

## Germinación *in vitro* y callogénesis de una especie del género *Digitalis*

### *In vitro* germination and callogenesis of a species of the genus *Digitalis*

MORALES-RUBIO, María Eufemia\*†, ACEVES-AGÜERO, Diana Massiel y GARZA-PADRÓN, Ruth Amelia

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Ave. Universidad s/n, San Nicolás de los Garza N.L. 66455

ID 1<sup>er</sup> Autor: *María Eufemia, Morales-Rubio* / ORC ID: 0000-0002-1199-531X, Researcher ID Thomson: S-5583-2018, CVU CONACYT ID: 41090

ID 1<sup>er</sup> Coautor: *Diana Massiel, Aceves-Agüero* / ORC ID: 0000-0003-3932-5067, Researcher ID Thomson: S-5511-2018, CVU CONACYT ID: 490532

ID 2<sup>do</sup> Coautor: *Ruth Amelia, Garza-Padrón* / ORC ID: 0000-0002-0930-5228, Researcher ID Thomson: S-5556-2018, CVU CONACYT ID: 167079

Recibido Abril 20, 2018; Aceptado Junio 30, 2018

#### Resumen

El objetivo fue el establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Digitalis purpurea* para la inducción de callo a partir de hoja mediante la adición de Ácido Naftalenacético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) a diferentes concentraciones. Para la obtención de las hojas, se sembraron semillas en MS (1962) sin reguladores del crecimiento, mientras que para la inducción de callo fue en medio Murashige y Skoog (MS, 1962) adicionado con auxinas y citocininas obteniendo 5 tratamientos. Se evaluó el peso fresco inicial y final del callo y su respuesta morfogénica durante 4 semanas. El inicio de la germinación se obtuvo el día 8, mientras que el día 9, presentó el pico máximo. El promedio de peso fresco inicial para los explantes fue de 10.82 a 13.08 mg mientras que el promedio de peso final más relevante fue para el T3 (ANA 1mg/L y BAP 2mg/L) con 300.28 mg.

**Germinación, *in vitro*, callogénesis, *Digitalis***

#### Abstract

The objective was the establishment of a protocol for *in vitro* culture of *D. purpurea* for induction of callus from leaf by adding Naphthalene Acetic Acid (NAA) and Benzyl Amino Purine (BAP) at different concentrations. To obtain leaves, seeds were sown in MS (1962) without growth regulators. Subsequently a protocol callus induction on Murashige and Skoog (MS, 1962) supplemented with auxins and cytokinins were designed five treatments. The initial and final fresh weight of callus and morphogenetic response was evaluated for 4 weeks. The beginning of germination was obtained on day 8, while on 9 presented the peak of germination that was 12 seeds. As for the average initial fresh weight of the explants was 10.82 to 13.08 mg while the average final weight was more relevant for T3 (NAA 1 mg/L and BAP 2mg/L) with 300.28 mg.

**Germination, *in vitro*, callogenesis, *Digitalis***

**Citación:** MORALES-RUBIO, María Eufemia, ACEVES-AGÜERO, Diana Massiel y GARZA-PADRÓN, Ruth Amelia. Germinación *in vitro* y callogénesis de una especie del género *Digitalis*. Revista de Sistemas Experimentales. 2018, 5-15: 9-16.

\*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: maria.moralesrb@uanl.edu.mx)

†Investigador contribuyendo como primer Autor.

## Introducción

El género *Digitalis* comprende un grupo de especies de plantas medicinales de gran interés económico debido a su alto contenido de cardenólidos, metabolitos secundarios de gran utilidad en la industria farmacéutica. Estos compuestos son empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva permitiendo el aumento de la fuerza de las contracciones sistólicas y favoreciendo la regulación del ritmo cardíaco (Luderitz, 2005). Además recientes hallazgos han relacionado el uso de glucósidos cardíacos como agentes eficaces en el tratamiento de cáncer humano (Newman *et al.*, 2008). Sólo dos especies de este género son de interés económico para la industria farmacéutica: *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea*, siendo esta última la más importante debido a su alta toxicidad como consecuencia de un elevado contenido de cardenólidos (Kole, 2011).

En América Latina se estima que unos 40 millones de personas mueren cada año por las llamadas enfermedades no transmisibles, tales como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (El Nuevo Diario, 2018), lo que permite destacar la necesidad de un aumento en la producción y estudios biotecnológicos de plantas medicinales relacionadas con estos padecimientos (Calixto, 2000).

La implementación de diversas técnicas de cultivo de tejidos vegetales se ha realizado con el objetivo de potenciar la conservación y propagación de muchas plantas medicinales, realizando estudios para el mejoramiento y la obtención de ejemplares con características deseadas a partir de modificaciones de distintos factores como la composición de nutrientes del medio de cultivo, luz, temperatura entre otros (Collin, 2001; Bosila *et al.*, 2003).

La propagación del género *Digitalis* puede verse beneficiada al establecer protocolos de cultivo de tejidos eficientes con los cuales puede cumplirse con el propósito de producir un tejido vegetal determinado bajo condiciones controladas para su posterior aplicación a nivel comercial. En el presente estudio se planteó establecer las concentraciones adecuadas de dos reguladores de crecimiento en las cuales se logre obtener la inducción y aumento de biomasa de callo a partir de explantes *in vitro* de *D. purpurea* bajo condiciones de crecimiento preestablecidas.

## Importancia del género *Digitalis*

Se ha identificado una amplia variedad de metabolitos secundarios en los miembros pertenecientes al género *Digitalis*, siendo los glucósidos cardioactivos de tipo cardenólido los más importantes (Kole, 2011). Todos los glucósidos cardioactivos son inhibidores de la enzima ATPasa de intercambio de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (E.C. 3.6.3.9), presente en las membranas celulares, que es responsable para el bombeo de sodio fuera de la célula y el bombeo de potasio dentro de ella. En general se cree que la inhibición de esta enzima es principalmente responsable del fortalecimiento de la contracción del corazón. La acción terapéutica de los glucósidos depende en gran parte de su estructura y el tipo de azúcar presente en el compuesto así como de su estereoquímica la cual forma parte clave para determinar su actividad biológica (Blakemore y Jennett, 2001).

La principal sustancia activa de *Digitalis purpurea* es la digitoxina, glucósido digitálico de acción sistémica cuyos principales efectos sobre el corazón son un aumento de la fuerza contráctil, sobre todo en el corazón insuficiente, y una disminución de la frecuencia. La desaceleración es particularmente marcada en personas con fibrilación auricular, y el latido del corazón también se hace más regular (Blakemore y Jennett, 2001).

## Generalidades del género *Digitalis*

“La Dedalera” como se le conoce comúnmente a esta planta, pertenece a la familia Plantaginaceae. El significado de *Digitalis* en latín, es “dedo de guante” debido a la forma que presentan las flores.

Todas las especies pertenecientes al género *Digitalis* son hierbas bienales o perennes, que raramente suelen presentarse como pequeños arbustos y poseen hojas simples, alternas, que a menudo se agrupan en rosetas basales. Las flores presentan forma de campana, son zigomorfas y dispuestas en la parte terminal en racimos bracteados que varían en color de acuerdo a las especies, van del púrpura al rosa, blanco y amarillo.

El cáliz tiene cinco lóbulos y es más corto que el tubo de la corola, la cual es de cilíndrico-tubular a globoso, a menudo más estrecha en la parte basal y semejante a dos labios en la parte terminal, de los cuales el labio superior es generalmente más corto que el inferior que se encuentra manchado o vetado en la parte interna (Bräuchler *et al.*, 2004).

El género *Digitalis* se distribuye principalmente a lo largo de dos grandes áreas geográficas: la Península Ibérica, África noroccidental; Macaronesia y la Península de los Balcanes, Asia Menor. Las zonas ubicadas entre estas dos áreas geográficas no cuentan con un gran número de especies ya que la distribución de algunas especies *Digitalis* se encuentra limitada a pequeñas áreas (Kole, 2011).

### Cultivo de tejidos vegetales

El conjunto de técnicas utilizadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro* bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos es lo que se conoce como cultivo de células vegetales. Está basado en el principio de la totipotencialidad de las células vegetales que establece, que una copia íntegra del material genético se encuentra en cualquier célula vegetal de la planta a la que pertenece, sin importar donde se encuentra o la función que posee, teniendo así el potencial para generar un nuevo ejemplar en su totalidad (Ferl y Paul, 2000).

El primer trabajo de cultivo *in vitro* de células vegetativas completamente diferenciadas fue reportado en el año de 1902 por Gottlieb Haberlandt, quien propuso que era posible cultivar células vegetativas libres y túbulos de polen, al adicionar soluciones nutritivas, esto lo lleva convertirse en el padre de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales (Calva y Pérez, 2005; Aceves, 2005).

Los primeros medios de cultivo utilizados contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, extracto de levadura o hidrolizado de caseína. Actualmente, los medios se constituyen de 5 grupos de ingredientes básicos que son los nutrientes inorgánicos, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, vitaminas y reguladores de crecimiento, estos últimos estimulan la formación de nuevas estructuras según los balances y las concentraciones adicionadas al medio (Murashige y Skoog 1962; Calva y Pérez 2005).

### Cultivo *in vitro* de *Digitalis*

Staba (1962) fue el primero en reportar un trabajo de cultivo *in vitro* utilizando *D. lanata* y *D. purpurea*, marcando así el inicio de cultivos celulares vegetales a partir de especies pertenecientes al género *Digitalis*.

Estudios preliminares permitieron establecer que la inducción de callo para diferentes especies de *Digitalis* era resultado de un claro sinergismo entre auxinas y citocininas, además de presentarse un efecto en el crecimiento de callo a partir de hojas, sin embargo, no se obtuvieron valores significativos para dicho crecimiento (Pérez-Bermúdez *et al.*, 1984).

En 1991, Cacho realizó un cultivo *in vitro* con diferentes explantes de *Digitalis thapsi* (hojas, hipocotilo y raíz) donde comprobó que la adición de ácido Naftalenacético en combinación con Benciladenina incrementaba la formación de callo utilizando como explante, las hojas. Además de demostrar que la capacidad morfogénica de las hojas es mayor utilizando una auxina sintética (ácido Naftalenacético) en lugar de una natural (ácido Indolacético).

Bosila *et al.*, (2003) evaluaron los diferentes factores que afectan la producción de callo para *Digitalis lanata*, obteniendo que un fotoperiodo de 16 h de luz así como explantes de hojas de 2-20 semanas de edad dan como resultado una producción de callo óptima, condiciones comprobadas más tarde por otros investigadores quienes además utilizaron distintas concentraciones de reguladores de crecimiento para promover la misma respuesta (Fátima *et al.*, 2009).

Por su parte Yücesan *et al.*, (2014) estableció un protocolo para la producción de callo de *Digitalis lamarckii ivanina* en un medio adicionado con diferentes concentraciones de Benciladenina y ácido Naftalenacético para posteriormente regenerar plantas completas y estimar su contenido de cardenólidos, contribuyendo de esta manera al establecimiento de sistemas de producción a escala de plantas medicinales para su producción y cultivo a nivel comercial evitando el uso de recursos naturales limitados por medio de técnicas de cultivo de tejidos.

## Hipótesis

La combinación y concentración de ANA (ácido Naftalenacético) y BAP (Bencilaminopurina) permitirán la inducción y proliferación de callo en *Digitalis purpurea*.

## Objetivo General

Evaluar la inducción y producción de callo en *Digitalis purpurea* utilizando dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones.

## Metodología a desarrollar

### Material vegetal

Para la germinación se emplearon semillas de *Digitalis purpurea* que fueron adquiridas en un centro comercial en McAllen, Texas, de la marca NK Lawn Garden, en el año 2015 (Fig. 1).



**Figura 1** Empaque comercial Marca NK Lawn & Garden

La callogénesis fue inducida en hojas jóvenes de plántulas de 10 meses de edad de *Digitalis purpurea*, que fueron germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS (1962), en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad.

### Medios de cultivo

Para germinación se empleó medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sin reguladores, el cual fue ajustado a pH 5.7 y se llevó a autoclave para su esterilización a 121° C durante 15 minutos; mientras que para callogénesis se elaboraron los medios de cultivo basal MS (1962) como control y adicionado con reguladores del crecimiento, tal como se muestra en la Tabla 1, mismos que se ajustaron a un pH 5.7 y se esterilizaron de igual forma que el de germinación.

Tratamiento	Regulador del crecimiento	
	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)
1	0	0
2	0.5	1.5
3	1	2
4	1.5	2.5
5	2	3

**Tabla 1** Tratamientos para inducción de callogénesis en *Digitalis purpurea*

### Establecimiento *in vitro*

#### Germinación *in vitro*

Las semillas de *D. purpurea* de uso comercial, fueron lavadas con agua corriente y detergente. Una vez realizado el lavado se llevó a cabo una inmersión rápida en etanol absoluto durante 1 minuto dentro de la campana de flujo laminar y posteriormente se sumergieron en una solución de cloro al 20% y Tween 20 en constante agitación, transcurridos 20 minutos se realizó un enjuague en agua bidestilada. La siembra se realizó en frascos con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento; dando un total de 29 frascos con 5 semillas cada uno y fueron trasladados al cuarto de cultivo. A los 4 meses se realizó un subcultivo de las plántulas en un medio MS sin reguladores con las mismas especificaciones y condiciones de incubación.

### Callogénesis

Dentro de la Campana de Flujo Laminar se llevó a cabo la selección de las hojas para posteriormente realizar los cortes de 1cm<sup>2</sup>, seguido de la toma de peso inicial de cada explante; posteriormente, fueron sembrados a en cada uno de los recipientes de cada tratamiento.

Se sembró un explante por frasco, 10 repeticiones por tratamiento. El monitoreo se realizó semanalmente durante un mes y se tomó el peso final de cada explante.

### Condiciones de incubación

Los frascos del establecimiento *in vitro* y para la inducción de callo fueron colocados bajo condiciones de luz (blanca, periodo 16 h luz) y temperatura (22+/- 1° C) controlada.

## Análisis estadístico

Transcurrido el período de incubación (1 mes) bajo condiciones de asepsia, se evaluó el peso final de cada uno de los explantes para determinar la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Science, 2011), a través de la prueba U de Mann-Whitney, alternativa no paramétrica de la prueba t-student para muestras independientes, utilizada cuando la variable dependiente posee un número de sujetos muy reducido y no cumple con el supuesto de normalidad.

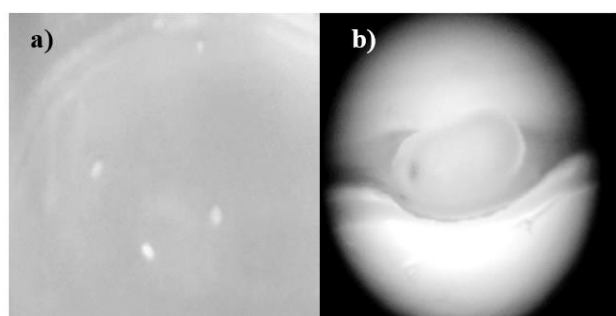
## Resultados

### Obtención de semillas

Las semillas se observaron bajo un microscopio estereoscópico, su color era en tonos café claro a oscuro, con un tamaño promedio menor a 1 mm.

### Desinfección y establecimiento *in vitro*

El procedimiento de desinfección y el establecimiento del cultivo *in vitro* fue exitoso al no presentarse contaminación durante el monitoreo correspondiente a los primeros días posteriores a la siembra (Fig. 2).

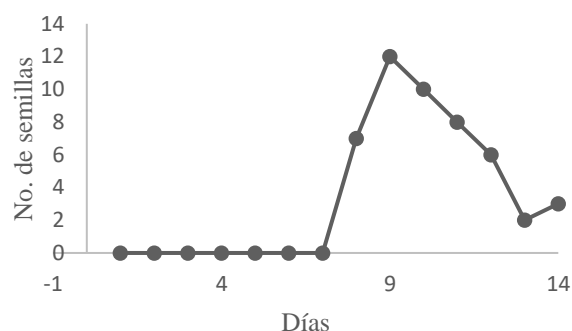


**Figura 2** Cultivo *in vitro* de *D. purpurea*. a) Semillas sembradas en el medio de cultivo, y b) decoloración de las semillas una vez realizada la desinfección.

### Germinación *in vitro*

Se obtuvo la germinación de 48 semillas (33% de germinación con respecto al total de semillas sembradas) en un periodo de 2 semanas. Los primeros registros de germinación se obtuvieron en el día 8 después de la siembra (Gráfica 1), mientras que el día 9 alcanza el pico de germinación (máximo número de semillas germinadas).

Germinación diaria de *D. purpurea*



**Gráfica 1** Germinación diaria. Se observa el inicio de germinación el día 8, mientras que el pico de germinación es en el día 9

Las plántulas germinadas *in vitro* presentaron un desarrollo uniforme, con raíz principal y las hojas cotiledonarias, seguido de un aumento en el número de hojas con una coloración verde y el desarrollo de raíces secundarias. En los primeros 4 meses de edad no se observó indicio de contaminación u oxidación del material permitiendo mantener la calidad de las plántulas para su posterior subcultivo.

Una vez realizada la resiembra se monitoreó el continuo crecimiento de las plántulas durante 6 meses, en donde se logró observar con mayor detalle el tamaño y la morfología de sus hojas, presentándose en forma alargada que variaban en longitud pero conservaban su aspecto festoneado y dentado con una superficie rugosa (Fig. 3).



**Figura 3** Incremento en el número de hojas con disposición de roseta característica de la especie

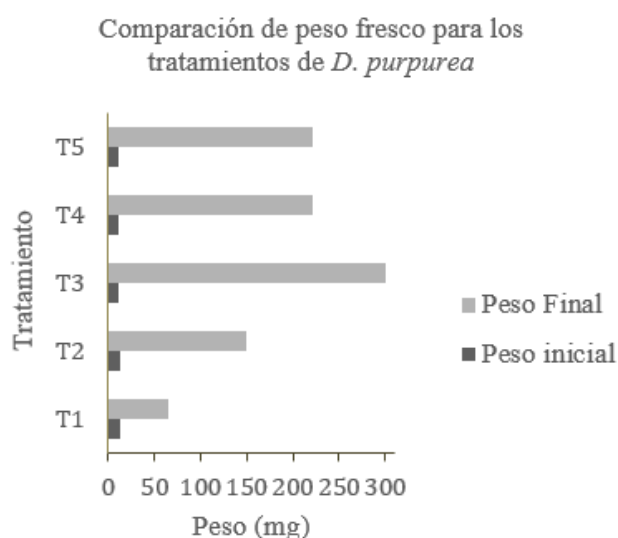
Además, la aparición de raíces adventicias se hizo visible para aquellas plántulas en las que se observó un menor tamaño de hojas con respecto a las restantes, así como la oxidación de raíces en algunos casos.

### Selección de hoja cultivada *in vitro*

Para la obtención del explante, se optó por hojas jóvenes que aproximadamente tuvieran una longitud de 2 a 3 cm de largo por 1 cm de ancho, ya que se realizaron secciones de 1 cm<sup>2</sup> mediante el uso de un cortador metálico que previo a la siembra fue esterilizado.

### Inducción de callo

Para la inducción de la formación de tejido desdiferenciado, se obtuvo el promedio del peso fresco inicial de los explantes sometidos a los diferentes tratamientos, que fue de 10.82 a 13.08 mg variación ocasionada a causa de tomar en cuenta únicamente la longitud de la hoja y no su grosor. Una vez concluido el periodo de incubación de cuatro semanas, se obtuvieron valores de peso fresco final que fueron desde 64.07 a 300.28 mg como se muestra en la Gráfica 2, haciendo evidente el efecto de los diferentes tratamientos de ANA y BAP.



**Gráfica 2** Comparación del promedio de peso fresco inicial y final para cada tratamiento, transcurridas las 4 semanas de monitoreo

El promedio de peso final más relevante fue para el T3 (ANA 1 mg/L y BAP 2 mg/L) con 300.28 mg, mientras que el T1 (Sin reguladores del crecimiento) obtuvo 64.07 mg, resultado esperado al ser considerado como control y no poseer reguladores de crecimiento que causaran un efecto directo en la inducción a callo. El T2 (ANA 0.5 mg/L y BAP 1.5 mg/L) obtuvo un promedio de 150 mg; mientras que T4 (ANA 1.5 mg/L y BAP 2.5 mg/L) y T5 (ANA 2 mg/L y BAP 3 mg/L) presentaron valores muy similares por debajo de los 250 mg.

Los explantes fueron comparados en base a su respuesta morfogénica con el fin de registrar cambios en la exposición a las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas.

En la primer semana, se logró observar el enrulamiento de los explantes para los 5 tratamientos, sin embargo, a partir de la segunda semana fue visible la decoloración y oxidación del tejido correspondiente a los T1, T2 y T4 que siguió en aumento ocasionando un mayor deterioro del tejido.

Al concluir la cuarta semana, los T3, T4 y T5 fueron los que mantuvieron la presencia de callo, únicamente los T3 y T5 mostraron presencia de callo que conservaba su color verde y menor oxidación del tejido.

### Datos estadísticos

Al realizar el análisis de Normalidad mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov se obtuvo un valor  $P < 0.05$  para el tratamiento 4 (Tabla 2), por lo que se puede concluir que dichos datos no provienen de una distribución normal ya que, según la prueba, valores  $P < 0.05$  no cumplen con el supuesto de normalidad.

Prueba de normalidad			
Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
Peso F	1	.164	10 .200 <sup>a</sup>
	2	.224	10 .168
	3	.200	10 .200*
	4	.274	10 .032
	5	.213	10 .200*

\*Este es un límite inferior de la significación verdadera.

<sup>a</sup> Corrección de la significación de Lilliefors

**Tabla 2** Prueba de normalidad realizada en SPSS versión 20 para los 5 tratamientos de acuerdo con su efecto en el peso final. Se consideran normales valores de  $p > 0.05$

Debido a que no se cumplió con el supuesto de normalidad se procedió a realizar la prueba Kruskal-Wallis para la cual se obtuvo un valor  $p < 0.05$  como se ilustra en la Tabla 3, lo que nos permite comprobar que los datos provienen de una misma población y además se asume que al menos 1 de los tratamientos es diferente de los demás.

Prueba de Kruskal-Wallis			
Tratamiento	N	Media	
Peso F	1	10	8.60
	2	10	24.50
	3	10	35.60
	4	10	29.70
	5	10	29.10
Total		50	

$p \leq 0.05$ , gl: 4, Sig. 0.001

**Tabla 3** Prueba de Kruskal-Wallis realizada en SPSS versión 20 para los 5 tratamientos de acuerdo a su efecto en el peso final

Finalmente, de acuerdo al análisis realizado mediante la prueba U de Mann-Whitney, se demostró que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos T2, T3, T4 y T5 con respecto al control (T1) así como diferencia significativa entre los tratamientos T2 y T3 como se ilustra en la Tabla 4.

Tratamientos	Significancia (U)
1 – 2	0.000
1 – 3	0.000
1 – 4	0.000
1 – 5	0.003
2 – 3	0.022
2 – 4	0.241
2 – 5	0.140
3 – 4	0.157
3 – 5	0.176
4 – 5	0.485

$p \leq 0.05$ .

**Tabla 4** Significancia obtenida entre los 5 tratamientos mediante prueba U de Mann-Whitney en el programa estadístico SPSS versión 20

Además se determinó que no existe diferencia significativa entre el efecto de los tratamientos T3, T4 y T5; así como entre los tratamientos T2, T4 y T5, agrupándolos en 3 bloques según el efecto provocado en los explantes considerando al control como un bloque (Tabla 5). Por otro lado se puede destacar que el tratamiento 2 y 3 tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás siendo considerados como los de mayor efecto.

Tratamientos	1	2	3	4	5
1		-	-	-	-
2	-		-	x	x
3	-	-		x	x
4	-	x	x		x
5	-	x	x	x	

**Tabla 5** Comparación de la diferencia significativa entre los tratamientos. Se encuentran marcados con una equis (x) aquellos tratamientos en los que no existe una diferencia significativa y con un guión (-) los tratamientos en los cuales si existe dicha diferencia

## Agradecimientos

Se agradece al proyecto PAICYT 2015.

## Conclusiones

Se logró la germinación *in vitro* de *D. purpurea* en el medio seleccionado. De las plántulas obtuvo la inducción de callogénesis a partir de explantes de hojas con los reguladores adicionados.

Se recomienda realizar estudios donde se evalué la adición de antioxidantes a los diferentes tratamientos que favorecen la integridad del callo y así potenciar la producción de metabolitos de interés farmacéutico.

## Referencias

Aceves, J. L., & Hernández, J. (2005). Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. Instituto de Investigaciones y Estudios Superiores de las Ciencias Administrativas, Ciencia administrativa Vol. Nueva época, Universidad Veracruzana.

Blakemore, C. & Jennett, S. (2001). "Cardiac glycosides." The Oxford Companion to the Body. Recuperado de <http://www.encyclopedia.com/doc/1O128-cardiacglycosides.html>

Bosila, H. A., Mohamed, S., El-Gamal, S., & Bekhit, M. (2003). Factors affecting callus production and glycosidal content of leaf tissue culture of *Digitalis lanata* Ehrh. In International Conference on Medicinal and Aromatic Plants (Part II) 597 (pp. 289-301).

Bräuchler, C., Meimberg, H., & Heubl, G. (2004). Molecular phylogeny of the genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) based on ITS-and trnL-F sequences. Plant Systematics and Evolution, 248(1-4), 111-128.

Cacho, M., Morán, M., Herrera, M. T., & Fernández-Tárrago, J. (1991). Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. Plant cell, tissue and organ culture, 25(2), 117-123.

- Calixto, B. J. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 33 (2). 179-189.
- Calva G, Pérez J. 2005. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro. *Revista Digital Universitaria* (Internet). Recuperado de [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov\\_art104a.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf).
- Collin, H. A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 119-134.
- El Nuevo Diario (2018). Necesidades de los pacientes latinoamericanos centran cumbre farmacéutica. *El nuevo Diario*. Recuperado de: <https://www.elnuevodiario.com.ni/internacional/es/464503-necesidades-pacientes-cumbre-farmacautica/>
- Fatima, Z., Mujib, A., Fatima, S., Arshi, A., & Umar, S. (2009). Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. *Turkish Journal of Botany*, 33 (1) 393-405.
- Ferl, R., Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 312-357), USA: American Society of Plant Physiologists.
- Kole, C. (2011). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Cereals* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Luderitz, B. (2005). Cardiac glycosides: William Withering (1741- 1799). *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 14: 61-62.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-97.
- Newman R., Yang P. & Pawlus A. (2008). Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interventions* 8, 36-49.
- Perez-Bermudez, P., Brisa, M. C., Cornejo, M. J., & Segura, J. (1984). *In vitro* morphogenesis from excised leaf explants of *Digitalis obscura* L. *Plant cell reports*, 3(1), 8-9.
- Staba, E.J. (1962) Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. I. Nutritional requirements in tissue cultures of *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 51, 249-254.
- Yücesan, B., Müller-Uri, F., Kreis, W., & Gürel, E. (2014). Cardenolide estimation in callus-mediated regenerants of *Digitalis lamarckii* Ivanina (dwarf foxglove). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(1), 137-142.