

Título: Efecto de elicitores bióticos y abióticos en algunas variables morfológicas y contenido de digoxina y digitoxina en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Digitalis purpurea* L. en medio de cultivo semisólido.



TESIS EN OPCION AL TITULO ACADEMICO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Autor: Ing. Franklyn Arana Labrada.

Tutor: Dr C. Elio A. Jiménez González.

Santa Clara, CUBA

2006

TABLA DE CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	4
2.1. <i>Digitalis purpurea</i> L. Generalidades.	4
2.1.1. Origen y ubicación taxonómica.	4
2.1.2. Descripción botánica.	5
2.1.3. Importancia del cultivo.	6
2.2. Metabolitos secundarios.	7
2.2.1. Sustancias activas de interés farmacológico en la especie <i>D. purpurea</i> .	8
2.3. Producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo <i>in vitro</i>.	10
2.3.1. Cultivo de callos.	11
2.3.2. Cultivo de suspensiones celulares.	12
2.3.3. Cultivo de órganos.	13
2.4 Empleo de elicitores en la producción de metabolitos secundarios.	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
3.0. Procedimientos generales de cultivo <i>in vitro</i> .	17
3.1. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre la morfología de brotes de <i>D. purpurea</i> multiplicados <i>in vitro</i> en medio de cultivo semisólido.	19
3.2. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre el contenido de digoxina y digitoxina en brotes de <i>D. purpurea</i> multiplicados <i>in vitro</i> en medio de cultivo semisólido.	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	25
4.1. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre la morfología de brotes de <i>D. purpurea</i> multiplicados <i>in vitro</i> en medio de cultivo semisólido.	25
4.2. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre el contenido de digoxina y digitoxina en brotes de <i>D. purpurea</i> multiplicados <i>in vitro</i> en medio de cultivo semisólido.	32
5. CONCLUSIONES.	38
6. RECOMENDACIONES.	39
7. BIBLIOGRAFÍA.	40

1. INTRODUCCIÓN.

La “Dedalera común”, de nombre científico *Digitalis purpurea* L., es una de las plantas medicinales más famosas en la historia de la humanidad, ya en 1700 se conocían sus propiedades para tratar enfermedades del corazón. También tiene propiedades medicinales como diurética, purgante, cicatrizante, anticancerígeno y para el tratamiento de úlceras. Contiene metabolitos secundarios de interés farmacológico, entre los más importantes se destacan la digitoxina y la digoxina de marcada actividad cardiotónica (Cowan, 2004).

Para la producción comercial, las plantas de *D. purpurea* son cultivadas en condiciones de campo en varios países. Las ventas de Lanoxin un producto de la digoxina son aproximadamente de 6 000 kg al año, el equivalente a 50 000 millones de dólares estadounidenses (Misawa, 1994).

La obtención de metabolitos secundarios mediante las técnicas de cultivo *in vitro* tiene como ventaja la producción de sustancias bajo condiciones controladas independientemente de cambios climáticos y condiciones de suelo, cultivo de células libres de patógenos, se puede multiplicar el rendimiento de metabolitos específicos, control automatizado del crecimiento celular y regulación racional del proceso reduciendo los costos y mejorando la productividad (Vanisree *et al.*, 2004).

Varios autores describen que en la producción de glicósidos cardiotónicos mediante el cultivo de tejido de *D. purpurea*, generalmente, los rendimientos son muy bajos y además durante las sucesivas transferencias de cultivos celulares la

cantidad de cardenólidos ha disminuido o desaparecido completamente (Rucker, 1988). En cambio, muchas investigaciones indican que la diferenciación morfológica causa un incremento en la productividad. Lui y Staba (1981) demostraron que los cultivos de órganos (brotes y raíces) de *Digitalis lanata* producen cardenólidos y que durante el cultivo el nivel de digoxina en los tejidos aumentó con el incremento de la edad.

Según Jen Fu (1998) se han seguido varias estrategias para mejorar el rendimiento de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* que incluyen cambios en la composición nutricional de los medios de cultivo, cambios en las condiciones físicas y composición de los reguladores del crecimiento. Recientemente la atención se ha enfocado en el uso de técnicas especializadas como la Ingeniería metabólica, la inmovilización celular y la elicitación, entre otras.

El uso de elicitores bióticos y abióticos no es solo efectivo para inducir o aumentar la síntesis de metabolitos específicos sino también para elucidar importantes etapas enzimáticas relacionadas con las rutas biosintéticas (Yamamoto *et al.*, 2001). Elicitores tales como extractos de la pared celular de hongos, polisacáridos de origen microbiano y algunos químicos incrementan la producción de metabolitos secundarios en varios sistemas de cultivo de células y tejidos vegetales (Jen Fu, 1998).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se estableció la siguiente hipótesis de trabajo: **Es posible incrementar el contenido de digoxina y digitoxina empleando elicitores bióticos y abióticos en la multiplicación *in vitro* de**

brotos de *Digitalis purpurea* L. en medio de cultivo semisólido como una vía para la obtención de glicósidos cardiotónicos de interés farmacéutico.

Para dar cumplimiento a esta hipótesis en el presente trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

- Evaluar la influencia de elicitores bióticos y abióticos en algunas variables morfológicas en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Digitalis purpurea* L. en medio de cultivo semisólido.
- Determinar el contenido de digoxina y digitoxina en la biomasa producida a partir de los brotes de *Digitalis purpurea* L. multiplicados *in vitro* en presencia de elicitores bióticos y abióticos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. *Digitalis purpurea* L. Generalidades.

2.1.1. Origen y ubicación taxonómica.

Digitalis: derivada del Latín (*digitus*) que significa dedo, es un género de plantas herbáceas bianuales y arbustos que incluye alrededor de 20 especies. Su nombre científico "dedo" hace referencia a la forma de la flor, la cual encaja con facilidad en el dedo humano. Una de las especies más conocida es la Dedalera común *Digitalis purpurea* L. (Wikipedia, 2005).

D. purpurea es nativa de Europa occidental, el Mediterráneo y noroeste de África, se ha naturalizado en otras partes de Europa, Asia, África, América del Sur, Nueva Zelanda, Canadá y en los Estados Unidos (Hultén, 1968; USDA, 2002; Wilson *et al.*, 1992).

En Cuba desde hace muchos años se cultiva la *D. purpurea* en invierno, con semillas recibidas de Europa y de Estados Unidos. Estas semillas germinan rápidamente en semilleros, luego se transplantan en canteros al aire libre y crecen normalmente hasta la llegada del verano. Muestra buen crecimiento en la etapa de otoño e invierno, pero por lo general las lluvias y el calor excesivo del verano destruyen la planta. Otras especies cultivadas en nuestro país son: *D. ambigua*. Murr, *D. lanata*. Ehrh, *D. lutea*. L, *D. parviflora*. L, *D. nervosa*. Roem y Shutt y *D. ferruginea*. L. Aunque la *D. purpurea* no llega a florecer en Cuba, se emplea como planta medicinal por que lo que se utiliza son las hojas que alcanzan un buen desarrollo (Roig, 1974).

La planta objeto de estudio se conoce en español con el nombre de Dedalera, Digital, Calzones de zorra. En gallego y portugués como Dedaleira (Wikipedia, 2005). Se conoce en inglés con el nombre de Foxgloves (Murcia *et al.*, 2001). En alemán se conoce por Fingerhutblätter y en francés como Doigtier, Digitale pourprée (Herbotecnia, 2005).

Fue ubicada taxonómicamente por Linnaeus y actualmente se acepta de la siguiente forma según Wikipedia (2005).

- Reino: *Plantae*.
- División: *Magnoliophyta*.
- Clase: *Magnoliopsida*.
- Orden: *Scrophulariales*.
- Familia: *Scrophulariaceae*.
- Género: *Digitalis*.
- Especie: *Digitalis purpurea*. L.

2.1.2. Descripción botánica.

Esta planta es una hierba bianual o perenne, de hasta 1,5 m. Las hojas son alternas, las basales reunidas en una roseta, pecioladas con limbo ovado-lanceolado y margen dentado, densamente pilosas sobre todo por el envés, que tiene una coloración grisácea. Nerviación reticulada (reticulódromas) muy saliente por el envés. Inflorescencia en un largo racimo terminal. Las flores pedunculadas y algo péndulas, muy vistosas. Cáliz pentámero, verde. Corola de 40-55 mm de

longitud, en forma de tubo ancho apenas lobulado en la porción distal, de color púrpura con manchas oscuras en su interior. Androceo formado por 4 estambres didínamos (de longitud desigual, dos más largos que los otros dos), fusionados a la corola y cuyas anteras se disponen en la parte superior del tubo de la corola. Gineceo bicarpelar, con ovario súpero que fructifica en una cápsula de dehiscencia valvar. Florece entre la primavera y el verano (Renobales *et al.*, 2001). El primer año de crecimiento produce únicamente las hojas basales, ovales, dentadas y de largo pecíolo, mientras que durante el segundo año se desarrolla un tallo largo y cubierto de hojas sésiles y rugosas (Wikipedia, 2005).

2.1.3. Importancia del cultivo.

D. purpurea aunque es utilizada como planta ornamental, su mayor importancia radica en sus propiedades medicinales. Se ha usado desde tiempos tempranos en casos del corazón ya que aumenta la actividad de los tejidos musculares sobre todo del corazón y arterias. La propiedad más importante de la droga es su acción en la circulación, tiene un efecto beneficioso en casos de dilatación cardíaca y mejora la nutrición del corazón, aumentando la cantidad de sangre (Derek, 2003).

La propiedad mejor conocida de la planta es la de su efecto tónico sobre el corazón. Siempre bajo prescripción médica, se emplea contra la insuficiencia cardíaca, las taquicardias y arritmias, la obstrucción aórtica y otras enfermedades coronarias. También se utiliza contra el edema, por su poder diurético (Murcia *et al.*, 2001). La Digitalis actúa inhibiendo la enzima sodio-potasio ATPasa, por lo cual se incrementa el calcio intracelular. El incremento del calcio intracelular produce un efecto inotrópico positivo. También se produce un efecto vagal en el

sistema nervioso parasimpático y por esta razón se utiliza en la regulación de las arritmias cardíacas y para disminuir las pulsaciones del ventrículo en la fibrilación ventricular (Wikipedia, 2005).

Las hojas de *D. purpurea* son además un excelente cicatrizante; tienen aplicación en úlceras (también las varicosas) y llagas de la piel. Esta era la forma original de administración de la planta, mucho antes de conocerse sus propiedades sobre el corazón (Natureduca, 2004).

2.2. Metabolitos secundarios.

Las plantas producen sustancias destinadas a su crecimiento como azúcares y proteínas, las cuales son consideradas compuestos del metabolismo primario. Otros compuestos especiales denominados metabolitos secundarios son sintetizados por diferentes rutas metabólicas produciendo una inmensa variedad de estructuras químicas tales como alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenoides, entre otros. (Briskin, 2000).

Se define como metabolitos secundarios a aquellos compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan (Robert *et al.*, 1991). Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario pero de limitada distribución en el reino de las plantas siendo restringidos a un grupo taxonómico particular. Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero a menudo tienen un rol ecológico, los mismos son atractivos de polinizadores, representan adaptaciones químicas a estrés medioambiental así como defensas químicas contra microorganismos,

insectos y contra depredadores superiores, incluso contra otras plantas (aleloquímicos) (Mann, 1978; Putnam, 1983; Palacios *et al.*, 2004).

Alrededor de un 25% de las drogas prescritas y altamente purificadas derivan del reino vegetal. El número de estructuras químicas descritas en plantas superiores llega a los cientos de miles y está aumentando continuamente. Aproximadamente 1 500 estructuras químicas nuevas de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un buen número tiene actividad biológica (Bittner, 1998).

2.2.1. Sustancias activas de interés farmacológico en la especie *D. purpurea*.

D. purpurea contiene una serie de sustancias activas muy importantes en farmacología para las afecciones cardíacas, de hecho sus principios activos todavía no han podido ser sustituidos por ningún otro producto. Entre las sustancias que contiene se distinguen glicósidos como la digitoxina, gitoxina y digoxina, de acción cardiotónica muy eficaz, así como normalizador del ritmo cardíaco; y otras sustancias no glicósidas como digitoflavina, ciclohexanol, tanino, ácido málico y ácido succínico, que complementan la acción de los glucósidos sobre el corazón (Natureduca, 2004).

Los glicósidos cardiotónicos representan la combinación de una aglicona o genina con 3 moléculas de monosacáridos (Figura 1). Su actividad farmacológica reside en la aglicona, pero son sus unidades monoméricas las que rigen la absorción, la penetrabilidad en la membrana celular, la persistencia de la acción cardíaca y la potencia del glicósido resultante (Gato del Monte *et al.*, 2001).

Todos los glicósidos cardíacos comparten una estructura química similar; poseen una aglicona o genina constituida por un núcleo esteroideo en el que se encuentra la actividad farmacológica del compuesto; un anillo de lactona insaturada (unida al C17) que incorpora actividad cardiotónica y azúcares ligados al C3 que modifican la potencia y la distribución farmacocinética del compuesto (absorción, vida media y metabolismo) La digoxina es el prototipo y el uso clínico más amplio le corresponde a esta, aunque existen otros (Katzung, 1998).

La hidrólisis ácida de la digoxina suministra 1 mol de digoxigenina y 3 moles de digitoxosa (azúcar). La digoxina es similar a la digitoxina, si bien muestra una farmacocinética diferente. La digitoxina se utiliza en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y para controlar el ritmo ventricular en la fibrilación auricular crónica. La digoxina aumenta la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, mejora la sintomatología de los pacientes con insuficiencia cardíaca y reduce las hospitalizaciones (Galiano, 2005).

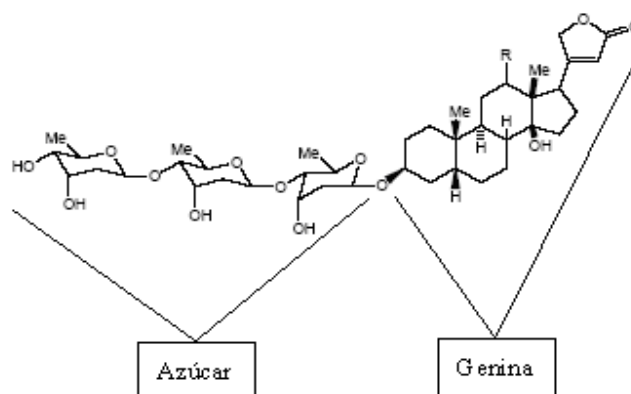


Figura 1. Estructura química de los principales productos de la hidrólisis de Digitalis. Digitoxina (R=H) y Digoxina (R=OH). El azúcar está constituido por tres moléculas de digitoxosa.

2.3. Producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos constituye un recurso alternativo para la obtención de metabolitos secundarios cuya extracción a partir de las plantas que los producen en condiciones de campo, puede resultar difícil o económicamente inviable. Lo que puede atribuirse a los largos períodos de tiempo necesarios para su producción, al riesgo de sobreexplotación a que se expone el cultivo, a las pequeñas cantidades presentes en la planta o debido a los controles a que se someten las plantas productoras (Robert *et al.*, 1991).

La obtención de metabolitos secundarios mediante procesos tradicionales es ineficiente, estando sujeta a las variaciones estacionales y/o climáticas, dificultades de conservación y transporte así como falta de homogeneidad del producto obtenido. Frente a estos inconvenientes, el cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de un suministro regular de un producto homogéneo y sobre todo la perspectiva de lograr buenos rendimientos, dado que las plantas pueden ser desarrolladas bajo condiciones controladas. El cultivo celular permite la "rutinización" típica de las actividades industriales y por lo tanto la optimización de las operaciones. Finalmente, se vislumbra también la posibilidad de obtener nuevos compuestos por medio del cultivo celular. Para ello se prevén dos enfoques diferentes: a) el aislamiento de un cultivo capaz de alto rendimiento y b) el cultivo celular en gran escala y la obtención industrial de determinados productos (Osorio, 2005). Recientemente la atención se ha enfocado en el uso de técnicas especializadas como la Ingeniería metabólica, la inmovilización celular y la elicitación, entre otras (Jen Fu, 1998).

2.3.1. Cultivo de callos.

Los callos son agregados de células indiferenciadas usualmente desarrollados en medios de cultivos solidificados generalmente con agar u otros agentes gelificantes. El estado indiferenciado del callo está determinado fundamentalmente por el balance entre auxinas y citoquininas añadido al medio de cultivo. La formación de callo se observa comúnmente en la superficie del explante pero en ocasiones inicia en el interior del mismo, pueden ser iniciados a partir de la mayoría de las partes de la planta (Haq, 1993).

El cultivo de callos no es comúnmente usado para la obtención de químicos, sin embargo son la fuente de establecimiento de las suspensiones celulares. Aunque la producción de metabolitos es mas estable en callos que en suspensiones celulares (Haq, 1993). Existen algunos trabajos sobre la producción de metabolitos secundarios utilizando el cultivo de callos, por ejemplo, Zhao *et al.* (2001) logran el cultivo de callos de *Catharanthus roseus* con la capacidad de sintetizar niveles estables de alcaloides; Bosila *et al.* (2003) describen la producción de glicósidos cardiotónicos en el cultivo de callos de *Digitalis lanata*.

En ocasiones el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos provoca una reducción considerable de los niveles de metabolitos secundarios, ocurriendo a veces la pérdida completa de productividad para determinados compuestos, lo que no significa que los cultivos celulares no sean capaces de producir compuestos de interés (Arias, 2002), por el contrario Ruyter y Stöckingt (1969) citado por Schripsema *et al.* (1996); Son *et al.* (2000); Zhao *et al.* (2001),

demonstraron que los cultivos celulares son una excelente fuente de nuevos compuestos.

2.3.2. Cultivo de suspensiones celulares.

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión, puede lograrse a partir de tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemos apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos, filamentos de anteras, fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993); además pueden ser usados embriones somáticos (van Holst *et al.*, 1996) o porciones de callos transferidos al medio líquido. El establecimiento de un cultivo de células en suspensión a partir de fragmentos de callos es más rápido, aunque depende de la friabilidad del tejido calloso.

Este sistema de cultivo es un poderoso implemento para realizar estudios sobre la inducción de la embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo; así como, la obtención de diversos productos secundarios tales como: algunos fenoles, antraquinonas, antocianina, nicotina, entre otros (Sato *et al.*, 1993).

El cultivo de suspensiones celulares es preferido para la producción a gran escala debido a su rápido ciclo de desarrollo. Las células vegetales son totipotentes y pueden producir los mismos metabolitos que la planta completa. Los callos y las suspensiones celulares en ocasiones tienen menor contenido de metabolitos que la planta original pero compuestos que no están presentes en la planta pueden estar presentes en el cultivo de células (Jen Fu, 1998). Son varios los autores que reportan el cultivo de suspensiones celulares para la obtención de metabolitos secundarios en varias especies de plantas medicinales entre ellos encontramos el

cultivo de suspensiones celulares de: *Tabernaemontana divaricata* (Schripsema, 1991); *Taxus baccata* (Hirasuna et al., 1996); *Thalictrum minus* (Hara et al., 1993); *Morinda citrifolia* (van der Plas et al., 1995); *Rollinia mucosa* (Figueiredo, 1996); *Catharanthus roseus* (Moreno et al., 1996); *Ammi majus* (Królicka et al., 2001).

2.3.3. Cultivo de órganos.

El desarrollo de ciertos niveles de diferenciación se considera importante en la producción exitosa de fitoquímicos mediante el cultivo de tejidos. Hay muchos ejemplos en la literatura que demuestran la relación entre diferenciación y acumulación metabólica (Hiraoka y Tabata, 1974). En cultivo *in vitro* de *D. purpurea*. L, (Hagimori, 1980) muestra la estimulación de la producción de cardenólidos mediante la rediferenciación de cultivo de callos. Un fenómeno similar ocurre en la formación de rotenona en *Derris elliptica* (Kodama, 1980).

Brotes, raíces y otros cultivos de órganos han sido desarrollados para la producción de compuestos secundarios que requieren diferenciación celular. Los productos de cultivos de tejidos organizados son similares a los obtenidos en las plantas desarrolladas en condiciones de campo (Endo et al., 1985). La estabilidad genética en el cultivo de tejidos organizados es superior a la de los cultivos de callos y suspensiones celulares. El crecimiento estable y la producción consistente de metabolitos secundarios han sido observados en cultivo de brotes y raíces de numerosas especies (Charlwood y Moustou, 1988; Miura et al., 1988). Sin embargo, los compuestos derivados del cultivo de tejidos organizados difieren de los de las plantas intactas. Charlwood y Moustou (1988) encontraron que los cultivos de brotes de *Pelargonium fragrans* producen una marcada reducción de

los niveles de monoterpenos comparado con la planta intacta. En otros casos compuestos no encontrados en las plantas intactas fueron detectados en cultivo de tejidos. Sugimoto *et al.* (1988) encontraron que los niveles de alcaloides de cultivo de raíces de *Stephania cepharantha* fueron superiores que en las plantas en condiciones naturales y aromalina que no está presente en la planta original alcanzó el 1 % del peso seco de las células.

2.4 Empleo de elicitores en la producción de metabolitos secundarios.

Los compuestos que pueden inducir la reacción de defensa en las plantas son conocidos como elicitores, la mayoría de estos son derivados de componentes de la superficie celular de microorganismos patogénicos o compuestos de bajo peso molecular producidos por patógenos (Yamaguchi *et al.*, 2000).

El término “elicitor” se utiliza comúnmente para denominar a aquellas moléculas naturales (bióticas), procedentes de la planta (elicitores endógenos) o del fitopatógeno (elicitores exógenos), que son capaces de inducir respuestas estructurales y/o bioquímicas asociadas a la resistencia de la planta frente al organismo que la ataca (Ebel y Mithöfer, 1997; Radman *et al.*, 2003). Por otro lado, existen los elicitores químicos (abióticos), tales como ácido isonicotínico, ácido salicílico (Sakamoto *et al.*, 1999) ácido jasmónico, etileno (Reymond y Farmer, 1998).

Los elicitores naturales (bióticos) pueden clasificarse en varios grupos, los que difieren en el rango de especificidad. Por ejemplo los elicitores derivados de los llamados genes de “avirulencia” se piensa que inducen reacciones de defensa solamente en las variedades que poseen genes de “resistencia”. Sin embargo,

otros como las oligosacarinas pueden ser reconocidas por varias especies de plantas, entre estos últimos los oligosacáridos derivados de la quitina y β glucano son potentes elicitores (Yamaguchi *et al.*, 2000).

Entre las señales elicitoras de reacciones de defensa se incluyen los oligosacáridos β (1-3,1-6)-glucanos, quitina y oligómeros quitosano, glicopéptidos, fosfolípidos y ácidos grasos como el araquidónico; todos ellos han sido identificados como potenciales elicitores capaces de desencadenar la cascada de eventos que permite la activación de genes de defensa (Picard *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que la resistencia sistémica esta mediada por diferentes vías de transducción de señales. La resistencia sistémica inducida (RSI) por patógenos esta mediada por una ruta asociada y dependiente del ácido salicílico (AS), y por una ruta independiente de AS, ligada al ácido jasmónico (AJ) y al etileno. La ruta dependiente de AS permite el desarrollo de la RSI y la expresión de genes que codifican proteínas de defensa, denominadas proteínas PR. La ruta ligada al AJ y etileno, conduce a la expresión de genes que codifican proteínas denominadas defensinas, tioninas o proteínas antimicrobianas (PAM), inhibidores de proteasas y otras proteínas PR no inducidas por AS. Frecuentemente ambas rutas se entrecruzan y pueden inducir compuestos o proteínas de defensa comunes (Reymond y Farmer, 1998).

Los elicitores dependiendo de la naturaleza del factor estresante, pueden ser físicos y químicos. Entre los primeros están el déficit hídrico, salinidad, temperaturas extremas, excesiva o insuficiente radiación luminosa, anaerobiosis por encharcamiento o inundación, factores mecánicos como el viento o la

compactación del suelo y las lesiones. Los químicos incluyen el estrés iónico (por salinidad), el estrés nutricional, o la presencia de contaminantes inorgánicos (dióxido de silicio, ozono o metales pesados) u orgánicos (clorofluorocarbonados, bifenilos policlorados o hidrocarburos aromáticos policíclicos). El estrés abiótico es el más común y generalmente, se produce una combinación de varios de ellos.

Królicka *et al.* (2001) describen la acumulación de umbeliferona (metabolito secundario) en el cultivo *in vitro* de callos, suspensiones celulares y raíces de *Ammi majus* utilizando elicitores abióticos (dióxido de silicio y ácido jasmónico) y elicitores bióticos (extractos autoclaveados de *Enterobacter sakazaki*, *Erwinia chrysanthemi* y scleroglucan un componente de la pared celular de hongos).

Spollansky *et al.* (2000) logran incrementar el contenido de alcaloides (escopolamina e hyoscyamina) en el cultivo *in vitro* de raíces de *Brugmansia candida* expuestos a diferentes elicitores (ácido jasmónico y cloruro de aluminio (AlCl_3)).

Un estudio de laboratorio indica que la producción de toxinas naturales puede elevarse como resultado de la elicitation. En el cultivo de suspensiones celulares de tomate *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT-cereza, que contenía un nivel bajo de glicoalcaloide (tomatina), con la adición de dos elicitores comúnmente usados (extracto de levadura y Metil Jasmonato), el nivel de tomatina aumentó en un 80 y 60%, respectivamente (Jen Fu, 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolitos Secundarios del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) y el Laboratorio de Cromatografía del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de La Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en el período comprendido de Enero de 2004 a Diciembre de 2005.

3.0. Procedimientos generales de cultivo *in vitro*.

Los instrumentos utilizados para la manipulación aséptica del material vegetal fueron esterilizados en estufa a una temperatura de 180° C durante dos horas antes de cada sección de trabajo y se mantuvo la asepsia colocando éstos en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% según la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1993). Todas las operaciones de disección y transferencias se realizaron en cabinas de flujo laminar horizontal. Los medios de cultivos se esterilizaron en autoclave vertical a 121 °C y 1.2 Kg.cm⁻² de presión durante 20 minutos.

Medios de cultivo.

En todos los casos se empleó el medio de cultivo basal compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), el cual a partir de este momento se nombrará como (MS). Como agente gelificante se utilizó Gelrite® (Merck & Co., Inc.), a razón de 3.0 g.L⁻¹. El pH fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización, con NaOH 1.0 N y HCL 1.0 N.

Preparación del material vegetal.

En esta investigación se utilizó como material vegetal inicial, semillas de *Digitalis purpurea* L. var. Rotter Berggold procedentes de la empresa de semillas Farmasaat GmbH (Alemania).

Las semillas se desinfectaron según el protocolo propuesto por (Gedeon, 1982), el cual se describe a continuación:

1. Lavar con agua y detergente.
2. Enjuagar con agua destilada estéril.
3. Sumergir en una solución de alcohol al 70 % (v/v), durante 5.0 minutos.
4. Enjuagar con agua destilada estéril.
5. Sumergir en una solución de hipoclorito de sodio [NaOCl] al 5.0 % durante 5.0 minutos.
6. Enjuagar tres veces con agua destilada estéril en cabina de flujo laminar.

Germinación de las semillas.

Las semillas se pusieron a germinar bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento con luz solar a 27 ± 2 °C y se empleó un medio de cultivo semisólido compuesto por sales MS (reducidas al 50 %) suplementadas con 1.0 mg.L⁻¹ de Tiamina, 100 mg.L⁻¹ de Myoinositol y 3.0 % de sacarosa. Se utilizaron como frascos de cultivo, frascos de policarbamato de 500 mL de capacidad a los cuales se le añadieron 25 mL de medio de cultivo.

Multiplicación de los brotes.

Para la multiplicación de los brotes se utilizó un medio de cultivo compuesto por sales MS (100 %) suplementado con 1.0 mg.L⁻¹ de Tiamina, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 1.0 mg.L⁻¹ de 6-BAP (6-Benzilaminopurina), 0.1 mg.L⁻¹ de AIA (Ácido indol-3-acético) y 3.0 % de sacarosa, el cual a partir de ahora se denominará (MMb). Los brotes se mantuvieron en condiciones controladas en cámaras de crecimiento con luz solar a 27 ± 2 °C. Como frascos de cultivo se usaron frascos de policarbamato de 500 mL de capacidad a los cuales se le añadieron 70 mL de medio de cultivo semisólido.

3.1. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre la morfología de brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro* en medio de cultivo semisólido.

Este experimento se realizó con el objetivo de estudiar el efecto de elicitores bióticos y abióticos en algunas variables morfológicas durante la multiplicación *in vitro* de brotes de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido.

Se utilizó el medio de cultivo de multiplicación de brotes (MMb) citado anteriormente al cual se añadieron los elicitores Metil Jasmonato (Duchefa NV, Holanda), ChitoPlant (Chitosana, Chipro GmbH, Bremen, Alemania) y SilioPlant (bióxido de silicio 35 %, Chipro GmbH, Bremen, Alemania) en las concentraciones que se describen en la tabla 1.

El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar, cada tratamiento estuvo compuesto por 10 frascos de cultivo a los que se le añadieron

70 mL de medio de cultivo semisólido y se colocaron 5 brotes por frasco procedentes del cuarto ciclo de cultivo (subcultivo) en fase de multiplicación.

Tabla 1. Elictores bióticos y abióticos y concentraciones aplicadas en la multiplicación *in vitro* de brotes de *D. purpurea*.

Tratamientos	Medio de cultivo	Elictores		
		ChitoPlant	SilioPlant	Metil Jasmonato
Control	MMb	-	-	-
ChP ₁	MMb	0.001 g.L ⁻¹	-	-
ChP ₂	MMb	0.01 g.L ⁻¹	-	-
ChP ₃	MMb	0.1 g.L ⁻¹	-	-
SiP ₁	MMb	-	0.01 g.L ⁻¹	-
SiP ₂	MMb	-	0.1 g.L ⁻¹	-
SiP ₃	MMb	-	1.0 g.L ⁻¹	-
MJ ₁	MMb	-	-	0.014 g.L ⁻¹
MJ ₂	MMb	-	-	0.018 g.L ⁻¹
MJ ₃	MMb	-	-	0.022 g.L ⁻¹

Evaluaciones morfológicas.

A los 28 días de cultivo se cosecharon los brotes y se evaluaron las siguientes variables morfológicas:

- Altura de los brotes (cm)
- Número de brotes.
- Masa fresca de brotes por frasco (g).
- Masa seca (Ms) de brotes por frasco (g).

Procesamiento estadístico de las variables morfológicas evaluadas.

El procesamiento de los datos se realizó mediante un Análisis de Varianza simple empleando el paquete estadístico Statgraphics Plus (versión 2.1) para Windows,. Como prueba de comparación de medias la de rangos múltiples de Duncan para un 5.0 % de significación. Los datos se transformaron mediante la raíz cuadrada del valor más 0.5.

En el caso de las variables altura de la planta y número de brotes, se analizaron 50 muestras por tratamientos. El número de muestras para la variable masa fresca por frasco fue de 10 y para la masa seca por frasco de 4.0.

3.2. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre el contenido de digoxina y digitoxina en brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro* en medio de cultivo semisólido.

Para evaluar la influencia de los elicitores estudiados sobre la síntesis de metabolitos secundarios se determinó el contenido de digoxina y digitoxina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se analizaron dos muestras por cada uno de los tratamientos a evaluar.

La forma de preparación de las muestras, obtención de los extractos y cromatografía por HPLC se describen a continuación:

Preparación de las muestras:

A los 28 días de cultivo se cosecharon los brotes, los cuales fueron lavados con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo, luego se colocaron sobre papel de filtro para eliminar el agua y se pesaron en una balanza digital para

cuantificar la masa fresca. Posteriormente las muestras fueron secadas en estufa a 60 °C durante 24 horas hasta que se mantuvo constante el peso y se determinó la masa seca.

Protocolo de extracción:

1. Tomar 1.5 g de masa seca pulverizada.
2. Añadir 15 mL de etanol absoluto al 70 % y mantener durante 15 minutos en baño ultrasónico a 70 °C.
3. Dejar enfriar y añadir 25 mL de agua bidestilada.
4. Añadir 10 mL de una solución de acetato de plomo dihidratado ($\text{AcPb} + 2\text{H}_2\text{O}$) al 15 %.
5. Centrifugar a 3 000 rpm durante 5.0 minutos.
6. Filtrar.
7. Añadir 12 mL de una solución de monohidrógeno fosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) al 10 %.
8. Centrifugar a 3 000 rpm durante 5.0 minutos.
9. Filtrar.
10. Realizar tres extracciones con mezcla de cloroformo / isopropanol (3:2), una primera con 30 mL de la mezcla y dos extracciones sucesivas con 20 mL de la mezcla. Unir las fracciones.
11. Rotoevaporar a 40 °C.
12. Resuspender el residuo en 1.0 mL de etanol absoluto.

Determinación del contenido de digoxina y digitoxina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

De los extractos obtenidos de cada una de las muestras se inyectaron 10 μL a una columna de fase reversa (Econosil C18, 5.0 μm , 250*4.6 mm; precolumna Econosil C18, 7.5*3.2 mm) acoplada a un cromatógrafo líquido de alta resolución (KNAUER GmbH, Alemania) con un detector UV-Vis a una longitud de onda de 220 nm. Las separaciones se realizaron en régimen de gradiente acetonitrilo-agua (25:75) y un flujo de 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 40 °C. Los datos fueron procesados mediante el Software EUROCHROM 2000 versión 2.05 para Windows ®.

Se obtuvieron las curvas de calibración con estándares de digoxina (SIGMA, USA) y digitoxina (SIGMA, USA) ploteándose la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con el área ($\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$) del pico correspondiente, como se muestra en las figuras 2 y 3.

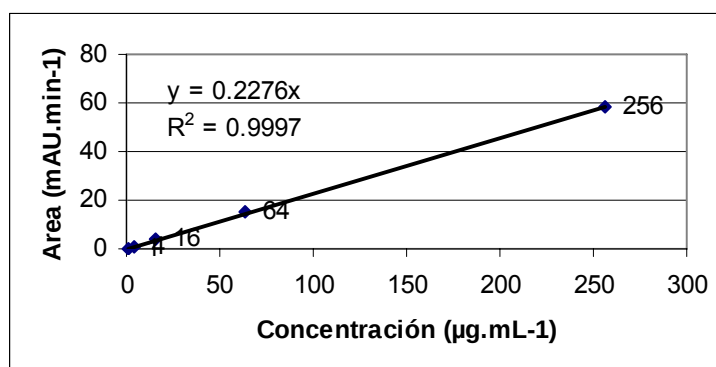


Figura 2. Curva de calibración para el estandar de digoxina.

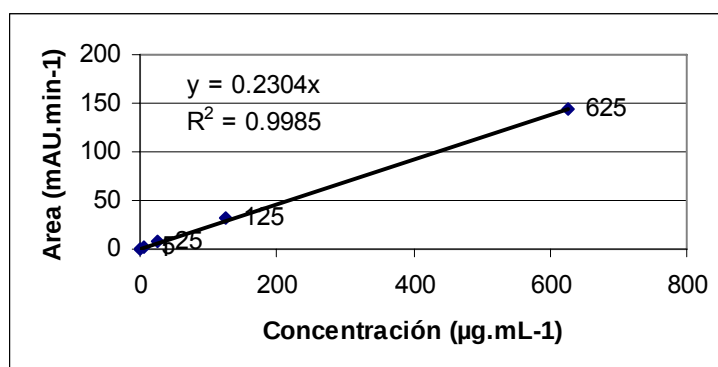


Figura 3. Curva de calibración para el estándar de digitoxina.

Para determinar el pico correspondiente a cada metabolito en las muestras analizadas se tuvo en cuenta que coincidiera con el tiempo de retención correspondiente a cada estándar (Figura 4). Se tomó el área debajo del pico y se afectó por la ecuación matemática de la curva de calibración para cada estándar.

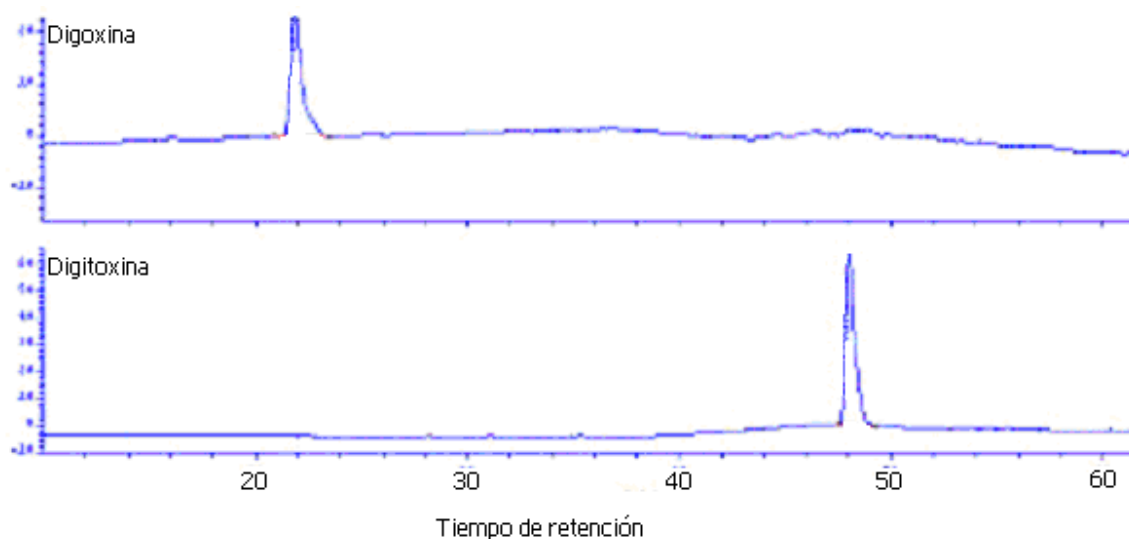


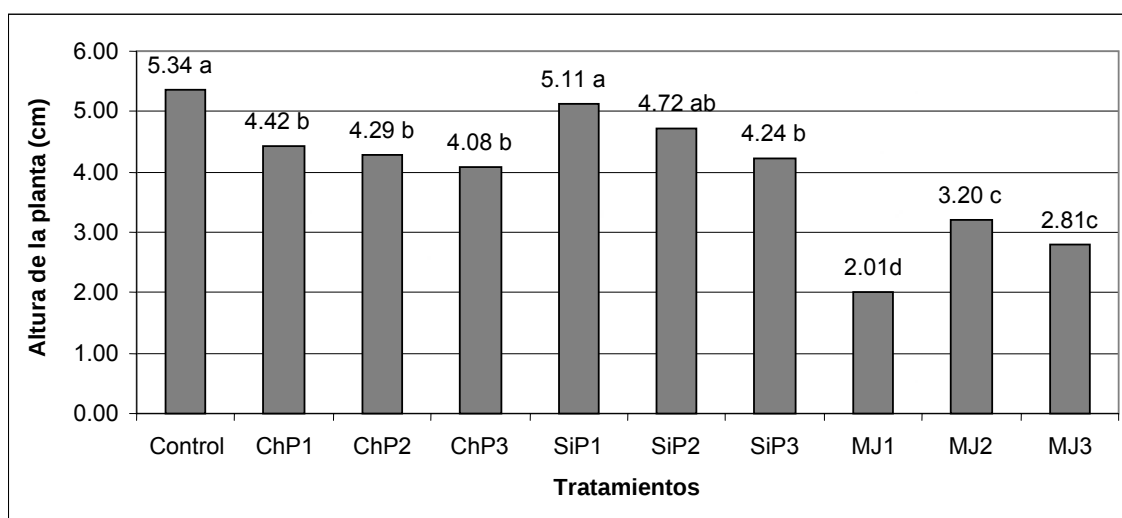
Figura 4. Cromatogramas de los estándares de digoxina (64 ppm) y digitoxina (125 ppm).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre la morfología de brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro* en medio de cultivo semisólido.

Teniendo en cuenta los datos representados en la figura 5 se puede afirmar que la adición de elicitores al medio de cultivo afectó el desarrollo de los brotes, observándose diferencias significativas entre los tratamientos empleados en cuanto a la altura de los brotes.

En todos los tratamientos con ChitoPlant hubo disminución de la altura de las plantas con respecto al control sin elicitores, aunque no difieren estadísticamente entre ellos.



*Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

± EE	0.05
CV	20.14

Figura 5. Influencia de elicitores bióticos y abióticos en la altura de brotes de *D. purpurea* cultivados *in vitro*. Control (MMb sin elicitores), ChP 1 (0.001 g.L^{-1}), ChP 2 (0.01 g.L^{-1}), ChP 3 (0.1 g.L^{-1}), SiP 1 (0.01 g.L^{-1}), SiP 2 (0.1 g.L^{-1}), SiP 3 (1.0 g.L^{-1}), MJ 1 (0.014 g.L^{-1}), MJ 2 (0.018 g.L^{-1}), MJ 3 (0.022 g.L^{-1}).

En los tratamientos con SilioPlant se evidenció una disminución de la altura de los brotes según aumenta la concentración de este elicitor. Las concentraciones de 0.01 y 0.1 g.L⁻¹ no difieren estadísticamente del control, pero en la mayor concentración utilizada (1.0 g.L⁻¹) hubo una disminución significativa en la altura de los brotes con respecto al control y a la concentración de 0.01 g.L⁻¹.

La adición de Metil Jasmonato al medio de multiplicación en cualquiera de las concentraciones ensayadas provocó disminuciones drásticas de la altura de los brotes con respecto al control y al resto de los tratamientos con elicitores.

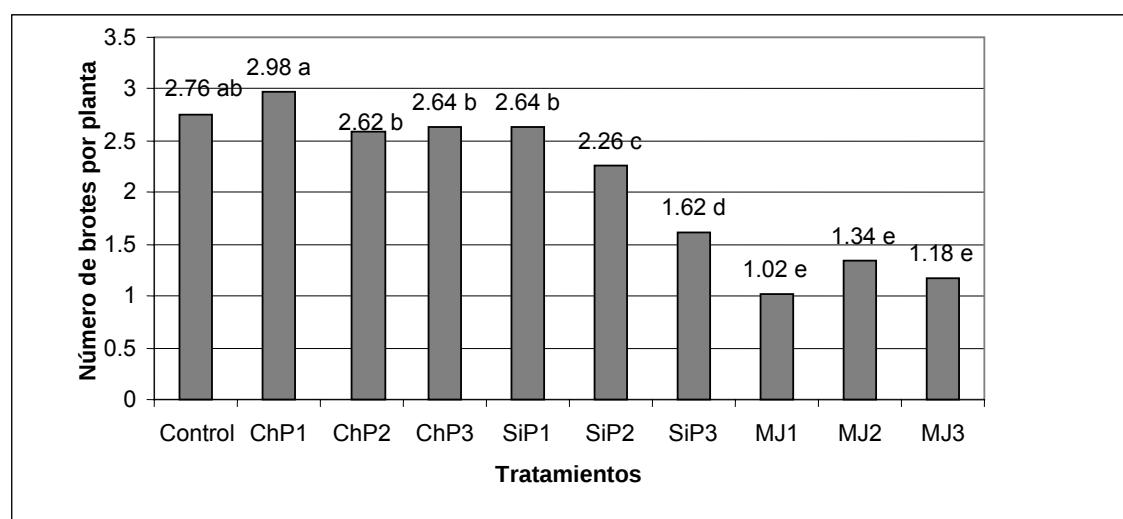
Además, en los tratamientos con Metil Jasmonato los ápices de los brotes en los primeros días de cultivo tenían una coloración morada y a los 28 días las hojas mostraban una coloración verde pálido similar al color de plantas con clorosis. En los demás tratamientos no se observó cambios de coloración.

En la figura 6 se representa la influencia de los elicitores estudiados sobre el número de brotes por explante, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos empleados.

Las distintas concentraciones de ChitoPlant ensayadas no mostraron una influencia marcada sobre el número de brotes por explante, al no observarse diferencias estadísticas con el control sin elicitores.

Con el aumento de la concentración de SilioPlant se observa una disminución gradual del número de brotes, existiendo diferencias significativas entre las concentraciones empleadas y el control, excepto en el tratamiento donde se adicionó la menor concentración (0.01 g.L⁻¹).

En los tratamientos con Metil Jasmonato se manifestó la mayor disminución en el número de brotes, con diferencias estadísticas con todos los demás elicitores ensayados y el control, pero sin diferencias significativas entre sí.



*Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

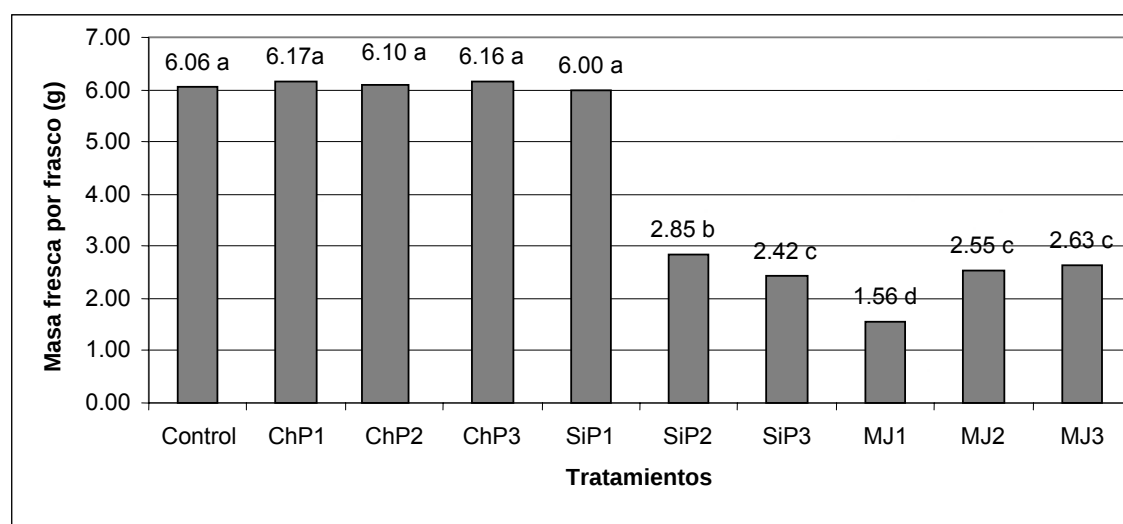
± EE	0.03
CV	19.46

Figura 6. Influencia de elicitores bióticos y abióticos en el número de brotes por explante en la multiplicación *in vitro* de *D. purpurea*. Control (MMb sin elicitores), ChP 1 (0.001 g.L^{-1}), ChP 2 (0.01 g.L^{-1}), ChP 3 (0.1 g.L^{-1}), SiP 1 (0.01 g.L^{-1}), SiP 2 (0.1 g.L^{-1}), SiP 3 (1.0 g.L^{-1}), MJ 1 (0.014 g.L^{-1}), MJ 2 (0.018 g.L^{-1}), MJ 3 (0.022 g.L^{-1}).

Al analizar el efecto de los elicitores estudiados en cuanto al comportamiento de la masa fresca por frasco de cultivo (Figura 7) existen diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos con ChitoPlant muestran un comportamiento similar y no difieren estadísticamente con el control.

El aumento de la concentración de SilioPlant provoca una disminución de la masa fresca. El tratamiento donde se emplea la concentración más baja de SilioPlant muestra un comportamiento similar al control no mostrando diferencias estadísticas con el mismo.

Los tratamientos con Metil Jasmonato muestran una disminución de la masa fresca con respecto al control y con la mayoría de los tratamientos, aunque se observa tendencia a aumentar según se aumenta la concentración.

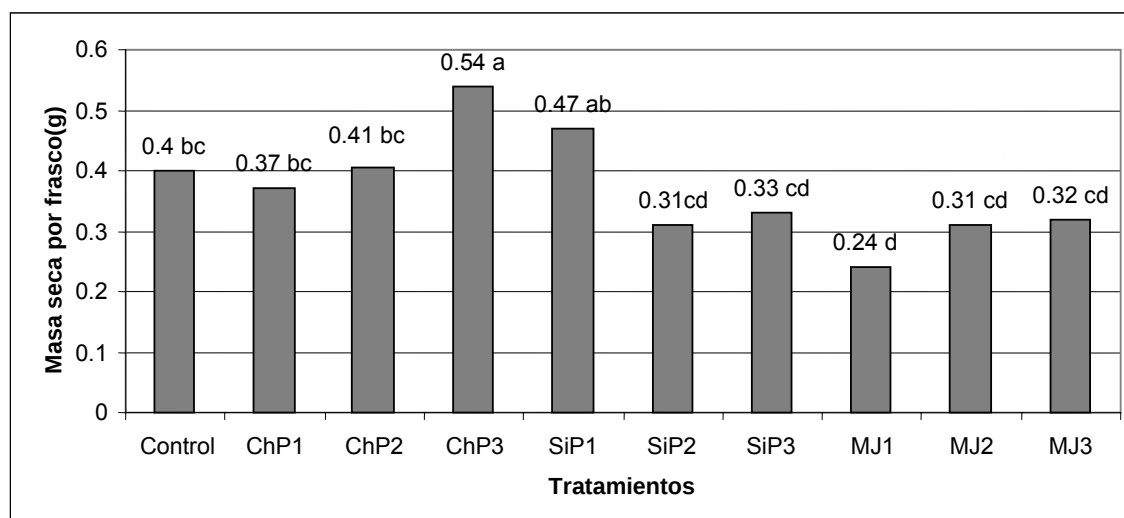


*Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

$\pm$ EE	0.05
CV	19.89

Figura 7. Influencia de elicitors bióticos y abióticos en el contenido de masa fresca por frasco de cultivo (g) de brotes de *Digitalis purpurea* cultivados *in vitro*. Control (MMb sin elicitors), ChP 1 (0.001 g.L^{-1}), ChP 2 (0.01 g.L^{-1}), ChP 3 (0.1 g.L^{-1}), SiP 1 (0.01 g.L^{-1}), SiP 2 (0.1 g.L^{-1}), SiP 3 (1.0 g.L^{-1}), MJ 1 (0.014 g.L^{-1}), MJ 2 (0.018 g.L^{-1}), MJ 3 (0.022 g.L^{-1}).

En la figura 8 se muestra la influencia de los elicitors estudiados en el contenido de masa seca de los brotes (g), por frasco de cultivo, donde se observa diferencia significativa entre los tratamientos. Los mejores valores de masa seca corresponden a la mayor concentración de ChitoPlant y la menor de SilioPlant, aunque la menor concentración de SilioPlant no difiere estadísticamente del control.



*Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

$\pm$ EE	0.03
CV	8.74

Figura 8. Influencia de elicitors bióticos y abióticos en el contenido de masa seca por frasco de cultivo (g), de brotes de *Digitalis purpurea* en cultivo *in vitro*. Control (MMb sin elicitors), ChP 1 (0.001 g.L^{-1}), ChP 2 (0.01 g.L^{-1}), ChP 3 (0.1 g.L^{-1}), SiP 1 (0.01 g.L^{-1}), SiP 2 (0.1 g.L^{-1}), SiP 3 (1.0 g.L^{-1}), MJ 1 (0.014 g.L^{-1}), MJ 2 (0.018 g.L^{-1}), MJ 3 (0.022 g.L^{-1}).

De los resultados de las evaluaciones morfológicas realizadas (altura y número de brotes, masa fresca y masa seca por frasco de cultivo) se demuestra que la adición de elicitors al medio de multiplicación provocó cambios en la morfología de los brotes y en dependencia de la concentración aplicada, afectaciones en el crecimiento y desarrollo de los mismos.

El chitoPlant contiene como ingrediente activo quitosana un derivado de la quitina componente que se encuentra en la pared celular de hongos e insectos entre otros. Forma una película semipermeable alrededor de los tejidos de las plantas (El Ghaouth et al., 1994), según Aita Barka *et al.* (2004) la quitosana es considerada como un potente elicitor de las respuestas de defensa de las plantas que a una concentración de 1.75 % (v/v) en el medio de cultivo induce un

incremento en el desarrollo de los explantes en el cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* pero una concentración de 2.0 %(v/v) tuvo un efecto negativo en el mismo. Marrero *et al.* (1997) con la adición de un hidrolizado de quitosana en el medio de cultivo a las concentraciones de 1, 5 y 10 mg.L⁻¹, comprobaron que las bajas concentraciones tuvieron un efecto estimulador sobre el crecimiento de las plantas *in vitro* de *Citrus aurantium*. Sin embargo en este trabajo la adición de ChitoPlant provocó una disminución en la altura con respecto al control, pero no produjo afectaciones en el número de brotes por explante ni en la masa fresca por frasco. En la cantidad de masa seca no hubo diferencias con el control a excepción de la concentración más alta (0.1 g.L⁻¹) que indujo un incremento significativo en esta variable con el valor más alto de todos los tratamientos ensayados.

El SilioPlant, a medida que se incrementó su concentración en el medio de cultivo, provocó disminuciones en la altura de los brotes, el número de brotes y la masa fresca con respecto al control, a excepción de la concentración de 0.01 g.L⁻¹ que no mostró diferencias para ninguna de estas variables. Mientras que en la producción de masa seca ninguno de los tratamientos difirió del control. Sobre la utilización de este elicitor en el cultivo *in vitro* hay pocos antecedentes, en la bibliografía consultada solo se describe su uso en el cultivo *in vitro* de callos, suspensiones celulares y raíces de *Ammi majus* con resultados favorables en la acumulación de umbeliferona (Królicka *et al.*, 2001).

El Metil Jasmonato en todas las concentraciones ensayadas provocó disminuciones en todas las variables evaluadas, con excepción de la masa seca

donde las concentraciones de 0.018 g.L^{-1} y 0.022 g.L^{-1} no mostraron diferencias con el control. Estos resultados señalan la conveniencia de, en futuros experimentos, ensayar con concentraciones menores de este elicitor.

El metil Jasmonato ha sido utilizado frecuentemente en varias especies cultivadas *in vitro* aunque mayormente en cultivo de suspensiones celulares, Wu et al., (2003) utilizan concentraciones entre 60 y 100 μM en suspensiones celulares de *Taxus chinensis* aunque también se ha utilizado en el cultivo de órganos, por ejemplo Colque R (2000) obtiene resultados favorables en el cultivo *in vitro* de brotes y bulbos de plantas de la familia Amaryllidaceae empleando una concentración de 25 μM de Metil Jasmonato.

La biosíntesis de metabolitos secundarios se asocia con la respuesta de defensa de las plantas cuando son sometidas a condiciones de estrés. Entre las respuestas bioquímicas tempranas de la planta, esta la generación de las especies reactivas de oxígeno (peróxido, superóxido y el radical hidróxilo) que pueden funcionar como moléculas señal para inducir genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y/o antioxidante o bien; para genes del sistema enzimático involucrado en regular sus propios niveles y que son tóxicos para la propia célula vegetal (Sepúlveda, 2005).

Las plantas muestran respuestas morfológicas y fisiológicas ante un grupo de factores físicos y químicos conocidos como elicitores, estas respuestas son consideradas como reacciones de defensa de la planta para asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad (Radman et al., 2003).

El metabolismo secundario se realiza a partir del metabolismo primario de la planta que son sustancias imprescindibles para su fisiología. En presencia de elicitores en la planta se activan las rutas metabólicas que dan origen a los metabolitos secundarios, por lo que la planta desvía parte del material del metabolismo primario para estos fines. Por esta razón, las plantas bajo tratamiento con elicitores pueden mostrar cambios morfológicos como disminución o detención del crecimiento como sucede en los tratamientos con Metil Jasmonato, que se considera como un intermediario en el metabolismo secundario de las plantas y también en los tratamientos donde se emplearon las concentraciones de 0.1 g.L^{-1} y 1.0 g.L^{-1} de SilioPlant.

4.2. Efecto de elicitores bióticos y abióticos sobre el contenido de digoxina y digitoxina en brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro* en medio de cultivo semisólido.

En la figura 10 se muestran los contenidos de digoxina y digitoxina en los tratamientos donde se elicitaron los brotes con ChitoPlant. La adición ChitoPlant en cualquiera de las tres concentraciones ensayadas incrementó el contenido tanto de digoxina como de digitoxina con respecto al control en medio de multiplicación. En el tratamiento con la mayor concentración de ChitoPlant (0.1 g.L^{-1}) se logró triplicar el contenido de digoxina e incrementar en 2.4 veces el contenido de digitoxina en comparación con el control.

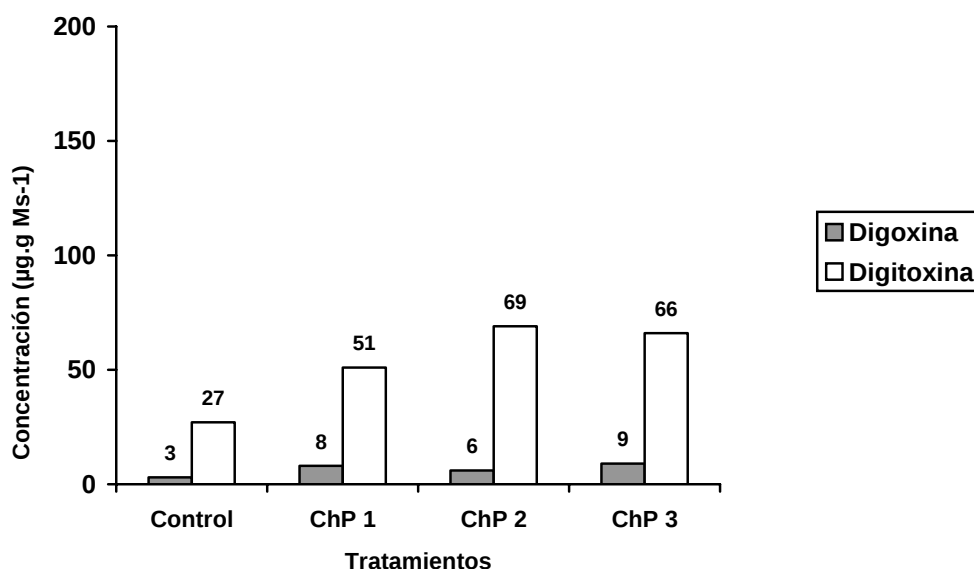


Figura 10. Influencia de la concentración de ChitoPlant en el contenido de digoxina y digitoxina ($\mu\text{g.g Ms}^{-1}$) en brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro*. Control (MMb sin elicitores), ChP 1 (0.001 g.L^{-1}), ChP 2 (0.01 g.L^{-1}), ChP 3 (0.1 g.L^{-1}).

Los brotes multiplicados con la adición de SilioPlant en el medio de cultivo (Figura 11), mostraron valores de contenido de digoxina y digitoxina superiores al control, con excepción del contenido de digoxina en el tratamiento con 1.0 g.L^{-1} .

Las mayores concentraciones de digoxina ($10 \mu\text{g.g Ms}^{-1}$) y digitoxina ($187 \mu\text{g.g Ms}^{-1}$) se encontraron en el tratamiento con 0.01 g.L^{-1} de SilioPlant, lo que corresponde a incrementos de 3.3 y 6.9 veces en el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente, en comparación con el control.

Es de destacar, que a pesar de que todos los tratamientos con SilioPlant incrementaron el contenido de digoxina y de digitoxina en los brotes, se observó una disminución progresiva del contenido de ambos compuestos a medida que se

incrementa la concentración de SilioPlant en el medio de cultivo, alcanzando el tratamiento con 0.1 g.L^{-1} contenido similar de digoxina al control.

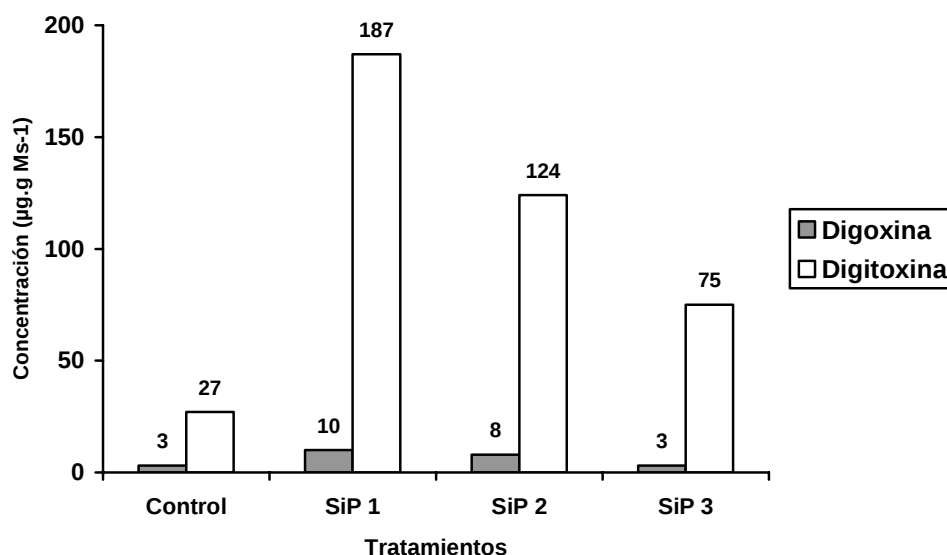


Figura 11. Efecto de la concentración de SilioPlant (bioóxido de silicio) en el contenido de digoxina y digitoxina ($\mu\text{g.g Ms}^{-1}$) en brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro*. Control (MMb sin elicitores), SiP 1 (0.01 g.L^{-1}), SiP 2 (0.1 g.L^{-1}), SiP 3 (1.0 g.L^{-1}).

La adición de Metil Jasmonato en las concentraciones ensayadas (0.014 , 0.018 y 0.022 g.L^{-1}) no tuvo un efecto marcado sobre el contenido de digitoxina, alcanzandose la mayor concentración de este compuesto en el tratamiento con 0.022 g.L^{-1} de Metil Jasmonato, con $37 \mu\text{g.g Ms}^{-1}$ por $27 \mu\text{g.g Ms}^{-1}$ en el control (Figura 12).

Por el contrario, el Metil Jasmonato logró incrementar la concentración de digoxina en los brotes hasta valores de $11 \mu\text{g.g Ms}^{-1}$ en el tratamiento con 0.018 g.L^{-1} , que equivale a un aumento de 3.7 veces con respecto al control, que es la mayor concentración alcanzada en todos los elicitores ensayados para este compuesto.

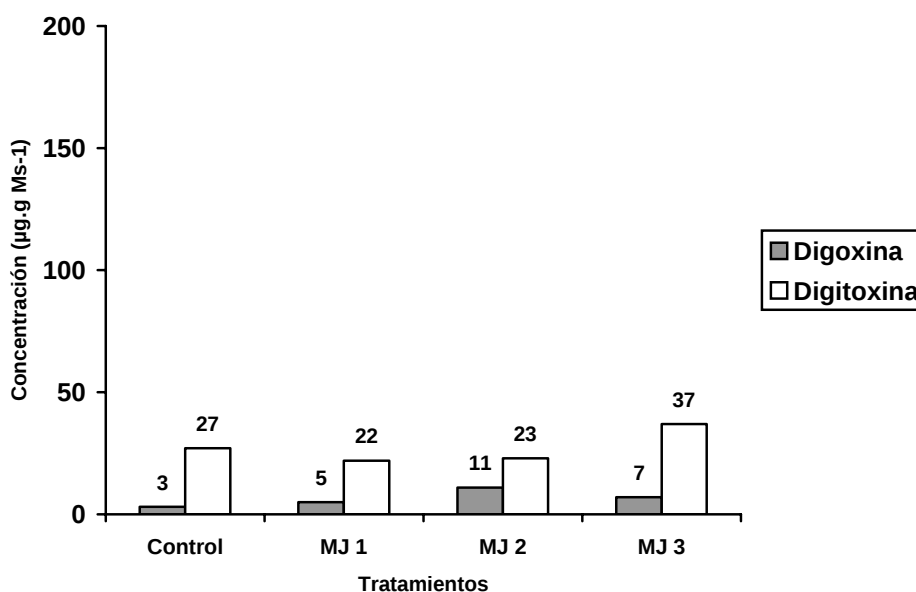


Figura 12. Influencia de la concentración de Metil Jasmonato en el contenido de digoxina y digitoxina ($\mu\text{g.g Ms}^{-1}$) en brotes de *D. purpurea* multiplicados *in vitro*. Control (MMb sin elicitores), MJ 1 (0.014 g.L^{-1}), MJ 2 (0.018 g.L^{-1}), MJ 3 (0.022 g.L^{-1}).

Haciendo un análisis general tanto de las evaluaciones morfológicas (producción de masa seca) como del contenido de metabolitos (digoxina y digitoxina) (Tabla 2), los mejores resultados integrales en cuanto a producción neta de estos compuestos se alcanzaron en el tratamiento con 0.01 g.L^{-1} de SilioPlant, en el cual se logra un rendimiento neto por frasco de cultivo de $4.7 \mu\text{g}$ de digoxina y $87.9 \mu\text{g}$ de digitoxina.

El segundo mejor resultado se observa en el tratamiento con 0.1 g.L^{-1} de ChitoPlant, que alcanzó una producción neta por frasco de cultivo de $4.9 \mu\text{g}$ de digoxina y $35.6 \mu\text{g}$ de digitoxina.

Tabla 2. Producción neta por frasco de cultivo de digoxina y digitoxina en los tratamientos ensayados.

Tratamientos	MS por frasco (g)	Digoxina ($\mu\text{g.g Ms}^{-1}$)	Digitoxina ($\mu\text{g.g Ms}^{-1}$)	Digoxina μg por frasco	Digitoxina μg por frasco
MMb (sin elicitores)	0.40	3	27	1.2	10.8
ChP 1 (0.001 g.L ⁻¹)	0.37	8	51	3.0	18.9
ChP 2 (0.01 g.L ⁻¹)	0.41	6	69	2.5	28.3
ChP 3 (0.1 g.L ⁻¹)	0.54	9	66	4.9	35.6
SiP 1 (0.01 g.L ⁻¹)	0.47	10	187	4.7	87.9
SiP 2 (0.1 g.L ⁻¹)	0.31	8	124	2.5	38.4
SiP 3 (1.0 g.L ⁻¹)	0.33	3	75	1.0	24.8
MJ 1 (0.014 g.L-1)	0.24	3	22	0.7	5.3
MJ 2 (0.018 g.L-1)	0.31	5	23	1.6	7.1
MJ 3 (0.022 g.L-1)	0.32	7	37	2.2	11.8

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten demostrar que con el empleo de elicitores en el medio de cultivo es posible incrementar la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en el cultivo de órganos (brotes) *in vitro*, en este caso con la especie *Digitalis purpurea* L. y para los compuestos digoxina y digitoxina en específico.

El uso de elcitores para incrementar la síntesis de metabolitos secundarios ha sido practicada con relativa amplitud en varias especies; por ejemplo Królicka *et al.* (2001) describen la acumulación de umbeliferona (metabolito secundario) en el cultivo *in vitro* de callos y suspensiones celulares de *Ammi majus* utilizando elicitores abióticos (dióxido de silicio y ácido jasmónico) y elicitores bióticos (extractos autoclaveados de *Enterobacter sakazaki*, *Erwinia chrysanthemi* y

scleroglucan un componente de la pared celular de hongos). Según Jen Fu (1998) en el cultivo de suspensiones celulares de tomate *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT-cereza, que contenía un nivel bajo de glicoalcaloide (tomatina), con la adición de dos elicitores comúnmente usados (extracto de levadura y Metil Jasmonato), el nivel de tomatina aumentó en un 80 y 60%, respectivamente. Zhang *et al.* (2004) indican que la elicitación combinada mediante la adición de 30 μM de Ag^+ , 60 μM de Metil Jasmonato y 50 mg de Chitosana a los 10 días de cultivo puede inducir significativamente la producción de paclitaxel en suspensiones celulares de *Taxus chinensis*.

Sin embargo la mayoría de los trabajos han sido realizados empleando principalmente cultivos de suspensiones celulares y con menor frecuencia el cultivo de callos, por lo que este constituye uno de los pocos trabajos en que se ha aplicado la elicitación y el cultivo de brotes para la producción de metabolitos secundarios.

Para una aplicación práctica de este resultado, el próximo paso necesario sería la comprobación del efecto de elicitación con SilioPlant y ChitoPlant a mayor escala empleando sistemas de inmersión temporal.

5. CONCLUSIONES.

- La adición de ChitoPlant provocó una disminución en la altura de los brotes y no produjo afectaciones en las demás variables evaluadas, a excepción de la concentración de 0.1 g.L^{-1} que indujo un incremento significativo de la masa seca.
- El SilioPlant, a medida que se incrementó su concentración en el medio de cultivo, provocó disminuciones en la altura, número de brotes y la masa fresca con respecto al control, a excepción de la concentración de 0.01 g.L^{-1} .
- El Metil Jasmonato provocó disminuciones en todas las variables evaluadas, excepto en la masa seca donde las concentraciones de 0.018 g.L^{-1} y 0.022 g.L^{-1} no mostraron diferencias con el control.
- El ChitoPlant incrementó el contenido de digoxina y digitoxina, lográndose en el tratamiento con 0.1 g.L^{-1} triplicar el contenido de digoxina e incrementar en 2.4 veces el contenido de digitoxina, en comparación con el control.
- El SilioPlant incrementó el contenido de digoxina y de digitoxina en los brotes, alcanzándose en el tratamiento con 0.01 g.L^{-1} incrementos de 3.3 y 6.9 veces en el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente, en comparación con el control.
- Los mejores resultados integrales se alcanzaron en el tratamiento con 0.01 g.L^{-1} de SilioPlant, en el cual se logra un rendimiento neto por frasco de cultivo de $4.7 \mu\text{g}$ de digoxina y $87.9 \mu\text{g}$ de digitoxina, seguido del tratamiento con 0.1 g.L^{-1} de ChitoPlant, que alcanzó una producción neta por frasco de cultivo de $4.9 \mu\text{g}$ de digoxina y $35.6 \mu\text{g}$ de digitoxina.

6. RECOMENDACIONES.

- Continuar el estudio del efecto de los elicitores estudiados en la morfología y contenido de digoxina y digitoxina en brotes de *D.purpurea* en medio de cultivo semisólido probando mayores concentraciones de Chitoplant que las utilizadas así como estudiar concentraciones menores de SilioPlant y Metil Jasmonato.
- Estudiar el efecto de los elicitores empleados en otros sistemas de cultivo *in vitro* (sistemas de inmersión temporal y cultivo de células en biorreactores) en *D.purpurea*, que permitan el escalado de la producción de biomasa para la obtención de digoxina y digitoxina.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Agramonte D., Pérez J., Pérez M., Pérez A (1993) Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCL) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola. 88-89.
- Ait Barka E., Eullaffroy P., Clement C y G Vernet (2004) Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. Physiology and Biochemistry. Plant Cell Report 22:608–614.
- Arias R (2002) [Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón, "Maca"](#). Tesis (Biólogo)-- Mención: Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima. [en línea]. Disponible en: <<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/tesis>>. [Consulta 15 Octubre 2005].
- Benson E (1990) Free Radical Damage in Stored Plant Germplasm. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Bosila HA., Mohamed S., El-Gamal S., Bekhit M (2003) Factors affecting callus production and glycosidal content of leaf tissue culture of *Digitalis lanata* Ehrh. ISHS Acta Horticulturae 597. [en línea]. Disponible en: <http://www.actahort.org/books/597/597_42.htm>. [Consulta: 25 Octubre 2005].
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M y Inzé D (1994) Superoxide dismutase in plants. CRC Crit. Rev. Plant Sci, 13:199-218.
- Briskin D (2000) Medicinal Plant and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. Plant Physiology, 124: 507-514.

- Charlwood B y Moustou C (1988) Manipulating Secondary Metabolism in Culture. Cambridge University Press: Cambridge, U. K. 187-194.
- Colque R (2000) Cultivo *in vitro* de plantas bulbosas de la familia Amaryllidaceae. Micropropagación y producción de galantamina por cultivo de organos. [en línea]. Disponible en: <<http://www.cibernetia.com/tesis>> [Consulta: 23 Noviembre 2005].
- Cowan T (2004) The Fourfold Path to Healing. Digitalis. [en línea]. Disponible en: <<http://www.fourfoldhealing.com/Digitalis.htm>>. [Consulta: 8 Octubre 2005].
- Dennis J., Trigiano N y Conger V (1993) Liquid suspension culture production of Orchard grass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. En: Redenbaugh K (Ed) Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement. 351-365. Calgene Inc, Daris, California.
- Dereck B (2003) [Canadian Poisonous Plants Information System](#). [en línea]. Disponible en: <http://www.cbif.gc.ca/pls/pp/poison?p_x=px>. [Consulta 23 Abril 2004].
- Ebel J y Mithöfer A (1997) Early events in the elicitation of plant defence. Planta, 206:335-348.
- El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Benhamou N., Asselin A y Belanger R (1994) Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphinodermatum* and induction of defense reactions. Phytopathology 84:313-320.

- Elstner EF (1987) Metabolism of activated oxygen species. En: Conn EE y Stumpf PK. (eds). The Biochemistry of Plants. 2: 253–315. Academic Press, London.
- Endo T y Yamada Y (1985) Phytochemistry, 24: 1233.
- Figueiredo SFL (1996) Desenvolvimento de um sistema de cultura *in vitro* para a produção de ligninas furofurânicas a partir de *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.(dissertation). Rio de Janeiro: Universidad Federal de Rio de Janeiro.
- Foyer C y Mullineaux P (1994) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Galiano RA (2005) Vademécum. Digoxina. [en línea]. Disponible en:<<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/d024.htm>>. [Consulta 5 Noviembre 2005].
- Gato del Monte A., Padrón S y Alfonso Y (2001) Formulación de digoxina 250 µg/mL inyectable para la producción nacional. Revista Cubana Farmacia, 35 (2): 85-90.
- 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>>. [Consulta 18 Abril 2004].
- Hagimori M (1980) Plant and Cell Physiol, 21: 1391.
- Haq N (1993) Breeding and improvement of medicinal and aromatic plants. Medicinal and Aromatic Plants in Asia (eds.) N. Chomchalow and H. V. Henle RAPA Pub.No: 19/93.

- Hara M., Kitamura T., Fukui H y Tabata M (1993) Induction of berberine biosynthesis by cytokinins in *Thalictrum minus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep,12:70-3.
- He Zhang C y Bi Xu H (2001) Improved paclitaxel production by *in situ* extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 23: 189–193.
- Herboteca (2005) Dedalera, Digital. [en línea]. Disponible en: <<http://www.herboteca.com.ar/exo-digital.html>>. [Consulta: 8 Octubre 2005].
- Hiraoka N y Tabata M (1974). *Phytochem*, 13:1671.
- Hirasuna TJ., Pestchanker LJ., Srinivasan V y Shuler ML (1996) Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell Tiss Org Cult*; 44:95-102.
- Hultén E (1968) *Flora of Alaska and Neighboring Territories*. Stanford University Press, Stanford, CA. 1008.
- Jen Fu T (1998) Safety considerations for food ingredients produced by plant cell and tissue culture. *CHEMTECH*, 28 (1): 40-46.
- Katzung BG (1998) *Farmacología básica y clínica*. 7ª. Edición. México: Manual Moderno. 235.
- Kodama T (1980) *Agric. Biol. Chem*, 44: 2387.
- Królicka A., Lojkowska E., Staniszevska I., Malinski E y Szafranek J (2001) Identification of secondary metabolites in *in vitro* culture of *Ammi majus* treated with elicitors. IV International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural

- Breeding. [en línea]. Disponible en: <<http://www.actahort.org/>>. [Consulta: 10 Octubre 2005].
- Lui J H y Staba E J (1981) *Planta Med*, 41: 90-95.
- Mann J (1978) *Secondary Metabolism* (Oxford Univ. Pres, Oxford); E.A. Bell and B.V. Charlwood, Eds., *Encyclopedia of Plant Physiology* (Springer-Verlag, New York, 1980),8.
- Marrero M., Reinaldo I., Cabrera G y Martínez M (1997) Hidrolizado de quitosana como estimulador del crecimiento de vitroplantas de naranjo agrio (*Citrus aurantium*). [en línea]. Disponible en: <[http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/CT18\(1\),%201997-INTERNET.htm](http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/CT18(1),%201997-INTERNET.htm)>. [Consulta: 15 Octubre 2005].
- Misawa M (1994) Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite. *FAO Agricultural services bulletin* N° 108. Roma, Italia.
- Miura Y., Hirata K., Kurano N., Miyamoto K y Uchida K (1988) *Planta Med*, 54: 18.
- Moreno PR., Poulsen C., van der Heijden R., Verpoorte R (1996) *Enzyme Microb. Technol*, 18: 99.
- Murashige. T.; Skoog. F (1962) *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- Murcia J y Hoyos I (2001) Características y aplicaciones de las plantas. [en línea]. Disponible en: <<http://www.zonaverde.net>>. [Consulta: 10 Diciembre 2004].
- Natureduca (2004) Plantas medicinales. [en línea]. Disponible en: <http://www.iespana.es/natureduca/index_ini.htm>. [Consulta: 20 Enero 2005].

- Navarro S., Vera R (1988) Historia del cultivo de tejidos vegetales. Hurtado D y Merino M.(eds). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México. 15-34.
- Ni W., Fahrendorf T., Ballance GM., Lamb CJ., Dixon RA (1996) *Plant Mol. Biol*, 30, 427.
- Osorio MA (2005) La biotecnología. [en línea]. Disponible en: http://www.100cia.com/monografias/biologia/la_biotecnologia.html. [Consulta: 20 Octubre 2005].
- Palacios N. 2004. Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(2): 67-77.
- Perl-Treves R y Galun E (1991) The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol*, 17:745-760.
- Picard K., Ponchet M., Blein, JP., Rey P., Tirilly Y y Benhamou N (2000) Oligandrin. A Proteinaceous Molecule Produced by the Mycoparasite *Pythium oligandrum* Induces Resistance to *Phytophthora parasitica* Infection in Tomato Plants. *Plant Physiol*, 124: 379-396.
- Putnam AR (1983) *Chem. Eng. News* 61 (14). 34; Rice EL, *Allelopathy* (Academic Press, New York, ed. 2; Rice EL, *Pest Control with Nature's Chemicals* (Univ. of Oklahoma Press, Norman.
- Radman R., Saez T., Bucke C, y Keshavarz T (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotech and Applied Biochem*, 37:91-102.

- Renobales y Sallés J (2001) Plantas de interés farmacéutico. [en línea]. Disponible en: <<http://www.vc.ehu.es/plfarm>>. [Consulta: 16 Mayo 2004].
- Reymond P, y Farmer E (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Cur Opin Plant Biol*, 1:404-411.
- Robert Ml., Reyes J., Loyola VM (1991) Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura*. (Ed. Por W.M Roca y L.A Mroginski). CIAP. Cali. 211-238.
- Roig JT (1974) Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. (Ed). Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana. 343.
- Rucker W (1988) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 4. Ed. Bajaj, Y.P.S.388-418. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Sakamoto K., Tada Y., Yokozeki Y., Akari H., Hayashi N., Fujimura T y Ichikawa N (1999) Chemical induction of disease resistance in rice correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. *Plant Mol Biol*, 40:847-855.
- Sato S., Newel C., Kolacz K., Tredo L., Finer J y Hinchey M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports*, 12:408-413.
- Scandalias JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*, 101:7-12.

- Schripsema I., Fung S y Verporte R (1996) Screening of plant cell culture secondary metabolism. Toward Industrialy Aplication. (Ed. Por F. Dicosmo y M. Misawa). CRC.
- Schripsema J (1991). Factors involved in the alkaloid production of *Tabernaemontana divaricata* plant cell suspension cultures (dissertation). Leiden: Universidade Leiden.
- Sepúlveda G (2005) Eventos bioquímicos involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios de importancia farmacológica producidos por cultivos de células vegetales. Proyecto CGPI 2005019. [en línea]. Disponible en: <<http://www.ceprobi.ipn.mx/version2004/Verespa/Investigacion/lineaccvb/CGPI%2020050109.htm>>. [Consulta: 10 Diciembre 2005].
- Son SH., Choi SM., Lee YH., Choi KB., Yun SR., Kim JK., Kwon OW., Noh EW., Seon JH y Park YG (2000) Larg-escale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanes yew) using a novel bioreactor. Plan Cell Reports, 19 : 628-633.
- Spollansky T., Pitta-Alvarez S y Giulietti A (2000) Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Electronic Journal of Biotechnology (EJB), 3(1). Valparaíso, Chile. [en línea]. Disponible en: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/6/#article>>. [Consulta: 15 Octubre 2005].
- Sugimoto Y., Sugimura Y., Yamada Y (1988) Agric. Biol. Chem, 52:1495.

- Szabados L., Mroginski LA., Roca WM (1991) Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: Roca. W. (ed). Cultivo de tejidos en la agricultura. 173.
- Thorpe TA (1980) Organogenesis *in vitro*: estructural, physiological and biochemical aspects. En Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue. Academic Press, Nueva York. 71-111.
- Thorpe TA (1983) Morphogenesis and regeneration in tissue culture. En: Owens LD. (Ed). Genetic engineering: Aplications to agriculture. Rowman and Allanhead, Totowa, Nueva Yersy, E.U. 285-303.
- Tsang E., Bowler C., Hérouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M y Inzé D (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to enviromental stress. Plant Cell, 3:783-792.
- USDA (United States Department of Agriculture), NRCS (Natural Resource Conservation Service) (2002) The PLANTS Database, Version 3.5. [en línea]. Disponible en: <<http://plants.usda.gov>>. National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. [Consulta: 15 Septiembre 2004].
- Van der Plas LHW., Eijkelboom C y Hagendoorn MJM (1995) Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. Plant Cell Tiss Org Cult,43:111.
- Van Holst G, Kreuger M, Meer W, Postma E y Abbestee R (1996) Somatic Embryogenesis Method. United States Patent. 5,587.312

- Vanisree M., Chen-Yue L., Shu-Fung Lo., Satish Manohar Nalawade., Chien Yih L y Hsin-Sheng T (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. [en línea. Disponible en: <<http://www.ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2004/1/bot45101.pdf>>]. [Consulta: 20 Febrero 2005].
- Wikipedia (La enciclopedia libre) (2005) Dedalera. [en línea]. Disponible en: <<http://es.wikipedia.org/wiki/Dedalera>>. [Consulta: 8 Octubre 2005].
- Wilson JB., Rapson GL., Sykes MT., Watkins AJ., y Williams PA (1992) Distributions and climatic correlations of some exotic species along roadsides in South Island, New Zealand. *Journal of Biogeography*, 19(2): 183-193.
- Yamaguchi T., Yamada A., Hong N., Ogawa T., Ishii T, y Naoto Shibuya (2000) Differences in the Recognition of Glucan Elicitor Signals between Rice and Soybean: β -Glucan Fragments from the Rice Blast Disease Fungus *Pyricularia oryzae* That Elicit Phytoalexin Biosynthesis in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Cell*, 12: 817-826.
- Yamamoto H., Yato A., Yazaki K., Hayashi H., Tagushi G y Inoue K (2001) Increase of secondary metabolite production in various plant cell cultures by co-cultivation with cork. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (4):853-60.
- Zhao J., Wei-Hua Z y Qiu Hu (2001) Effects of Light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus culture. *Plant Growth Regulation*, 33: 43-49.

Zhu D y Scandalios JG (1993) Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9310-9314.