

## Efecto de la densidad de inóculo y la renovación de la atmósfera gaseosa en el cultivo de brotes de *Digitalis purpurea* L. en Sistemas de Inmersión Temporal

Naivy Pérez-Alonso<sup>1\*</sup>, Alina Capote<sup>1</sup>, Anabel Pérez<sup>1</sup>, André Gerth<sup>2</sup>, Borys Chong-Pérez<sup>1</sup>, Elio Jiménez<sup>1\*\*</sup> \*Autora para correspondencia

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>2</sup>VITA 34 AG. Deutscher Platz 5a D-04103 Leipzig, Germany.

\*\*Dirección actual: Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 18905 SW 280<sup>th</sup> Street, Homestead, FL 33031, USA.

### RESUMEN

*Digitalis purpurea* L. es una de las dos únicas especies de interés económico del género *Digitalis*. Su importancia radica en que constituye una de las principales fuentes de cardenólidos, fármacos irremplazables en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la densidad de inóculo y la renovación de la atmósfera gaseosa en sistemas de inmersión temporal (SIT) en *Digitalis purpurea* L. Para su cumplimiento, se estudiaron diferentes densidades de inóculo (6, 12, 18 explantes por SIT) en la producción de biomasa así como el uso de la ventilación forzada. La mayor producción de biomasa por SIT (104.03 gMF y 5.74 gMS) se obtuvo cuando se inocularon 12 explantes. Sin embargo, la menor densidad de inóculo produjo un efecto negativo en el desarrollo de los explantes y no hubo incremento de biomasa. La renovación de la atmósfera mediante la ventilación forzada indujo un mayor estrés oxidativo asociado a un aumento de la síntesis de digitoxina. Tanto la densidad de inóculo como la ventilación forzada son factores de gran importancia en el cultivo en sistemas de inmersión temporal ya sea para la producción de biomasa como para la obtención de metabolitos secundarios en plantas de interés.

Palabras clave: cardenólidos, medios líquidos, metabolitos secundarios, ventilación forzada

## Effect of inoculum density and gaseous atmosphere renovation in *Digitalis purpurea* L. shoots culture in Temporary Immersion Systems

### ABSTRACT

*Digitalis purpurea* L. is one of the two unique species of economic interest in the genus *Digitalis*. It is important because is one of the principal source of cardenolides, irreplaceable drugs in the treatment of heart failure. The present work was done with the objective to determinate the effect of inoculum density and gaseous atmosphere renovation in *D. purpurea* plants cultivated in Temporary Immersion Systems (TIS). To do this, several parameters like inoculums density (6, 12, 18 explants per TIS) and the use forced ventilation were studied. The highest biomass production was obtained when 12 explants were inoculated (104.03 gFW and 5.74 gDW). On the contrary, the lower inoculum density caused a negative effect in plant development and the biomass did not increase. On the other hand, the renovation of atmosphere mediated by forced ventilation induced a higher oxidative stress associated to an increase of digitoxin synthesis. Both factors are of great importance for biomass and secondary metabolites production in plants with pharmaceutical interest.

Key words: cardenolides, forced ventilation, liquid medium, secondary metabolites

### INTRODUCCIÓN

Las plantas son consideradas una fuente valiosa para la producción de compuestos de interés farmacéutico. Entre ellas se destacan como fuente de cardenólidos las pertenecientes al género *Digitalis*, siendo

*Digitalis purpurea* L. una de las dos únicas especies de interés económico de dicho género (Sales *et al.*, 2011). Estos compuestos son relevantes para la industria farmacéutica, principalmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la segunda causa

de muerte en varios países, incluido Cuba. Además, en los últimos años se han descrito también sus efectos en el control del cáncer de riñón, de próstata y leucemia (Elbaz *et al.*, 2012).

El proceso de síntesis química es inviable por los altos costos y la complejidad estructural de los cardenólidos por lo que las plantas de dicho género constituyen la única fuente comercial de estos compuestos (Sales *et al.*, 2011). En Cuba, la planta no se cultiva por lo que se importa la materia prima para la elaboración de los fármacos proveniente de plantas de *Digitalis* cultivadas en países productores.

En este caso, las estrategias se han visto restringidas al cultivo *in vitro* y el aumento de la productividad de las plantas. Es por ello que se realizan estudios con este fin y ofrecer alternativas a la producción en condiciones naturales la cual presenta limitantes considerables. Estas se enmarcan en la variación ambiental que provoca cambios en la calidad de las plantas y la fluctuación y heterogeneidad de las sustancias activas (Roca-Pérez *et al.*, 2004).

En consecuencia, el desarrollo de la biotecnología para la obtención de compuestos activos comprende dos pasos cruciales según Wang *et al.* (2012). Uno de ellos, es el desarrollo de métodos eficientes para la producción de biomasa que permitan obtener grandes cantidades de materia prima en cortos períodos de tiempo, en espacios reducidos y al menor costo posible. Es en este contexto, los sistemas de inmersión temporal (SIT) juegan un papel fundamental debido a la facilidad de escalado y el incremento de la eficiencia biológica, ventajas que se describen en la literatura científica (Pérez-Alonso *et al.*, 2012; Schumann *et al.*, 2012). El segundo paso es lograr una concentración elevada del compuesto de interés en la biomasa producida. Esta pudiera lograrse con la activación transitoria de las rutas que regulan la biosíntesis de dichos compuestos mediante la variación de las condiciones de cultivo entre otras variantes.

La densidad de inóculo así como la renovación de la atmósfera gaseosa, son factores que podrían contribuir a lograr un incremento de la biomasa de *Digitalis purpurea* y en

consecuencia de las concentraciones de digoxina y la digitoxina, cardenólidos de interés. En la literatura científica, pocos son los trabajos que refieren el efecto de estos factores en los SIT, sin embargo se consideran de relevante importancia. En *D. purpurea* no se describe hasta la fecha el efecto de estos factores en la producción de biomasa y cardenólidos, el cual constituye el objetivo de la investigación realizada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se emplearon plantas *in vitro* de *Digitalis purpurea* L. var. 'Rotter Berggold' propagadas según Pérez-Alonso *et al.* (2009) entre el cuarto y séptimo subcultivo. Las hojas y raíces de estas fueron cortadas. Los brotes con una longitud aproximada de 2.0 cm fueron utilizados como inóculo.

Para el desarrollo de los experimentos, se empleó el medio de cultivo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), 4.0 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con 0.5 μM de ácido indolacético (AIA) y 4.4 μM de 6-bencilaminopurina (6-BAP). El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización, con KOH 0.5 N y HCl 0.5 N.

Los brotes se cultivaron 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 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y ocho horas de oscuridad, a 27±2 °C.

Cada SIT estuvo conformado por dos frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, según describe Jiménez *et al.* (1999). Se añadieron 250 ml de medio de cultivo anteriormente descrito por SIT y en cada experimento fueron inoculados cuatro SIT por tratamiento.

### **Efecto de la densidad de inóculo**

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la densidad de inóculo sobre el desarrollo morfo-fisiológico de los brotes y por consiguiente en la producción de biomasa en los SIT. Para ello, se evaluaron tres densidades de inóculo: 6, 12 y 18 brotes por SIT. Antes de

la inoculación se determinó la masa fresca (g) correspondiente a cada densidad de inóculo. Las inmersiones se realizaron cada cuatro horas con dos minutos de duración teniendo en cuenta estudios previos descritos por Pérez-Alonso *et al.* (2009).

A los 28 días de cultivo se cosechó la biomasa producida. Se evaluaron la altura (cm) y el número de brotes como indicadores morfológicos de crecimiento. La biomasa producida se evaluó mediante la masa fresca, expresada en gramos de masa fresca (gMF) y masa seca, expresada en gramos de masa seca (gMS), por frasco de cultivo referido por Pérez-Alonso *et al.* (2009). El cálculo del contenido de agua (%) se realizó según describe Bandyopadhyay *et al.* (2004).

Además, los brotes fueron individualizados y clasificados en brotes hiperhídricos o normales según su aspecto morfológico. Se consideraron como brotes hiperhídricos aquellos que presentaron apariencia turgente, translúcidos y que se quiebran fácilmente en comparación con los brotes normales. Para determinar el color de los brotes se utilizó el código hexadecimal de colores (<http://www.cwp.linnet.edu/cwis/cwp.html>).

### **Efecto de la renovación de la atmósfera**

Este experimento se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de la renovación de la atmósfera gaseosa en los SIT sobre la producción de biomasa y de cardenólidos. Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a la densidad de inóculo así como estudios previos descritos por Pérez-Alonso *et al.* (2009).

Los recipientes de cultivo que contenían los explantes fueron aireados de forma periódica (dos veces) durante un minuto en los intervalos entre cada inmersión para un total de 12 aireaciones adicionales. El diseño de los SIT no se modificó, solo se programó el canal de entrada de aire a este recipiente y se tuvieron en cuenta las posibilidades del temporizador para la programación. Como control se empleó igual frecuencia (cada 4h) sin aireaciones adicionales.

Además de las variables morfológicas y de producción de biomasa descritas

anteriormente, se determinó la dinámica de producción de biomasa durante el cultivo mediante el monitoreo de la masa fresca por SIT, para lo cual se pesó el frasco de cultivo de los brotes previo a la inoculación. Este valor fue restado al peso total del frasco con los explantes cada siete días.

Previo a la inoculación en los SIT, los brotes se pesaron para conocer la masa fresca (g) inicial. Se determinó el contenido de los cardenólidos (digoxina y digitoxina) mediante HPLC, se expresó en  $\mu\text{g gMS}^{-1}$  y se calculó la producción neta de cardenólidos ( $\mu\text{g}$  de cardenólidos por SIT) teniendo en cuenta la masa seca obtenida por SIT. El protocolo de extracción y cuantificación de cardenólidos fue el propuesto por Wichtl *et al.* (1982) con algunas modificaciones referidas por Pérez-Alonso *et al.* (2009).

Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron los niveles de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y malondialdehído (MDA). Los primeros fueron determinados según el método descrito por Sergiev *et al.* (1997). El contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue calculado mediante una curva de calibración realizada a partir de concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno. La peroxidación lipídica fue estimada mediante la determinación de los niveles de malondialdehído (MDA) en las hojas a través de la reacción del ácido tiobarbitúrico (SIGMA) (Sivanesan *et al.*, 2011).

### *Procesamiento estadístico*

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizó el programa SPSS ver. 18.0, para el sistema operativo Windows. Se aplicaron análisis no paramétricos en todos los datos puesto que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para  $p < 0.05$  de significación y las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron determinadas mediante la prueba de Mann Whitney con la penalización de Bonferroni.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados mostraron que la densidad de inóculo tuvo efecto en el desarrollo morfo-fisiológico de los brotes y la biomasa obtenida

por SIT (Tabla 1). Las plántulas obtenidas en el tratamiento con 12 explantes (aproximadamente 20 ml de medio de cultivo por explante) alcanzaron una mayor altura (10.93 cm) y un mayor número de brotes por explante (5.85).

De igual manera, en este tratamiento se obtuvieron los mayores valores en la masa fresca y masa seca por SIT y un menor contenido de agua en la biomasa producida por SIT respecto al tratamiento con una densidad de inóculo de 18 explantes. Todos estos factores indicaron una mayor calidad de las plántulas obtenidas en el tratamiento con 12 explantes. El incremento de la producción de biomasa como índice biológico está directamente relacionado con la disponibilidad de nutrientes, la cual está influenciada por el volumen de medio de cultivo por explante (Gárate y Bonilla, 2008).

En el tratamiento con menor densidad de inóculo (6 explantes/SIT) se observaron los menores valores en las variables evaluadas y en los brotes se apreciaron afectaciones morfológicas a los 28 días de cultivo (Figura 1).

La densidad de inóculo como variable tiene su fundamento en la cantidad de volumen de medio de cultivo disponible por explante, además del espacio físico para su desarrollo. Es posible que el poco desarrollo morfo-fisiológico y la afectación en los explantes sea debido a un insuficiente inóculo, influenciado a su vez por la disponibilidad del medio de cultivo (aproximadamente 40 ml disponibles por explante) y el ambiente *in vitro*. Estos factores, según Piqueras y Debergh (1999), influyen directamente en el desarrollo de los brotes y los procesos morfo-genéticos.

Tabla 1. Efecto de la densidad de inóculo en el desarrollo de brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados durante 28 días en sistemas de inmersión temporal (SIT).

Indicadores evaluados	Densidad de inóculo/SIT					
	**6 explantes		***12 explantes		***18 explantes	
	Media	RM	Media	RM	Media	RM
Altura (cm)	3.58	12.50 c	10.93	79.61 a	8.71	49.39 b
Número de brotes/explante	1.00	12.50 c	5.85	78.51 a	4.20	50.49 b
*Brotes hiperhídricos/SIT (%)	0	2.50 c	3.93	6.50 b	20.10	10.50 a
*Masa fresca/SIT (g)	6.70	2.50 c	104.03	10.50 a	88.46	6.50 b
*Masa seca/SIT (g)	0.36	2.50 c	5.74	10.50 a	2.57	6.50 b
*CA en biomasa producida (%)	94.7	5.50 b	94.5	3.50 b	97.1	10.50 a

Leyenda: CA Contenido de agua, RM Rangos medios. Rangos medios con letras no comunes dentro de una misma fila difieren según prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0.05$  (\* $n=4$ , \*\* $n=24$  y \*\*\* $n=40$  para Altura y Número de brotes/explante)

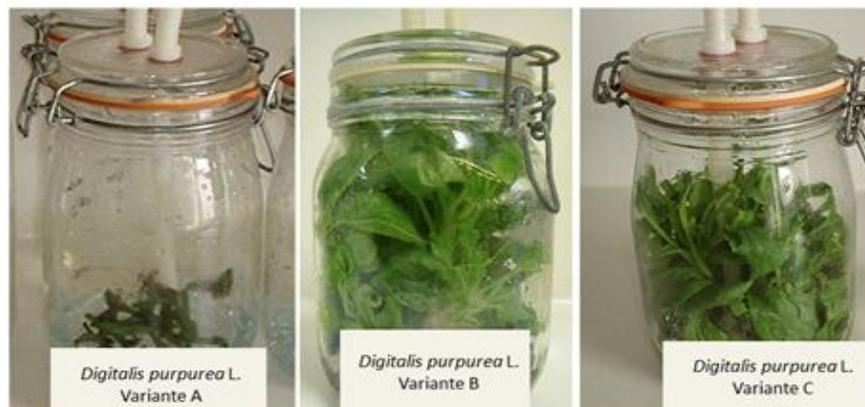


Figura 1. Brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados durante 28 días en sistemas de inmersión temporal con diferentes densidades de inóculo, A: 6 explantes; B:12 explantes; C:18 explantes/SIT.

En el tratamiento con 18 explantes por SIT (aproximadamente 13 ml de medio de cultivo por explante) hubo una reducción considerable del valor de la masa seca (2.57 g), con el mayor contenido de agua en la biomasa producida (97.1%). En este tratamiento pudo existir una mayor competencia por los nutrientes lo que afectó los valores de masa fresca y masa seca. Además, esta reducción de la masa seca en el tratamiento con 18 explantes puede estar asociada a la presencia de brotes hiperhídricos (20.15%), valor que difiere significativamente con el porcentaje de brotes hiperhídricos obtenidos en las densidades menores.

La figura 2 muestra la morfología de los brotes normales con hojas verdes (código hex: #008000) expandidas y los hiperhídricos obtenidos en el tratamiento con 18 explantes. En las densidades de inóculo de 12 y 18 explantes/SIT, el 100% de los brotes normales desarrollaron raíces.

La hiperhidricidad descrita como severos desórdenes fisiológicos y anatómicos (Ivanova y Van Staden, 2011) se caracteriza por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos. Las hojas y los tallos de los brotes hiperhídricos muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos son translúcidos y se quiebran con facilidad (Savio *et al.*, 2012). Según Kevers *et al.* (2004), la hiperhidricidad implica problemas de diferenciación celular, por lo que los brotes no pueden tener un desarrollo morfo-fisiológico normal. Este fenómeno aunque no ha sido dilucidado completamente se describe como un desorden multicausal (Quiala *et al.*, 2012)

pero que en las condiciones experimentales pudo ser resultado de una mayor concentración de etileno en la atmósfera interna. Preil (2005) refiere que los brotes de especies dicotiledóneas tienden a ser más hiperhídricos cuando las densidades de inóculo son altas en los cultivos en medios líquidos.

Hasta el momento, varias investigaciones refieren el empleo de los SIT en la producción de biomasa en especies de interés medicinal (Schumann *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que la densidad de inóculo es una variable básica para establecer métodos de cultivo en SIT, existe limitada información acerca de su efecto sobre la proliferación y calidad de los brotes.

Schumann *et al.* (2012) describen la influencia de diferentes factores, entre ellos la densidad de inóculo en la producción de biomasa en brotes de *Leucosium aestivum* L. en sistemas de inmersión temporal. En su investigación refieren resultados muy similares donde el incremento de biomasa varió en dependencia de la densidad de inóculo. Los autores obtuvieron el mayor coeficiente de multiplicación (6.09) en SIT de 1.0 l con una densidad de 10 gMF y una reducción con la menor densidad de inóculo pero no refieren una explicación al fenómeno.

Contrario a los pocos ejemplos relacionados con el estudio de la densidad de inóculo en el cultivo de órganos en plantas de interés farmacológico, la literatura científica refleja investigaciones en los procesos de micropropagación de diferentes especies en medios de cultivo líquidos.



Figura 2. Morfología de brotes hiperhídricos (A) y normales (B) de *Digitalis purpurea* L. obtenidos a los 28 días de cultivo en Sistemas de Inmersión Temporal con una densidad de inóculo de 18 explantes.

Al respecto, Hahn y Paek (2005) indicaron que la evaluación de este factor incrementó la eficiencia de multiplicación pues es posible obtener un gran número de propágulos al mismo tiempo. Sus investigaciones se desarrollaron en el cultivo de brotes de *Dendranthema grandiflorum* Kitam en biorreactores de 10 l de capacidad y observaron que en las etapas iniciales la multiplicación de brotes se incrementó en el tratamiento donde se empleó la mayor densidad (80 explantes). Sivakumar *et al.* (2005) en el cultivo de brotes de *Chrysanthemum grandiflorum* L. en biorreactores compararon diferentes densidades de inóculo en el crecimiento y la calidad de las plantas. En su investigación obtuvieron el menor desarrollo de los brotes y de la biomasa con la menor densidad de inóculo, pero no encontraron una explicación a este resultado.

El estrés que sufren las plantas durante el cultivo *in vitro* es posible controlarlo potencialmente mediante la manipulación de los parámetros de cultivo (Cassells y Curry, 2001). De esta afirmación se deriva el especial interés en el estudio de la densidad de inóculo en el desarrollo de métodos para la producción de biomasa. Además, el manejo de la densidad de explantes, permite, según Jiménez (2005), definir el aprovechamiento del volumen del frasco de cultivo, así como la capacidad productiva en las cámaras de crecimiento.

A partir de los resultados obtenidos, se definió como densidad de inóculo 12 explantes para

la multiplicación de brotes de *D. purpurea* que servirá de base para futuras investigaciones.

### Efecto de la renovación de la atmósfera

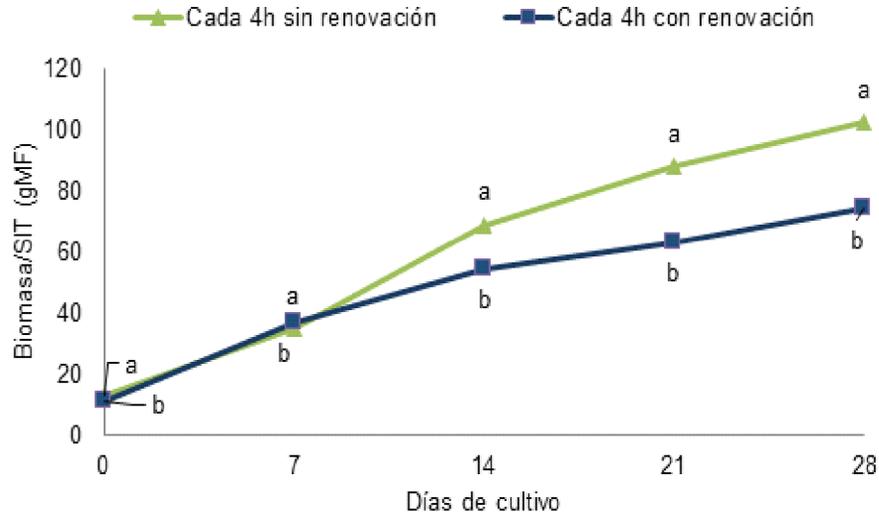
La renovación adicional de la atmósfera, la cual consistió en 12 aireaciones diarias, provocó una reducción significativa en las variables evaluadas (Tabla 2). Durante los primeros siete días (Figura 3) se observó un incremento similar de biomasa en ambos tratamientos y a los 14 días un menor crecimiento en el tratamiento con renovación adicional. En ambos tratamientos la presencia de brotes hiperhídricos fue baja y los valores no difirieron significativamente (2.0 y 3.25 brotes por SIT con y sin renovación adicional respectivamente) por lo que no representó una variable importante.

La ventilación forzada es una estrategia que puede tenerse en cuenta para incrementar la producción de biomasa y la obtención de metabolitos secundarios, pues influye en la asimilación de nutrientes, eliminación de gases como son el etileno y el CO<sub>2</sub>, los cuales pueden llegar a ser tóxicos y la renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo (Mohamed y Ibrahim, 2012). Estos aspectos aplicados a los resultados obtenidos pudieran parecer contradictorios; sin embargo, una mayor ventilación debido a la renovación adicional de la atmósfera interna mediante 12 aireaciones diarias pudo ser excesiva e inhibir el desarrollo de la biomasa en los SIT.

Tabla 2. Efecto de la renovación adicional de la atmósfera en la producción de biomasa a partir de brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados durante 28 días en sistemas de inmersión temporal (SIT).

Indicadores evaluados	Frecuencia de inmersión (4 h)			
	Sin renovación		Con renovación	
	Media	RM	Media	RM
*Altura (cm)	12.38	51.39a	10.42	29.61b
*N. de brotes/explante	5.98	51.03a	4.65	29.98b
**Masa seca/SIT (g)	5.09	6.38a	4.68	2.63b
**CA (%)	95.00	6.50a	93.70	2.50b

Leyenda: PN Producción neta por SIT, RM Rangos medios. Rangos medios con letras no comunes en una misma fila difieren estadísticamente según pruebas de Mann-Whitney para  $p < 0.05$  (\* $n=40$ , \*\* $n=4$ ). La renovación adicional de la atmósfera consistió en 12 aireaciones diarias



Puntos con letras no comunes en igual día de cultivo difieren significativamente según prueba de Mann-Whitney para  $p < 0.05$  ( $n=4$ )

Figura 3. Efecto de la renovación adicional de la atmósfera en la dinámica de producción de biomasa a partir de brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados durante 28 días en sistemas de inmersión temporal. La renovación de la atmósfera consistió en 12 aireaciones diarias.

En ambos tratamientos debido al principio de funcionamiento de los SIT ya existe una renovación de la atmósfera que reduce la humedad relativa dentro del frasco (Berthouly y Etienne, 2005) y las concentraciones de CO<sub>2</sub> recobran los valores de concentración ambiental en el momento de la inmersión (Roels *et al.*, 2006). Estas condiciones ambientales pudieron ser suficientes para el desarrollo de la biomasa de *D. purpurea* como se corrobora en el tratamiento con inmersiones cada 4h (control). Sin embargo, una renovación adicional elevada de 12 aireaciones diarias pudo favorecer la transpiración excesiva y de esta manera afectar la producción de la masa fresca y seca.

Mills *et al.* (2004) en la multiplicación de brotes de *Simmondsia chinensis* (Link) C. K. Schneid describen resultados similares por una elevada ventilación. Además, coinciden con resultados obtenidos por Mohamed y Ibrahim (2012) en el cultivo de *Ruta graveolens* donde una elevada ventilación afectó negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas.

De igual manera, coinciden con los informados por Ziv (2000) quienes refirieron que una elevada aireación redujo el desarrollo de la biomasa de *Dianthus caryophyllus* L. En este

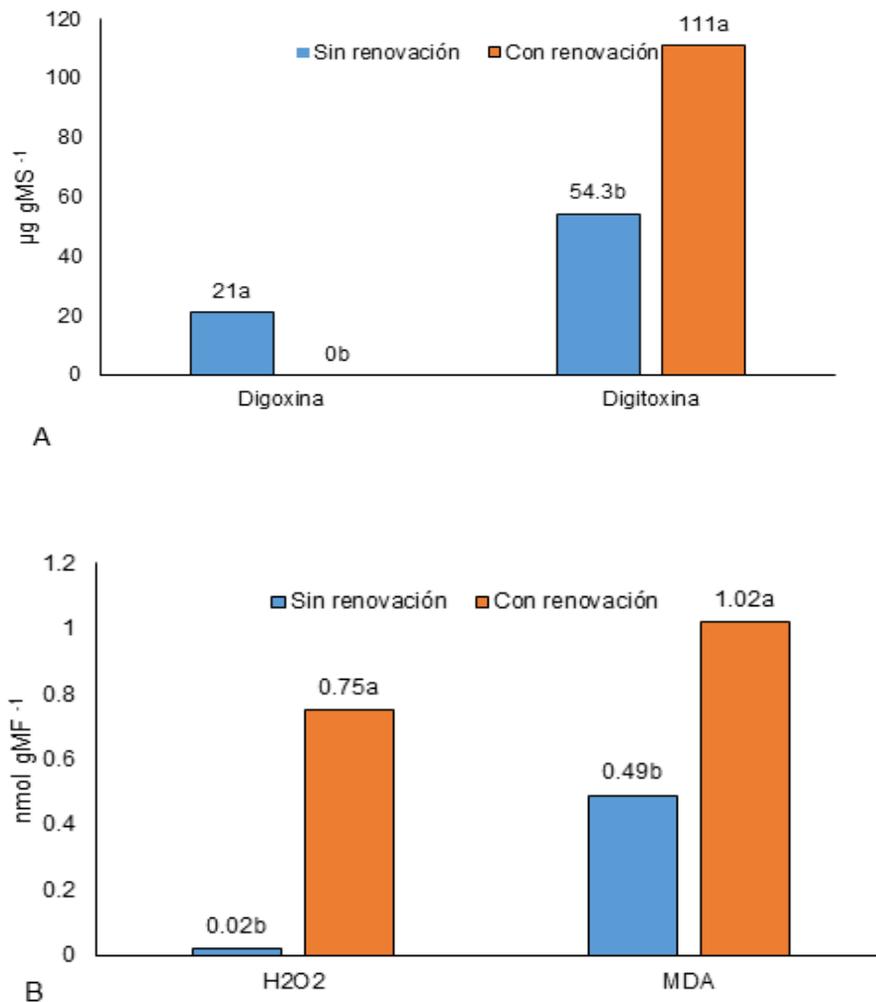
mismo cultivo pero en condiciones estáticas Fal *et al.* (2002) describieron que un incremento en la ventilación provocó un aumento en la desecación, la cual de acuerdo con estos autores pudiera ser la causa principal de la disminución de la biomasa de *D. purpurea*. Otra hipótesis señalada por Sallanon y Maziere (1992) que justificaría esta reducción del crecimiento, pudiera ser que la evaporación del medio de cultivo conduce a una concentración de las sales e induce estrés en las plántulas y como consecuencia el crecimiento es menos vigoroso.

Los cultivos con ventilación forzada favorecen el normal desarrollo morfológico y fisiológico de las plantas (Park *et al.*, 2004). A diferencia de estos sistemas de cultivo estáticos descritos donde la ventilación ha sido favorable, en los SIT, existe un intercambio gaseoso y una ventilación de la atmósfera interna como ya se ha explicado con anterioridad. Por tanto, los resultados demostraron que la renovación adicional, al menos con 12 aireaciones diarias que fue la estudiada, no mejoró las condiciones de cultivo creadas en los SIT para la producción de biomasa.

La renovación adicional también influyó en el contenido de cardenólidos. La digoxina no se

detectó en el tratamiento con renovación adicional, mientras que el contenido de digitoxina se incrementó hasta  $111.0 \mu\text{g gMS}^{-1}$  (Figura 4A). Los cardenólidos están constituidos por una genina o aglicona y una secuencia de moléculas de azúcares generalmente raros (Kreis y Müller-Uri, 2013). En *Digitalis*, la diferencia entre sus geninas (serie A la más común, serie C mayor importancia) está en el grupo OH que tiene la digoxina en el carbono 12, mientras que la

digitoxina tiene un grupo hidrógeno. Es probable que los cambios en la atmósfera gaseosa debido a la ventilación forzada pudo afectar fenómenos como la hidroxilación, tal como sucede con elicitores abióticos y bióticos descritos por Pérez-Alonso *et al.* (2014). Según Yücesan (2011) se desconoce cuáles variaciones encontradas en las series A y C son determinadas genéticamente o cuáles pueden ser causadas por factores ambientales o externos.



Medias con letras no comunes dentro de cada figura para cada cardenólido o compuesto, difieren significativamente según prueba de Mann-Whitney para  $p < 0.05$  ( $n=4$ )

Figura 4. Efecto de la renovación adicional de la atmósfera sobre: (A) contenido de digoxina y digitoxina y (B): contenido de peróxido de hidrógeno y malondialdehído (MDA) en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal (SIT) con una frecuencia de inmersión cada 4 horas. La renovación de la atmósfera consistió en 12 aireaciones diarias.

Se observó un incremento en el contenido de ambos marcadores de estrés oxidativo en el tratamiento con renovación de la atmósfera, donde también se manifestó un aumento de la concentración de digitoxina (Figura 4B). La biosíntesis de metabolitos secundarios puede asociarse con la respuesta de defensa de las plantas cuando son sometidas a condiciones de estrés. Entre las respuestas bioquímicas tempranas de la planta, está la generación de las especies reactivas de oxígeno. En el tratamiento sin renovación adicional, el contenido de peróxido de hidrógeno fue muy bajo y se obtuvo un incremento de su contenido en los brotes desarrollados bajo el efecto de la renovación adicional de la atmósfera. En células vegetales, el estrés oxidativo se origina por una descompensación entre la tasa de formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad defensiva antioxidante. Por otra parte, en el proceso metabólico de las EROs, el MDA es un marcador apropiado de la peroxidación lipídica (Wu *et al.*, 2009). Su incremento en el tratamiento con renovación adicional de la atmósfera indica según Niknam *et al.* (2011) un daño oxidativo bajo condiciones de estrés.

Los resultados hasta aquí descritos indicaron que la renovación adicional de la atmósfera gaseosa en los SIT provocó cambios notables en el contenido de cardenólidos, específicamente en la digitoxina. Los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA fueron superiores, lo que corrobora que un incremento en la frecuencia de renovación de la atmósfera indujo un mayor estrés oxidativo en los brotes asociado a un aumento en la síntesis de digitoxina.

En la literatura científica se describen algunos estudios que relacionan la biosíntesis de metabolitos secundarios con el estrés oxidativo. Al respecto, Chong *et al.* (2004) refieren que los mayores niveles de antraquinonas en el cultivo de suspensiones celulares de *Morinda elliptica* L. podrían estar asociados con un incremento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La biosíntesis de metabolitos secundarios está regida por procesos de gran complejidad, la interacción de las rutas en la red metabólica, los mecanismos de transporte, compartimentación y almacenamiento, las enzimas complejas así como la inhibición de reacciones y la regulación de los procesos. Desafortunadamente, los

mecanismos de producción de cardenólidos en plantas del género *Digitalis* no han sido elucidados completamente y es necesario profundizar en su estudio. Es posible especular sobre el efecto de las condiciones ambientales en aspectos básicos aun cuando no existen evidencias que confirmen los posibles mecanismos en los que influyen directamente. Estas pueden estar relacionadas con afectaciones en el metabolismo primario que modulan la expresión de moléculas del metabolismo primario involucrado en el transporte a vacuolas donde se almacenan dichos metabolitos, limiten o favorezcan precursores de la ruta del ácido mevalónico descrita como ruta de biosíntesis de cardenólidos (Kreis y Müller-Uri, 2013).

Los resultados apuntan a que posiblemente el estrés asociado a la renovación adicional de la atmósfera alteró la localización o la solubilidad de las enzimas y provocara una activación en las enzimas específicas que regulan la síntesis de la digitoxina en detrimento de aquellas que rigen la síntesis de la digoxina, la cual no fue detectada en las muestras analizadas. Esto por supuesto es un tema que debe ser objeto de futuras investigaciones, las que contribuirán a un mayor conocimiento de las rutas biosintéticas.

## REFERENCIAS

- Bandyopadhyay T, Gangopadhyay G, Poddar R, Mukherjee K (2004) Trichomes their diversity, distribution and density in acclimatization of Teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 78:113-121
- Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, pp. 165-195. Springer. Dordrecht
- Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell Tiss Organ Cult 64:145-157
- Chong TM, Abdullah MA, Fadzillah NM, Lai OM, Lajis NH (2004) Anthraquinones production, hydrogen peroxide level and antioxidant vitamins in *Morinda elliptica* cell suspension cultures from intermediary and production medium strategies. Plant Cell Rep 22:951-958

- Elbaz HA, Stueckle TA, Wang HL, O'Doherty GA, Lowry DT, Sargent LM, Wang L, Dinu CZ, Rojanasakul Y (2012) Digitoxin and a synthetic monosaccharide analog inhibit cell viability in lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 258:51–60
- Fal MA, Majada JP, Sánchez Tamés R (2002) Physical environment in non-ventilated culture vessels affects *in vitro* growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38:589-594
- Gárate A, Bonilla I (2008) Nutrición mineral y producción vegetal. En: Azcón-Bieto J, Talón M Fundamentos de fisiología vegetal, pp. 143-164. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid
- Hahn EJ, Paek KY (2005) Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, pp. 143-153. Springer. Dordrecht
- Ivanova M, Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:13-21
- Jiménez E (2005) Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, pp. 197-211. Springer. Dordrecht.
- Jiménez E, Pérez-Alonso N, de Fera M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E, Pérez JC (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 59:19-23
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77:181-191
- Kreis W, Müller-Uri F (2013) Cardenolide aglycone formation in *Digitalis*. En: Bach TJ y Rohmer M (Eds) Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: new concepts and experimental approaches, pp. 425-438. Springer Science+Business Media. New York.
- Mills D, Yanqing Z, Benzioni A (2004) Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:396-402
- Mohamed MAH, Ibrahim T (2012) Enhanced *in vitro* production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 111:335-343
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Niknam V, Meratan AA, Ghaffari SM (2011) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidative enzymes in callus of two *Acanthophyllum* species. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 47:297-308
- Park SW, Jeon JH, Kim SH, Park YM, Aswath C, Joung H (2004) Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Sci Hort* 99:199-205
- Pérez-Alonso N, Capote A, Gerth A, Jiménez E (2012) Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 110:153–162
- Pérez-Alonso, N, Wilken D, Gerth A, Jahn A, Nitzsche HM, Kerns G, Capote-Pérez A, Jiménez EA (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, Arana Labrada F, Capote A, Pérez A, Sosa R, Mollineda A, Jiménez E (2014) Estimulación de la producción de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante la adición de elicitores. *Revista colombiana de Biotecnología XVI* (1): 51-61
- Piqueras A, Debergh P (1999) Morphogenesis in micropropagation. En: Soh WY, Bhojwani SS (Eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures, pp. 443-462 Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, pp. 1-8. Springer. Dordrecht.
- Quiala E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, de Fera M, Barbón R (2012) Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:223-234
- Roca-Pérez L, Boluda R, Gavidia I, Pérez-Bermúdez P (2004) Seasonal cardenolide production and Dop5br gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry* 65:1869-1878
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R, Debergh P (2006) The effect of headspace renewal in a temporary immersion

- bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 84: 155–163
- Sales E, Frieder M, Nebauer SG, Segura J, Kreis W, Arrillaga I (2011) *Digitalis*. En: C Kole (Ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops*, pp. 73-111. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin
- Sallanon H, Maziere Y (1992) Influence of growth room and vessel humidity on the *in vitro* development of rose plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 30:121-125
- Savio LEB, Astarita LV, Santarém ER (2012) Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108(3): 465-472
- Schumann A, Berkov S, Claus D, Gerth A, Bastida J, Codina C (2012) Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Appl Biochem Biotechnol* 167: 1907–1920
- Sergiev I, Alexieva V, Karanov E (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *CR Acad Bulg Sci* 51:121-124
- Sivakumar G, Kim SJ, Hahn EJ, Paek KY (2005) Optimizing environmental factors for large-scale multiplication of Chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in balloon-type bioreactor culture. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:822-825
- Sivanesan I, Song JY, Hwang SJ, Jeong BR (2011) Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai—a rare endemic ornamental plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:55-63
- Wang J, Gao WY, Zhang J, Zuo BM, Zhang LM, Huang LQ (2012) Production of ginsenoside and polysaccharide by two-stage cultivation of *Panax quinquefolium* L. cells. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 48:107-112
- Wichtl M, Mangkudidjojo M, Wichtl-Bleier W (1982) Hochleistungs-Üssigkeits-chromatographische analyse von digitalis-blatttext-rakten. *J Chromatogr* 234:503-508
- Wu Z, Chen LJ, Long YJ (2009) Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45:483-490
- Yücesan B (2011) *In vitro* propagation and cardiac glycoside production in endemic *Digitalis* L. species de Anatolia. Thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the Abant İzzet Baysal University, Turkey.
- Ziv M (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. *Hortic Rev* 24:1-30

Recibido: 14-10-14

Aceptado: 18-12-2014