de segmentos foliares que forman raíces a los 15 días del cultivo *in vitro*.

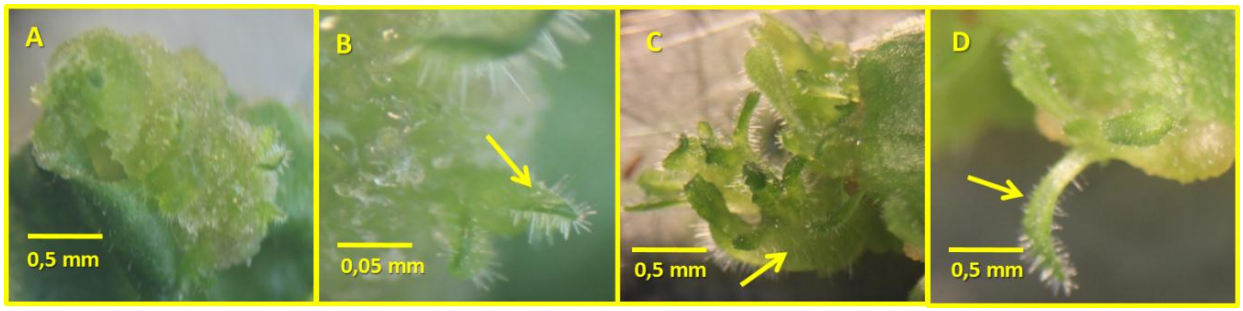
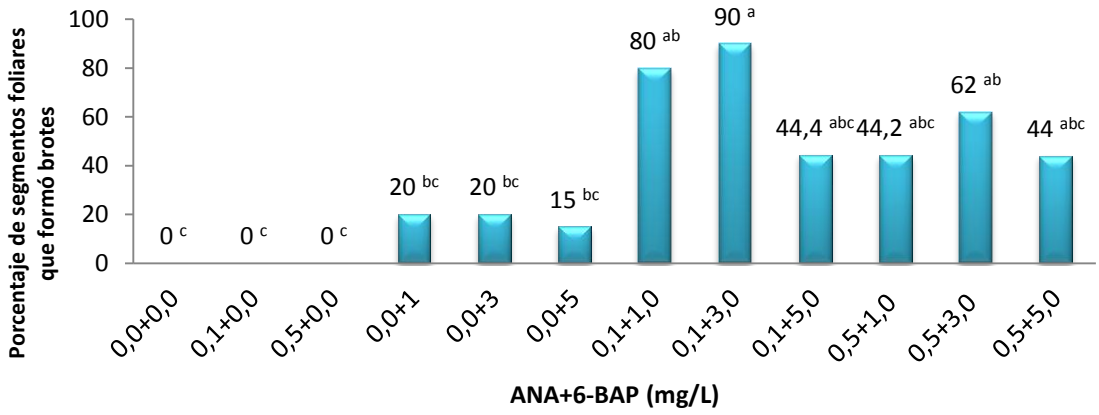


Figura 8. Formación de brotes a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 20 (A y B) y 25 (C-D) días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP, A meristemoide formado en la nerviación central, B primer par de primordios foliares, C pequeños tallos en crecimiento, D disposición en roseta de las hojas característico de la especie. La imagen ampliada fue tomada con una cámara digital (Canon EOS 600) ajustada al estereoscopio (Motic SMZ 140).

A los 28 días las variables porcentaje de segmentos que formó brotes, así comonúmero de brotes por segmento foliar mostraron diferencias entre tratamientos. Los mejores resultados en el porcentaje de segmentos foliares que formó brotes (90%) se obtuvieron con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP, seguido de 0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP con un 80% (fig. 9).

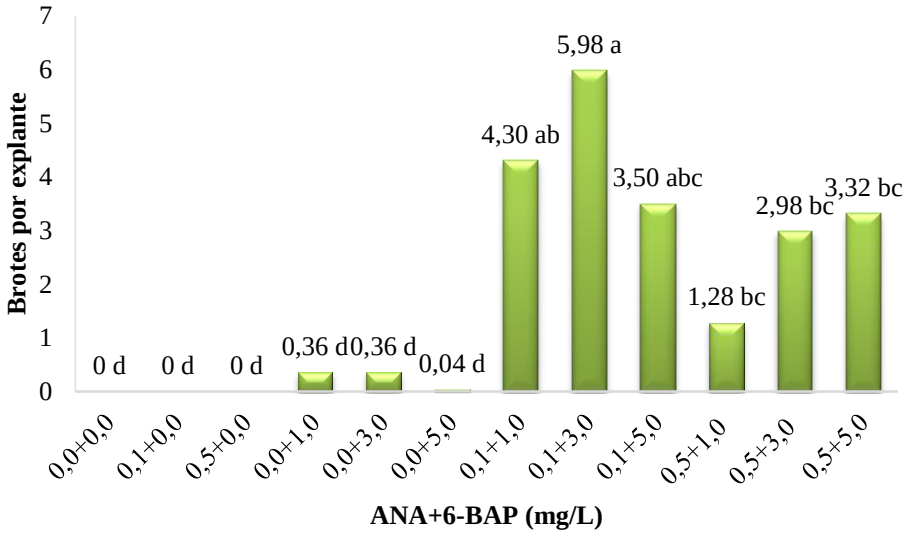


Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 9. Influencia de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP), en el porcentaje de segmentos foliares que formó brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 28 días.

El mejor resultado en la formación de brotes por explante se obtuvo con el tratamiento 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP (5,98), seguido de 0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP (4,30). Mientras que el menor número de brotes por segmento foliar (0,04) se obtuvo en las concentraciones de 0,0 mg/L de ANA y 5,0 mg/L de 6-BAP, considerando que en las combinaciones donde solo se empleó ANA no se formaron brotes (fig. 10).

Sin embargo las combinaciones de ANA y 6-BAP no mostraron diferencias estadísticas significativas ni en el porcentaje de segmentos foliares que formó brotes, ni en el número de brotes por segmento foliar a los 28 días (figs. 9 y 10).

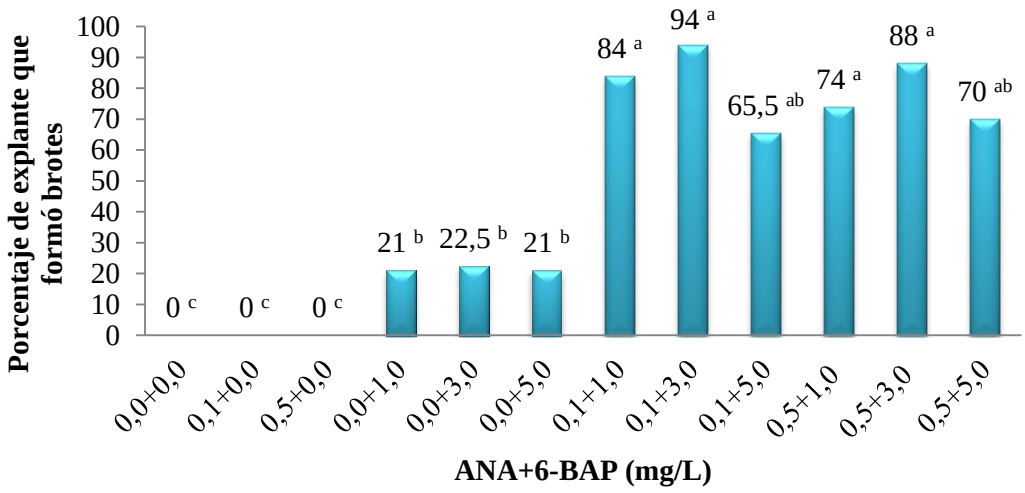


Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 10. Efecto de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP) en la formación de brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 28 días.

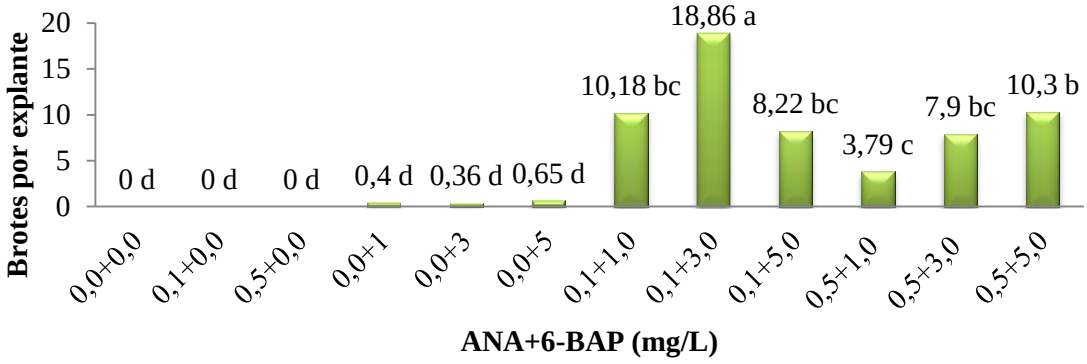
A los 42 días con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP un 96% de segmentos foliares formó brotes seguido de 0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP (84%), sin diferencias estadísticas significativas en cuanto a esta variable, entre todos los tratamientos en la que se combinaron ANA y 6-BAP (fig. 11). Sin embargo en cuanto a la formación de brotes por segmento foliar la combinación 0,1 mg/L de ANA con 3,0 mg/L de 6-BAP mostró diferencias estadísticas significativas con el resto de los tratamientos; según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

para p<0,05 y la comparación múltiple de medias *a posteriori*. Los segmentos foliares cultivados en esta combinación formaron 18,86 brotes por explante, los mejores resultados para dicha variable (fig. 12).



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 11. Influencia de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP), en el porcentaje de segmentos foliares que forman brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 42 días.



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 12. Efecto de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP), en la formación de brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 42 días

Este experimento permitió determinar los principales cambios morfogenéticos que ocurren en segmentos foliares de *D. purpurea*. Se concluyó que mediante un proceso de organogénesis directa en un medio de cultivo suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP a los 42 días de cultivo, se obtiene un promedio de 18,86 brotes en el 96% de los segmentos foliares.

Las plantas obtenidas fueron subcultivadas cada 28 días y al tercer subcultivo se compararon con las que le dieron origen (control). La figura 13 muestra las características fenotípicas de las plantas obtenidas en los diferentes tratamientos.

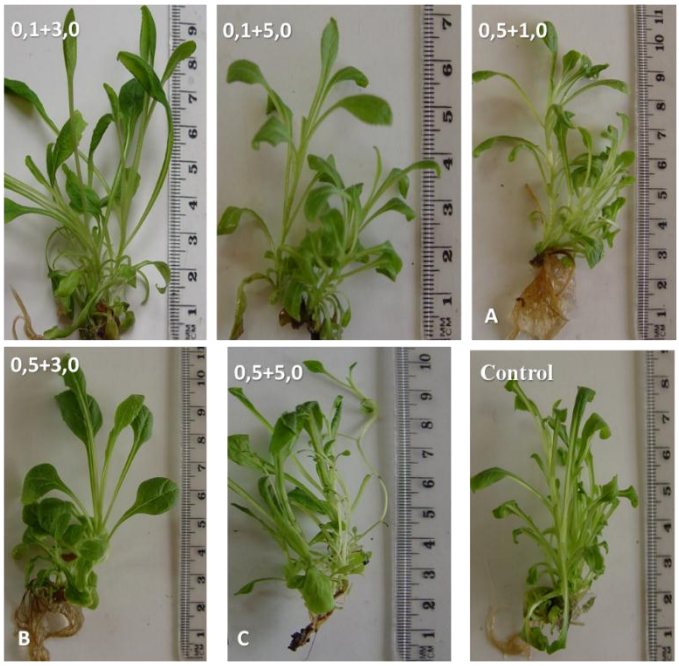
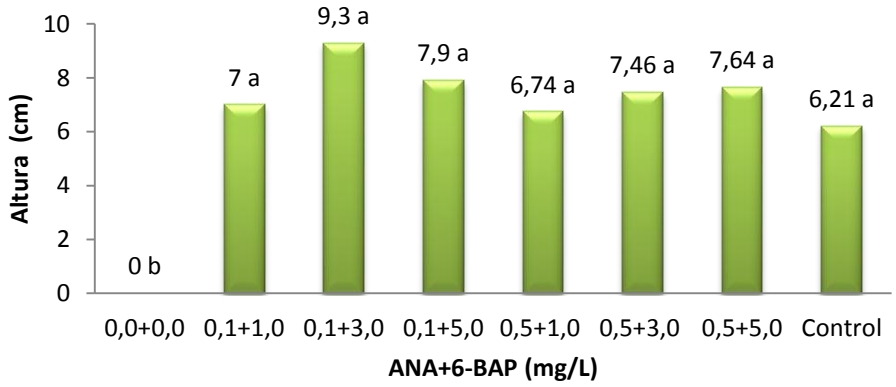


Figura 13. Plantas con tres subcultivos obtenidas del cultivo *in vitro* previo a la fase de aclimatización, **A** y **B** sistema radicular desarrollado, **C** tallos alargados, en algunos casos ausencia de raíz. Los números indican la concentración (mg/L) de ANA y 6-BAP empleadas en su obtención, el control proviene de semillas germinadas en condiciones *in vitro*.

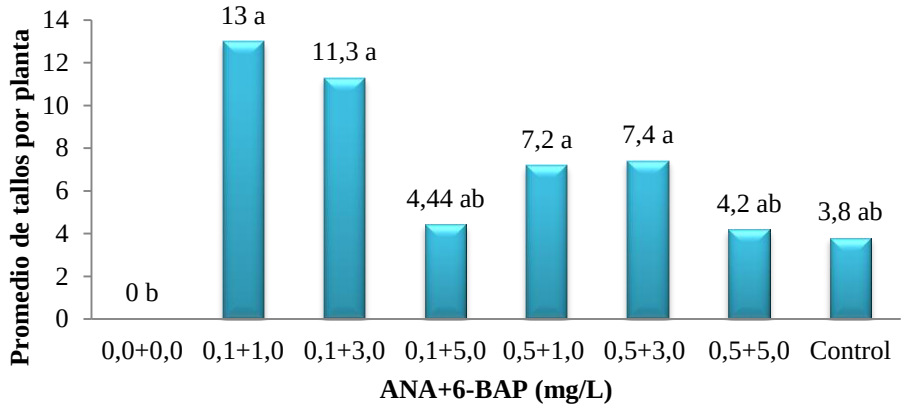
En las plantas control (fig. 13) las hojas fueron escasamente ovadas con bordes ligeramente dentados (fig. 14); se caracterizaron por tener el promedio de altura más bajo, 6,2 cm (fig. 15) y el menor número de tallos por planta (fig. 16). Con un sistema radicular bien desarrollado.

Figura 14. Plantas con tres subcultivos de edad obtenidas del cultivo *in vitro* a 0,1mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP, representan la diversidad de morfologías foliares observadas, **A** hojas cordiformes en planta hiperhídrica, **B** hojas escasamente ovadas con bordes dentados y **C** hojas lanceoladas con poco desarrollo del limbo.



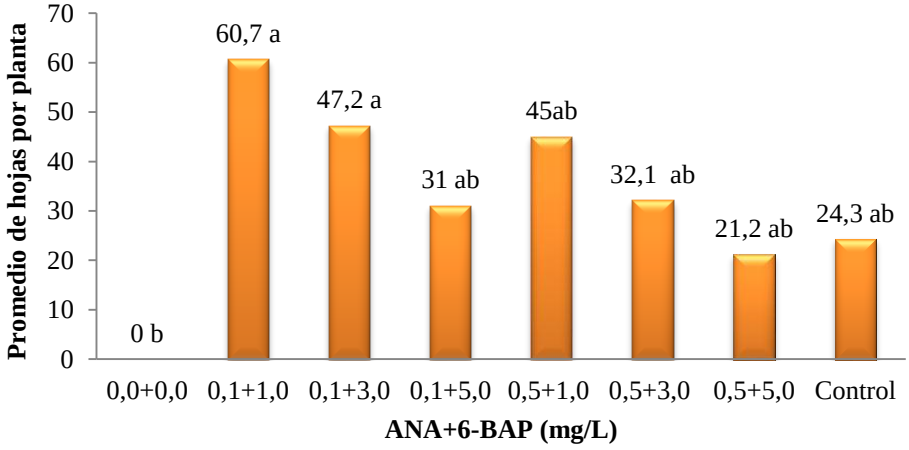
Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 15. Influencia de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP), en la altura de brotes de *Digitalis purpurea* L. con tres subcultivos. Control plantas germinadas de semillas en medio basal suplementado con 1,0 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de AIA



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 16. Influencia de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP), en el promedio de tallos por planta de *Digitalis purpurea* L. regeneradas *in vitro*, a los tres subcultivos. Control plantas regeneradas de semillas en medio basal suplementado 1,0 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de AIA.



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 17. Influencia de los reguladores del crecimiento (ANA+6-BAP), en el promedio de hojas por planta de *Digitalis purpurea* L., regeneradas *in vitro* con tres subcultivos. Control plantas regeneradas de semillas en medio basal suplementado 1,0 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de AIA.

En las obtenidas de la combinación 0,1mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP (fig. 13) se observaron diversidad de morfologías foliares. Algunas con hojas lanceoladas, poco desarrollo del limbo; en los casos de hiperhidricidad fueron cordiformes, la mayoría fue escasamente ovada (fig. 14). Presentaron el mayor número de hojas (60,7) y tallos (13) por plantas (figs. 15 y 16) con raíces cortas y poco abundantes.

Las plantas obtenidas del tratamiento con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP fueron las más altas (9,3 cm; fig. 14) con hojas lanceoladas, numerosos tallos (fig. 15) y abundante enraizamiento. Las del tratamiento con 0,1mg/L de ANA y 5,0 mg/L de 6-BAP tuvieron hojas escasamente ovadas, con bordes ligeramente dentados. Las plantas regeneradas a 0,5 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de 6-BAP y a 0,5 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP presentaron hojas escasamente ovadas y mejor desarrollo del sistema radicular que las anteriores. En algunos casos hubo ausencia de raíces o eran cortas y escasas.

De esta evaluación podemos concluir que las variables morfométricas empleadas (altura, número de tallos y de hojas por planta) permitieron la caracterización fenotípica de las plantas regeneradas y las que le dieron origen. No existieron diferencias estadísticas significativas entre las mismas, solo en encontraron aisladas plantas hiperhídricas. Por lo cual se puede decir que las concentraciones de reguladores del crecimiento empleadas no inducen alteraciones en la morfología de las plantas regeneradas.

4.1.1 Análisis de la estabilidad genética de las plantas regeneradas

Con las combinaciones de cebadores RAPD empleadas, se obtuvieron un total de 60 productos amplificados (fig. 18), de los cuales el 88,04% fueron monomórficas. Solo en tres de las combinaciones evaluadas se determinaron bandas polimórficas, sin patrón único de bandas polimórficas (Tabla V). Cuatro de las combinaciones de los cebadores utilizados no fueron efectivas para generar patrones de bandas.

Tabla V. Fragmentos amplificados por medio de marcadores tipo RAPD en plantas de *Digitalis purpurea* L. procedentes del cultivo *in vitro* de segmentos foliares y semillas.

Combinación de cebadores	Fragmentos Monomórficos	Fragmentos Polimórficos	Polimorfismo (%)	Fragmentos totales	Patrón de bandas único
2	7	0	0	7	0
2-3	8	0	0	8	0
2-5	11	2	15,38	13	0
2-6	6	0	0	6	0
5	12	3	20	15	0
5-3	7	4	36,36	11	0
Total	51	9	11,96	60	0

De modo general las combinaciones de cebadores fueron altamente monomórficas en un rango del 63,64 al 100 %, lo cual es un indicador de la alta homogeneidad genética entre las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* mediante el empleo de 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. El cebador 5 sin combinar permitió identificar el mayor número de bandas (15 fragmentos), mientras que las parejas de cebadores 2-6 identificaron el menor número de bandas (6 fragmentos).

Las parejas de oligonucleótidos 5 y 5-3 con 15 y 11 fragmentos de amplificación en cada una, revelaron los mayores porcentajes de polimorfismo (20 y 36,36 % respectivamente). Sin embargo el 85% de los fragmentos identificados fue compartido por todas las plantas estudiadas.

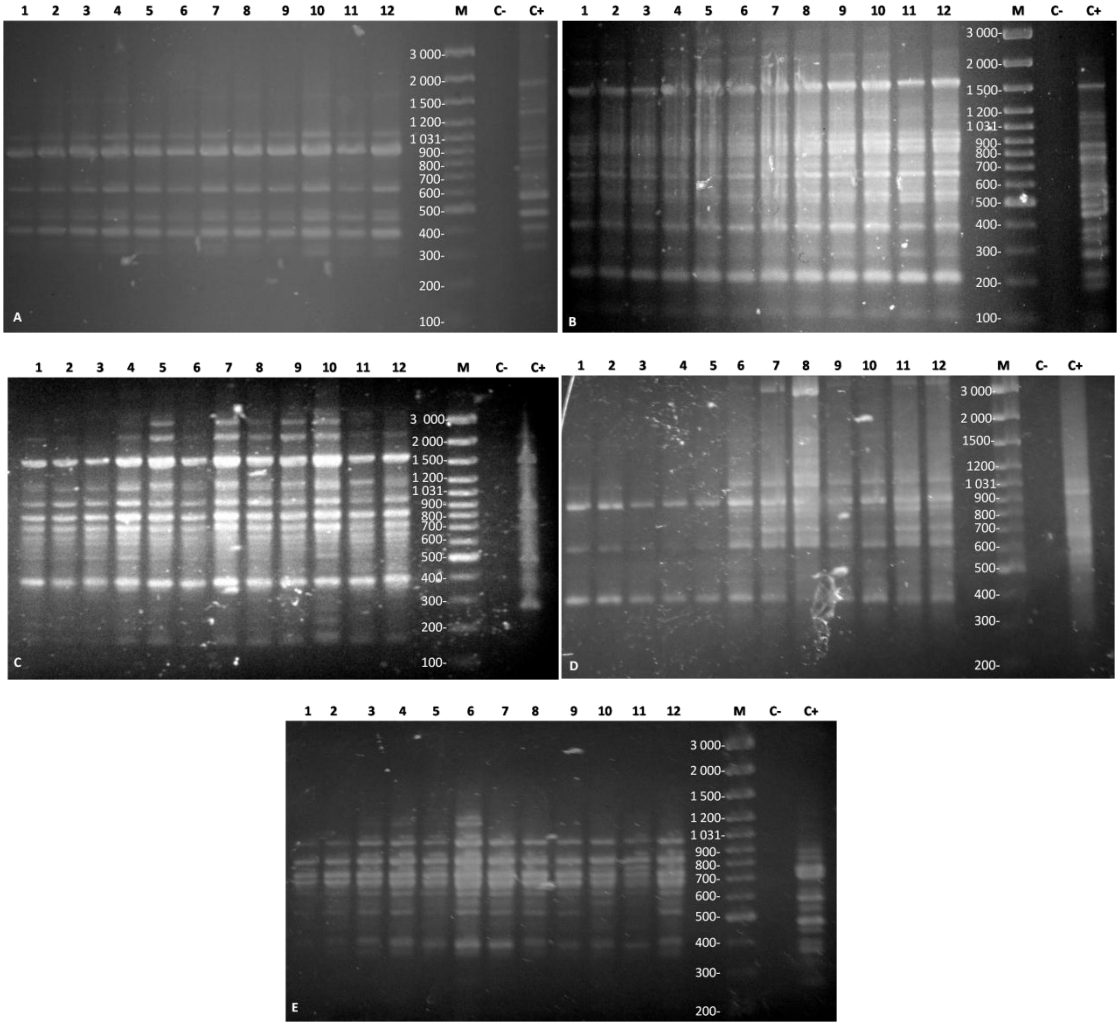


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) de los productos RAPD generados con la combinación de cebadores, A 2/3, B 2/5, C 3/5, D 2, E 5, en plantas de *Digitalis purpurea* L. Marcador de peso molecular (M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas) C- control de la pureza de agua, C+ muestra de ADN genómico de planta de *Digitalis* germinada de semilla empleada como control.

El análisis de clúster identificó grupos con un coeficiente de similitud entre 0,96 y 0,99, resultados que denotan la gran homología entre las muestras analizadas (fig. 19).

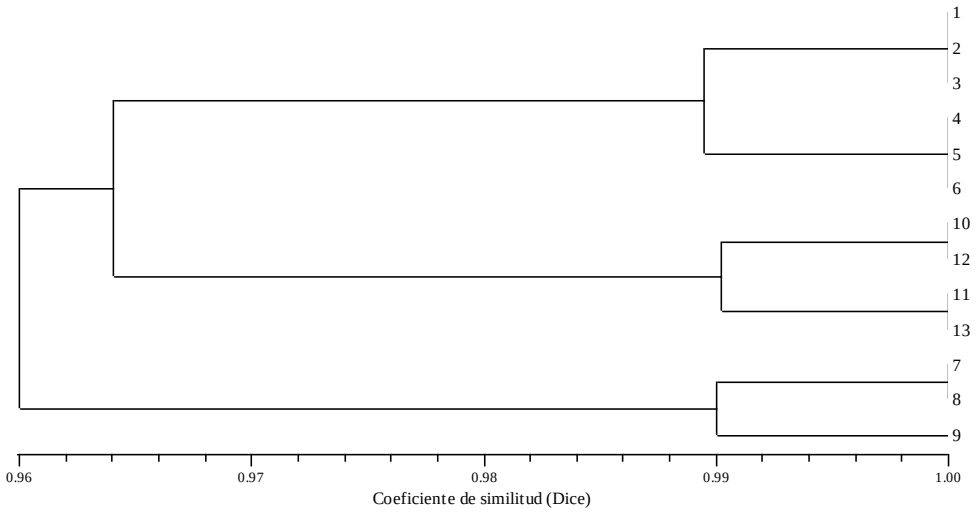


Figura 19. Dendograma realizado mediante el método UPGMA con el coeficiente de similitud Dice.

Mediante los marcadores moleculares tipo RAPD fue posible corroborar que la homología fenotípica de las plantas obtenidas vía organogénesis directa, se corresponde con la estabilidad genética detectada. Esto permite identificar al método de regeneración como una tecnología viable para la propagación de plantas y su empleo en programas de mejoramiento genético.

4.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de *D. purpurea* durante la organogénesis directa

4.2.1 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de cloroplastos

Durante la primera semana del cultivo *in vitro*, los segmentos foliares en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 de 6-BAP, sin antibiótico (control), formaron raíces en algunos casos y mantuvieron una coloración verde oscuro (código hex: #006400). También se pudieron observar ligeros tropismos, plegamiento (fototropismo positivo de la región adaxial) y crecieron expandiéndose sobre el medio de cultivo.

Los márgenes se observaron ligeramente engrosados y formaron masas de células desdiferenciadas. Durante la segunda semana del cultivo *in vitro* se pudo notar la formación de

meristemoides principalmente en la nervadura central, en la región más cercana al peciolo. No hubo cambios de coloración, los márgenes recurvados y engrosados se convirtieron en meristemoides y en algunos segmentos foliares se pueden apreciar incipientes brotes; el 40,4% de los segmentos foliares había desarrollado raíces. A la tercera semana el 33% de ellos había formado de uno a tres brotes. Mientras que en quinta semana el 100% de los segmentos foliares habían formado hasta 15 brotes.

Los efectos de la espectinomicina fueron visibles desde la primera semana de evaluación (fig. 20). De modo general los principales cambios morfológicos apreciados en los segmentos foliares fueron: clorosis, expansión, engrosamiento y recurvado. Para concentraciones entre 25 y 75 mg/L no se produjeron cambios de coloración. En los segmentos foliares cultivados con 100, 300, 500 mg/L de espectinomicina se produjeron clorosis (verde claro, código hex: #90EE90) y puntos necróticos. La primera fue mayor en los segmentos foliares cultivados en 700 mg/L, estos fueron verde pálido (código hex: #98FB98). Todos estaban recurvados y expandidos sobre el medio de cultivo.

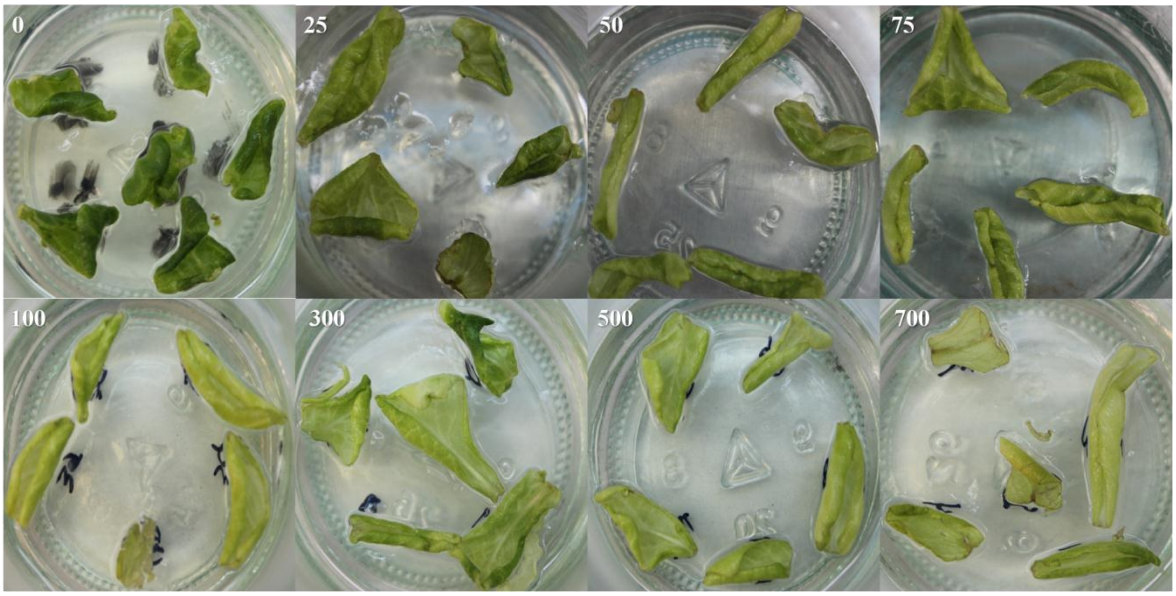


Figura 20. Efectos de la espectinomicina sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 7 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

Durante la tercera semana, los segmentos foliares a las concentraciones desde 300 a 700 mg/L tenían los bordes marginales coloración perú (código hex: #CD853F), ligeramente quemados. La

clorosis se intensificó a la cuarta semana en los explantes cultivados desde 100 a 700 mg/L, los cuales adquirieron una coloración amarillo claro (código hex: #FFFFE0). Además la necrosis se había extendido cubriendo la mayor del 90% de los mismos (fig. 21).

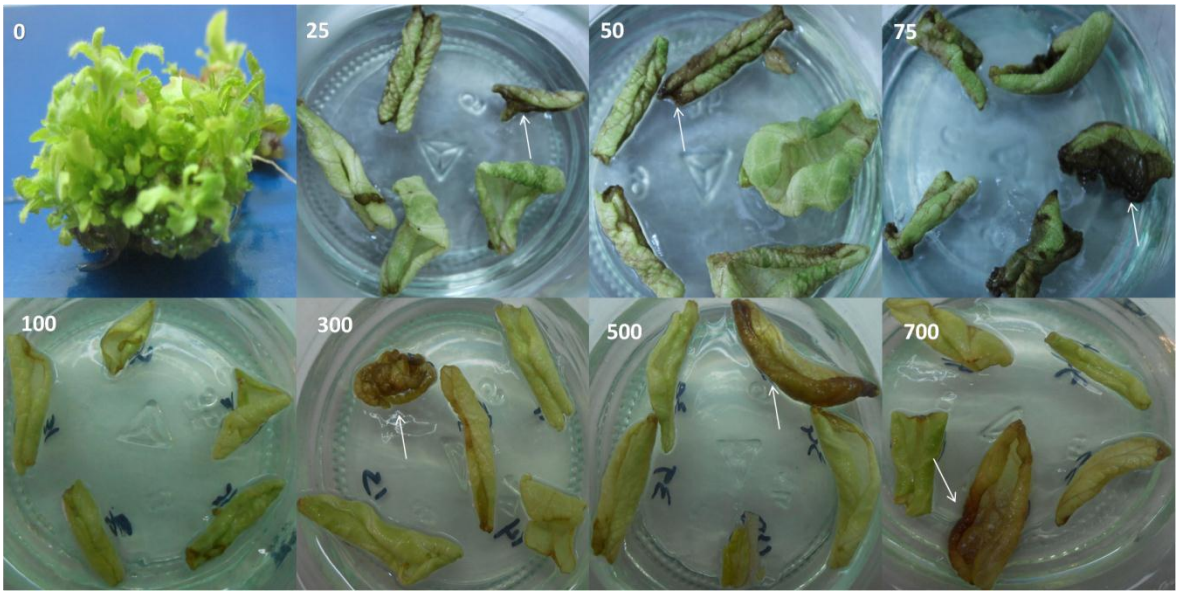


Figura 21. Efectos de la espectinomicina sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 28 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L) y las flechas necrosis.

Pasados 7 semanas de iniciado el experimento a las concentraciones de 25 a 700 mg/L de espectinomicina, los segmentos foliares se encontraron necrosados. Esta señal se extendió a través de la venación central. De manera general desapareció totalmente la pigmentación clorofílica y la apariencia del explante fue blanquecina (fig. 22).

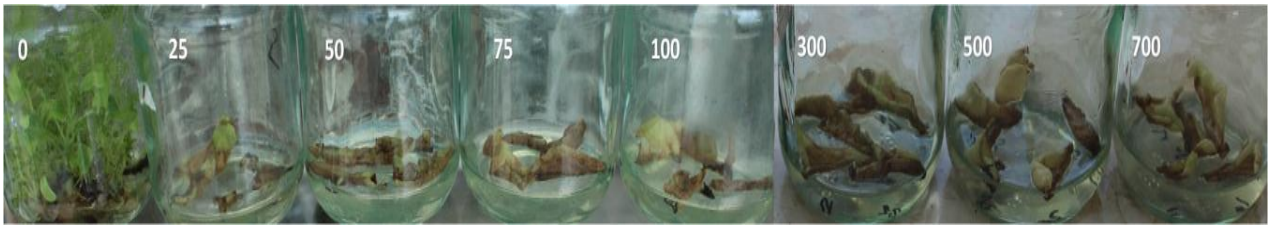
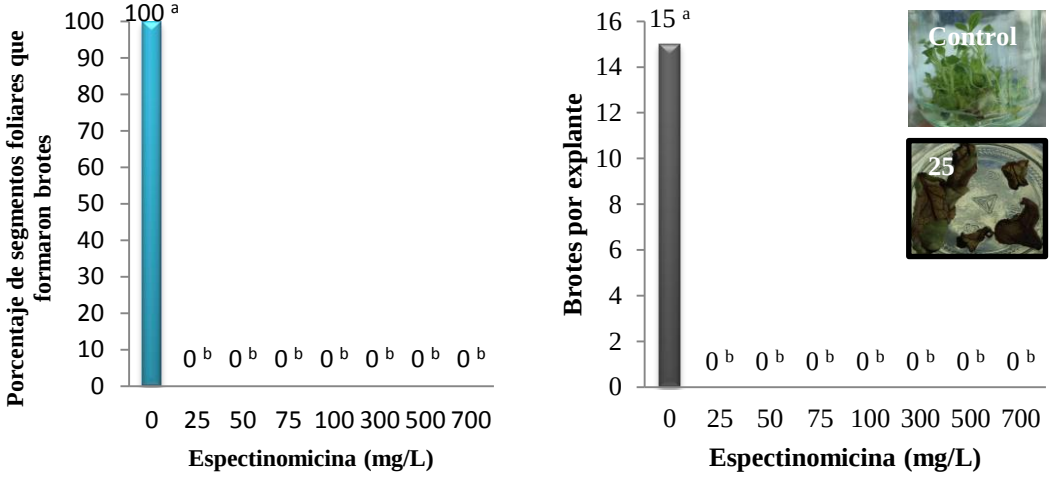


Figura 22. Efectos de la espectinomicina sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

Todas las concentraciones evaluadas (25-700 mg/L) de espectinomicina fueron letales para la regeneración vía organogénesis directa de *D. purpurea* pues en ninguna de ellas se formaron brotes (figs. 22 y 23).



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 23. Efecto de la concentración (mg/L) de espectinomicina, sobre la formación de brotes en segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días en medio de cultivo basal suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP.

Durante la primera semana, todos los segmentos foliares en medio de cultivo con estreptomicina mantuvieron una coloración verde oscuro (código hex: #006400), excepto los explantes en la mayor concentración (700 mg/L), donde apreció una ligera clorosis. Todos los segmentos foliares se recurvaron y expandieron sobre el medio (fig. 24).

Transcurridas tres semanas, los segmentos foliares mantenían una coloración verde intensa, con los bordes recurvados. A 500 mg/L estos se encontraban ligeramente más pálidos, a 700 mg/L la clorosis fue mayor y la nerviación estaba ligeramente necrosada. A los 28 días se presenciaron cambios en la pigmentación, predominando el color verde claro (código hex: #90EE90), aunque en algunos casos la necrosis se extendió por casi la totalidad del explante, generalmente se encontró asociada a los bordes marginales y a la nerviación (fig. 25).

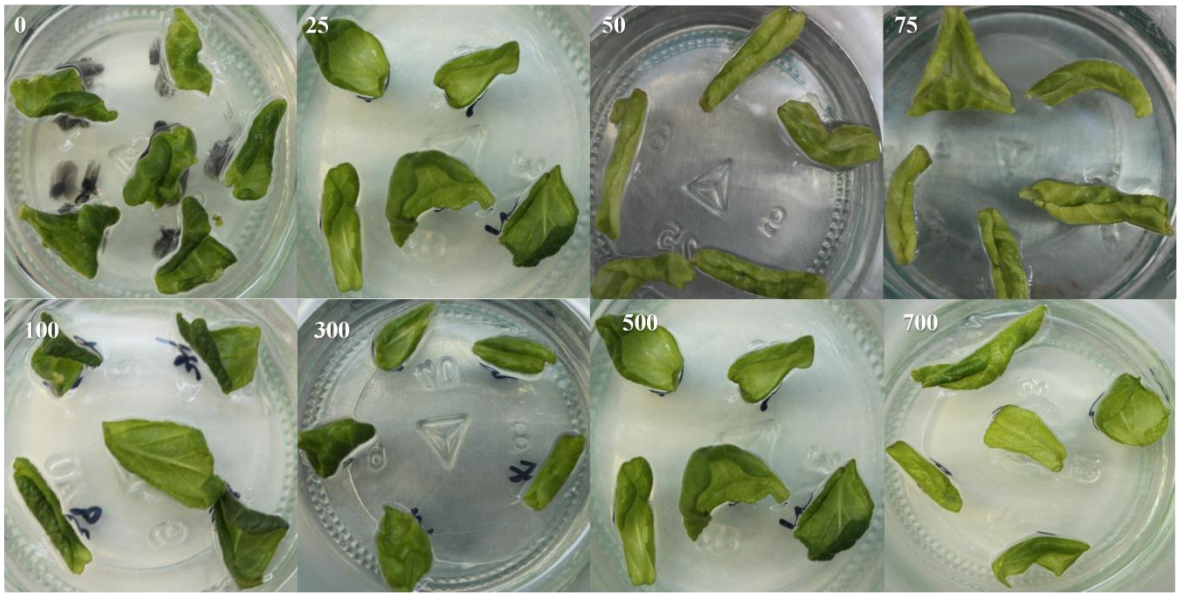


Figura 24. Efectos de la estreptomicina sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 7 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

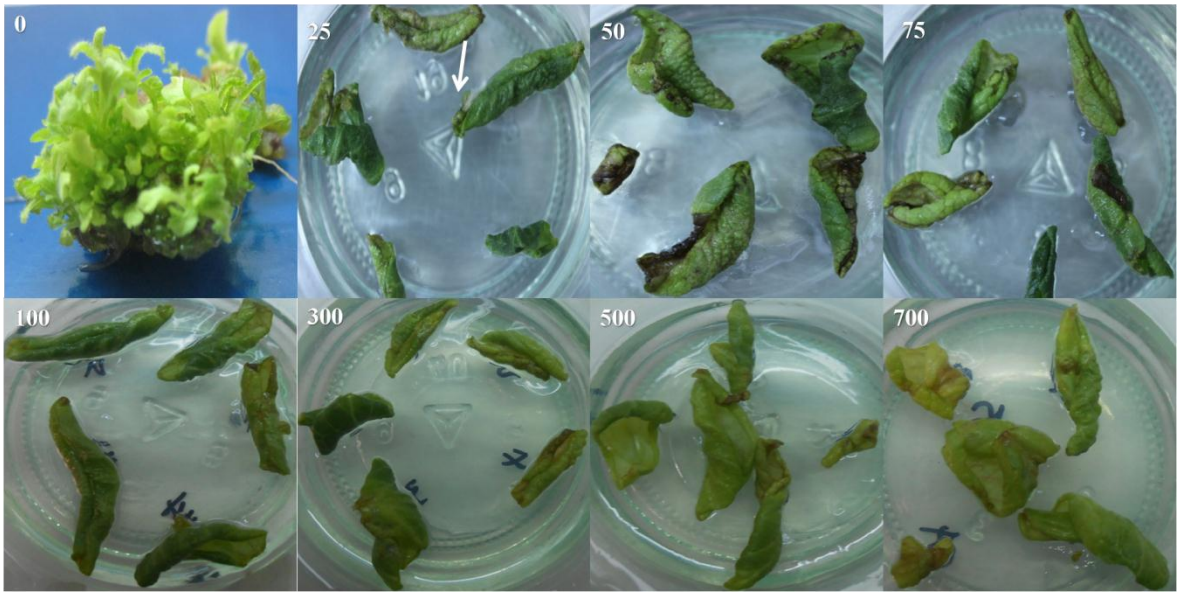
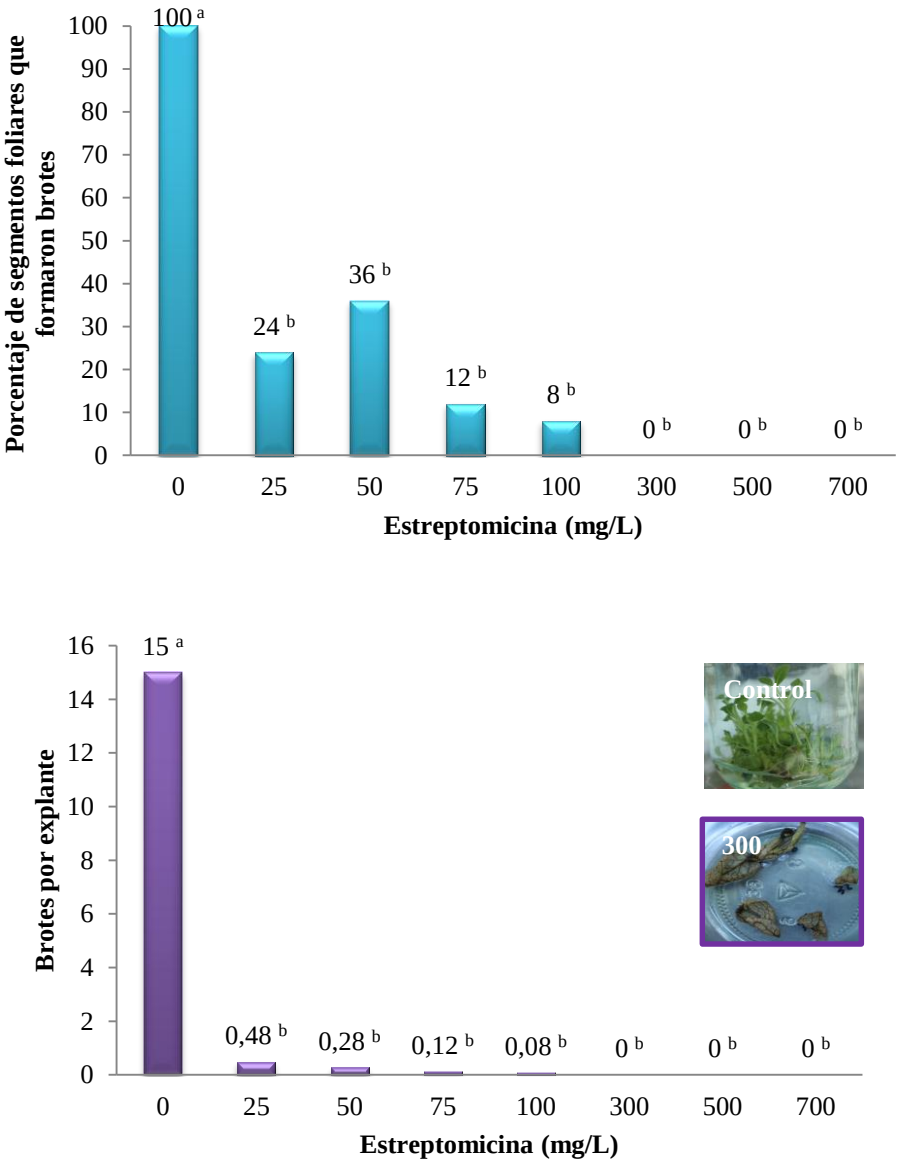


Figura 25. Efectos de la estreptomicina sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 28 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. La flecha señala una raíz. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

A los 35 días, la mayor parte de los segmentos foliares estaban totalmente quemados, además de necrosados en toda la venación. Solo los explantes a 100 mg/L conservaban tejido de verde oscuro (código hex: #006400) a verde claro (código hex: #90EE90). A los 42 días el 100% de los segmentos foliares a las concentraciones de 100 a 700 mg/L, se encontraban con una coloración amarillo claro (código hex: #FFFFE0); inviables para la regeneración (fig. 26).

Figura 26. Efectos de la estreptomicina sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

La figura 27 muestra el efecto de la estreptomicina en el porcentaje de segmentos foliares que forman brotes y el número de brotes por explantes. El 8% de los segmentos foliares cultivados a 100 mg/L formaron brotes, mientras que concentraciones mayores o iguales a 300 mg/L resultaron letales.



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 27. Efecto de la estreptomicina (mg/L), sobre la formación de brotes en segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días en medio de cultivo basal suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP.

Realizados estos experimentos, es posible concluir que deben evaluarse concentraciones menores a 25 mg/L; para identificar la concentración mínima letal de espectinomicina a emplear en

esquemas de selección durante la transformación genética. Por otra parte se pudo determinar la concentración mínima letal a emplear de estreptomicina (300 mg/L), donde no se evidenció ningún proceso morfogenético que pueda ser causa de escapes durante la regeneración del material transformado.

4.2.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación de ADN nuclear

Durante la primera semana los segmentos foliares en medio de cultivo con higromicina B a 5 y 10 mg/L solo se encontraban recurvados y expandidos. Mientras que a las concentraciones de 20 a 70 mg/L sufrieron blanqueamiento y necrosis parciales. En algunos casos se observaron regiones donde aún se conservaba la coloración inicial, bordeada por un aro necrótico y despigmentado (fig.28).

A la segunda semana no se observaron cambios en los segmentos foliares a 5 y 10 mg/L. Sin embargo el 100% de los colocados a las concentraciones entre 20 y 100 mg/L estaban totalmente despigmentados. La necrosis se generalizó cubriendo la totalidad de los mismos.

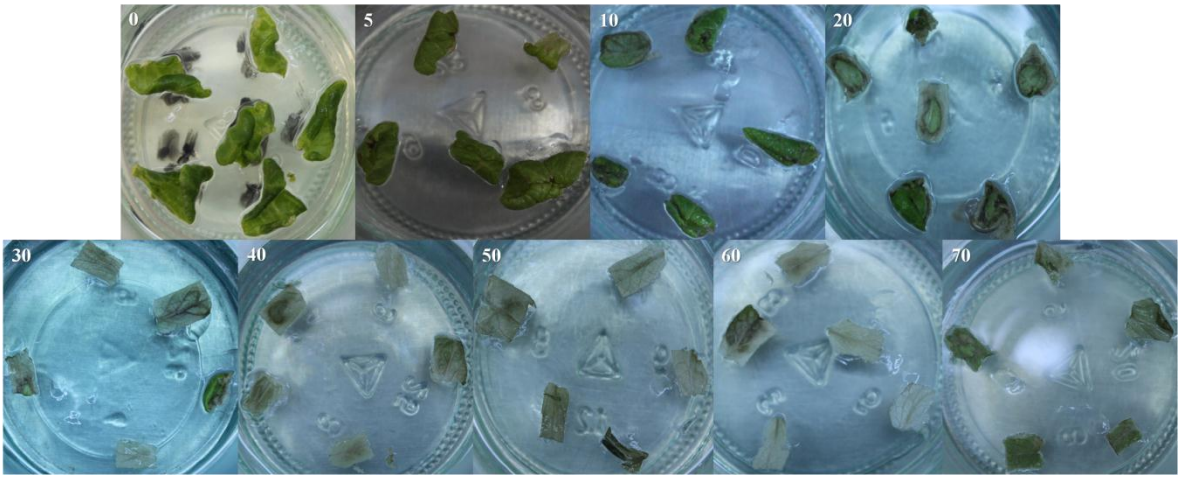


Figura 28. Efectos de la higromicina B sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 7 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

Sin embargo a los 28 días el 8% de los segmentos foliares a 5 mg/L de higromicina B, formó brotes mientras que a partir de10 mg/L el 100% de ellos se encontró totalmente necrosado (fig. 29).

Figura 29. Efectos de la higromicina B sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 28 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

A los 42 días solo habían regenerado brotes en los segmentos foliares cultivados a 5 mg/L del antibiótico (figs. 30 y 31), de lo cual se concluyó que la concentración mínima letal para la selección con higromicina B, es 10 mg/L. Esta debe ser empleada durante la regeneración vía organogénesis directa de segmentos foliares de *D. purpurea* transformadas genéticamente, ya que solo regenerarían, brotes que presenten un gen que le confiera resistencia a dicho antibiótico.

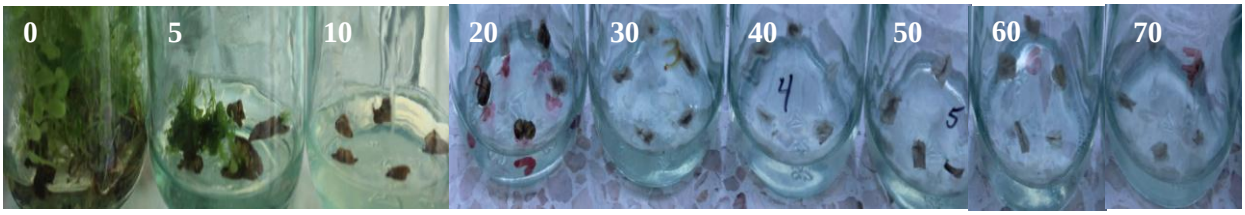
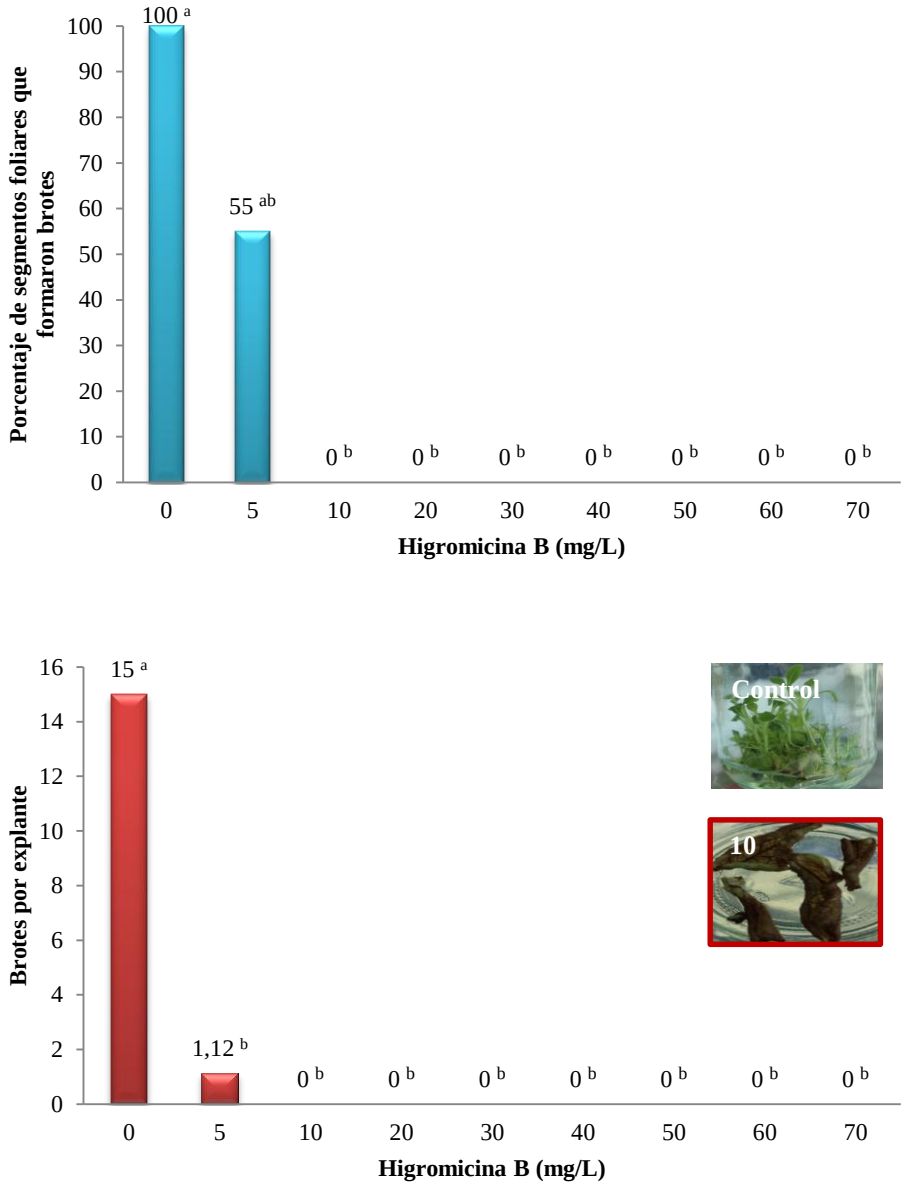


Figura 30. Efectos de la higromicina B sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 31. Efecto de la higromicina B (mg/L), sobre la formación de brotes en segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días en medio de cultivo basal suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP.

Durante la primera semana del cultivo *in vitro* de los segmentos foliares en medio de cultivo con geneticina G-418 a concentraciones de 5 y 10 mg/L; no manifestaron cambios ostensibles. Solo se

recurvaron, expandieron ligeramente y mantuvieron una coloración verde oscuro (código hex: #006400). Sin embargo a 20 mg/L, los bordes marginales se despigmentaron, mientras que la región central mantuvo la misma coloración inicial. A partir de los 30 mg/L de antibiótico la clorosis de los segmentos fue mayor extendiéndose parcialmente sobre su superficie, cubriendo la totalidad del explante a 50 mg/L (fig. 32).

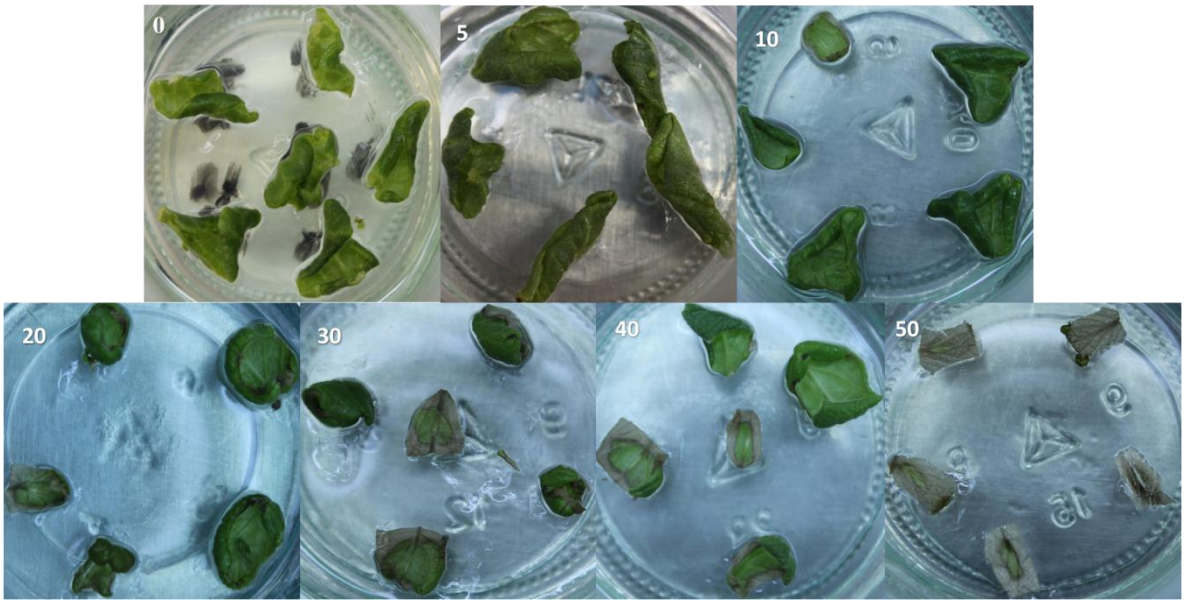


Figura 32. Efectos de la geneticina G-418 sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 7 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

A los 15 días el 10% de los segmentos foliares en 10 mg/L de G-418 tenían una coloración dorado alambre (código hex: #DAA520). La misma coloración estuvo presente en el 33,3% de los explantes a 20 mg/L y el 6,6 % de los mismos se encontraba blanquecino. Por otro lado el 16 % de los explantes a 30 mg/L presentaron una coloración dorado alambre (código hex: #DAA520), con un 24% de los mismos blanquecinos, con necrosis generalizadas. Estos valores fueron superiores para los que se encontraban a 40 mg/L, dónde el 45% de los mismos estaban dorado alambre (código hex: #DAA520) y el 30% blanquecinos. El 66,6% de los segmentos foliares a la máxima concentración (50 mg/L) estaban totalmente blanquecinos e inviables para la regeneración.

A las tres semanas el 28% de los segmentos foliares habían formado raíces a 5 mg/L de G-418 y el 8 % callos, mientras que a 10 mg/L el 4 % había formado brotes y raíces (fig. 33). Sin embargo a 42 días todos los segmentos foliares en las concentraciones de 20 a 50 mg/L, se encontraban blanquecinos con regiones necrosadas e inviables para la regeneración (fig. 34). Por lo cual 20 mg/L fue la concentración mínima letal determinada para la selección con G-418 (fig. 35), esta debe ser empleada en programas de transformación genética.

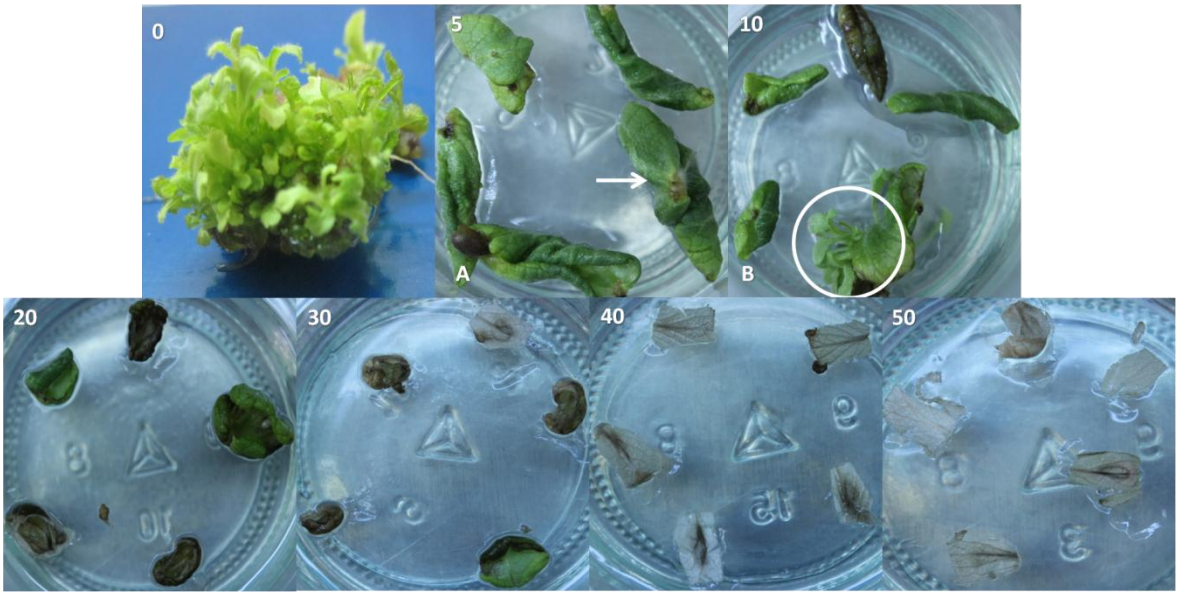


Figura 33. Efectos de la geneticina G-418 sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 28 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP, A formación de raíces, B formación de brotes. Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).

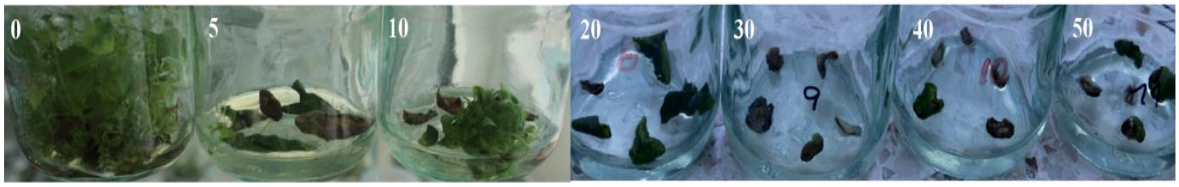
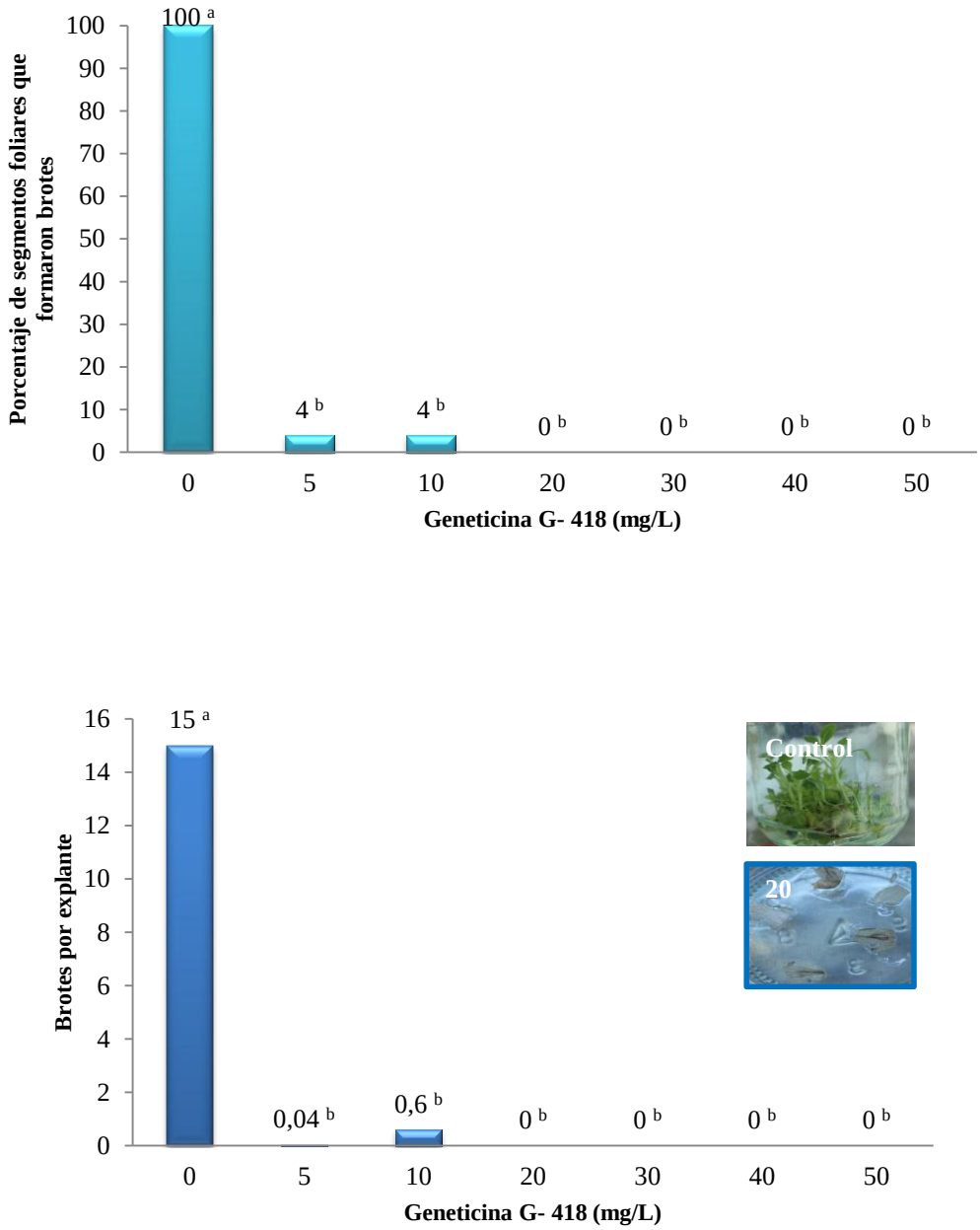


Figura 34. Efectos de la geneticina G-418 sobre segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días, en medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP, Los números indican la concentración empleada del agente selectivo (mg/L).



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de medias a posteriori para p<0,05

Figura 35. Efecto de la geneticina G-418 (mg/L), sobre la formación de brotes en segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L., a los 42 días en medio de cultivo basal suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP.

En cuanto a la selección con la higromicina B y la G-418 es posible emplearlas en esquemas de transformación genética de plantas obtenidas mediante la regeneración vía organogénesis directa en las concentraciones 10 mg/L y 20 mg/L respectivamente.

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1 Morfogénesis *in vitro* a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold

El desarrollo vegetal o morfogénesis, es el resultado de la expresión secuencial de un programa detallado codificado en el ADN, resultante de la interacción entre diversos factores. Estos factores determinan rutas alternativas y las regulan (*e.g*., temperatura, fotoperíodo, accesibilidad al agua y otros nutrientes). Está formado por dos grandes procesos: crecimiento y diferenciación. El primero de ellos consiste en modificaciones cuantitativas, en el aumento irreversible de las dimensiones. Mientras que el segundo comprende la adquisición gradual de rasgos estructurales y funcionales por la población celular uniforme no diferenciada del meristemo (Taiz y Zeiger, 2006).

La organogénesis es una de las rutas morfogenéticas más compleja y está formada por varias etapas. Incluyen la diferenciación del tejido diana y seguido a la iniciación, diferentes fases de desarrollo que culminan con la formación de un brote completo. Para su estudio se emplean diversas técnicas como la microcirugía, cultivo de tejidos, análisis moleculares, empleo de inhibidores, reguladores del crecimiento utilizando diferentes partes de la planta (Joy y Thorpe, 1999). En la presente investigación mediante el empleo de los reguladores del crecimiento ANA y 6-BAP por separado y en combinaciones, se pudo observar la morfogénesis *in vitro* de *Digitalis purpurea* L., a partir de segmentos foliares.

Las plantas al igual que los animales, utilizan hormonas (fitohormonas), moléculas de señalización que coordinan y regulan su fisiología. Estas regulan numerosos procesos del desarrollo, como dirección del crecimiento (tropismo), floración, enraizamiento, respuesta a estrés biótico y abiótico. Un ejemplo de ello lo constituye el flujo de las auxinas en los tejidos. El transporte polar de las mismas genera un gradiente máximo dentro de los tejidos, que funciona como regulador de varios procesos de desarrollo en la planta, incluidos embriogénesis, organogénesis, formación vascular de tejidos y tropismos (Robert y Friml, 2009).

Es ampliamente conocido que el empleo de auxinas y citoquininas en el cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales producen efectos en el ciclo celular. Estas son las más importantes en la regulación del crecimiento y la morfogénesis (George *et al.*, 2008). Sus efectos están relacionados

con las concentraciones empleadas, el tejido diana, si se usan en combinación o por separado y la interacción con otros factores. Estos reguladores del crecimiento no actúan de igual modo en todas las especies, incluso en ocasiones no se observan resultados positivos en la morfogénesis así como en la calidad de las plantas obtenidas (Dangi *et al.*, 2012). Es por esto que se precisan estudios experimentales para conocer la respuesta morfogenética, que inducen los mismos en la especie de interés.

En este trabajo, los explantes en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento (control) no regeneraron brotes. Las lesiones necróticas observadas en el control, que se extendieron sobre la superficie del explante hasta cubrirlo, es producto de la senescencia. Este es un proceso durante el cual, las hojas separadas de la planta, pierden lentamente la clorofila, ARN, lípidos y proteínas. Sucede incluso si se mantienen en condiciones de cultivo *in vitro* proporcionándoles la humedad y minerales necesarios y ocurre un envejecimiento programado (Taiz y Zeiger, 2006). Esto nos permitió concluir que los cambios morfogenéticos observados en el resto de los explantes se debió al empleo de reguladores del crecimiento. La respuesta diferencial fue condicionada por las combinaciones y concentraciones empleadas, considerando que se trató del mismo genotipo y las mismas condiciones de cultivo.

El fototropismo positivo de la región adaxial de los segmentos foliares, observado durante la primera semana del cultivo *in vitro,* puede deberse a la posición de estos sobre el medio de cultivo y al estímulo de la luz azul. El crecimiento diferencial del lado en sombra (mayor) que el lado iluminado, es el que da lugar a la curvatura (Taiz y Zeiger, 2006). Se ha comprobado que existen dos flavoproteínas, las fototropinas 1 y 2 que son los fotorreceptores de la ruta de señalización de la luz azul. Estas median la curvatura de los hipocotilos de *Arabidopsis* y en los coleóptilos de *Avena*. Son proteínas quinasas que se autofosforilan ante el estímulo de la luz azul. El gradiente en la fosforilación de las fototropinas induce el movimiento de la auxina hacia el lado oscuro del coleóptilo. Una vez ahí es trasportada basípetamente a la zona de elongación donde estimula dicho proceso *op. cit*. Teniendo en consideración que el medio de cultivo se encontraba suplementado con auxinas (ANA), la elongación y por tanto la curvatura no dependió solamente del balance endógeno de las mismas, sino que pudo estar influenciado por ellas.

Numerosos estudios fisiológicos han revelado que la relación auxina:citoquinina regula la morfogénesis en cultivos de tejidos (George *et al.*, 2008). El balance de ellas trae como resultado

diferentes procesos morfogenéticos. Si la proporción de auxinas es mayor que de citoquininas estimulan la formación de raíces y bajos tallos, cuando es intermedia se forman callos indiferenciados. Cuando la concentración de citoquininas es mucho mayor que la de auxinas, se favorece la formación de brotes (George *et al.*, 2008). Por ejemplo, en la planta medicinal *Rehmannia glutinosa* Libosch. se logró la regeneración de brotes a partir de callos (organogénesis indirecta) donde los mejores resultados se obtuvieron empleando una relación de auxinas (ANA y AIA) y citoquininas (6-BAP) 1:10 (Piątczak *et al.*, 2015).

El efecto de las hormonas observado en los tejidos vegetales, se debe a su influencia sobre el ciclo celular. Este es regulado y controlado por muchas de ellas. Existen varios puntos de control interno celular. Los más importantes son: la transición entre las fases G1 y S así como de G2 a M. La transición de la fase G1 a la S es regulada positivamente por auxinas, citoquininas, giberelinas, brasinoesteroides y la sacarosa, este tránsito determina si la célula inicia una nueva replicación del ADN o abandona el ciclo. Mientras que la transición entre las fases G2 y M determina si la célula entra o no en mitosis, este paso es estimulado por auxinas, citoquininas y giberelinas (Segura, 2008). Los cambios morfogenéticos observados durante el curso de esta investigación fueron detonados por la auxina (ANA), citoquinina (6-BAP) y sacarosa empleados, así como por la interacción de las mismas con las hormonas endógenas de los explantes foliares. Las cuales activaron procesos del ciclo celular al inducir la expresión diferencial de numerosas proteínas involucradas en el mismo.

Otros factores generados por las condiciones del cultivo *in vitro* pudieron también condicionar la respuesta observada (*e.g.*, fotoperíodo, temperatura, solidez y pH del medio de cultivo). El fotoperíodo puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento (George *et al.*, 2008). La solidez del medio de cultivo también puede influenciar la inducción de procesos morfogenéticos. Las concentraciones del gelificante pueden provocar un estrés para la planta, que reduce la formación de meristemoides, pero puede estimular la producción de yemas foliares (Taiz y Zeiger, 2006). El pH cuando es ácido como el empleado en esta investigación (pH 5,7), provoca un aumento rápido e inmediato de la velocidad de crecimiento. A valores ácidos de pH, las expansinas provocan la distención de las paredes celulares por debilitamiento de los puentes de hidrógeno entre los polisacáridos y componentes de la pared celular (Taiz y Zeiger, 2006, George *et al.*, 2008).

A los 15 días, los explantes colocados en medio de cultivo suplementado con ANA solamente formaron raíces hasta en el 84 % de ellos, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos y a los 28 días la totalidad de los explantes había enraizado. Está descrito en la literatura que esta auxina participa en la formación de raíces, así como en la ramificación y formación de raíces laterales (Taiz y Zeiger, 2006).

Otro fenómeno observado durante la segunda semana del cultivo *in vitro* fue la formación de meristemoides. Estos son masas esféricas de células pequeñas isodiamétricas como las células meristemáticas, de apariencia nodular, con citoplasma denso y una alta relación núcleo-citoplasma al observarla al microscopio (Joy y Thorpe, 1999). Podemos inferir que estas estructuras se formaron como respuesta a la citoquinina empleada (6-BAP), ya que en los casos donde no se empleó, solo se formaron raíces (0,1 mg/L de ANA y 0,0 de 6-BAP; 0,5 de ANA y 0,0 de 6-BAP).

En *Nicotiana tabacum* L. cv W38 (tabaco) se forman meristemoides en un medio de cultivo enriquecido con AIA (1,75 mg/L) y kinetina (0,43 mg/L). Estos son inicialmente apolares pero rápidamente muestran actividad divisoria direccional para formar el primordio unipolar. El mismo comienza a hacerse visible a partir del día 10 del cultivo *in vitro,* observación que coincide con los resultados de la presente investigación. El primordio emerge de la base del callo aproximadamente en el día 12, por un proceso de organogénesis indirecta. En *Pinus radiata* D. Don. (pino), se ha logrado la organogénesis directa a partir de cotiledones colocados en medio de cultivo con BA (5,68 mg/L). Después de 10 días de cultivo, los cotiledones adquieren una apariencia nodular por el incremento del tamaño del meristemoide debajo de la epidermis y después del día 21 el primordio foliar se hace visible (Joy y Thorpe, 1999). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra investigación, donde a los 20 días del cultivo *in vitro* fue posible observar los primordios foliares de *D. purpurea*.

La secuencia de transformaciones que ocurren durante el desarrollo para la formación de los brotes en coníferas y angiospermas es similar incluso a pesar de la naturaleza del explante inicial (embriones maduros, cotiledones, epicótilos, etc.). Esta secuencia incluye primeramente la formación de meristemoides, después del brote primario y finalmente el brote adventicio con mayor organización en la región apical (Joy y Thorpe, 1999).

A los 20 días se pudo observar la formación de los primordios foliares, las auxinas ejercen un papel fundamental dentro de la iniciación de estos, así como en la fitotaxia. En las zonas donde se acumula auxina marca la iniciación de un nuevo primordio. Esto se logra por la inactivación de la familia de genes *KNOX* como *STM* que mantienen el estado indiferenciado de las células del meristemo, así como la activación secuencial del desarrollo de un nuevo órgano (Dubrovsky *et al.*, 2008).

Los brotes se formaron sin una fase intermedia de callo, por lo cual se consideró como un proceso de organogénesis directa. En cuanto al número de brotes por segmentos foliares, a los 28 días aparecieron diferencias estadísticas significativas, entre los tratamientos en los que se combinaron los reguladores del crecimiento y los que no. Donde solo se empleó ANA no regeneró ningún brote, mientras que en donde se aplicó 6-BAP ocurrió lo contrario. Sin embargo, los mejores resultados se observaron al combinar ambos reguladores. A la menor concentración de ANA (0,1 mg/L) a medida que se aumentó la de 6-BAP se incrementaron los resultados tanto en el número de brotes (4,30-5,98) como en el porcentaje de brotes por segmento foliar (80-90 %). No obstante, a la máxima concentración de 6-BAP (5,0 mg/L), disminuyeron ambos valores. Por otro lado a la máxima concentración de auxinas (0,5 mg/L), los rendimientos disminuyeron notablemente para ambas variables.

El tratamiento con 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP a los 42 días mostró diferencias estadísticas significativas con el resto de los tratamientos en cuanto al número de brotes por explante (18,86), seguido de 0,5 mg/L de ANA y 5,0 mg/L de 6-BAP (10,3) con el cual también mostró diferencias estadísticas. Por este motivo fue seleccionado como el mejor tratamiento para la regeneración de brotes por explantes, teniendo en consideración que además es de las concentraciones menores de reguladores del crecimiento evaluadas.

Fernández (2014) desarrolló la organogénesis directa de *D. purpurea* bajo las mismas condiciones de cultivo durante los primeros 28 días, sin embargo no evaluó la influencia de los reguladores del crecimiento de manera independiente. Razón que imposibilita la discusión de los presentes resultados en la especie. Por otra parte, en el resto de las concentraciones de reguladores del crecimiento, este mismo autor describe que no encontró diferencias estadísticas significativas, entre las concentraciones 0,1 mg/L de ANA al combinarla con 3,0 y 5,0 mg/L de 6-BAP, mientras que si las encontró con el resto de los tratamientos. Este autor obtiene los mejores resultados a

(5,74 brotes por explante), seguido de 4,38 en 0,1 mg/L de ANA y 5,0 mg/L de 6-BAP, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos por lo que, al igual que en este trabajo, seleccionan la menor concentración como la más eficaz para la regeneración.

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos permitieron concluir que cuando se emplea solamente 6-BAP, la formación de brotes por explante es muy baja (hasta 0,04 brotes por explante) durante los primeros 28 días. A los 42, estos resultados no varían significativamente (hasta 0,65). Cuando se empleó el 6-BAP en combinación con el ANA se lograron mejores resultados.

La organogénesis directa ha sido descrita en varias especies del género *Digitalis*. Gurel *et al.* (2010) estudiaron la morfogénesis *in vitro* de *D. davisiana* y evaluaron seis medios de cultivo diferentes. Los mejores resultados en la regeneración de la especie lo lograron en el medio Linsmaier y Skoog (LS) enriquecido con 0,25 mg/L ácido indolacético (AIA) y 0,5 mg/L de tidiazuron (TDZ). A medida que aumentaron la concentración de la citoquinina TDZ de 0,1-0,5 mg/L obtuvieron mayor número de brotes por explantes (6,3), sin embargo los mejores resultados los obtuvieron al combinar la (TDZ) con la auxina (AIA). Estas conclusiones concuerdan con las alcanzadas en esta investigación en la que de igual modo, los mejores resultados se lograron al combinar ambos reguladores del crecimiento.

Por otra parte, Çördük y Aki (2010) describieron igualmente, un proceso de organogénesis directa en *Digitalis trojana* Ivan. Estos investigadores obtuvieron los mejores resultados en la regeneración empleando un medio de cultivo MS suplementado con 1,0 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP. Estas concentraciones fueron iguales a las empleadas en la presente investigación. Sin embargo, en cuanto al tiempo de cultivo, los autores lo extendieron a 12 semanas y lograron un promedio de 28 brotes. Debe tenerse en cuenta que al incrementar el tiempo de cultivo los resultados pueden falsearse, debido a la rápida multiplicación de los brotes y que no sean brotes regenerados mediante la organogénesis directa. Karimi y Kazemitabar (2013) también desarrollaron un protocolo de organogénesis directa en *Digitalis nervosa*, en el cual identificaron las mismas condiciones que Çördük y Aki (2010), como las más efectivas para la especie. Estos autores a las cinco semanas obtuvieron de 6-9 brotes por explante. Los mismos refieren que a medida que aumenta la proporción de reguladores del crecimiento hacia las citoquininas, aumenta la efectividad en la producción de brotes por explante, cuando se usan en combinación con auxinas.

De igual manera, en *D. cariensis* la combinación de citoquininas y auxinas indujo el mayor número de explantes, sin embargo no resultó positivo el uso de explantes foliares y solo lograron un promedio de 3,9 brotes por explante de hipocotilo (Mohammed *et al.*, 2015).

Tanto a los 28 como a los 42 días se observó que cuando la proporción de citoquinina fue mayor que la de auxinas se produjeron más brotes por explantes. Sin embargo, con la máxima concentración de 6-BAP (5,0 mg/L) empleada, disminuyó el número de brotes por explante. Este fenómeno puede deberse a que la proporción de citoquininas es demasiado elevada y se hace ineficiente el proceso de regeneración. Esta diferencia se hizo estadísticamente significativa a los 42 días con la combinación 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L de 6-BAP y se obtuvo el mayor número de brotes por explante (18,86). Por esta razón fue elegida como la combinación más efectiva en la formación de brotes por explante, además de que el 94% de los explantes formaron brotes. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Çördük y Aki (2010) y Karimi y Kazemitabar (2013), para *D. trojana* y *D. nervosa* respectivamente.

Un estudio de variables morfométricas como altura, número de hojas por planta y número de tallos por planta permitió concluir que las plantas obtenidas respondieron adecuadamente al subcultivo en el medio de multiplicación. Estas no presentaron diferencias estadísticas significativas al compararlas con las que le dieron origen y confirman que no existió una variación fenotípica entre las plantas evaluadas. A pesar de ser estas evaluaciones de gran importancia para la elección y caracterización de un proceso morfogenético con fines de propagación o mejoramiento, en la literatura consultada no se describen. No obstante, estos resultados no son suficientes para corroborar la estabilidad genética de las plantas obtenidas, por lo cual se emplean en este tipo de investigaciones marcadores moleculares.

5.1.1 Análisis de la estabilidad genética de las plantas regeneradas

La variación somaclonal es uno de los riesgos a los que se enfrenta el cultivo de tejidos, en un medio enriquecido con hormonas (Pushpendra *et al.*, 2002). Por esta razón, los estudios de estabilidad genética deben ser considerados en toda investigación donde se usen. Los marcadores moleculares de tipo RAPD, han sido exitosos en la determinación de la estabilidad genética de numerosas especies. Estos son acertados para validar si las plantas regeneradas en condiciones de cultivo *in vitro* son similares a su fuente de origen.

En la presente investigación de las diez combinaciones realizadas se identificó un total de 60 fragmentos, con un 88,04 % de monomorfismo; lo cual denota el alto grado de similitud encontrado. Esto fue corroborado por medio del índice de Dice y el posterior análisis de clúster (UPGMA). Las plantas regeneradas y las que le dieron origen tuvieron un coeficiente de similitud entre 0,96 y 0,99. Los resultados fueron superiores a los obtenidos en *D. obscura*, donde mediante el empleo de siete cebadores identificaron un total de 23 bandas, de ellas solo un 40% monomórficas (Gavidia *et al.*, 1996). A pesar de que este valor no es muy alto, los autores consideran que el método de propagación empleado no afecta la integridad genética de la especie.

Otro estudio realizado en plantas regeneradas vía organogénesis directa, evaluó la estabilidad genética de *Dendrocalamus asper* Schult. & Schult. F., mediante marcadores de tipo RAPD. Los autores usaron 25 cebadores y de ellos 22 generaron un total de 146 bandas, todas monomórficas. Para cuantificar la similitud emplearon el coeficiente de Jaccard, concluyendo que las plantas eran similares y que el método no inducía variabilidad genética (Singh *et al.*, 2012).

En plantas micropropagadas de *Hypericum perforatum* L., de interés medicinal, se utilizaron los marcadores RAPDs para determinar la estabilidad genética. Sin embargo, de las 48 bandas, generadas a partir de 11 cebadores, el 43,75% fueron polimórficas (Goel *et al.*, 2009b) . Por lo cual, la efectividad de esta metodología es cuestionable, al producirse variabilidad entre las plantas obtenidas. De igual modo, se obtuvo un alto porcentaje de polimorfismo, durante la caracterización molecular de diversos fenotipos de banana (*Dwarf Cavendish*). Donde a partir de 10 cebadores se generaron 80 fragmentos, de ellos 49 polimórficos (61,25%) (Gubbuk *et al.*, 2004). Ambas investigaciones permitieron identificar alta variedad intraespecífica; lo cual contrasta con lo obtenido en la presente, donde prevalecieron las bandas monomórficas (88,04%), sobre las polimórficas (11,96%).

Recientemente, en *Terminalia bellerica* Roxb se utilizaron marcadores moleculares tipo RAPD para confirmar la estabilidad genética de plantas regeneradas a partir de cotiledones (Dangi *et al.*, 2012). Para ello los autores utilizaron 10 cebadores y siete de ellos generaron un total de 180 fragmentos monomórficos confirmando la homología entre las plantas regeneradas y las que les dieron origen. Estos resultados, al igual que los obtenidos en el presente trabajo, confirman el uso de estos marcadores para el estudio de la estabilidad genética en plantas regeneradas mediante métodos biotecnológicos.

A pesar de los resultados discutidos es válido aclarar que la concurrencia de otros marcadores moleculares, en el posterior análisis de la estabilidad genética de plantas de *D. purpurea* regeneradas mediante esta metodología, pudiera arrojar más luces a dichas aseveraciones.

5.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de *D. purpurea* durante la organogénesis directa

5.2.1 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación genética de cloroplastos

La espectinomicina es un antibiótico bacteriostático descubierto en 1962. Lo produce una cepa de *Streptomyces spectabilis*. En bacterias actúa sobre la subunidad 30S del ribosoma, donde probablemente inhibe la etapa de la traslocación en la síntesis de proteínas, quizá porque interfiera en el movimiento del ARNm en relación con la subunidad 30S del ribosoma (Azanza *et al.*, 1998).

Este antibiótico ha sido empleado como agente selectivo en la transformación genética plastídica de numerosas especies para lo cual se les introdujo un casete de expresión con el gen *aadA, e.g.*, *Nicotiana tabacum* (Svab y Maliga, 1993, Khan y Maliga, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Sikdar *et al.*, 1998), *Solanum tuberosum* (Sidorov *et al.*, 1999), *Euglena gracilis* (Doetsch *et al.*, 2001), *Brassica napus* (Hou *et al.*, 2003), *Glycine max* (Dufourmantel *et al.*, 2004), *Lactuca sativa* (Lelivelt *et al.*, 2005, Ruhlman *et al.*, 2010), *Beta vulgaris* (Marchis *et al.*, 2009), entre otras. Este gen codifica la enzima bacteriana aminoglucosido 3-adenil transferasa (aadA), la cual confiere resistencia a la espectinomicina y a la estreptomicina. Cuando este gen es flanqueado por los promotores y terminadores apropiados, confieren altos niveles de resistencia a los antibióticos en Clamidomonas y plantas. La enzima puede modificar a ambos antibióticos y brindarle resistencia a los transformantes (Day y Michel, 2011).

Los efectos observados en la presente investigación sobre los explantes foliares de *D. purpurea*, indican que las concentraciones evaluadas (25-700 mg/L) inducen la senescencia y muerte celular de los mismos. De modo que todas las concentraciones evaluadas fueron letales. Estos resultados son muy lógicos al compararlos con los empleados en otras especies. Por ejemplo, en *Nicotiana tabaco,* Svab y Maliga (1993) usaron solo 0,5 mg⁄ L, mientras que Ruhlman *et al* (2010) usaron

0,1 mg⁄ L en *Lactuca*. Sin embargo, algunas especies de cereales como *Oryza* son resistentes a dicho antibiótico (Khan y Maliga, 1999).

La estreptomicina, otro de los antibióticos evaluados y empleado de igual modo en la selección de plantas transformadas con el gen *aadA*; mostró sensibilidad para concentraciones mayores a 300 mg/L. Mientras que resistió concentraciones menores e iguales a 100 mg/L. Por lo cual la concentración mínima letal fue 300 mg/L. Este antibiótico se ha empleado en numerosas especies para la selección de transformantes, *e.g., Oryza sativa* (Lee *et al.*, 2006), *Solanum tuberosum* (Sidorov *et al.*, 1999), *Euglena gracilis* (Doetsch *et al.*, 2001), *Brassica capitata* (Liu *et al.*, 2007), *Solanum melongena* (Singh *et al.*, 2010), entre otras.

En la especie *Prunus armeniaca* L. se necesitó una concentración mayor que 50 mg/L de estreptomicina para alcanzar la inhibición de los brotes en un esquema de transformación genética (Serrano, 2005).

En la literatura consultada, no existen antecedentes de investigaciones que describan del efecto de la espectinomicina y la estreptomicina en el género *Digitalis* por lo que se consideran estos resultados como los pioneros en este aspecto.

5.2.2 Determinación de la concentración mínima letal de los agentes selectivos para la transformación nuclear

En los sistemas de selección de transformantes de ADN nuclear se emplea comúnmente la higromicina B. El gen *hpt* produce una enzima capaz de desactivarla y por tanto le confiere resistencia a los tejidos que lo posean (Padilla y Burgos, 2010). Ha sido utilizado exitosamente en protocolos de transformación de soya *Glicine max* (Bobrowski y Dode, 2006), *Musa* (Sreeramanan *et al.*, 2006), entre otras especies.

La higromicina B es el segundo antibiótico de uso más frecuente en el proceso de selección de eventos transgénicos por su alta toxicidad para las plantas. En la literatura se describe que el gen fue utilizado en el 19-31% de las plantas transgénicas obtenidas con fines investigativos (Miki y McHugh, 2004 revisado por Kairúz, 2013).

En *Bacopa monnieri* L. planta de interés medicinal de la misma familia de la *Digitalis*, se desarrolló un protocolo de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* donde emplean la higromicina B como agente selectivo (Mahender *et al.*, 2012). De igual manera, utilizaron un sistema de regeneración vía organogénesis directa y con 25 mg/L como concentración mínima letal lo que trajo como resultado una eficiente selección de los transformantes.

Por otra parte, en *Pricorhiza kurroa* Royle ex. Benth., planta medicinal, fue utilizada 15 mg/L de higromicina B para la selección de plantas transformadas genéticamente. Las mismas fueron obtenidas mediante la organogénesis directa y resultó efectiva dicha selección (Bhat *et al.*, 2012).

La concentración mínima letal determinada para la higromicina B (10 mg/L) en la presente investigación fue muy similar a la establecida por Kairúz *et al.* (2013) aunque estos autores utilizaron diferente método de regeneración. Ellos identificaron para la selección de callos y la regeneración de brotes mediante organogénesis indirecta, 12 mg/L como concentración mínima letal en la misma especie en estudio.

De cualquier manera, se hace necesario establecer la concentración mínima letal en cada una de las etapas del proceso, atendiendo al sistema de regeneración empleado y diseño del esquema de transformación, aun cuando se trate de la misma especie.

La geneticina ha sido también usada en protocolos para la transformación genética. El gen *neo* (*nptII*) codifica la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa II, o neomicin fosfotransferasa II (NPTII). Esta enzima cataliza la fosforilación ATP-dependiente del grupo 3'-hidroxil de la porción amino-hexosa de ciertos antibióticos de la familia de los aminoglicósidos (*e.g.*, neomicina, kanamicina, geneticina (G418) y paramomicina) (Padilla y Burgos, 2010). Por esta razón ha sido ampliamente introducido en casetes de expresión durante la transformación genética de especies plantas.

Serrano (2005) estudió el efecto de los antibióticos aminoglicósidos como geneticina (G418) y kanamicina sobre la regeneración adventicia a partir de hojas de *Prunus armeniaca* L. El autor describe un efecto altamente tóxico para las hojas de albaricoquero con la geneticina y la regeneración fue inhibida en todas las concentraciones probadas. Incluso las concentraciones más bajas ensayadas de este antibiótico provocó la muerte celular. Contrario a los resultados obtenidos en el presente trabajo, las concentraciones hasta 10 mg/L no inhibieron la regeneración de brotes por lo que no fueron efectivas para la selección.

Mientras, en *Glycine max*, Parrott *et al*. (1989) utilizaron como marcador de selección la geneticina (G-418) (10 mg/L) durante 30 días en medio de cultivo N10 (sales MS, vitaminas B5, 1,5% de sacarosa, 10 mg/L de ANA, 0,2 % de Gelrite ®, pH 5,8), para seleccionar las células transformadas genéticamente (Pérez-Pérez, 2011).

La concentración mínima letal determinada para la geneticina en este trabajo fue 20 mg/L. En la literatura científica revisada existen pocos antecedentes del empleo de la geneticina para la selección en el género *Digitalis*. Los resultados alcanzados fueron menores a las concentraciones determinadas en el proceso de selección de callos de *D. purpurea,* donde fue necesario 50 mg/L para inhibir la formación de callos (Chong-Pérez *et al.,* 2008). Por otra parte, Pérez-Alonso *et al.* (2014) emplearon este antibiótico para la selección de plantas regeneradas mediante organogénesis indirecta, obteniendo una alta eficiencia en la obtención de plantas transformadas en esta especie.

Las investigaciones muestran la diversidad de las concentraciones y agentes selectivos empleados en esquemas de transformación genética, donde la susceptibilidad del tejido al antibiótico depende de las especies, tipo de explantes y condiciones de cultivo que se utilizan en los protocolos de transformación genética (Padilla y Burgos, 2010).

Determinar adecuadamente la concentración mínima letal evita el riesgo de escape durante un experimento de transformación. De modo que solo regenerarán las células transformadas genéticamente, en un medio de cultivo con el respectivo agente selectivo.

Los resultados obtenidos en la morfogénesis *in vitro* de *D. purpurea* a partir de segmentos foliares así como el efecto de los agentes selectivos utilizados, podrán integrarse en los programas de propagación y mejoramiento genético de la especie. Servirán como base metodológica para desarrollar estrategias biotecnológicas con el objetivo de incrementar el contenido de cardenólidos en plantas del género *Digitalis*.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Se determinó que con 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético y 0,3 mg/L de 6-bencilaminopurina, se obtuvieron los mejores resultados en la morfogénesis *in vitro* vía organogénesis directa, a partir de segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L.
2. Las plantas obtenidas mostraron estabilidad morfogenética con respecto a las que le dieron origen.
3. Se identificó la concentración mínima letal de los agentes selectivos estreptomicina, higromicina B y geneticina, para su enmpleo en un protocolo de transformación genética nuclear y plastídica.

Recomendaciones

7. RECOMENDACIONES

1. Emplear 0,1 mg/L de ANA y 3,0 mg/L 6-BAP para la propagación *in vitro* de *D. purpurea*; por organogénesis directa.

2. Emplear otros marcadores moleculares en el estudio de la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

3. Evaluar concentraciones menores a 25 mg/L de espectinomicina para determinar su concentración mínima letal.

4. Emplear 300 mg/L de estreptomicina en sistemas de selección para la transformación genética de cloroplastos en *D. purpurea*.

5. Emplear 10 mg/L de higromicina B y 20 mg/L de geneticina en sistemas de selección para la transformación genética nuclear de *D. purpurea*.

Literatura Citada

8. LITERATURA CITADA

Arnold, S. V. (2008) Somatic embryogenesis. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition.* pp. 335-354. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Azanza, J. R., Honorato, J. y Mediavilla, A. (1998) **Tetraciclinas, cloranfenicol y otros antibióticos**. In: *Farmacología humana.* Barcelona, España: Masson, pp. 1131-1144.

Bhat, W. W., Lattoo, S. K., Rana, S., Razdan, S., Dhar, N., Dhar, R. S. y Vishwakarma, R. A. (2012) Efficient plant regeneration via direct organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Picrorhiza kurroa*: an endangered medicinal herb of the alpine Himalayas. ***In Vitro Cell Dev Biol-Plant*** 48: 295–303.

Bobrowski, V. L. y Dode, L. B. (2006) Otimização do método de transformação transitória de soja via bombardeamento de conjuntos embriogênicos. ***R Bras Agrociência***. 12(3): 375-377.

Cacho, M., Margarita, M., Jorge, F. y Purificación, C. (1995) Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. ***Plant Cell Reports***. 14: 786-789.

Cacho, M., Margarita, M., Purificación, C. y Fernández-Tárrago, J. (1999) Effect of calcium restriction on cardenolide accumulation in two cell lines of *Digitalis thapsi* grown under different light regimes. ***Acta Physiologiae Plantarum***. 21 (4): 335-340.

Castro-Félix, P., Carmen, R., Jorge, P., Georgina, V. y A, V.-A. (2006) Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* utilizando marcadores RAPDs en genoma diploide y haploide. In: *Scientia-CUCBA.* pp. 193—202.

Corchete, M. P., M., A., Margarita, M., Margarita, C. y Jorge, F.-T. (1991) Effect of calcium, manganese and lithium on growth and cardenolide content in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. ***Plant Cell Reports***. 10: 394-396.

Corduan, G. y Spix, C. (1975) Haploid Callus and Regeneration of Plants from Anthers of *Digitalis purpurea* L. ***Planta***. 124: 1-11.

Çördük, N. y Akı, C. (2010) Direct shoot organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan., an endemic medicinal herb of Turkey. ***African Journal of Biotechnology***. 9(11): 1587-1591.

Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. y Bisaria, V. (2002) Bioprocess Considerations for Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Suspension Cultures. ***Biotechnol Bioprocess Eng***. 7: 138-149.

Chaturvedi, H. C. y Madhu, J. (1994) Restoration of regeneration potentiality in prolonged culture of *Digitalis purpurea* ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***. 38: 73-75.

Chong-Pérez, B., Pérez-Alonso, N., Occeguera, Z., Capote, A., Pérez, A. y Jiménez, E. (2008) Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Geneticina G418 en el proceso de formación de callos de *Digitalis purpurea* L. ***Biotecnología Vegetal***. 8(2): 115 - 118.

Dangi, B., Kachhwaha, S. y Kothari, S. L. (2012) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Terminalia bellerica* Roxb.: a multipurpose tree species. ***In Vitro Cell Dev Biol-Plant***. 48: 304–312.

Day, A. y Michel, G.-C. (2011) The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnology Journal*. 9: 540–553.

Demey, J., Elizabeth, G., Sandy, M. y Diógenes, I. (2004) Comparative Study of the Discriminating Capacity of AFLP and ISTR Markers for Genetic Analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 29–35.

Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P. y Ríos, R. (2004) **Transformación genética**. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. pp. 109-123.

Doetsch, N. A., Favreau, M. R., Kuscuoglu, N., Thompson, M. D. y Hallick, R. B. (2001) Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic psbK operon. ***Curr Genet*** 39: 49–60.

Dostanic-Larson, I., Lorenz, J., Van Huysse, J., Neumann, J., Moseley, A. y Lingrel, J. (2006) Physiological role of the a1- and a2-isoforms of the Na+-K+-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. ***American Journal of Physiology***. 290: 524-528.

Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J. ı., Shishkova, S., Celenza, J. y Benkova, E. (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. ***PNAS***. 105 (25): 8790–8794.

Dufourmantel, N., Pelissier, B., Garcon, F., Peltier, G., Ferullo, J. M. y Tissot, G. (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. ***Plant Mol Biol***. 55: 479–489.

Eisenbeig, M., Kreis, W. y Reinhard, E. (1999) Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures. ***Plant Physiol Biochem***. 37 (1): 13-23.

Engelborghs, I., Rony, S. y Steven, V. C. (2000) Capacidad del AFLP para detectar diferencias genéticas y variantes somaclonales en *Musa spp*. *INFOMUSA.* 7 (2): 3-6.

Erdei, I., Kiss, Z. y Maliga, P. (1981) Rapid clonal multiplication of *Digitalis lanata* in tissue culture. ***Plant Cell Rep*** 1: 34-35.

Fatima, Z., Mujib, A., Fatima, S., Arshi, A. y Umar, S. (2009) Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. ***Turk J Bot***. 33: 393-405.

Fernández, E. (2014) Regeneración vía organogénesis directa de plantas de *Digitalis purpurea* L. In: *Licenciatura en Biología.* Santa Clara: Universidad Central ¨Marta Abreu¨de Las Villas, pp. 72.

Gavidia, I., Agudo, L. d. C. y Pérez-Bermúdez, P. (1996) Selection and long-term cultures of high-yielding *Digitalis obscura* plants: RAPD markers for analysis of genetic stability. ***Plant Science***. 121: 197-205.

Gedeon, R. (1982) Propagating foxglove from sterile seeds or shoot apices Patente US. # GB2099851 [en línea]. Disponible en: http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=GB2099851. [Consultada 27 de Abril 2015]

George, E. F., Hall, M. A. y De KlerK, G.-J. (2008) **Plant growth regulators I: Introduction; Auxin, their analogues and Inhibitors**. En: Springer (ed.). *Plant propagation by tissue culture*.

Goel, M., Kukreja, A. y Bisht, N. (2009a) *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 96: 1–9.

Goel, M. K., Kukreja, A. K. y Bisht, N. S. (2009b) *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. ***Plant Cell Tiss Organ Cult.*** 96: 1-9.

Gubbuk, H., Pekmezci, M., Onus, A. N. y Erkan, M. (2004) Identification and selection of superior banana phenotypes in the cultivar *Dwarf Cavendish* using agronomic characteristics and RAPD markers. ***Pak J Bot***. 36(2): 331-342.

Gurel, E., Buhara, Y., Esra, A., Songul, G., Sandeep, V., Munevver, S. y Atalay, S. (2010) Regeneration and cardiotonic glycoside production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya Foxglove). In: *Plant Cell Tiss Organ Cult.* Springer Science+Business Media.

Hagimori, M., Takashi, M. y Yukiteru, O. (1982) Studies on the Production of *Digitalis* Cardenolides by Plant Tissue Culture. II Effects of light and plant growth substances on

digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. ***Plant Physiol*** 69: 653-656.

Hagimori, M., Takashi, M. y Yukiteru, O. (1983) Effects of Mineral Salts, Initial pH and Precursors on Digitoxin Formation by Shoot-forming Cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in Liquid Media. ***Agric. Biol Chem.*** 47 (3): 565-571.

Harirah, A. y Norzulaani, K. (2006) Direct Regeneration and RAPD Assessment of Male Inflorescence Derived Plants of *Musa acuminata* cv. Berangan. *Asi Pasific Journal of Molecular Biology an Biotechnology*. 14 (1): 11-17.

Hou, B. K., Zhou, Y. H., Wan, L. H., Zhang, Z. L., Shen, G. F., Chen, Z. H. y Hu, Z. M. (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. ***Transgenic Res***. 12: 111–114.

Joy, R. W. y Thorpe, T. A. (1999) **Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology** En: Soh, W.-Y. y Bhojwani, S. S. (eds.). *Morfogenesis in plant tissue cultures.* pp. 171-215. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Kairúz, E., Pérez-Alonso, N., Capote, A., Pérez, A., Jiménez, E. y Chong-Pérez, B. (2013) Concentración mínima letal de higromicina B en la formación de callos y multiplicación de brotes de *Digitalis purpurea* L. ***Biotecnología Vegetal***. 138(1): 23 - 31.

Karimi, M. y Kazemitabar, S. K. (2013) Study on the production of cardiac glycosides in direct regenerated shoots of Foxglove (*Digitalis nervosa*). ***International journal of Agronomy and Plant Production***. 4(2): 204-211.

Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B. y Infante, D. (2002) A Rapid and Simple Method for Small-Scale DNA Extraction in *Agavaceae* and Other Tropical Plants. ***Plant Mol Biol Reporter***. 20: 299a–299e.

Khan, M. S. y Maliga, P. (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. ***Nat Biotechnol*** 17: 910–915.

Kreis, W. y Müller-Uri, F. (2013) **Cardenolide Aglycone Formation in *Digitalis***. En: Rohmer, T. J. B. a. M. (ed.). *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches.* pp. 425-438. New York: Springer Science+Business Media.

Lakshmanan, V., Sreedhar, V. y Bhagyalakshmi, N. (2007) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers10 (1).

Lee, S. M., Kang, K., Chung, H., Yoo, S. H., Xu, X. M., Lee, S. B., Cheong, J. J., Daniell, H. y Kim, M. (2006) Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. ***Mol Cells***. 21: 401–410.

Lehmann, U., Moldenhauer, D., Thomar, S., Dierttrich, B. y Luckner, M. (1995) Regeneration of plants from *Digitalis lanata* cells transformed with *Agrobacterium tumefaciens* carrying bacterial genes endoding neomycin phosphotransferase II and β-glucuronidase. ***J Plant Physio***. 147 (1): 53-57

Lelivelt, C. L., McCabe, M. S., Newell, C. A., Desnoo, C. B., van Dun, K. M., Birch-Machin, I., Gray, J. C., Mills, K. H. y Nugent, J. M. (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). ***Plant Mol Biol***. 58: 763–774.

Li, Y., Gao, Z., Piao, C., Lu, K., Wang, Z. y Cui, M.-L. (2014) A Stable and Efficient *Agrobacterium* tumefaciens-Mediated Genetic Transformation of the Medicinal Plant *Digitalis purpurea* L. ***Appl Biochem Biotechnol***. 172: 1807–1817.

Liu, C. W., Lin, C. C., Chen, J. J. y Tseng, M. J. (2007) Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. ***Plant Cell Rep***. 26: 1733–1744.

Loössl, A. y Mohammad, W. (2011) Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant Biotechnology Journal* 9: 527–539.

Lutz, K., Azhagiri, A., Tungsuchat-Huang, T. y Maliga, P. (2007) A Guide to Choosing Vectors for Transformation of the Plastid Genome of Higher Plants. ***Plant Physiology***. 145: 1201–1210.

Mahender, A., Mallesham, B., Srinivas, K., Kumar, G. K., Rao, K. V., Rajesh, Y., Zhang, P. y Sadanandam, A. (2012) A rapid and efficient method for in vitro shoot organogenesis and production of transgenic *Bacopa monnieri* L. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. ***In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant***. 48: 153–159.

Marchis, F. D., Wang, Y., Stevanato, P., Arcioni, S. y Bellucci, M. (2009) Genetic transformation of the sugar beet plastome. ***Transgenic Res*** 18: 17–30.

Ministerio de Salud Pública Dirección de Registros Médicos y Estadístias de Salud (2015) *Anuario Estadístico de Salud* La Habana, Cuba.

Mohammed, A., Yücesan, B., Demir-Ordu, Ö., Cihangir, C., Eker, í., Kreis, W. y Gürel, E. (2015) *In vitro* regeneration and cardenolide determination of an endemic foxglove, *Digitalis cariensis*. ***In Vitro Cell Dev Biol-Plant***.

Nover, L., M., L., A., T., R., G. y E., V. (1996) Cell specialization and cardiac glycoside formation in cell cultures of *Digitalis* species. ***Acta Horticulturae***.

Núñez-Colín, C. A. y Escobedo-López, D. (2011) Uso correcto del análisis de clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. ***Agronomía Mesoamericana***. 22(2): 415-427.

Padilla, I. y Burgos, L. (2010) Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols 29: 1203-1213.

Palazón, J., Mercedes, B., Rosa, C., M., P. y Carmen, M. (1995) Effects of Auxin and Phenobarbital on Morphogenesis and Production of Digitoxin in *Digitalis* Callus ***Plant and Cell Physiology***. 36 (2): 247-252.

Patil, J. G., Ahire, M., Nitnaware, K., Panda, S., Bhatt, V., Kishor, P. y Nikam, T. (2012) *In vitro* propagation and production of cardiotonic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. ***Appl Microbiol Biotechnol***.

Pérez-Alonso, N., Wilken, D., Gerth, A., Jähn, A., Nitzsche, H.-M., Kerns, G., Capote-Pérez, A. y Jiménez, E. (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. ***Plant Cell Tiss Organ Cult***. 99: 151–156.

Pérez-Alonso, N., Capote-Pérez, A., Gerth, A. y Jiménez, E. (2012) Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. ***Plant Cell Tiss Organ Cult***. 110: 153–162.

Pérez-Alonso, N. (2013) Sistemas de inmersión temporal, elicitación y transformación genética en *Digitalis purpurea* L. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 133.

Pérez-Alonso, N., Chong-Pérez, B., Capote, A., Pérez, A., Izquierdo, Y., Angenon, G. y Jiménez, E. (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Digitalis purpurea* L. ***Plant Biotechnol Rep***. 8: 387–397.

Pérez-Bermúdez, Brisa, M., Cornejo, M. y Segura, J. (1984) *In vitro* morphogenesis from excised leaf explants of *Digitalis obscura* L. ***Plant Cell Reports***. 3: 8-9.

Pérez-Bermúdez, Cornejo, M. y Segura, J. (1985) Pollen plant formation from anther cultures of *Digitalis obscura* L. ***Plant Cell Tiss Organ Cult***. 5: 63-68.

Pérez-Pérez, J. L. (2011) Cultivo de tejidos y transformación genética en *Glycine max* (L.) Merrill. ***Biotecnología Vegetal***. 11(4): 223 - 234.

Pia˛tczak, E., Kuz´ma, Ł., Sitarek, P. y Wysokin´ska, H. (2015) Shoot organogenesis, molecular analysis and secondary metabolite production of micropropagated *Rehmannia glutinosa* Libosch. ***Plant Cell Tiss Organ Cult***. 120: 539–549.

Prassas, I. y Diamandis, E. (2008) Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. ***Nature***. 7: 926-935.

Pushpendra, K. G., Rajeev, K. V. y Manoi, P. (2002) **Molecular markers: principles and methodology** En: Jain, S. M. *et al.* (eds.). *Molecular thecniques in crop improvement.* pp. 9-16. EE.UU: Flower academic.

Reinbothelst, C., Tewes, A., Luckner, M. y Reinbothe, S. (1 992) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by in vivo and *in vitio* protein synthesis. ***Plant J***. 2 (6): 91-97.

Robert, H. S. y Friml, J. (2009) Auxin and other signals on the move in plants. ***Nature Chem Biol***. 5(5): 325-332.

Rogalski, M. y Helaine, C. (2011) Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. *Plant Biotechnology Journal* 9: 554–564

Rohde, W. (1996) Inverse sequence taggedrepeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *J. Genet. & Breed.* 50: 249–261.

Roig, J. T. (1974) ***Digital*** *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba.* pp. 343-344. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica, Instituto del Libro.

Ruhlman, T., Verma, D., Samson, N. y Daniell, H. (2010) The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. ***Plant Physiol***. 152: 2088–2104.

Saito, K., Yamazaki, M., Kaneko, H., Murakosh, I., Fukuda, Y. y Montagu, M. V. (1991) Tissue-specific and stress-enhancing expression of the TR promoter for mannopine synthase in transgenic medicinal plants. ***Planta***. 184: 40-46.

Salas, J. (2010) Propagación *in vitro* vía organogénesis de *Morus alba* L. variedad Criolla. In: *Instituto de Biotecnología de Las Plantas.* Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, pp. 145.

Sales, E., Nebauer, S. G., Arrillaga, I. y Segura, J. (2002) Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *J Plant Physiol.* 159: 9–16.

Sales, E., Muñoz-Bertolomeu, Arrillaga, I. y Juan, S. (2007) Enhancement of Cardenolide and Phytosterol Levels by Expression of an N-Terminally Truncated 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase in Transgenic *Digitalis minor* ***Planta Med***. 73: 605-610.

Sales, E., Müller-Uri, F., Nebauer, S. G., Segura, J., Kreis, W. y Arrillaga, I. (2011) ***Digitalis***. En: Kole, C. (ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops.* pp. 73-112. Berlin Heidelberg Springer-Verlag.

Segura, J. (2008) **Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal**. En: Azcon-Bieto, J. y Talón, M. (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal.* pp. 351-376. Madrid: Mc GrawHill interamericana.

Serrano, C. P. (2005) Transformación genética del Albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas. In: *Departamento de Biología Vegetal.* Murcia: Universidad de Murcia, pp. 194.

Sharma, S., Glenn, B., Mark, W. y Steve, M. (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226: 1449-1458.

Sidorov, V. A., Kasten, D., Pang, S. Z., Hajdukiewicz, P. T., Staub, J. M. y Nehra, N. S. (1999) Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. ***Plant J.*** 19: 209–216.

Sikdar, S. R., Serino, G., Chaudhuri, S. y Maliga, P. (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. ***Plant Cell Rep***. 18: 20–34.

Singh, A. K., Verma, S. S. y Bansal, K. C. (2010) Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). . ***Transgenic Res*** 19: 113–119.

Singh, S. R., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A. K. y Kalia, R. K. (2012) Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. ***Acta Physiol Plant***. 3: 67-80.

Sokal, R. y Michener, C. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. ***University of Kansas Science Bulletin*** 38: 1409-1438.

Sreeramanan, S., Maziah, M., Abdullah, M. P., Rosli, N. M. y Xavier, R. (2006) Potential Selectable Marker for Genetic transformation in Banana. ***Biotechology***. 5(2): 189-197.

Svab, Z. y Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 90: 913–917.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006) *Fisiología vegetal*. III. Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I.

Verma, P. y Ajay, K. (2011) Direct shoot bud organogenesis and plant regeneration from pre-plasmolysed leaf explants in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 106: 401–408.

Verma, S., Yücesan, B., Gürel, S. y Gürel, E. (2011) Indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from cotyledonary leaf segments of *Digitalis lamarckii* Ivan., an endemic medicinal species. ***Turk J Biol***. 35: 743-750.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M. y Lee, T. V. d. (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

Williams, J., Anne, K., Kenneth;, L., Antoni, R. y Scott, T. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18 (22): 6531–6535.

Wong, C., Ruth, K., George, A., Ohn, S., Sing, L. y Yik, G. (2002) Assessent of the validity of the sections in *Musa (Musaceae)* using AFLP. *Annals of Botany.* 90: 231-238.

Wu, B., Li, Y., Yan, H., Ma, Y., Luo, H., Yuan, L., Chen, S. y Lu, S. (2012) Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and mlncRNAs associated with secondary metabolism and stress response in *Digitalis purpurea*. ***BMC Genomics***. 13 (15): 1-23.

Zambrano, A., Demey, J. R., Fuenmayor, F., Segovia, V. y Gutiérrez, Z. (2003) Diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares RAPDs. ***Agronomía Tropical***. 28 (12): 684-689.